

Revisiones Bibliográficas:

**USO DE LA TÉCNICA DE HIBRIDIZACIÓN CHECKERBOARD ADN-ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA PERIIMPLANTARIA. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

**USE OF CHECKERBOARD DNA-DNA HYBRIDIZATION TECHNIQUE FOR PERIIMPLANTITIS MICROBIOTA IDENTIFICATION**

Recibido para arbitraje: 06/07/2006

Aceptado para publicación: 08/05/2007

- **Cássio do Nascimento, João Paulo Mardegan Issa**, Alumno de Pós-Grado (Masterado) en el área de Reabilitação Oral de la Facultad de Odontologia de Ribeirão Preto de la Universidad de San Paulo-FORP/USP
- **Alma Blásida Concepción Elizaur Catirse** Profesora del Departamento de Materiales Dentarios y Prótesis de la Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidad de San Paulo- FORP/USP

**Endereço para correspondência:**

Cássio do Nascimento, Rua Garibaldi, 805, apto- 102CEP: 14010-170 Bairro: Centro

E-mail: [cassionasc@forp.usp.br](mailto:cassionasc@forp.usp.br), Fone: (16) 3635-7457, (16) 9123-0425. Ribeirão Preto - SP, Brasil

**RESUMEN**

El término Periimplantitis hace referencia a la condición de enfermedad en los tejidos de soporte de los implantes bucales. Su etiología es multifactorial, aunque la biopelícula microbiana desempeña un papel esencial en la etiopatogenia de la enfermedad. A través de técnicas de cultivo, se han identificado algunas bacterias implicadas en la etiopatogenia de las periodontopatías, entre estas, especies pertenecientes a los Géneros *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Porphyromonas*. El desarrollo de técnicas de biología molecular permite la identificación de especies bacterianas que antes no eran referidas como parte de la microbiota responsable de la patogénesis periodontal. La detección de la microbiota presente en los sacos periodontales que se originan alrededor de los implantes es necesaria para el establecimiento de la conducta terapéutica a ser instruida, más aún si se toma en consideración que las alteraciones de las estructuras de soporte están directamente relacionadas con muchos de los microorganismos presentes y constituyen una de las causas más frecuentes de fracaso del tratamiento rehabilitador con implantes. El objetivo de este artículo es presentar una revisión bibliográfica de la técnica de hibridación checkerboard ADN-ADN para la identificación de los microorganismos más frecuentemente asociados a la peri-implantitis.

**PALABRAS CLAVE:** DNA-Checkerboard, microbiota periimplantaria, periimplantitis, implantes osseointegrables.

**ABSTRACT**

The periimplantitis term is characterized as a disease that affects the support implant tissues. It has a multifactorial etiology, with an important role of the biofilm on the periodontal diseases. The culture techniques use possibilled to identify bacterias responsible for periodontal alterations, as *Fusobacterium*, *Prevotella* and *Porphyromonas ssp*. The development of the molecular biology techniques possibilled the identification of some bacterial species, that there were not related in the literature and there were responsible for periodontal pathogenesis. The microbiota present on the periodontal pockets in overdentures may contribute in the orientation of the therapeutic procedures, considering that the structural alterations on the periodontal tissues are straightly related to microorganism presence, and it constitutes one of the causes that affect the oral rehabilitation treatment with implants. This, the aim of this study was to present a literature review of DNA-DNA hybridization technique in the identification of the microorganisms more related to periimplantitis.

**KEY-WORDS:** DNA Checkerboard, periimplantar microbiota, periimplantitis, osseointegrated implants

**INTRODUCCIÓN**

El término periimplantitis, que caracteriza la condición de enfermedad en los tejidos de soporte de los implantes, fue definido en el Workshop Europeo de Periodoncia en 1993 (1). Este término no debe ser considerado sinónimo de "falla del implante". La presencia de inflamación en el tejido peri-implante, no significa que inevitablemente esté comprometida la osteointegración

y consecuente pérdida del implante (2).

Lo inicio de la colonización bacteriana se caracteriza por un aumento del número de streptococos anaeróbios facultativos. Entre tanto, anaeróbios gram-negativos fueron aislados en algunos casos en pequeñas cantidades (3). Con el decorrer del tiempo, hay una disminución de los streptococos facultativos y un aumento en la proporción de gram-negativos anaeróbios estrictos, como *Fusobacterium ssp* e *Prevotella ssp*. Las bacterias encontradas en peri-implantitis están asociadas a aquellas encontradas en la periodontitis del adulto, con excepción de los microorganismos *Porphyromonas gingivalis* y *Actinomyces comitans*. (4,5)

La dolencia periodontal, resultado de una infección polimicrobiana, es la mayor y más frecuente enfermedad que acomete a la cavidad oral de los adultos. Es causada por varias especies microbiológicas, tales como *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. gingivalis*, *Tannerella. forshytensis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*. El análisis de los microorganismos presentes en la cavidad oral humana se ha limitado a métodos de análisis de cultivo microbiano convencional. Entretanto, muchas especies encontradas en la cavidad oral permanecen todavía no totalmente caracterizadas o cultivadas. Consecuentemente, estudios evaluando los posibles causantes de las enfermedades de la cavidad oral, como la peri-implantitis, se restringen apenas a las especies cultivables. Por tanto, un gran número de microorganismos no detectados por el método tradicional de cultivo pueden hacer un papel fundamental en el origen y desenvolvimiento de esas enfermedades (6).

En la década pasada, la introducción de nuevas técnicas para identificación de especies bacterianas, a partir de muestras provenientes de placas subgingivales, permitieron ampliar los conocimientos en relación con la composición de la microbiota periodontal, así como el efecto de las terapias periodontales sobre la composición de estas placas. Esas técnicas son más rápidas que las convencionales y son realizadas a través del uso de sondas de ADN (7,8,9).

Para SOCRANSKY et al. (2004)(10), es muy difícil realizar estudios en gran escala sobre los complejos ecosistemas microbiológicos usando técnicas microbiológicas convencionales. Técnicas moleculares de identificación, como la técnica de hibridación checkerboard ADN-ADN permiten identificar un gran número de especies en un gran número de muestras. Es una técnica rápida, sensible y relativamente barata. La técnica consiste en el cruzamiento de las muestras recogidas con las sondas de los microorganismos a ser estudiados, preparadas a partir de su ADN genómico.

Las sondas de ADN genómico vienen siendo utilizadas extensamente en estudios evaluando la composición de placas subgingivales y la microbiota asociada con lesiones endodónticas (8,9,11).

La técnica de hibridación checkerboard ADN-ADN fue descrita por primera vez en 1994, por SOCRANSKY et al. (12), usando sondas específicas de 40 especies bacterianas, determinaron que la placa subgingival contiene especies bacterianas en diferentes complejos. Estos parecen tener diferentes asociaciones con la severidad de la enfermedad periodontal e los varios estados de desenvolvimiento de la placa microbiana (Cuadro 1). Los complejos amarillo y verde, los cuales incluyen varias especies de streptococos, así como de bacilos Gram negativos anaerobios facultativos fueron detectados en el surco gingival sano y al inicio de la formación de la placa. La colonización por especies del complejo naranja parece depender de la presencia de los primeros complejos (amarillo y verde) y comprende las especies pertenecientes a los Géneros *Prevotella sp* y *Campylobacter spp*. Las especies más virulentas (complejo rojo) incluyen *P. gingivalis*, *T. forshytensis* e *T. denticola*. Otras especies fueron agrupadas en un quinto complejo, o púrpura (Ver Tabla 1). Algunas especies como *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *Actinomyces Naeslundii* e *Selomonas noxia* no fueran encuadradas en ningún grupo (13).

La técnica DNA-checkerboard está siendo muy utilizada para examinar la composición microbiana de las placas supra y subgingivales de pacientes saludables y con periodontitis, la relación de la microbiota de la saliva con la dolencia periodontal, la relación del cigarrillo con la composición de la placa subgingival, las diferencias de la composición de la placa subgingival de pacientes de localizaciones geográficas diversas, la relación de la interfaces entre los componentes de los implantes y el acúmulo de placa, así como el efecto de varias terapias periodontales sobre los microorganismos implicados (6,9).

Este medio de diagnóstico ofrece ventajas en relación a los métodos tradicionales de cultivo, como la detección de microorganismos de desarrollo lento, nutricionalmente exigentes/fastidiosos y, todavía, la microbiota no cultivable. Se trata de una técnica precisa y mucho más rápida que las demás técnicas de diagnóstico molecular, pues pueden ser examinadas até 30 muestras de placa microbiana de una única vez contra las sondas de ADN de 45 especies diversas. Además, las muestras colectadas pueden ser conservadas por largos períodos de tiempo (11,15).

DAHLÉN & LEONHARDT (2006) (16), evaluaron a través de la técnica de checkerboard ADN-ADN, la asociación de 13 nuevas bacterias recientemente asociadas a las dolencias periodontales, contra 12 patógenos periodontales conocidos. Cincuenta pacientes participaron en el estudio. Para cada paciente, fueron colectadas las muestras de placa microbiana de los sitios saludables e con dolencia periodontal con conos de papel. Las muestras fueron examinadas en relación a las 25 sondas genómicas de las especies a ser evaluadas. Observaron que de las 25 especies estudiadas, 24 fueron detectadas más frecuentemente en los sitios con enfermedad periodontal cuando se compararon con las zonas sin enfermedad. De las nuevas especies asociadas a las dolencias periodontales, solamente *Prevotella tanneriae*, *Fillifactor alocis* y *Porphyromonas endodontalis* presentaron diferencias estadísticas en relación a los sitios saludables y con dolencia periodontal. Los autores concluyen que estos microorganismos deben ser adicionados a las otras 12 especies usadas para el diagnóstico de la

periodontitis asociada a la microflora bacteriana.

KATSOUKIS y col. (2005) (17), evaluaron el efecto del almacenaje de las muestras bacterianas en relación a la detección microbiológica por la técnica de checkerboard ADN-ADN, bien como la proporción de distribución de los patógenos pertenecientes al complejo rojo de Socransky. Las muestras de las placas sub-gingivales fueron divididas en cuatro grupos: (1) procesamiento mediato, (2) después del almacenaje a +4°C por 6 semanas, (3) después almacenaje a -20°C por 6 meses e (4) después almacenaje a -20°C por 12 meses. La proporción de distribución de los microorganismos pertenecientes al complejo rojo no presentó diferencias entre los tres primeros grupos. Entretanto, la cantidad total de ADN bacteriana evaluado disminuyó significativamente en los grupos 3 e 4. Cantidades relativas de *T. forsythensis*, *P. gingivalis* e *T. denticola* permanecieron estables en el segundo grupo, mientras que en los grupos 3 e 4 tuvieron sus cantidades reducidas. Los autores concluyeron que todas las muestras bacterianas deben ser procesadas siguiendo un protocolo de almacenaje máximo de 6 semanas a +4°C, de modo a obtener mejores resultados cualitativos e cuantitativos, comparados al procesamiento mediato de las muestras.

QUIRYNEN y col. (2005) (18), estudiaron la composición microbiológica por medio de la técnica de hibridación checkerboard ADN-ADN en pacientes sometidos al tratamiento con implantes (Branemark System, Nobel Biocare) mandibulares después de 10 años de funcionamiento. Treinta y siete pacientes edéntulos totales participaron en el estudio, cuyas edades oscilaban entre 36 y 85 años. Fueron divididos en dos grupos: (1) 25 fueron rehabilitados con sobredentaduras (OD) y, el grupo (2) 12 pacientes recibieron prótesis fijas (FFP) sobre los implantes. Las muestras de las placas subgingivales fueran recogidas con el auxilio de conos de papel estériles. Después de 10 años de uso de las prótesis, no hubo diferencias estadísticas, cuanto a la composición de las placas subgingivales entre los grupos estudiados (OD e FFP), ni dentro del grupo OD. La microbiota subgingival colectadas a partir de los sucos periimplantares presentó bajas cantidades de ADN ( $\pm 10 \times 10^5$ ), pero gran frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* (>90%), *P. gingivalis* (>85%) e *T. forsythensis* (30%).

La dinámica de las modificaciones microbiológicas subgingivales durante las primeras semanas, después de la terapia periodontal, todavía no está aclarado. El impacto del ambiente supragingival (saliva, placa supragingival y tejidos blandos) sobre la manutención e re-colonización subgingival después la terapia periodontal todavía es controvertida (19). Los implantes orales posibilitan la observación del modelo inicial de colonización subgingival. QUIRYNEN et al. (2005) (20) estudiaron el desarrollo inicial de la biopelícula bacteriana y el tiempo necesario para que una microbiota subgingival compleja se instale en implantes con bolsas superficiales (<3 mm) y moderadas (>3 mm) realizadas durante la colocación de componente intermediario, cuando comparados con los dientes vecinos del mismo paciente, con bolsas superficiales (?4 mm) y moderadas (>4 mm). Los pacientes fueron orientados para hacer buches con clorhexidina al 0,2% por una semana. Cuatro muestras de placa subgingival fueran colectadas de las bolsas peri-implantares y dientes después de 1, 2 e 4 semanas de la colocación del componente intermediario. El análisis por el método del checkerboard ADN-ADN y cultivo revelaron una microbiota compleja, incluyendo varias especies patógenas (como *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis* e *P. intermedia*), en las bolsas iniciales después de una semana, con un aumento mínimo del número de microorganismos al final de la cuarta semana. El análisis de los resultados demuestra que hasta mismo cuando el ambiente supragingival es la única origen para el inicio de la colonización bacteriana, una compleja microbiota puede desarrollarse en apenas una semana.

#### Cuadro 1 - Complejos Microbiológicos en las placas subgingivales

Complejo	Especie
Complejo rojo	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	<i>Tannerella forsythensis</i>
	<i>Treponema denticola</i>
Complejo naranja	<i>Campylobacter gracilis</i>
	<i>Campylobacter rectus</i>
	<i>Campylobacter showae</i>
	<i>Eubacterium nodatum</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Nucleatum</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Polymorphum</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Vicentii</i>
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>
	<i>Peptostreptococcus micros</i>
	<i>Prevotella ntermedia</i>
	<i>Prevotella nigrescens</i>
	<i>Streptococcus constellatus</i>
	Complejo verde
<i>Campylobacter concisus</i>	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	
<i>Eikenella corrodens</i>	
Complejo amarillo	<i>Streptococcus gordonii</i>
	<i>Streptococcus intermedius</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>
	<i>Streptococcus oralis</i>
	<i>Streptococcus sanguinis</i>
Complejo morado	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
	<i>Veillonella parvula</i>
Otras especies	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype b</i>
	<i>Actinomyces naeslundii genospecies 2</i>
	<i>Selenomonas noxia</i>

## CONCLUSIÓN

Los estudios abordados en esta revisión de la literatura demuestran la variabilidad en la prevalencia de las especies bacterianas detectadas, de forma semejante a lo que ocurre en los dientes. Esto confirma la necesidad de estudios adicionales utilizando métodos de biología molecular para mejor comprensión de la microbiota envolviendo los implantes. De esta forma, podrán obtenerse informaciones adicionales en relación a la etiología y ecología de la enfermedad peri-implantar, en diferentes etapas de desarrollo de la dolencia, proporcionando abordajes más direccionados para el tratamiento, y así garantizar el éxito a largo plazo del tratamiento rehabilitador con implantes.

## REFERENCIAS

1. Albrektsson T. & Isidor F.: Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology. Quintessence Publishing Company (1993); 365-369.
2. Mombelli A., Burgin W., Buser D., Lang N.P., Rutar A. Retrospective assessment of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. Clin Oral Impl Res. (2001); 12: 189-195.
3. Mombelli A., Buser D. & Lang N.P.: Colonization of osseointegrated titanium implants in

- edentulous patients. Early results. *Oral Microbiology and Immunology*. (1988); 3: 113-120.
4. Mombelli A, Van Oosten M.A.C., Schurch E. & Lang N.P.: The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiology and Immunology*. (1987); 2: 145-151.
  5. Mombelli A. & Mericske-stern R.: Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clinical Oral Implants Research*. (1990); 1: 1-7.
  6. Sakamoto M., Umeda M., Benno Y.: Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodont Res*. (2005); 40: 277-285.
  7. Colombo A.P., Haffajee A.D., Dewhirst F.E., Paster B.J., Smith C.M., Cugini M.A.: Clinical and microbiological features of refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*. (1998); 25: 169-180.
  8. Haffajee A.D., Cugini M.A., Tanner A., Pollack R.P., Smith C., Kent R.L. Jr.: Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*. (1998); 25: 346-353.
  9. Ximenez-fyvie L.A., Haffajee A.D., Socransky S.S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in subjects in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. (2000); 27: 648-657.
  10. Socransky S.S., Haffajee A.D., Smith C.: Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. (2004); 19: 352-362.
  11. Siqueira J.F., Rocas I.N., De Uzeda M., Colombo A.P., Santos K.R.: Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of selected endodontic pathogens. *J Med Microbiol*. (2002); 51: 1090-1096.
  12. Socransky S.S., Smith C., Martin L., Paster B.J., Dewhirst F.E., Levin A.E.: Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. (1994); 17: 788-792.
  13. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Jr.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. (1998); 25: 134-144.
  14. Siqueira J.F., Rocas I.N., Favieri A., Santos K.R.N.: Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. (2000); 15: 335-337.
  15. Moraes S.R., Siqueira JR J.F., Colombo A.P., Rocas I.N., Ferreira M.C.S., Domingues R.M.C.P.: Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod*. (2002); 28: 86-89.
  16. Dahlén G., Leonhardt A.: A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. (2006); 21: 6-11.
  17. Ktsoulis J., Lang N.P., Persson G.R.: Proportional distribution of the red complex and its individual pathogens after sample storage using the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Clin Periodontol*. (2005); 32: 628-633.
  18. Quirynen M., Alsaad G., Pauwels M., Haffajee A., Van Steenberghe D., Naert I.: Microbiological and clinical outcomes and patient satisfaction for two treatment options in the edentulous lower jaw after 10 years of function. *Clin Oral Impl Res*. (2005); 16: 277-287.
  19. Petersilka G.J., Ehmke B., Flemmig T.F.: Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000*. (2002); 28: 56-71.

20. Quirynen M., Vogels R., Pauwels M., Haffajee A.D., Socransky S.S., Uzel N.G., Van Steenberghe D.: Initial subgingival colonization of "pristine" pockets. J Dent Res. (2005); 84(4): 340-344.