

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN LAS DIFERENTES  
ETAPAS PERIODONTALES SEGÚN LA NUEVA CLASIFICACIÓN DE  
ENFERMEDADES PERIODONTALES.**

**BRENDA NICHOLL GOMEZ LOPEZ  
JAIRO ERNESTO GONZALEZ FORERO**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
PROGRAMA DE PERIODONCIA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
BOGOTA DC.- FEBRERO 2020**

## HOJA DE IDENTIFICACION

**Universidad** El Bosque

**Facultad** Odontología

**Programa** Periodoncia y medicina oral

**Título:** **Caracterización de la microbiota subgingival en las diferentes etapas periodontales según la nueva clasificación de enfermedades periodontales.**

**Grupo de investigación** Unidad de Investigación Básica Oral- UIBO

**Línea de investigación:** Medicina periodontal

**Institución participante:** Facultad de Odontología - Universidad El Bosque  
Universidad Complutense de Madrid

**Tipo de investigación:** Posgrado /Grupo

**Estudiantes:** BRENDA NICHOLL GOMEZ LOPEZ  
JAIRO ERNESTO GONZALEZ FORERO

**Asesor temático:** Dra. Luz Amparo Gómez

**Asesor metodológico:** Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

**Asesor estadístico** Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

**Otros asesores** Dra. Diana Marcela Castillo

## DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

<b>HERNANDO MATIZ CAMACHO</b>	Presidente del Claustro
<b>JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO</b>	Presidente Consejo Directivo
<b>MARIA CLARA RANGEL G.</b>	Rector(a)
<b>RITA CECILIA PLATA DE SILVA</b>	Vicerrector(a) Académico
<b>FRANCISCO FALLA</b>	Vicerrector Administrativo
<b>MIGUEL OTERO CADENA</b>	Vicerrectoría de Investigaciones.
<b>LUIS ARTURO RODRÍGUEZ</b>	Secretario General
<b>JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS</b>	División Postgrados
<b>MARIA ROSA BUENAHORA</b>	Decana Facultad de Odontología
<b>MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL</b>	Secretaria Académica
<b>DIANA ESCOBAR</b>	Directora Área Bioclínica
<b>MARIA CLARA GONZÁLEZ</b>	Director Área comunitaria
<b>FRANCISCO PEREIRA</b>	Coordinador Área Psicosocial
<b>INGRID ISABEL MORA DIAZ</b>	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
<b>IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES</b>	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
<b>MIGUEL FERNANDO VARGAS DEL CAMPO</b>	Director(a) Programa de Periodoncia y medicina oral
<b>MARIA ALEJANDRA SABOGAL</b>	Coordinador(a) Programa de Periodoncia y medicina oral

**“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.**

## GUÍA DE CONTENIDO

**Resumen**

**Abstract**

	<b>Pág.</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>3</b>
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>18</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>20</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>6. Aspectos metodológicos</b>	<b>22</b>
6.1 Tipo de estudio	22
6.2 Población y muestra	22
6.2.1 Población de estudio	22
6.2.2 Criterios de inclusión	22
6.2.3 Criterios de exclusión	22
6.2.4 Variables	23
6.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información	24
6.3.1 Valoración clínica	24
6.3.2 Parámetros radiográficos	24
6.3.3 Toma de muestra de placa subgingival	25
6.4 Método de identificación de microorganismos	25
6.5 Plan de Tabulación y análisis.	25
<b>7. Consideraciones éticas</b>	<b>27</b>
<b>8. Resultados</b>	<b>28</b>
<b>9. Discusión</b>	<b>32</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>35</b>
<b>11. Referencias bibliográficas</b>	<b>36</b>
<b>12. Anexos</b>	<b>39</b>
12.1 Formato de consentimiento informado	39
12.2 Formato de recolección de datos	45
12.3 Formato de registro de periodontograma maxilar superior	46
12.4 Formato de registro de periodontograma maxilar inferior	47

## RESUMEN

### CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN LAS DIFERENTES ETAPAS PERIODONTALES SEGÚN LA NUEVA CLASIFICACIÓN DE ENFERMEDADES PERIODONTALES.

**Antecedentes:** En 2017, las enfermedades periodontales se clasificaron nuevamente en etapas y grados; sin embargo, los diferentes microorganismos presentes en la placa subgingival de la población colombiana no se han caracterizado según estos nuevos criterios de clasificación.

**Objetivo:** identificar y caracterizar la microbiota subgingival a través del cultivo microbiológico en diferentes etapas y grados periodontales de acuerdo con la nueva clasificación de la enfermedad periodontal. **Métodos:** Se evaluaron 67 pacientes con diferentes estadios de enfermedad periodontal, divididos en 3 grupos, 0 (sano gingivitis n = 14), 1 (estadios I y II de periodontitis n = 22) y 2 (estadios III y IV de periodontitis n = 31) evaluado en la Clínica Universitaria El Bosque. Se recogieron datos clínicos y sociodemográficos. La identificación microbiológica se realizó por cultivo en muestras subgingivales. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Chi cuadrado para evaluar las diferencias de frecuencia entre los grupos y para la concentración se realizó una prueba de Kruskal Wallis / U Man Whitney. **Resultados:** Hubo una diferencia en la frecuencia y concentración de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. micra* y *F. nucleatum* entre la salud de la gingivitis y las etapas I-II o etapa III-IV de la periodontitis ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, *P. intermedia* no hubo diferencias entre las etapas de salud-gingivitis y periodontitis ( $p > 0.05$ ). Para ninguno de los microorganismos, se observaron diferencias en la frecuencia y concentración de microorganismos entre las diferentes etapas de la periodontitis ( $p > 0.05$ ). **Conclusiones:** Aunque la microbiota difiere entre gingivitis saludable y periodontitis, la etapa de periodontitis no influye en la composición de la microbiota subgingival.

**Palabras clave:** Enfermedades periodontales, diagnóstico, microbiología, microbiota, *P. gingivalis*

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF SUBGINGIVAL MICROBIOTA IN THE DIFFERENT PERIODONTAL STAGING ACCORDING TO THE NEW CLASSIFICATION OF PERIODONTAL DISEASE.

**Background:** In 2017, periodontal diseases was classified again in stages and grades; however, the different microorganisms present in subgingival plaque of the Colombian population have not been characterized according these new classification criteria. **Objective:** Identify and characterize the subgingival microbiota through microbiological culture in different periodontal stages and grades according to the new classification of periodontal disease. **Methods:** Sixty-seven patients with different staging of periodontal diseases were evaluated, divided into 3 groups, 0 (healthy-gingivitis n= 14), 1 (stage I and II of periodontitis n=22) and 2 (stage III and IV of periodontitis n=31) evaluated at El Bosque University Clinic. Clinical, microbial and sociodemographic data were collected. Microbiological identification was carried out by culture in grouped subgingival samples. The differences of the frequency between the groups were performed with chi squarer test and for the concentration a Kruskal Wallis /U Man Whitney test were realized. **Results:** There was a difference for frequency and concentration of *P. gingivalis*, *T. Forsythia*, *P. micra* and *F. nucleatum* between health-gingivitis and stages I-II or stage III-IV of the periodontitis ( $p < 0.05$ ). However *P. intermedia* there were no differences between health-gingivitis and the periodontitis stages ( $p > 0.05$ ). For none microorganism differences in frequency and concentration of microorganism were observed between the different stages of periodontitis ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions** Although the microbiota differs between healthy-gingivitis and periodontitis, the stage of periodontitis does not influence the composition of subgingival microbiota.

**Key Words:** Periodontal Diseases, Diagnosis, Microbiology, microbiota, *P. gingivalis*

## Introducción

En 1999 se creó un sistema de clasificación de la enfermedad periodontal según Armitage *et al.*, el cual dividió la enfermedad periodontal en gingivitis inducida o no por placa y periodontitis en crónica y agresiva entre otras, y junto a esto los posibles microorganismos asociados a estas dos patologías caracterizando cada nicho con los complejos de Socransky *et al.*, 1998, donde se conoce que para la periodontitis crónica se encuentran periodontopatógenos del complejo rojo como *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *A. actinomycetemcomitans*, el cual se asocia en mayor frecuencia con la periodontitis agresiva.

En 2018 se elabora un nuevo sistema de clasificación de las patologías y alteraciones periodontales y periimplantarias generando una nueva clasificación periodontal, la cual muestra cambios en la definición de salud periodontal, gingivitis, periodontitis, junto con diferentes criterios de clasificación, en estadios y grados de acuerdo a observaciones clínicas y radiográficas y un seguimiento por parte del periodoncista.

En condiciones de salud periodontal dentro de los surcos gingivales (<4 mm de profundidad), predominan el filo Firmicutes, dentro de los que se puede encontrar los géneros *Streptococcus*, *Granulicatella* y *Gemella*, adicionalmente se pueden encontrar bacterias del filo Proteobacterias. Se ha demostrado en estudios *in vitro* la gran abundancia de *Treponema denticola* junto con *Porphyromona gingivalis* y *Tannerella forsythia* en la capa superior del biofilm. [Mayorga-Fayad I. *et al.*, 2007].

Estos microorganismos presentes tanto en surcos afectados como sanos ayudaron a determinar el tratamiento y los pasos a seguir para tratar la enfermedad periodontal, sin embargo, para la nueva clasificación periodontal no se han caracterizado los microorganismos en los nuevos estadios y grados de la enfermedad, teniendo en cuenta la gran controversia que se ha generado, ya que ha sido de difícil entendimiento y aplicabilidad. El propósito de este estudio fue evaluar la frecuencia y concentración de los microorganismos presentes en la cavidad oral de acuerdo a la nueva clasificación periodontal.

Por lo anterior, se hace necesario identificar los microorganismos en el microambiente subgingival en pacientes sanos, con gingivitis o con periodontitis en los distintos grupos de edad evaluados en este estudio para luego confrontarlos con esta nueva clasificación la cual incorpora cambios en el diagnóstico clínico y requiere evidencias relacionadas con la etiología de la periodontitis ajustada a estos nuevos parámetros clasificatorios. Por lo que este estudio sería uno de los pioneros en el aporte de estas evidencias a la luz de los nuevos criterios de clasificación y tal vez así ayudar a mejorar el diagnóstico y tratamiento a futuro.

## 2. Marco Teórico

### 2.1. Definición de Enfermedad periodontal

La periodontitis se define como una enfermedad crónica inflamatoria multifactorial, asociada con una disbiosis de la biopelícula y caracterizada por una destrucción del tejido de soporte dental.

Se va a caracterizar por pérdida del tejido de soporte periodontal, que se manifiesta por la pérdida de inserción clínica, pérdida ósea radiográfica, presencia de bolsas periodontales, hemorragia gingival. [Papapanou, P. N., Sanz, M. *et al.*, 2018].

### 2.2 Clasificación de enfermedades periodontales y condiciones del international workshop (1999)

En 1999, se llevó a cabo el Taller Internacional para la clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y se acordó una nueva clasificación. Se realizaron distintas modificaciones y se adicionaron nuevas condiciones que no se tenían incluidas anteriormente como una sección sobre enfermedades gingivales; y se desarrollo mediante una clasificación detallada de lesiones gingivales que son inducidas por placa dental o no inducidas por placa dental.

Una característica importante de la sección sobre enfermedades gingivales inducidas por placa dental es el reconocimiento de que la expresión clínica de gingivitis puede ser principalmente modificada por factores sistémicos tales como alteraciones en el sistema endocrino, medicamentos y desnutrición. La sección sobre lesiones gingivales no inducidas por placa incluye una amplia gama de trastornos que afectan la encía. [Papapanou, P. N., Sanz, M. *et al.*, 2018].

Junto con esto en la sección de periodontitis se reemplazó el término periodontitis del adulto por periodontitis crónica, ya que esta forma de periodontitis ha sido caracterizada como una enfermedad lentamente progresiva.

El término periodontitis crónica fue criticado por algunos participantes, ya que crónico podría ser interpretado como no curable. Sin embargo se aceptó el término siempre que se entendiera que si respondía al tratamiento.

La periodontitis crónica se dividió en leve, moderada o severa dependiendo de la severidad de la misma. [Armitage *et al.*, 1999].

Otro importante ítem fue el reemplazo de la periodontitis de inicio temprano por periodontitis agresiva; anteriormente se usó el término "periodontitis de inicio temprano" (EOP) en las clasificaciones europeas 1989 AAP y 1993 como una designación colectiva para un grupo de enfermedades periodontales destructivas que afectaron a pacientes jóvenes, pero que surgieron problemas para su diagnóstico ya que no había un límite de edad, y no se sabía cual era la tasa de progresión.

Debido a estos problemas, los participantes del taller decidieron que era conveniente descartar las terminologías de clasificación que dependían de la edad o requerían conocimiento de tasas de progresión. En consecuencia, las formas altamente destructivas de periodontitis fueron renombradas usando el término "periodontitis agresiva". En la siguiente tabla se observa la nueva clasificación de enfermedades y afecciones periodontales.

*Tomado de Armitage GC. 1999*

**Guidelines for Determining Severity of Periodontitis**

	Slight (Mild)	Moderate	Severe (Advanced)
Probing depths	>3 & <5 mm	≥5 & <7 mm	≥7 mm
Bleeding on probing	Yes	Yes	Yes
Radiographic bone loss	Up to 15% of root length or ≥2 mm & ≤3 mm	16% to 30% or >3 mm & ≤5 mm	>30% or >5 mm
Clinical attachment loss <sup>1</sup>	1 to 2 mm	3 to 4 mm	≥5 mm



El Workshop del 2017, acordó que teniendo en cuenta los conocimientos actuales sobre fisiopatología, se pueden identificar tres formas de periodontitis: periodontitis necrotizante, periodontitis como una manifestación de enfermedad sistémica y las formas de la enfermedad previamente reconocidas como "crónicas" o "agresivas", ahora agrupados en una sola categoría, "periodontitis". [Papapanou, P. N., Sanz, M. *et al.*, 2018]

La evidencia actual no respalda la distinción entre periodontitis crónica y agresiva, tal como se define en el Taller de clasificación de 1999, como dos enfermedades separadas; [Armitage *et al.*, 1999] sin embargo, existe una variación importante en la presentación clínica con respecto al grado y severidad en todo el espectro de edad.

Además con este nuevo consenso, se debe definir al paciente como un caso, sin diagnosticar cada diente individualmente, [Papapanou, P. N., Sanz, M. *et al.*, 2018] y se considera un caso de periodontitis si:

- CAL interdental es detectable a  $\geq 2$  dientes no adyacentes.
- La CAL vestibular es  $\geq 3$  mm con bolsas  $\geq 3$  mm es detectable en  $\geq 2$  dientes, pero la CAL observada no puede atribuirse a causas no relacionadas con la periodontitis, tales como:
  - a) Recesión gingival de origen traumático
  - b) Caries dental que se extiende en el área cervical del diente
  - c) La presencia de CAL en el aspecto distal de un segundo molar y asociada con la malposición o extracción de un tercer molar
  - d) Una lesión endodóntica que drena a través del periodonto marginal
  - e) La aparición de una fractura de raíz vertical.

Un caso individual de periodontitis se debe caracterizar con una sencilla tabla que describa el estadio y el grado de la enfermedad, estos pueden evaluarse en cada caso individual en el momento del diagnóstico mediante datos anamnésticos, clínicos y de imágenes apropiados.

**Estadio:** Depende de la severidad de la enfermedad en el momento de la presentación, así como de la complejidad anticipada del tratamiento de la enfermedad e incluye una descripción del alcance y la distribución de la enfermedad en la boca.

**Grado:** Describe la velocidad y el riesgo de progresión, las probabilidades de obtener un mal resultado tras el tratamiento y su impacto sobre la salud general [Tonetti, M. S, Greenwell, H. *et al.*, 2018].

[Adaptado de Tonetti *et.*, al 2018].

		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
	CAL interdental en zona con la mayor pérdida	1-2 mm	3-4 mm	≥ 5 mm	≥ 8 mm
<b>Gravedad</b>	Pérdida ósea radiográfica	Tercio coronal (< 15 %)	Tercio coronal (15-33 %)	Extensión a tercio medio	Extensión a tercio apical
	Pérdidas dentarias	Sin pérdidas dentarias por razones periodontales		≤ 4 pérdidas dentarias por razones periodontales	≥ 5 pérdidas dentarias por razones periodontales
		Profundidad de sondaje máxima ≤ 4 mm	Profundidad de sondaje máxima ≤ 5 mm	Profundidad de sondaje 6-7 mm	Profundidad de sondaje ≥ 8 mm
<b>Complejidad</b>	Local	Pérdida ósea principalmente horizontal	Pérdida ósea principalmente horizontal	Además de complejidad Estadio II:	Además de complejidad Estadio III:
				Pérdida ósea vertical ≥ 3 mm	Disfunción masticatoria, Trauma oclusal secundario; movilidad dentaria ≥ 2
				Afectación de furca grado II o III	Colapso de mordida, migraciones, abanicamiento dentario
				21-28 dientes residuales	< 20 dientes residuales
				Defecto de cresta moderado	Defecto de cresta grave
<b>Extensión y distribución</b>	Añadir a estadio como descriptor	En cada estadio, describir extensión como localizada (< 30 % de dientes implicados), generalizada, o patrón molar/incisivo			

		Grado A	Grado B	Grado C
<b>Evidencia directa</b>	Radiografías o evaluación periodontal en los 5 años anteriores	No evidencia de pérdida de hueso/ inserción	Pérdida < 2 mm	Pérdida ≥ 2 mm
	Pérdida ósea vs. edad	< 0,25	0,25-1,0	> 1,0
<b>Evidencia indirecta</b>	Fenotipo	Grandes depósitos de <i>biofilm</i> con niveles bajos de destrucción	Destrucción proporcional a los depósitos de <i>biofilm</i>	El grado de destrucción supera las expectativas teniendo en cuenta los depósitos de <i>biofilm</i> ; patrones clínicos específicos que sugieren periodos de progresión rápida y/o patología de aparición temprana... Por ejemplo, patrón molar-incisivo; falta de respuesta prevista a tratamientos de control bacteriano habituales
<b>Factores modificadores</b>	Tabaquismo	No fumador	< 10 cig./día	≥ 10 cig./día
	Diabetes	Normal con/sin diabetes	HbA1c < 7 con diabetes	HbA1c > 7 con diabetes

Entonces, los estadios implican cuatro categorías (estadios I a IV) y se determina después de considerar diversas variables, incluida la pérdida de inserción clínica, la cantidad y el porcentaje de pérdida ósea, la profundidad de sondaje, la presencia y la extensión de los defectos óseos angulares, la afectación de la furcación, la movilidad dental y la pérdida de dientes debido a la periodontitis. La progresión incluye tres grados: Grado A: bajo riesgo, grado B: riesgo moderado, grado C: alto riesgo de progresión y abarca, además de los aspectos relacionados con la progresión de la periodontitis, el estado de salud general y otras exposiciones, como fumar o el nivel de control metabólico en la diabetes. Por lo tanto, la clasificación permite al odontólogo tener en cuenta factores individuales del paciente en el diagnóstico que servirán para el manejo integral del paciente y su correcta evolución a través del transcurso de la enfermedad.

#### *2.4 Epidemiología de la enfermedad periodontal*

Para la epidemiología mundial, según Baelum *et al.*, 2002 realizaron un estudio en 27 países africanos donde se observó que la enfermedad periodontal se veía reflejada en su mayoría estrato 2, 3, y 4. Según Corbet, en un análisis en Asia y Oceanía, se encontró que un nivel de ingresos inferior o bajo, presentarían un 50% de periodontitis crónica, y que por el contrario el grupo con ingresos medio alto y alto presentaban solo cálculo y una destrucción periodontal moderada.

Para el continente americano, en américa del sur, Gjermo *et al.*, estudiaron la prevalencia en Brasil y Argentina, donde Brasil presenta periodontitis moderada del 52% y severa del 15% y por el contrario, en Argentina se presentó una prevalencia de 28% para periodontitis moderada y 19% para severa. Para américa del norte, se observa que el menor porcentaje fue para periodontitis severa, lo cual es diferente a américa del sur.

Para Colombia, contamos con el resultado del ENSAB IV, la mayor parte de la población (61.8%) evidencia periodontitis en sus diferentes grados de severidad, siendo la más frecuente la periodontitis moderada, presente en el 43.46% de los sujetos, seguida por 10.62% con periodontitis avanzada, con un 38,20% de los sujetos que se clasifican como sin periodontitis.

De acuerdo con la distribución por sexo, un mayor porcentaje de mujeres (42.59%) presenta ausencia de periodontitis comparado con los hombres (33.59%). Por el contrario, un mayor porcentaje de hombres evidencian periodontitis moderada (45.03%) frente a las mujeres (41.97%). Se resalta que la proporción de periodontitis avanzada en hombres es cercana al doble (13,84%) con respecto a las mujeres (7,56%).

La presencia de periodontitis a los 18 años indica una prevalencia de 21.90%, distribuida en las categorías leve (10.69%) y moderada (10.97%). En el grupo de edad de 35 a 44 años, cerca de la mitad de las personas cumple los criterios para periodontitis moderada (48.29%) en tanto la presencia de periodontitis avanzada se evidencia en el 7.84% de las personas de esta misma edad. En el grupo de 45 a 64 años en un 62.53% se encuentra periodontitis moderada, mientras el porcentaje de periodontitis avanzada se distribuye en forma creciente entre el rango etario de 45 a 64 años (20.35%) y de 65 a 79 años (25.99%). IV Estudio de salud bucal. [ENSAB IV. Situación en salud bucal. Ministerio de Protección Social].

Para periodontitis agresiva se ha reportado a *A. actinomycetemcomitans* en todas partes del mundo por diferentes estudios, y se ha observado que en sitios como Rumania (Ali RW. 1996), Turquía [Dogan B, Antinheimo J. *et al.*, 2003], Tailandia [Dahlen G, Widar F. *et al.*, 2002], Corea [Choi BK, Park SH. *Et al.*, 2000] y es el microorganismo más frecuente, sin embargo, para sitios como Grecia se demostró que su prevalencia es baja y que por el contrario el microorganismo más frecuente es *P. gingivalis*. [Kamma JJ, Nakou M. *Et al.*, 2004].

### *2.5 Microorganismos Asociados a la enfermedad periodontal*

Gracias a las observaciones hechas por Leeuwenhoek sobre el microbioma de la cavidad oral se mostró una colección diversa de morfotipos bacterianos en la placa dental. Junto con el conocimiento que se desarrolló a través de los medios de cultivo bacterianos por Koch, Pasteur y otros, se realizó la caracterización del componente cultivable de la microbiota de la boca y se descubrió que comprende una colección diversa de organismos, incluidos aerobios obligados y anaerobios facultativos y obligados y una amplia gama de metabolismo, incluida la capacidad de degradar azúcares y proteínas.

La misión basada en métodos moleculares independientes del cultivo fue realizada por Pasteur et al. donde los phyla que contribuyeron con el mayor número de especies se encontraban en orden de la ingesta: Firmicutes, Espiroquetas, Bacteroidetes, Proteobacterias, Actinobacterias y Fusobacterias. [Colombo, Boches. *et al.*, 2009].

La cavidad oral es uno de los nichos mejor estudiados, sin embargo aún los métodos utilizados tienen muchos defectos y/o desventajas que siempre dan resultados diferentes y con mucha diversidad.

Estos microorganismos han demostrado sus interacciones significativas con las células huésped y exhiben una influencia directa en la fisiología humana, el metabolismo y las respuestas inmunitarias [Bik *et al.*, 2006; Blaser *et al.*, 2014; Kilian *et al.*, 2016]. Además, agrega su importancia cuando las enfermedades altamente peligrosas como la diabetes [Long *et al.*, 2017; Ganesan *et al.*, 2017], la bacteremia [Poveda-Roda *et al.*, 2008], el cáncer [Michaud *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 2015], SIDA [Kistler *et al.*, 2015], endocarditis [Parahitiyawa *et al.* 2009] y enfermedades autoinmunes [Lerner *et al.*, 2016] han mostrado las comunidades bacterianas alteradas en comparación con la cavidad oral de un individuo sano. La diversidad microbiana de la cavidad oral se ha estudiado ampliamente mediante la secuenciación tradicional basada en Sanger durante 2005-2010 [Aas *et al.*, 2005; DeLillo *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2008; Faveri *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2011; Keijser *et al.*, 2008; Bik *et al.*, 2010; Dewhirst *et al.*, 2010]. Estos estudios concluyeron que una cavidad bucal saludable alberga la gran cantidad de microorganismos que pueden clasificarse en seis grandes filos, a saber: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes y Fusobacteria [Siqueira *et al.*, 2016; Shade *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014]

Los diversos análisis revelan el predominio de Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes y Espiroquetas en una cavidad oral sana que constituye el 96% del total de bacterias orales [Zaura et al. 2009; Bik et al. 2010; Palmer et al. 2014]. Entre todos, Firmicutes contribuye al máximo de 36.7% seguido por Bacteroidetes (17.1%),

Proteobacteria (17.1%), Actinobacteria (11.6%), Espiroquetas (7.9%) y Fusobacteria (5.2%). [Diaz P. *et al.*, 2012].

En personas con cierta susceptibilidad a la enfermedad periodontal, la pérdida de inserción gingival va a generar la formación de una bolsa periodontal, que se coloniza fuertemente con bacterias anaerobias.

Las especies asociadas con periodontitis incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*, que originalmente se asociaron con la enfermedad en estudios basados en cultivos y posteriormente se confirmaron con sondas de ADN genómico completo. Otros estudios además del cultivo dieron a conocer otros microorganismos ampliando el rango de bacterias asociadas a la enfermedad periodontal como *Anaeroglobus geminatus*, *Eubacterium saphenum*, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* y *Bacteroidetes* y *Fretibacterium phylotypes*. [Socransky SS, Haffajee AD. *et al.*, 1998].

En un estudio realizado por Colombo, Boches, Cotton, et al., 2009 se encontraron patógenos periodontales que fueron significativamente prevalente en sujetos con periodontitis refractaria incluidos *P. micra*, *C. gracilis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella spp.*, *Eubacterium nodatum*, *Selenomonas noxia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema spp.*, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter concisus*. [Colombo, Boches. *et al.*, 2009].

Sin embargo, solo algunas de estas especies están involucradas en el inicio y la progresión de la enfermedad. *P. gingivalis*, *T forsythia* y *T denticola* son algunas de estas especies bacterianas pertenecientes al complejo rojo; este grupo de bacterias gramnegativas anaerobias son capaces de producir un conjunto de factores de virulencia que les permiten resistir la defensa del huésped y causar la destrucción del tejido [Bodet, Chandad. *et al.*, 2006] [Mysak. *et al.*, 2014].

## 2.6 Asociación de la enfermedad periodontal y los microorganismos

Según Page y Schroeder 1978, la enfermedad periodontal comienza en el epitelio gingival y conduce a la gingivitis, y bajo ciertas condiciones progresará hacia el tejido conectivo

subyacente que conduce a la periodontitis. Hasta hace relativamente poco, el estudio de la patogénesis de la periodontitis se centró en el papel de la infección bacteriana. En las últimas dos décadas, ha habido un interés creciente en la respuesta del huésped como un factor que impulsa la enfermedad periodontal.

Ahora se entiende que la patogénesis de la periodontitis implica tanto la respuesta inmune innata como la adquirida. La respuesta inicial a la infección bacteriana es una reacción inflamatoria local que activa el sistema inmune innato. La respuesta inflamatoria da como resultado la liberación de una serie de citocinas y otros mediadores y la propagación de la inflamación y el reclutamiento de células inflamatorias en el tejido gingival. La propagación de la inflamación al tejido conectivo adyacente provoca la destrucción del tejido conectivo y del hueso alveolar.

Desde el punto de vista histopatológico se permite obtener una subdivisión más clara de los estados de la patogenia de la enfermedad periodontal: inicial, temprana, establecida y avanzada.

1. Lesión inicial: Esta lesión inicial se localiza en el surco gingival. También se afecta una porción del epitelio de unión, el epitelio surcular y la parte más coronal del tejido conectivo. Se compromete del 10 – 15% del tejido conectivo. La formación de la bolsa ocurre durante etapas más adelante de la enfermedad mientras que se convierte en epitelio de la bolsa y tiene una extensión apical y lateral.

Los vasos sanguíneos del plexo gingival se dilatan, mientras que los leucocitos migran al epitelio de unión y al surco gingival, aparecen macrófagos y linfocitos. Por otro lado, una porción del colágeno peri vascular desaparece y su espacio es ocupado por fluido, proteínas séricas y células inflamatorias. Estos síntomas aparecen a partir del día 2 de la aparición de la gingivitis.

2. Lesión temprana: Se confunde con la lesión inicial ya que no tiene una línea que los divida. Las características de la lesión temprana fueron descritas por primera vez por James & Counsell en 1927, se da la formación de un denso infiltrado celular de linfocitos dentro del tejido conectivo.

Persiste el exudado inflamatorio que junto con el fluido crevicular y el número de leucocitos alcanzan su máximo nivel entre el día 6 y el 12 después de establecida la gingivitis.

El epitelio oral y surcular no se ven afectados por este infiltrado, mientras que el epitelio de unión contiene un aumento de neutrófilos y un infiltrado de células como linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y mastocitos.

Los neutrófilos infiltran el epitelio de unión y el surco gingival, también se observan en los vasos sanguíneos y poco frecuentes en el tejido conectivo. El mayor porcentaje (74%) está compuesto por linfocitos los cuales en su mayoría se diferencian en linfocitos T y B.

Se reduce en un 70% el contenido de colágeno de la zona de tejido conectivo no inflamada, afectando las fibras dentogingivales y circulares que soportan el epitelio de unión. Se alteran de igual manera los fibroblastos del infiltrado en la zona y en la zona de la lesión se ven incrementados en número hasta tres veces más.

Las fibras de colágeno comienzan a descomponerse para proporcionar espacio para la infiltración de leucocitos.

3. Lesión establecida: Las características de las etapas de la lesión temprana se ven acentuadas, el epitelio de unión y el epitelio surcular proliferan y migran dentro del tejido conectivo a lo largo de la superficie radicular convirtiéndose en epitelio de la bolsa y se observa delgado y ulcerado.

Se puede observar también proliferación vascular en gran cantidad en el epitelio de la bolsa que tan solo se separa del ambiente externo por una o dos células epiteliales. Gran cantidad de inmunoglobulinas se encuentran en el epitelio y el tejido conectivo, se activa el sistema del complemento, y complejos de anticuerpos.

Aunque hubo conocimiento limitado sobre el rol de las especies bacterianas en la periodontitis, Page & Schroeder, fueron rápidos en darse cuenta de que las bacterias eran esenciales, pero no una suficiente causa de periodontitis.

Ellos observaron que la lesión establecida que incluye gingivitis moderada a severa, no progresó necesariamente a la periodontitis, pero podría mantenerse estable

indefinidamente, lo que lleva a concluir que la respuesta inmune de cada persona es distinta al desafío bacteriano.

4. Lesión avanzada: Entre las características de esta lesión se pueden observar la formación de la bolsa periodontal, supuración y ulceración de la superficie, fibrosis de la encía, destrucción del hueso alveolar y del ligamento periodontal, movilidad dental y exfoliación eventual del diente. En otras palabras, se observa la enfermedad periodontal evidente.

Se da reabsorción ósea por la acción de osteoclastos que comienza en la cresta alveolar usualmente en el septum interdental alrededor de los vasos sanguíneos. Al abrirse los espacios medulares tanto la médula blanca como la roja se convierten hiper celulares sometándose a la fibrosis y transformándose en cicatrices del tejido conectivo.

Aprovechando el concepto de que la periodontitis es el resultado de las interacciones entre el huésped y las bacterias, Page, junto con Kenneth Kornman y Maurizio Tonetti, publicó un manuscrito en 1997 titulado "La respuesta del huésped al desafío microbiano en la periodontitis", donde los autores utilizaron la analogía de montar una producción teatral y describieron cómo cambia el escenario a medida que la historia avanza desde la salud hasta la progresión de la enfermedad.

Aunque no se conocen las funciones microbianas específicas involucradas en la respuesta destructiva, los periopatógenos del complejo rojo *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*, que a menudo se asocian entre sí y con sitios enfermos, pueden inhibir las funciones de defensa innatas del huésped.

*P. gingivalis*, el periodontopatógeno mejor caracterizado, puede inhibir las funciones de defensa del hospedador, incluida la secreción epitelial gingival de IL-8 que es inducida por otras bacterias orales, por varios mecanismos [Darveau, R. P., Belton. *et al.*, 1998]. Este fenómeno, denominado "parálisis local de quimiocinas", se propuso ser un mecanismo de virulencia, ya que puede afectar el gradiente de IL-8 que proporciona la quimiotaxis de neutrófilos desde la vasculatura a través de el tejido periodontal y dentro del surco gingival.

*T. denticola* también puede inhibir la función de IL-8 pero el mecanismo de inhibición no se entiende aún. La proteasa dentilisina de *T. denticola* puede suprimir la acumulación de interleucina-8 sin afectar la transcripción. Sin embargo, el nivel de interleucina-1a no se vio afectado por el cocultivo con *T. denticola*, y la forma de lisado no suprimió la acumulación de interleucina-8, lo que sugiere que la proteasa puede no ser suficiente para suprimirla. Además, *T. Forsythia* no permite la secreción de IL-8 de las células epiteliales gingivales, pero se desconoce el mecanismo de esto. [Ji, S., Kim, Y. *et al.*, 2007].

## 2.7 Métodos microbiológicos para la detección de los microorganismos

En la actualidad, la identificación de microorganismos se realiza con métodos que resulten rápidos y económicos, y dependiendo también el objetivo de la muestra, y los microorganismos que se quieran encontrar, estos métodos son llamado fenotípicos, ya que por el contrario los métodos genotípicos son de mayor costo y son para bacterias que sean difíciles de identificar con métodos convencionales.

El cultivo, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. [Boua, G., Fernández, A. *et al.*, 2011]. Otro método usado basado en el cultivo es la identificación por medios cromogénicos. En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación. En estos métodos, la identificación de microorganismos basada en el cultivo tiene el objetivo inicial de obtener cultivo puro. Un cultivo puro que contiene un solo tipo de microorganismo se puede obtener de varias maneras a partir de cultivos de enriquecimiento. Los métodos de aislamiento utilizados con frecuencia incluyen la siembra por deshidratación, siembra profunda en medios sólidos y dilución líquida. Para los organismos que forman colonias en placas sólidas medianas, la técnica de siembra por agotamiento es rápida, fácil y el método de elección. A partir de la recolección y siembra repetidas de una colonia aislada, se puede obtener un cultivo puro. Mediante el uso de dispositivos de incubación apropiados, es posible purificar organismos tanto aeróbicos como anaeróbicos en placas de medio sólido mediante el método de siembra por agotamiento. [Franco R, Cernakova L. *et al.*, 2019].

También es importante señalar que a través del cultivo, el microorganismo se puede identificar a partir de la producción de ciertos metabolitos liberados en el medio con ácido láctico y otros, y por lo tanto, la técnica se basa en la reacción del medio con los metabolitos liberados. Sin embargo, la identificación de microorganismos que se basa solo en el cultivo sigue siendo pobre e incompleta si queremos identificar bacterias más difíciles de cultivar. Aunque pueden ser económicos, permiten información cuantitativa y cualitativa sobre la diversidad de microorganismos presentes en una muestra, estos métodos son laboriosos y requieren mucho tiempo (preparación de medios, dilución, recubrimiento, incubación, recuento, aislamiento y caracterización), y los resultados solo se observan después de varios días, y con frecuencia se obtienen falsos positivos, especialmente cuando se consideran especies microbianas similares. [Franco R, Cernakova L. *et al.*, 2019].

El cultivo ofrece un buen conocimiento, de hecho suficiente para poder diagnosticar y tratar, sin embargo puede no ser exacto y requerir otros métodos adicionales para su correcto resultado sobre de la composición del microbioma oral.

Otro problema asociado con los métodos basados en cultivos es el hecho de que no pueden identificar células no cultivables y la microbiota oral es una comunidad bacteriana compleja, que se ha caracterizado por requerir métodos independientes del cultivo basados en el análisis de las secuencias de genes aislados de muestras de saliva o biopelículas orales. El gen más utilizado para este propósito ha sido el que codifica el 16S rRNA. El gen que codifica el 16S rRNA se amplifica por PCR usando cebadores universales dirigidos a las regiones ultraconservadas del gen y luego se clona por incorporación en un vector plasmídico. [Boua, G., Fernández, A. *et al.*, 2011].

Generalmente el proceso de detección de microorganismos se realiza en tres pasos o etapas: La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante PCR propiamente dicha. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, o mediante hibridación con sondas específicas. En general todo este proceso suele durar aproximadamente 24 h. [Costa J. 2004].

Otro método para la identificación de microorganismos son los inmunoensayos, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), aunque son eficaces, son caros y están diseñados solo para algunas especies bacterianas.

Con el avance de la tecnología se ha buscado en conseguir velocidad en los resultados para poder tratar a tiempo ya que para que un método se considere exitoso hoy en día, la obtención de resultados debe tomar un máximo de 24 h por lo cual los métodos basados en la espectrometría de masas han ganado popularidad como una herramienta de tipificación microbiana debido a su velocidad, costos reducidos, facilidad y aplicabilidad para una amplia gama de microorganismos como bacterias, arqueas y hongos. [Franco R, Cernakova L. *et al.*, 2019] [Sauer, S.; Kliem, M. *et al.*, 2010].

### **3. Planteamiento del problema**

#### *3.1 Descripción del problema*

Se sabe que la enfermedad periodontal se caracteriza, por una pérdida de soporte de los tejidos periodontales debida a inflamación con la gingivitis o la periodontitis, según se evalúa clínicamente, es un requisito previo para definir la salud periodontal [Diaz P. *et al.*, 2012], según los parámetros del sistema internacional de clasificación de la enfermedad periodontal y condiciones asociadas [Armitage *et al.* 1999], la extensión localizada de la pérdida de inserción (afecta hasta el 30% de las superficies examinadas), se da en el 64.36% de las personas de 20 a 34 años; mientras que la generalizada (afecta más del 30% de las superficies) se encuentra en el 27.24% de los casos, cifra que es mayor en hombres (31.49%) que en mujeres (23.02%). Para severidad en Colombia en el grupo de 20 a 34 años establece una pérdida leve de inserción, de 1.0 hasta 2.9 mm, en el 89.73% de las personas; para los grupos de 35 a 44 años de edad en promedio 36.1% de todas las superficies dentales evaluadas por individuo (extensión) presenta pérdida del NIC mayor a 1 mm, mientras el valor promedio de pérdida de inserción en estas superficies afectadas (severidad) es de 1.68 mm [IV Estudio de salud bucal. ENSAB IV. Situación en salud bucal. Ministerio de Protección Social]. En 2017 se habló de una nueva clasificación periodontal, que diagnostica la gingivitis y la periodontitis, y diferentes criterios de clasificación, esta última en estadios y grados de acuerdo a criterios clínicos y radiográficos y un seguimiento por parte del periodoncista. Sin embargo la microbiota subgingival no ha sido expuesta en esta nueva clasificación. Por lo anterior, se hace necesario identificar los microorganismos en el microambiente subgingival en pacientes sanos, con gingivitis o con periodontitis en los distintos grupos de edad evaluados en este estudio para luego confrontarlos con esta nueva clasificación la cual incorpora cambios en el diagnóstico clínico y requiere evidencias relacionadas con la etiología de la periodontitis ajustada a estos nuevos parámetros clasificatorios. Por lo que este estudio sería uno de los pioneros en el aporte de estas evidencias a la luz de los nuevos criterios de clasificación y tal vez así ayudar a mejorar el diagnóstico y tratamiento a futuro.

### *3.2 Pregunta de investigación*

¿Cuáles son los microorganismos cultivables del microbioma subgingival que se presentan en la población Colombiana en pacientes de 30 hasta 65 años de edad categorizados según el consenso mundial de diagnóstico periodontal de 2017?

#### **4. Justificación**

Desde el año 2017 se esta usando una nueva clasificación periodontal para definir los criterios de salud y enfermedad periodontal y periimplantar [Papapanou, P. N., Sanz, M. *et al.*, 2018] lo cual logró integrar distintos criterios a tener en cuenta que antes no se tenían en cuenta como el análisis radiográfico a través del tiempo de haber iniciado el tratamiento, el nivel de afectación ósea, algunos factores contribuyentes a presentar esta enfermedad, edad entre otros, pero algo muy importante son los criterios para definir un periodonto sano y asi poder comparar con un paciente que presente afectación de su periodonto, lo anterior conlleva a iniciar nuevos estudios entre el componente microbiano en los diferentes estadios de enfermedad propuestos. Esta clasificación no esta relacionada con el microbioma subgingival de un paciente sano o con enfermedad periodontal que puede presentarse entre poblaciones de diferentes edades y distintos estratos que pueden cambiar un estilo de vida para asi poder evaluar si el componente microbiológico puede ser una de las causas de esas diferencias y los cuales puede llevar a este tipo de afectaciones. Así mismo, la nueva clasificación mundial de la enfermedad periodontal muestra cambios significativos en los criterios diagnósticos y requiere estudios que valoren factores etiológicos para poder definir con certeza la enfermedad periodontal y dar un mejor diagnostico y plan de tratamiento.

## 5. Objetivos

### 5.1 *Objetivo general*

Identificar y caracterizar la microbiota subgingival de bacterias cultivables del microbioma subgingival en las diferentes etapas y grados periodontales según la nueva clasificación de la enfermedad periodontal, a través del cultivo microbiológico en pacientes entre los 30 y 65 años de edad de la población Colombiana

### 5.2 *Objetivos específicos*

- Identificar el componente microbiano de las distintas muestras obtenidas de placa subgingival en pacientes que presentan los diferentes estadios y grados periodontales de acuerdo al último consenso mundial de diagnóstico periodontal.
- Establecer la correlación entre la presencia de bacterias cultivables y los distintos estadios y grados de la enfermedad periodontal.
- Determinar cuáles bacterias se encuentran presentes tanto en diagnóstico sano como en presencia de enfermedad periodontal en el total de la muestra obtenida de la población Colombiana.

## **6. Aspectos metodológicos**

### *6.1 Tipo de estudio*

Estudio de corte transversal

### *6.2 Población y muestra*

Se evaluaron hombres y mujeres adultos entre los 30 y 65 años de edad de la población Colombiana en la práctica institucional de la Universidad El Bosque, pacientes referidos por los centros de convenios con la Facultad de Odontología de la Universidad El Bosque con diferentes estadios de enfermedades periodontales de acuerdo al taller mundial de la AAP y EFP de 2017.

#### *6.2.1 Población de estudio*

Fueron un total de 67 Pacientes que asistieron a las clínicas odontológicas de las Facultad de Odontología de la Universidad El Bosque de más de 30 años y menores de 65 años de edad con diferentes estadios de la enfermedad periodontal de acuerdo al taller mundial de la AAP y EFP de 2017 divididos en 3 grupos, 0 (sano gingivitis n = 14), 1 (estadios I y II de periodontitis n = 22) y 2 (estadios III y IV de periodontitis n = 31)

#### *6.2.2 Criterios de inclusión*

Diagnostico de salud/ gingivitis o periodontitis (presencia de bolsas periodontales, perdida de inserción clínica, sangrado al sondaje entre otros criterios que se explican mas adelante. Los diagnósticos se realizaran con base al taller mundial de la AAP y EFP de 2017

#### *6.2.3 Criterios de exclusión*

Presentar patologías periodontales agudas tales como abscesos periodontales o enfermedades periodontales necrotizantes, haber tomado antibióticos en los últimos tres meses, embarazo o lactantes, enfermedades sistémicas como diabetes, defectos de neutrófilos u otros trastornos del sistema inmunitario y enfermedades autoinmunes, uso de anti-inflamatorios,

anticonvulsivantes, inmunosupresores, bloqueadores de los canales de calcio iniciados seis meses antes de la toma de muestra.

#### 6.2.4 Variables

**Tabla 1.** Variables del estudio

<b>Variable</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Nivel de Medición</b>	<b>Escala de Medida</b>
<b>Índice de placa</b>	Independiente	Índice que permite establecer grados de intensidad del acúmulo de placa	Cuantitativo	Razón discreta	Mediana RIQ
<b>Sangrado al sondaje</b>	Independiente	Presencia de sangrado al sondaje	Cuantitativo	Razón discreta	Mediana RIQ
<b>Bolsa periodontal</b>	Independiente	Profundidad del surco gingival >4mm	Cuantitativo	Razón discreta	Mediana RIQ
<b>Nivel de inserción</b>	Independiente	Distancia entre la unión amelocementaria (UAC) y fondo de la bolsa periodontal	Cuantitativo	Razón discreta	Mediana RIQ
<b>Edad</b>	Control.	Edad en años.	Cuantitativo.	Razón Discreta	Número de años.
<b>Género</b>	Control	Femenino/masculino	Cualitativo	Nominal Dicotómico	1 Femenino 0 hombre
<b>Estado civil</b>	Control	Situación personal en que se encuentra la persona según sus circunstancias y la legislación.	Cualitativo	Nominal Polítomico	1 Soltera 2 Casada 3 Unión libre
<b>Escolaridad</b>	Control	Nivel de estudio de la persona.	Cualitativo	Ordinal	Primaria Bachiller Técnico Profesional
<b>Estrato social</b>	Control	Nivel socioeconómico.	Cualitativo	Ordinal	Estrato 1 Estrato 2 Estrato 3

### *6.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información*

#### *6.3.1 Valoración periodontal*

Se consignaron las características sociodemográficas y generales de los pacientes: edad, sexo, salud sistémica, medicamentos, tabaquismo entre otras.

Se realizó un check list junto con un examen periodontal inicial. Una vez obtenidos los criterios de inclusión y exclusión, los pacientes fueron informados verbalmente sobre el estudio, y se les pidió firmar un consentimiento informado. Tras la aceptación, cada paciente fue designado para la iniciación de estudio.

Tras la aceptación de ingreso al estudio, cada paciente recibió un examen periodontal y radiográfico, que incluye índice de placa, índice gingival, profundidad de la bolsa, nivel de inserción y radiografías periapicales. Después de este examen, el diagnóstico periodontal de los sujetos incluidos se confirmó de acuerdo a los criterios descritos en la nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias 2017.

#### *6.3.2 Parámetros radiográficos*

Se tomaron las radiografías periapicales como se menciona en el taller mundial de la AAP y EFP de 2017, donde menciona que si no se poseen radiografías del caso previas del estado del paciente (5 años), se toma el diente que presenta mayor afectación según el periodontograma, se toma la longitud radicular desde la UAC (unión amelocementaria) hasta la parte más apical, y a ese valor se le resta un milímetro, ese valor sería el 100%. Ahora, se mide de la cresta alveolar a la parte más apical. Se debe conocer a que porcentaje corresponde esta medida, por lo que se hace una regla de tres. Este resultado se divide entre la edad del paciente y se obtiene el dato de la pérdida ósea que ha tenido el paciente a través del tiempo. Posteriormente, se le agrega la variable "fumar" o si presenta "diabetes" ya que son factores modificantes del grado de afectación periodontal. Los grados periodontales se clasificaron de la siguiente manera: Grado A, grado B, y grado C de acuerdo con la nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias [Papapanou, P. N., Sanz, M. *et al.*, 2018].

### 6.3.3 Toma de muestra de placa subgingival

La toma de muestra de placa subgingival se realizó en 4 sitios, el sitio por cada cuadrante que tuviera el sondaje más profundo, con previa realización de periodontograma. Después de retirar la placa supragingival con curetas se insertó una punta de papel en cada bolsa periodontal durante 20 segundos. Se transfirió la punta de papel a un tubo con medio Viability Medium Goteberg Anaerobically (VMGA) III para ser llevado al laboratorio de microbiología y realizar la identificación de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, y *F. nucleatum*. Todas las muestras se etiquetaron y se enviaron al laboratorio (Laboratorios de Microbiología Oral, Instituto de la Unidad Básica de Investigación Oral, Universidad El Bosque). Todas las muestras fueron procesadas dentro de las 24 horas de la toma de muestra.

### 6.4 Métodos de identificación de microorganismos

El cultivo e identificación de las especies microbianas se realizó de acuerdo con las recomendaciones de Slots. [Slots J. 1986], cuyas técnicas fueron estandarizadas previamente en el laboratorio. Brevemente, para la identificación de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra* y *Fusobacterium spp.* Se hicieron cinco diluciones en base 10 a partir del medio VMGA III, se sembraron 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en agar brucella sangre enriquecido con hemina y menadiona (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) y se llevaron a incubación a 36°C en atmósfera de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) durante siete días. Se realizó la lectura de morfología e identificación de colonias bacterianas y pruebas bioquímicas. [Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI. *et al.*, 2007].

### 6.5 Plan de Tabulación y análisis

Para el análisis de la distribución de frecuencias con relación a la presencia de los diferentes microorganismos se realizó prueba de  $\chi^2$  y prueba exacta de Fisher; para la comparación de la concentración de los diferentes microorganismos se realizó prueba de Kruskal Wallis, y donde hubo diferencia se usó una prueba no paramétrica como U Mann-Whitney entre pares.

Con previa verificación de la distribución normal mediante Shapiro Wilk. Toda las pruebas se realizaron mediante STATA. Se manejo un nivel de confianza 95% con un valor de significancia para todas las pruebas de  $p=0,05$ .

## **7. Consideraciones éticas**

Este trabajo de grado hace parte del proyecto denominado “Desarrollo de sondas de ADN genómico para la evaluación de bacterias cultivables y no cultivables del microbioma oral en pacientes con periodontitis de Colombia y España.”, El cual fue presentado en el 2018 en la convocatoria para proyectos de ciencia, tecnología e innovación en salud. Los pacientes fueron requeridas para firmar un consentimiento informado en donde se dió la información pertinente de esta investigación en donde las muestras se utilizarían para identificar y caracterizar las bacterias cultivables de la microbiota subgingival en los diferentes estadios y grados periodontales según la nueva clasificación de la enfermedad periodontal.

El proyecto describe una investigación científica en seres humanos con un riesgo mínimo que estará sujeto a todo lo dispuesto en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Esta investigación tuvo en cuenta los artículos a los que hace alusión dicha resolución en el capítulo I de los aspectos éticos de la investigación en humanos y por las características del estudio que lo clasifica como riesgo mínimo, todo participante firmó un consentimiento informado antes de iniciar el estudio (Anexo 1).

Adicionalmente, las muestras que se tomaron para procesamiento en los individuos que ingresaron a la consulta, son consideradas como riesgo mínimo para los participantes ya que corresponden al proceso de una valoración periodontal y no generan riesgo adicional.

## 8. Resultados

Los datos sociodemográficos de 67 pacientes con diferentes estadios de la enfermedad periodontal divididos en 3 grupos se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Caracterización sociodemográfica y clínica de pacientes de España y Colombia de acuerdo al estadio de la enfermedad periodontal.

Variables	Condición Periodontal					
	Sano		Estadio I-II		Estadio III-IV	
	F	M	F	M	F	M
<b>Edad/Genero</b>						
<b>30-40</b>	4(50)	3(50)	9(69.2)	4(44.4)	4(28.6)	5(16.6)
<b>41-50</b>	1(12.5)	2(33.3)	2(15.3)	2(22.2)	10(71.4)	6(33.3)
<b>51-60</b>	3(37.5)	1(16.3)	2(15.3)	3(33.3)	0(0)	6(35.2)
<b>Total</b>	8 (22.8)	6(18.7)	13(37.1)	9(28.1)	14(40)	17(53.1)
<b>Índice de placa</b>						
<b>Mediana (%)</b>	0.5		96		98	
<b>(RIQ)</b>	(0-2)		(25-100)		(62-100)	
<b>Sangrado</b>						
<b>Mediana (mm)</b>	5		98		100	
<b>(RIQ)</b>	(4-13)		(26-100)		(76-100)	
<b>Bolsa</b>						
<b>Mediana (mm)</b>	2.26		3.36		3.62	
<b>(RIQ)</b>	(2.13-2.41)		(2.89-3.6)		(2.89-3.6)	
<b>Nivel de Inserción</b>						
<b>Mediana (mm)</b>	0.62		3.18		4.11	
<b>(RIQ)</b>	(0.27-0.75)		(2.39-3.96)		(3.2-5.05)	

El total de pacientes femeninos fueron 35 (52,23%) y pacientes masculinos fueron 32 (47,76%); siendo evaluados mas mujeres que hombres; el grupo de pacientes en estadio III-IV presentó un total de 31 individuos (46,2%); el mayor numero de pacientes tanto hombres como mujeres se presento en la edad de 41-50 años de es grupo, con un total de 16 (23,8%); El grupo de edad 30-40 años tuvo un total de 29 (43,2%) pacientes, observando un mayor numero de mujeres (9) con respecto a los hombres que fueron 4. La menor población del estudio se observó en la edad de 51-60 años donde se obtuvieron 15 (22,3%) pacientes.

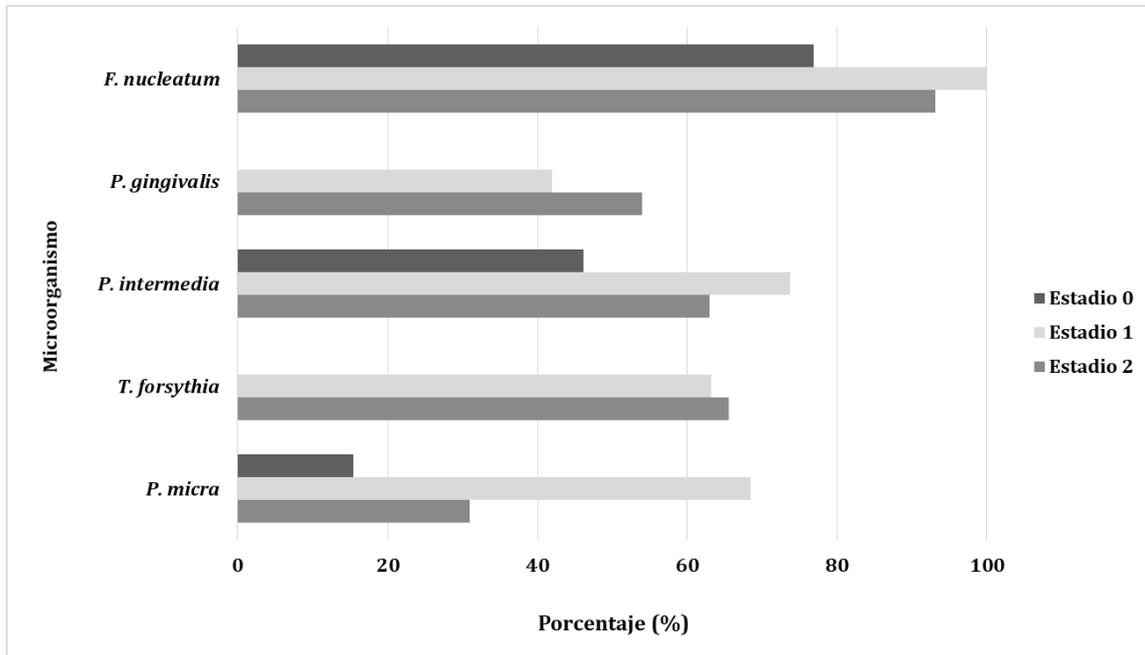
El análisis de los indicadores clínicos se realizo mediante porcentaje y rango intercuartil, el índice de placa tanto el estadio I-II como III-IV presentaron un alto porcentaje de placa (96%-98%) con una dispersión mas alta en el estadio I-II, en el índice de sangrado se observo presencia en los 3 estadios siendo el estadio III-IV el mayor de todos con un 100% de los

pacientes, el ítem bolsa periodontal, presento la mayor profundidad en el estadio III-IV con 3.62 mm y el estadio I-II presento un nivel de 3.36 mm, para el nivel de inserción observamos un nivel mayor en el estadio III-IV con 4.11 mm, el estadio I-II con 3.18 mm.

**Tabla 3.** Distribución de frecuencias para *P. gingivalis*, *T. Forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, y *F. nucleatum*.

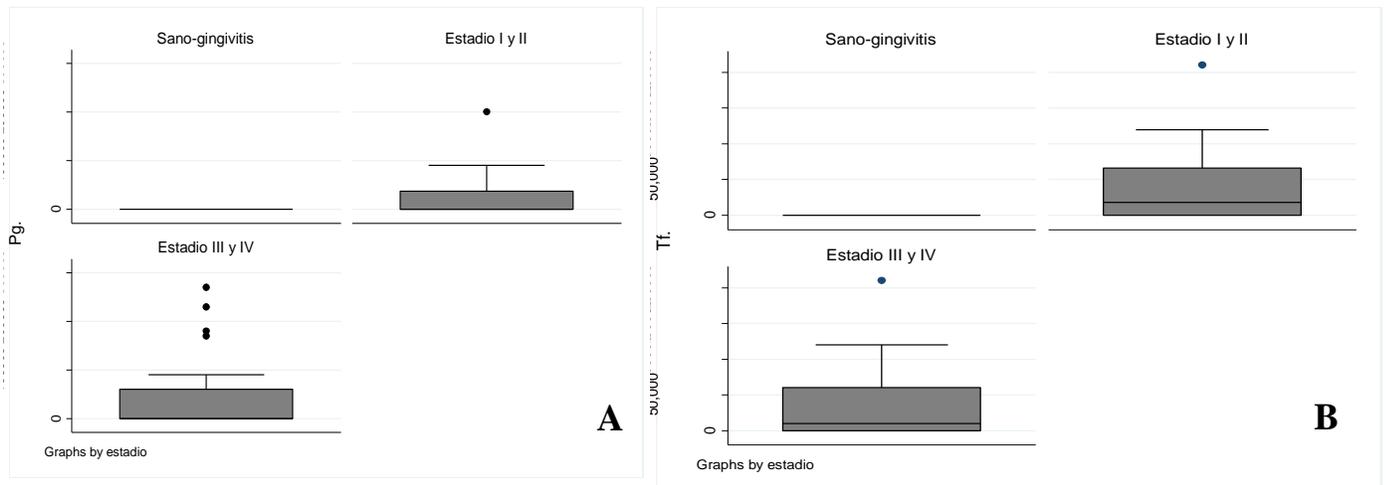
		Sano		Estadio I y II		Estadio III y IV		Valor p
		n	%	n	%	n	%	
<i>P. gingivalis</i>	Presencia	0	0.00%	8	42.11%	15	53.57	<b>0.004</b>
	Ausencia	13	100%	11	57.89%	13	46.43%	
<i>T. forsythia</i>	Presencia	0	0.00%	12	63.16%	19	65.52%	<b>0.000</b>
	Ausencia	13	100%%	7	36.84%	10	34.48%	
<i>P. intermedia</i>	Presencia	6	46.15%	14	73.68%	17	62.96%	<b>0.286</b>
	Ausencia	7	53.85%	5	26.32%	10	37.04%	
<i>P. micra</i>	Presencia	2	15.38%	13	68.42%	9	31.03%	<b>0.005</b>
	Ausencia	11	84.62%	6	31.58%	20	68.97%	
<i>F. nucleatum</i>	Presencia	10	76.92%	19	100%	27	93.10%	<b>0.061</b>
	Ausencia	3	23.08%	0	0.00%	2	6.90%	

En la tabla 3 y figura 1 se muestra la distribución de frecuencias para *P. gingivalis*, *T. Forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, y *F. nucleatum* en los 3 estadios. Para los pacientes sanos se observa una ausencia total de *P. gingivalis* con valor  $p$  0.004, ausencia total de *T. Forsythia* con valor  $p$  0.000; *P. intermedia* tuvo una ausencia en 7 pacientes (53.85%); *P. micra* presento una ausencia en 11 pacientes (84.62%) con valor  $p$  0.005, y *F. nucleatum* estuvo presente en 10 pacientes (76.92%). Para el estadio I-II muestra presencia de *P. gingivalis* en 8 pacientes (42.11%), *T. Forsythia* en 12 pacientes (63.16%), *P. intermedia* presente en 14 pacientes (73.68%), *P. micra* presente en 13 pacientes (68.42%), y *F. nucleatum* presente en 19 pacientes (100%); en el estadio III-IV muestra *P. gingivalis* en 15 pacientes (53.57%), *T. Forsythia* presente en 19 pacientes (65.52%), *P. intermedia* presente en 17 pacientes (62.96%), *P. micra* presenta ausencia en 20 pacientes (68.97%), y *F. nucleatum* presente en 27 pacientes (93.10%).



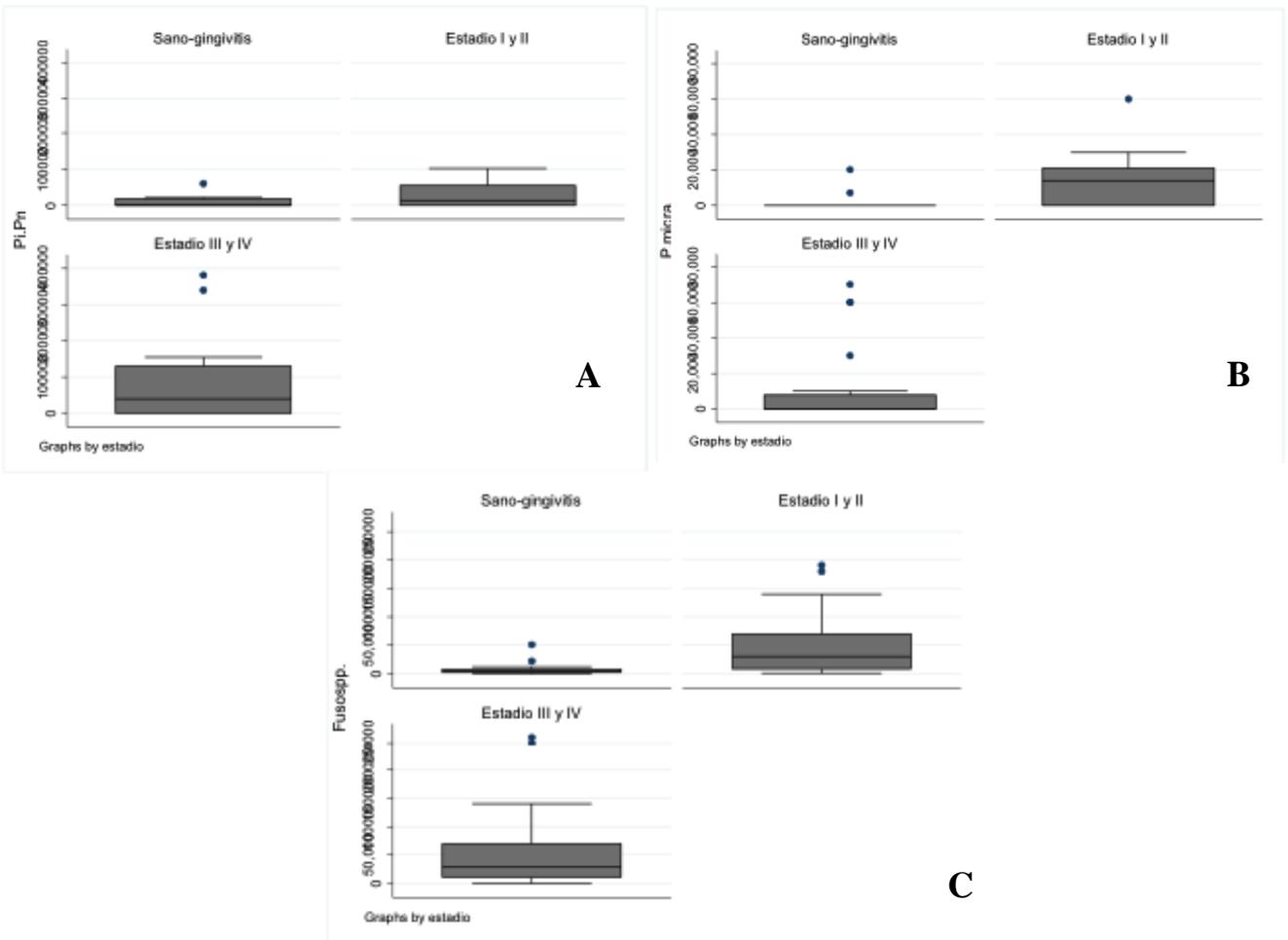
**Figura 1.** Distribución de frecuencias para *P. gingivalis*, *T. Forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, y *F. nucleatum*.

La figura 2(A) muestra la concentración de *P. gingivalis* entre grupos donde se observa una concentración mucho mayor en el estadio III-IV comparado con el estadio I-II y total ausencia en pacientes sanos; en la figura 2(B) se muestra la concentración de *T. forsythia* donde existe una concentración similar tanto en el estadio I-II como en el estadio III-IV.



**Figura 2.** Concentración de *P. gingivalis* (A) y *T. forsythia* (B) entre grupos.

En la figura 3 se muestra la concentración de *P. intermedia*(A) se observa mucho mayor en el estadio III-IV, pero también se encuentra en el estadio I-II y en pacientes sanos/gingivitis; para la concentración de *P. micra* (B) se presentó en gran concentración en el estadio I-II y ausencia total en sano/gingivitis; para la concentración de *F. nucleatum*(C) donde hubo mayor presencia fue en el estadio I-II y III-IV a diferencia de sano/gingivitis.



**Figura 3.** Concentración de *P. intermedia*(A), *P. micra*(B) y *F. nucleatum*(C) entre grupos.

## 9. Discusión

Según la Clasificación de enfermedades periodontales y Peri-implantares y Condiciones según AAP y Federación Europea de Periodoncia (EFP) se han unido para desarrollar un nuevo sistema de clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales [Caton JG, Armitage G. *et al.*, 2018], donde como protagonista principal se observó los cambios en la clasificación de la periodontitis son altamente relevantes. A diferencia de la clasificación anterior propuesta por Armitage 1999 [Armitage GC. 1999] la cual se manejó por más de 20 años donde se tenían los criterios suficientes para la práctica clínica como en el campo de la investigación para lograr un diagnóstico definitivo. Desde esta reunión ha aparecido información de estudios científicos que han evaluado las características diferenciales de la agresión microbiana y la respuesta del hospedador, pero esta evidencia no es capaz de diferenciar fenotipos claros que permitieran una distinción entre las patologías y condiciones que se habían definido.

Como se encuentra en el ENSAB IV para Colombia [ENSAB IV. Situación en salud bucal. Ministerio de Protección Social], la mayor parte de la población (61.8%) evidencia periodontitis en sus diferentes grados de severidad lo que concuerda con el estudio 53 paciente (79.10%) donde la mayoría de pacientes presentaba cualquier estadio de periodontitis. A diferencia del ENSAB IV [ENSAB IV. Situación en salud bucal. Ministerio de Protección Social] el 10.62% presentaba periodontitis avanzada a diferencia del estudio donde se encontró una mayor presencia de la población con una periodontitis en estadio III-IV 31 pacientes (46.26%). De acuerdo con la distribución por sexo presentada en el ENSAB IV [ENSAB IV. Situación en salud bucal. Ministerio de Protección Social] un mayor porcentaje de mujeres (42.59%) presenta ausencia de periodontitis comparado con los hombres (33.59%), lo que concuerda con el estudio, mujeres (22.8%) y hombres (18.7%). Un mayor porcentaje de hombres evidencian periodontitis en estadio III-IV (53.1%) a diferencia de las mujeres (40%), pero en el estadio I-II las mujeres presentan mayor porcentaje de periodontitis (37.1%) a diferencia de los hombres (28.1%) lo que contradice al ENSAB IV [IV Estudio de salud bucal. [ENSAB IV. Situación en salud bucal. Ministerio de Protección Social]. Se debe considerar para dar una conclusión definitiva tener en cuenta una mayor población y que el ESTUDIO NACIONAL DE SALUD BUCAL (ENSAB) se realice

de acuerdo al nuevo sistema de clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales [Caton JG, Armitage G. *et al.*, 2018].

En el grupo de edad de 35 a 44 años, cerca de la mitad de las personas cumple los criterios para periodontitis moderada (48.29%) en tanto la presencia de periodontitis avanzada se evidencia en el 7.84% de las personas de esta misma edad. En el grupo de 45 a 64 años en un 62.53% se encuentra periodontitis moderada, mientras el porcentaje de periodontitis avanzada se distribuye en forma creciente entre el rango etario de 45 a 64 años (20.35%) y de 65 a 79 años (25.99%). IV Estudio de salud bucal. [ENSAB IV. Situación en salud bucal. Ministerio de Protección Social], a diferencia en este estudio se encontró que del total de la población evaluada en 17 pacientes (25.37%) presentaban los criterios para el estadio I-II de periodontitis y para el estadio III-IV 25 pacientes (37.31%) estaban incluidos en estos criterios, sin embargo se debe tener en cuenta que la distribución de los grupos de edades en el ENSAB IV es diferente al presentado en este estudio.

De acuerdo con el presente estudio hubo una diferencia en la frecuencia y concentración de *P. gingivalis*, *T. Forsythia*, *P. micra* y *F. nucleatum* entre salud-gingivitis y los estadios I-II ò III-IV de la periodontitis ( $p < 0.05$ ), donde *P. gingivalis* y *T. Forsythia* mostraron estar asociadas a enfermedad periodontal basados en hibridación DNA-DNA checkerboard como lo demuestra Socransky 1998 [Socransky SS, Haffajee AD. *et al.*, 1998]. En otro estudio realizado por Colombo *et al.*, 2009 menciona que *P. gingivalis*, *T. Forsythia*, *P. micra* fueron significativamente prevalentes en sujetos que presentaban periodontitis refractaria lo que conlleva a la incognita de si *P. micra* esta involucrado directamente en la progresión de la enfermedad periodontal ya establecida en un paciente que ya presento periodontitis.

*P. gingivalis* y *T. forsythia* no se encuentra en paciente sano/gingivitis. *P. gingivalis* se encuentra presente en el estadio I-II con 42.11% y en el estadio III-IV con un 53.57% lo que corrobora una asociación de *Porphyromonas gingivalis* con periodontitis [Socransky SS, Haffajee AD. *et al.*, 1998]. *P. intermedia* con un 73,68% - 62.96%, *P. micra*, con un 68.42% - 31.03% y *F. nucleatum* con un 100% - 93.10% presentes en periodontitis en estadio I, II, III y IV lo que lleva a pensar que son microorganismos los cuales aumentan la capacidad de formación de biopelículas para generar un aumento en la progresión de la enfermedad periodontal.

*P. micra* se encontró en mayor proporción (68.42%) en el estadio I-II a diferencia de el estadio III-IV y sano/gingivitis el cual se puede relacionar que es un microorganismo que cuando ya se encuentra presente en la enfermedad periodontal puede relacionarse con un aumento de esta y de acuerdo con lo que menciona en su estudio Colombo, Boches, Cotton, et al., 2009 se encontraron patógenos periodontales que fueron significativamente prevalente en sujetos con periodontitis refractaria incluidos *P. micra*, *C. gracilis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella spp.*, *Eubacterium nodatum*, *Selenomonas noxia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema spp.*, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter concisus*. [Colombo, Boches. et al., 2009].

*P. intermedia* no tuvo diferencias entre las etapas de salud-gingivitis y periodontitis ( $p > 0.286$ ). Sin embargo, [Ashimoto A, Chen C. et al., 1996] muestra una asociación estadísticamente significativa entre *P. intermedia* con la presencia de *P. gingivalis* en estadios mas avanzados de la periodontitis, como se observa en este estudio con una mayor presencia de *P. intermedia* en estadios I, II, III, IV.

Según Signat y Roques en el 2011 *F. nucleatum* cumple un papel en la colonización inicial y su interacción con *P. gingivalis* y *P. intermedia* generaría un aumento en la progresión de la enfermedad periodontal [Signat B., Roques C. et al., 2011], lo que concuerda con el presente estudio donde se observa que hay presencia en las 3 categorías, en salud/gingivitis y los estadios I-II ò III-IV de la periodontitis con porcentajes de 76.92%, 100%, 93.10% respectivamente, generando otra hipótesis, si tiene relación directa la presencia de *F. nucleatum* con la progresión y presencia de enfermedad periodontal, sin embargo se necesitan mas estudios para corroborar esta hipótesis planteada.

Se comparó la concentración de *P. gingivalis*, *T. Forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, y *F. nucleatum* entre grupos. Para ninguno de los microorganismos, se observaron diferencias en la frecuencia y concentración de microorganismos entre las diferentes etapas de la periodontitis ( $p > 0.05$ ).

En cuanto a la concentración en los resultados de este estudio mostraron ausencia de *P. gingivalis* en sano/gingivitis pero presencia en periodontitis en estadio I y II y aumento en el estadio III y IV.

## 10. Conclusiones

El componente microbiano en los pacientes evaluados difiere en la nueva clasificación propuesta por el taller mundial de la AAP y EFP de 2017. *F. nucleatum* se encuentra presente en los 3 estadios de la enfermedad periodontal.

En estado sano/gingivitis no se encontró presencia de *P. gingivalis* o de *T. forsythia*, sin embargo la presencia de *P. gingivalis* en estadio I-IV al igual que *T. forsythia* se asocia directamente a periodontitis.

La presencia de *P. gingivalis*, *T. Forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, y *F. nucleatum* no es una indicación para determinar el estadio o el grado de progresión de periodontitis; sin embargo, *T. forsythia*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* se encontraron en mayor porcentaje en el estadio I y II lo cual nos lleva a pensar que su presencia influye en la progresión de la enfermedad periodontal.

Según la concentración de *P. gingivalis* y *T. Forsythia* encontrada genera una incógnita que en mayor presencia de estos microorganismos se da un aumento en el estadio de la periodontitis.

## 11. Referencias bibliográficas

1. Ali RW, Velcescu C, Jivanescu MC, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:133-9.
2. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Peri-odontol* 1999;4:1-6.
3. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11: 266-273.
4. Boua G, Fernández A, García C, Sáez JA, Valdezate S. Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(8):601–608.
5. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri- implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S1–S8.
6. Choi BK, Park SH, Yoo JY, Choi SH, Chai JK, Cho KS. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid based approach. *J Periodontol* 2000;71:1387-94
7. Colombo, Boches, Cotton. Comparisons of Subgingival Microbial Profiles of Refractory Periodontitis, Severe Periodontitis, and Periodontal Health Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *J Periodontol* 2009;80:9
8. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(5):299-305.
9. Dahlen G, Widar F, Teanpaisan R, Papapanou PN, Baelum V, Fejerskov O. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a rural adult population in Southern Thailand. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17:137-42
10. Darveau, R. P., Belton, C. M., Reife, R. A. & Lamont, R. J. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 66, 1660–1665 (1998).

11. Diaz P. Microbial Diversity and Interactions in Subgingival Biofilm Communities, Division of Periodontology, Department of Oral Health and Diagnostic Sciences School of Dental Medicine, The University of Connecticut Health Center, 2012
12. Dogan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74:803-14
13. Estudio de salud bucal. ENSAB IV. Situación en salud bucal. Ministerio de Protección Social.
14. Franco R, Cernakova L, Kadam S. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms* 2019, 7, 13.
15. Horiuchi, A., Kokubu, E., Warita, T., & Ishihara, K. Synergistic biofilm formation by *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum*. *Anaerobe*. 2019 Sep 12:102100
16. Ji, S., Kim, Y., Min., B. M., Han, S. H. & Choi, Y. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *J. Periodont. Res.* 2007. 42, 503–510.
17. Kamma JJ, Nakou M, Gmür R, Baehnl PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:314-21
18. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sciences Reviews* 1976;9:65–107.
19. Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo D, Barón A, Aya MR. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. *Biomédica* 2007;27:21-33
20. Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., ... & Greenwell, H. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 89, S173-S182.
21. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003. WHO Global Oral Health Programme. [Internet]. 2003.
22. Ranz, J., and Clifton, B. Characterization and evolutionary dynamics of complex regions in eukaryotic genomes. *Sci China Life*. 2019
23. Sauer, S.; Kliem, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 74–82.

24. Signat B., Roques C., Poulet P., Duffaut D. Role of *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease. *Curr Issues Mol Biol.* 2011;13(2):25-36.
25. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986;1:48-57
26. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 1998;25:134-44.
27. Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*, 2018. 89, S159-S172.
28. World Workshop in periodontics - AAP and EFP, Chicago 2017.