

## ¿El análisis de rutina diaria de la microbiota subgingival en la periodontitis contribuye al beneficio del paciente?

Mercedes Fernández y Mostajo<sup>1</sup>, Egija Zaura<sup>2</sup>, Wim Crielaard<sup>2</sup>, Wouter Beertsen<sup>1</sup>

Eur J. Oral Sci 2011

European Journal of Oral Sciences

En periodoncia clínica es una práctica común tomar una muestra de placa subgingival de pacientes con periodontitis y buscar la presencia de supuestos patógenos periodontales utilizando técnicas de laboratorio rutinarias como el cultivo, hibridación DNA-DNA o PCR en tiempo real. Generalmente se presta especial atención al reconocimiento de los microorganismos del "complejo rojo" y al *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Recientemente se han introducido ilimitadas técnicas moleculares, que se distinguen de los alcances clásicos en que no realizan una pre-selección para determinadas especies. En este estudio investigamos como la extensión de los resultados de estas técnicas ha cambiado nuestra perspectiva en cuanto a la composición de la microbiota subgingival, y si tienen consecuencias en la decisión clínica. Los alcances ilimitados mostraron que la composición de la placa subgingival es mucho más compleja de lo que se pensaba previamente. A partir de los "clásicos" patógenos periodontales putativos, varias especies cultivables y selectivas, son ahora reconocidas como asociadas a la periodontitis, y por lo tanto se agranda el grupo de patógenos sospechosos periodontales. **Concluimos que el análisis de rutina de la placa subgingival en la clínica no necesariamente benefician al paciente.**

Generalmente se sostiene que la mayoría de las infecciones crónicas, como la gingivitis, periodontitis, caries y

peri implantitis, estomatitis por prótesis e infecciones endodónticas, son causadas por microorganismos que residen en una biopelícula polimicrobiana. Las biopelículas constituyen un ecosistema dinámico en el que los microorganismos se influyen unos a otros mediante sus productos y señalizaciones moleculares, y consecuentemente pueden ocurrir cambios profundos en el comportamiento y fisiología microbiana. **La composición y propiedades de las biopelículas pueden cambiar como resultado de las influencias ambientales, como la dieta, la higiene oral y el tabaco.**

Los estudios de microbiota subgingival cultivable en pacientes periodontales en las últimas décadas han mostrado que varias especies son potencialmente dañinas para el periodonto. Esta perspectiva ha llevado a los microbiólogos en varios países a promover los análisis microbianos de muestras subgingivales de rutina para ayudar al clínico a identificar los patógenos periodontales y hasta seleccionar una terapia antimicrobiana apropiada.

Estudios anteriores han mostrado que las bacterias predominantes en sitios periodontalmente sanos son cocos y bacilos Gram + facultativos. En la gingivitis y en la periodontitis hay una disminución en el número de estos organismos concomitantemente con un aumento en el número de bacilos Gram- y espiroquetas. **Una gran diferencia entre los tejidos periodontales sanos y**

<sup>1</sup> Departamento de Implantología y Periodoncia, Radboud University Medical Center, Nijmegen

<sup>2</sup> Departamento de Odontología Preventiva, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), University of Amsterdam and Free University Amsterdam, Amsterdam.

Traducciones de la Cátedra de Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de la Republica Oriental del Uruguay, Prof Dr. Luis Bueno, traducción Dra. Victoria García

**enfermos es un aumento en la proporción de los miembros del mencionado "complejo rojo" *Tanarella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*" en los tejidos enfermos.**

Es importante distinguir entre la colonización (estado portador) y la infección. La presencia de patógenos por sí sola no necesariamente indica que causa enfermedad. Tiene que ocurrir un disturbio ecológico para permitir que los patógenos alcancen un número relativamente dominante y una significancia clínica. Si el balance simbiótico entre el hospedero y los microorganismos residentes en el área subgingival es perturbado por cualquier razón, la enfermedad periodontal puede ocurrir, aún en pequeños animales de laboratorio que sólo fueron expuestos a su microbiota autóctona.

### TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIANO

Las técnicas de diagnóstico microbiano están en continuo desarrollo. Mientras que **los cultivos han brindado conocimiento considerable acerca de los microorganismos asociados con los estados de enfermedad del periodonto y puede ayudar para evaluar la sensibilidad antimicrobiana, este alcance "clásico" es limitado por el hecho que se enfoca en microorganismos cultivables y por lo tanto tiende a brindar una imagen incompleta. Más recientemente, la búsqueda de patógenos putativos en biopelículas orales se ha extendido de las bacterias cultivables a organismos no cultivables e incluso a virus.** Se está aumentando la atención hacia el microambiente: la comunidad ecológica de todos los microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que comparten nuestro espacio corporal. Se ha mostrado recientemente que el microambiente oral es altamente diverso, y consiste en aproximadamente 19000 filotipos. Este elevado número fue detectado por una pirosecuencia-454 de muestras de saliva y placa tomadas de 98 adultos periodontalmente sanos. Una mayor proporción de secuencias bacterianas de individuos sanos no relacionadas eran idénticas, apoyando el concepto de "centro del microambiente en salud" (el conjunto de filotipos compartidos por individuos sanos). Sin embargo **es de interés notar que se encontró también una considerable variación en las microbiotas supra y subgingival de sitio a sitio en un mismo sujeto. Estudios recientes han demostrado que hay muchas especies, además de los patógenos reco-**

**nocidos normalmente, que probablemente se asocian con la periodontitis.** Estos microorganismos pueden ser considerados como patógenos comensales oportunistas asociados a las infecciones periodontales.

Luego de décadas de enfocarnos en los cultivos puros de las bacterias, y en unos pocos complejos bacterianos, se aclaró que, para manejarlas en nuestro beneficio, necesitaríamos entender cómo la microbiota opera en un ecosistema dinámico que les provee la cavidad oral. La interrelación entre los microorganismos orales, el sistema inmune de defensa, y la estrategia de prevención o tratamiento seguida por un odontólogo, define el resultado: salud, transición hacia la enfermedad, o recuperación de la infección.

### OBJETIVO

El World Workshop in Periodontics se enfocó en un pequeño grupo de especies periodonto-patógenas, a aquellas que eran detectadas por los métodos "clásicos" de detección como el cultivo, y para los cuales había suficientes datos disponibles para considerarlos como potencialmente patógenos. Sin embargo este enfoque en un pequeño grupo, ha distraído nuestra atención de otros posibles, y quizás igualmente importantes, patógenos que no son fácilmente aislados, cultivados e identificados. Para evaluar la extensión en la cual el resultado de nuevos alcances moleculares ilimitados cambian nuestra perspectiva hacia la composición de la microbiota subgingival o tiene consecuencias para la decisión clínica, decidimos emprender una revisión de la literatura actual.

### ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA Y RESULTADOS

Buscamos en la biblioteca nacional de datos de medicina de EEUU (MEDLINE-PubMed) publicaciones que usaron alcances moleculares ilimitados para la detección de la microbiota subgingival (identificación de especies sin preselección). Se consideraron las siguientes técnicas: 454-pirosecuencia, o clonación y secuenciación del ribosoma 16S DNA (rDNA) utilizando preparaciones universales para la amplificación de PCR. Las condiciones eran: ("Técnicas de diagnóstico molecular" (Mesh)) O "análisis secuenciales" (Mesh) Y "enfermedades periodontales/microbiología" (Mesh) O "Periodontitis Agresiva/ microbiología" (Mesh) O Periodontitis Crónica/microbiología "(Mesh)" O "Encía/microbiología "(Mesh)", hasta el 1° de

marzo de 2011. La búsqueda de los titulares seleccionados fue conducida por W.C y M.F. Los resúmenes fueron seleccionados por W.C y E.Z. La lista de referencia de estudios primarios disponibles fue revisada para identificar artículos adicionales relevantes para suplementar la búsqueda.

La búsqueda electrónica identificó cerca de 1.641 titulares potencialmente relevantes. Luego de la selección de los titulares, 80 estudios fueron seleccionados para la selección de resúmenes. De éstos, 8 cumplían con el criterio de alcance ilimitado. Del manual de búsqueda, 2 estudios más fueron detectados e incluidos. La heterogeneidad de los datos previno el análisis cuantitativo. La tabla 1 resume las principales características de estos estudios. Como la definición de especies es controversial, en particular cuando solo los datos de secuencia molecular estaban disponibles, se utilizó el término filotipo. Todos estos, excepto 2 (6 y 30) carecían de una definición clara de parámetros clínicos, y los datos eran generados por un pequeño número de grupos de investigación. Los artículos seleccionados eran heterogéneos con respecto a la condición clínica de los sujetos, la selección de sitios analizados y los procedimientos para la muestra. Los estudios todos incluían un número relativamente pequeño de sujetos.

Un estudio de referencia identificó 2522 clones bacterianos en muestras subgingivales de 31 sujetos y reveló muchas especies nuevas. Los autores reportaron que los patógenos periodontales clásicos eran un típico componente en minoría de la microbiota subgingival, y documentaron que **la placa subgingival humana alberga varios cientos de especies bacterianas o filotipos, la mayoría de las cuales son no cultivables. De la misma manera, el 30% de las nuevas especies fueron identificadas en la placa subgingival de 26 sujetos con periodontitis agresiva generalizada. Este es el único estudio que con un alcance ilimitado que encontró que la P. gingivalis es relativamente dominante en la enfermedad.**

Las especies anaerobias Gram +, fueron más comunes en sujetos con periodontitis que en sujetos sanos. Los nuevos candidatos identificados excedieron a la P.gingivalis y a otras especies previamente calificadas como periodontopatógenas. La diversidad de la comunidad microbiana no se correlacionaba ni con la salud periodontal ni con la enfermedad, pero la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* estaba significativamente asociada con la enfermedad, así como *Treponema socrasnkii* y *Pseudomonas*. En un análisis de 10 pacientes que sufrían

de periodontitis agresiva generalizada, el 57% de la secuencia de clones (40 taxones) representaban filotipos para lo cual no se habían reportado cultivos aislados. Los más prevalentes eran selenomonas y estreptococos. Los clásicos patógenos periodontales putativos, como *A. actinomycetemcomitans*, estaban por debajo del límite de detección.

**La falta de asociación consistente entre la enfermedad y los patógenos periodontales putativos P.gingivalis, T.forsythia y T.denticola por supuesto no prueba que estas especies no sean importantes en la periodontitis.** Además, todavía queda por establecerse si los nuevos microorganismos identificados, como *Filicator alocis*, *Dalister pneumosintes*, TM7, *Arcaea*, y *Campilobacter gracilis* - organismos que se encontraron en asociación con periodontitis - realmente causan periodontitis. Por otra parte, se encontró una variación considerable en la composición bacteriana entre los estudios que utilizaron alcances ilimitados. Una posible razón para esto puede ser el uso de diversos estudios de PCR establecidos.

**Lo que aparenta de los estudios resumidos en la tabla 1 es que un porcentaje sustancial (40-60%) de la microbiota subgingival no había sido identificado previamente.** Estos porcentajes son acordes con los resultados de DEWHIRST y col., quienes analizaron alrededor de 34753 clones orales de secuencia 16S ribosomal RNA (rRNA) para proveer un conjunto de referencia de secuencia de genes 16SrRNA con lo que construyen una base de datos de microbiota oral en humanos. Hasta ahora, los alcances ilimitados tienden a indicar que los alcances más "clásicos" (cultivo, tiempo real de PCR y análisis en tablas DNA-DNA) no son capaces de identificar todos los patógenos periodontales.

## ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son ampliamente utilizados para tratar infecciones bacterianas. En los pacientes periodontales, los antibióticos están aumentando considerablemente como una opción de tratamiento. Sin embargo, muchos trabajadores en esta disciplina han enfatizado la necesidad de limitar el uso de antibióticos para prevenir el desarrollo de resistencia bacteriana. **En general, los antibióticos deben ser prescriptos preferentemente en base a un diagnóstico microbiológico.** Con respecto a esto, algunos autores estiman la identificación de supuestos patógenos periodontales como un valioso

coadyuvante. **Recientemente se concluyó que las pruebas microbiológicas pueden proveer alguna dirección en la elección de un agente antibiótico específico, principalmente en casos periodontales que no responden a la terapia inicial o al uso previo de antibióticos. Sin embargo, la mayoría de evidencia sostiene que el uso de estas pruebas se baso en reporte de casos. Nosotros pensamos que deberíamos ir un paso adelante: basados en la evidencia microbiológica actual, existen una multitud de patógenos potenciales en el ambiente subgingival que no pueden ser identificados con exámenes de rutina. Por lo tanto, si los antibióticos, de hecho son para ser usados, un alcance más realista sería combatir la microbiota periodontal utilizando antibióticos de amplio espectro.**

La implementación del monitoreo microbiológico ha sido sugerido como una medida preventiva para reducir el riesgo de periodontitis en adolescentes. Sin embargo, como fue citado por Mombelli y col. "hasta que un estudio intervencionista identifique una decisión terapéutica superior que amoxicilina y metronidazol para *A. actinomycetemcomitans* (casos de JP2 positivos), la utilidad de dichas pruebas se mantiene hipotética. Los mismos principios se mantienen válidos para cualquier otro miembro de la microbiota subgingival y de cualquier otra forma de periodontitis". Las pruebas de laboratorio, de hecho, solo son significativas cuando la información adquirida ayuda a dirigir las medidas terapéuticas y cuando la misma provee una terapia óptima. **Como fue resaltado anteriormente, no deberíamos pensar en términos de "patógenos" sino no en términos de "una comunidad microbiana perturbada".**

Nos gustaría que todavía, 8 años después de la revisión de LISTGARTEN & LOOMER (58), la selección de especies "biomarcadores" discriminatorias y su significado diagnóstico para guiar las medidas terapéuticas es cuestionable porque parece ser que las diferentes formas de enfermedades periodontales no han sido todavía caracterizadas por diferentes perfiles microbiológicos específicos. Sin embargo, el hecho que una pequeña proporción

de la microbiota total sea reconocida rutinariamente por si sólo no desacredita el uso de marcadores de bacterias sustitutas para los propósitos de investigación.

**Con respecto a lo anterior, la información microbiológica parece no tener un valor consistente para proveer opciones de antibióticos óptimos para los pacientes con periodontitis.** Incluso puede distraer al clínico en un diagnóstico clínico claro y el uso apropiado de otras herramientas (por ejemplo el índice de placa, profundidad al sondaje, sangrado al sondaje y el nivel de inserción clínica) para seguir el resultado de las medidas terapéuticas. Es obvio que el tratamiento periodontal será más efectivo en una práctica periodontal especializada, donde el objetivo principal es guiar al paciente hacia una mejora cuidadosa y consistente en su higiene oral y su hábitos de estilo de vida. **Los antibióticos pueden ser de utilidad en el tratamiento de periodontitis agresivas, pero no debe distraer la atención del clínico en cuanto a las medidas preventivas, terapia inicial y un adecuado cuidado de mantenimiento.**

**El régimen de antibióticos más común y exitoso reportado hasta la fecha es metronidazol más amoxicilina, como un resultado de sus efectos sinérgicos.** Sin embargo, no hay estudios clínicos estrictamente controlados en los que las diferentes estrategias de tratamiento hayan sido probadas en grupos de pacientes comparables. **Estudios moleculares recientes, utilizando clonación y secuenciación, han identificados varios organismos Gram+ y Gram- no cultivables y selectivos que están asociados con periodontitis, sumado a los clásicos periodontopatógenos putativos. Dada la gran diversidad de la composición de la microbiota subgingival, es claro que el tratamiento con amoxicilina + metronidazol, a pesar de ser bastante efectivo en muchos casos, es empírico.** La racionalidad para elegir uno sólo de estos 2 antibióticos parece cuestionable. **Dado el peligro de aumentar la resistencia bacteriana, destacamos la idea de que el uso de antibióticos debería ser restringido. ⇨**

---

*Razonamiento final por parte del lector:*

*Por lo antedicho hoy día el uso de test microbiológicos por parte del clinico es poco útil debido a que muchas especies no son identificadas por los mismos.*

*La opción de amoxicilina metronidazol en los casos que esta indicado parece ser efectiva en muchos casos una pero no deja de ser empirico debido a la falta de conocimiento total de la microflora.*

*Faltan test que permitan reconocer la totalidad de la microflora, hasta ese entonces toda suscripcion antibiotica será empirica.*