

Detección de bacterias periodontopáticas en niños con anemia de Fanconi

Karine Lyko¹

Carmem Bonfim²

Elaine Machado Benelli³

Cassius Carvalho Torres-Pereira⁴

José Miguel Amenábar⁴

Resumen

Objetivo: Comparar la prevalencia de cuatro bacterias periodontopáticas incluyendo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Treponema denticola* en muestras de placa supragingival de niños con y sin anemia de Fanconi.

Material y métodos: Muestras de placa supragingival fueron colectadas en 71 personas con edades entre 6-18 años de edad. Las muestras se dividieron en tres grupos: anemia de Fanconi pre-trasplante (n= 25), anemia de Fanconi post-trasplante (n=23) y control (n=24). Las bacterias se identificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar in vitro al gen codificante 16S rRNA.

Resultados: El *A. actinomycetemcomitans* sólo fue encontrado en una muestra del grupo pre-

trasplante. El microorganismo *P. gingivalis* se identificó en una muestra del grupo pre-trasplante y en una del grupo post-trasplante. El *T. denticola* se encontró únicamente en dos muestras del grupo pre-trasplante. El microorganismo *F. nucleatum* se observó en todos los grupos. La presencia de los microorganismos varió del 30% en el grupo control al 58% en el grupo Pre-trasplante. No fueron encontradas diferencias estadísticas entre los grupos.

Conclusión: Los resultados del estudio sugieren que las alteraciones sistémicas encontradas en los individuos con AF no afectan la prevalencia de las cuatro bacterias analizadas.

Palabras clave: Placa dental, Microbiota, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Anemia de Fanconi.

¹ Master en Odontología, Universidad Federal de Paraná, Brasil.

² Médico Responsable Centro de trasplante de médula ósea Hospital de Clínicas, Universidad Federal de Paraná, Brasil.

³ Profesora asociada, Departamento Bioquímica, Universidad Federal de Paraná, Brasil.

⁴ Profesor adjunto, Departamento Estomatología Universidad Federal de Paraná, Brasil.

Artigo Original

Detecção de bactérias periodontopatógenas em crianças com anemia de Fanconi

Resumo

Objetivo: Comparar a prevalência de quatro bactérias periodontopatógenas incluindo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola* em amostras de biofilme supragengival de crianças com e sem anemia de Fanconi.

Materiais e métodos: Amostras de biofilme supragengival foram coletadas em 71 pessoas com idades entre 6-18 anos. As amostras se dividiram em três grupos: anemia de Fanconi pré-transplante (n= 25), anemia de Fanconi pós-transplante (n=23) e controle (n=24). As bactérias se identificaram por meio da reação em cadeia da polimerase para amplificar *in vitro* o gene codificante 16S rRNA.

Resultados: O *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado unicamente em uma amostra do grupo pré-transplante. O microorganismo *P. gingivalis* foi identificado em uma amostra do grupo pré-transplante e uma do grupo pós-transplante. O *T. denticola* foi observado em duas amostras do grupo pré-transplante. O microorganismo *F. nucleatum* foi observado em todos os grupos. A presença dos microorganismos variou de 30% no grupo controle a 58% no grupo pré-transplante. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Conclusão: Os resultados do estudo sugerem que as alterações sistêmicas encontradas nos indivíduos com AF não afetam a prevalência das quatro bactérias analisadas.

Palavras chave: Placa dentária, Microbiota, Reação em Cadeia da Polimerase, Anemia de Fanconi.

Original article

Detection of periodontopathic bacteria in children with Fanconi anemia

Abstract

Objectives: compare the prevalence of four periodontopathic bacteria including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Treponema denticola* in saliva samples from children with and without Fanconi anemia.

Material and methods: Dental plaque samples were collected from 71 children and adolescents,

aged 6–18 years old. The samples were divided in three groups: Fanconi anemia before transplant (n=25), Fanconi anemia after transplant (n=23) and control (n=24). The test bacteria were identified using a 16S rRNA-based PCR analysis.

Results: *A. actinomycetemcomitans* was found only in one sample of Fanconi anemia before transplant group. *P. gingivalis* was identified in

one sample of Fanconi anemia before transplant group and Fanconi anemia after transplant group. *T. denticola* was found in two samples of Fanconi anemia before transplant group. *F. nucleatum* was observed in all groups. The presence of microorganisms ranged from 30% in the control group to 58% in the Fanconi anemia before transplant group. No statistical differences were found between groups.

Conclusion: Systemic alterations found in FA subjects did not affect the prevalence of the four bacteria analyzed.

Key words: Dental plaque, Microbiota, Polymerase Chain Reaction, Fanconi Anemia.

Introducción

La anemia de Fanconi (AF) se caracteriza por insuficiencia de la médula ósea, anormalidades físicas y aumento del riesgo de malignidad. La insuficiencia de la médula ósea progresiva con pancitopenia típicamente comienza a los 7 años de edad, a menudo con trombocitopenia o leucopenia¹.

El trasplante de células tronco hematopoyéticas es la única terapia curativa para las manifestaciones hematológicas de la AF. Idealmente, el trasplante se lleva a cabo antes de la aparición de síndrome mielodisplásico o de la leucemia y antes de que se den múltiples transfusiones de apoyo hematopoyético².

Las condiciones orales asociadas con AF incluyen a las enfermedades periodontales³ y esta susceptibilidad está asociada con el grado y la duración de la granulocitopenia, la severidad de la condición dental preexistente, los cambios en la integridad de la mucosa, así como los cambios en las glándulas salivales y en la microbio-

ta oral⁴. Por otro lado, el uso de quimioterapia, radioterapia, y agentes inmunosupresores antes del trasplante también aumentan el riesgo de la enfermedad periodontal en estos individuos⁴⁻⁷.

La gingivitis y la periodontitis son un conjunto de enfermedades de naturaleza infecciosa e inflamatoria⁸. El factor etiológico primario de este tipo de enfermedades es la presencia de bacterias específicas organizadas en forma de placa dental. La microflora responsable de estas enfermedades es compleja, debido a que se han detectado más de 700 especies bacterianas diferentes en la placa dental. Algunas de las principales especies son: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* y el *Treponema denticola*⁹⁻¹².

Es de particular importancia investigar la colonización temprana de patógenos periodontales, por ser un enfoque importante para la prevención y el tratamiento de la enfermedad periodontal. Sin embargo, no hay ninguna información relacionada con la prevalencia de microorganismos patógenos periodontales en niños con AF antes y después del trasplante. Por estas razones, el objetivo de este estudio preliminar fue comparar la prevalencia de cuatro bacterias periodontopatógenas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Treponema denticola* en muestras de placa de niños con AF.

Material y métodos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital de Clínicas de la Universidad Federal de Paraná, Brasil. Los padres o tutores de los niños recibieron información detallada sobre la naturaleza y los procedi-

mientos involucrados en el estudio y firmaron formularios de consentimiento informado.

Grupos de estudios

Los pacientes con AF fueron elegidos de entre los niños y adolescentes registrados en el Servicio de Trasplante de Médula Ósea del Hospital de Clínicas de la Universidad Federal de Paraná en un período de 5 meses para los chequeos de rutina. Los participantes del grupo control fueron elegidos entre los niños y adolescentes registrados en la Clínica de Odontología de la Universidad Federal de Paraná.

Los criterios de inclusión fueron la presencia de la salud gingival, tanto de los dientes primarios como de los permanentes y la ausencia de uso de antibióticos en los últimos 3 meses. En el grupo de control, otro criterio de inclusión fue la ausencia de cualquier problema de salud sistémica conocido.

Colecta de las muestras

La colecta de la placa supragingival se realizó con una cureta periodontal McCall sobre las superficies vestibulares y linguales de todos los dientes.

Las muestras recogidas se colocaron en tubos de 1,5ml que contenían 50 μ l de tampón (50 mM de Tris-HCl, pH 7,6; EDTA 1 mM, pH 8 y 0,9% de NaCl). Todos los tubos fueron etiquetados con el código de cada paciente. Todas las muestras fueron almacenadas en una nevera a -20°C. Todas las análisis fueron realizadas en un período entre 7 y 10 días después de la colecta.

Extracción de ADN

Las muestras de placa dental fueron descongeladas y centrifugadas a 10.000 \times g durante 5 min en

una microcentrífuga a 4°C. El sobrenadante se desecho y el precipitado resultante se lavó dos veces más con 1 ml de agua estéril. El precipitado se reconstituyó con 0,5 ml de agua estéril, y se incubó a 55°C durante 120 min. Las muestras se centrifugaron otra vez, a 10.000 \times g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se utilizó para el análisis de PCR.

Protocolo de PCR

La concentración de ADN se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, DE, EE.UU). Los iniciadores específicos de las especies utilizadas para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de este estudio se encuentran en la **Tabla 1**. Las secuencias de los cebadores fue seleccionada con base en el trabajos anteriores^{13,14,15}. Los ácidos nucleicos fueron extraídos de las cepas ATCC de cada una de las bacterias y se amplificó el gen 16S rRNA. El medio de reacción para la amplificación de PCR contenía 100ng de ADN, 10pmol de cada cebador y 10 μ l del tampón de reacción 2X verde GoTaq® (pH 8,5) (GoTaq® ADN polimerasa, 400 μ M de dATP, 400 μ M de dGTP, 400 μ M de dCTP, 400 μ M de dTTP y 3 mM MgCl₂). Los ADN aislados de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522, *P. gingivalis* ATCC 33277, *F. nucleatum* ATCC 25586 y *T. denticola* ATCC 33520 fueron probados con los cebadores especie-específicos como controles positivos. Se utilizó agua destilada estéril como control negativo para cada serie de reacciones.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador programable (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemania) utilizando el programa listado en la **Tabla 1**. Después de la amplificación, 10 μ l de cada producto de PCR fue analizado por medio de electroforesis en un gel

Tabla 1. Cebadores y condiciones para la identificación de los microorganismos.

BACTERIAS	SECUENCIA DE LOS CEBADORES "FORWARD" Y REVERSO (5'-3')	LONGITUD DEL AMPLICÓN (bp)	PERFIL TÉRMICO	REFERENCIA
<i>P. gingivalis</i>	F: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG R: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404	1 ciclo de 2 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C	Slots et al. [14]
<i>T. denticola</i>	F: TAA TAC ATG TGC TCA TTT ACA T R: TCA AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316	1 ciclo de 2 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C	Slots et al. [14]
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	F: AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC R: ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	557	1 ciclo de 5 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C.	Ashimoto et al. [13]
<i>F. nucleatum</i>	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG R: GTC ATC GTG CAC ACA GAA TGG CTG	360	1 ciclo de 2 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s a 65°C y 45 s a 72°C.	Vickerman et al. [15]

de agarosa al 2%. El gel fue teñido con 0,03g/ml de bromuro de etidio para la visualización (**Figura 1**). La abundancia relativa de cada producto de PCR se determinó mediante análisis cuantitativo de las fotografías digitales de los geles utilizando el software Labworks 4.5 (UVP Products, Upland, CA). Una escala de 100-pb (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) se usó como patrón de peso molecular.

Análisis estadístico

Los test ANOVA, chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher fueron utilizados para determinar la asociación las variables y los diferentes

grupos, escogiendo un nivel de significancia de 95%.

Resultados

Un total de 34 niños y adolescentes participaron del estudio. El grupo AF se dividió en dos subgrupos: Pre-trasplante (n = 13) y Post-trasplante (n = 8). El grupo control tuvo 13 participantes. Datos demográficos de todos los grupos se presentan en la **Tabla 2**. Cuando se compararon los parámetros demográficos, no se observó ninguna diferencia estadísticamente entre los grupos.

Los cebadores para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, y *T. denticola* demos-

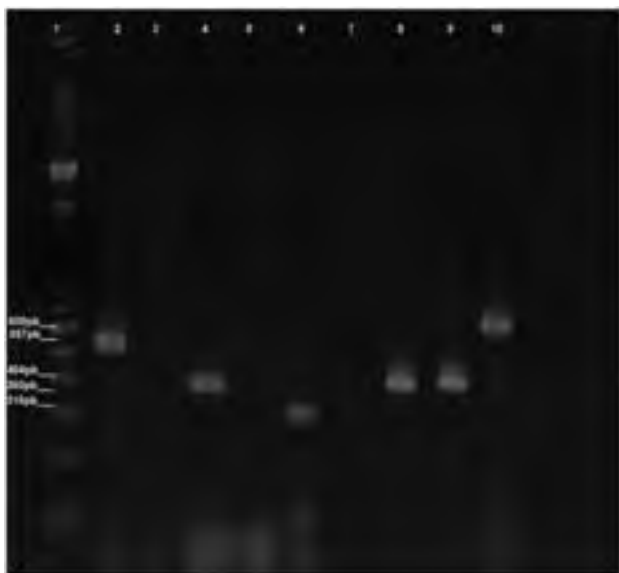


Figura 1. Perfil de migración electroforética de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores de los diferentes microorganismos en la placa supragingival.

Electroforesis en el gel de agarosa 1,5%.

1. Marcador de peso molecular de 100pb (INVITROGEN)
2. ADN de *A. actinomycetemcomitans* (557pb).
3. Muestra de ADN extraído de la placa supragingival amplificada con cebadores de *A. actinomycetemcomitans* (557pb).
4. ADN de *P. gingivalis* (404pb).
5. Muestra de ADN extraído de la placa supragingival amplificada con cebadores de *P. gingivalis* (404pb).
6. ADN de *T. denticola* (316pb).
7. Muestra de ADN extraído de la placa supragingival amplificada con cebadores de *T. denticola* (316pb).
8. ADN de *F. nucleatum* (360pb).
9. Muestra de ADN extraído de la placa supragingival amplificada con cebadores de *F. nucleatum* (360pb).
10. Muestra amplificada con cebador control.

traron amplificación específica de cada especie bacteriana y no amplificaron el ADN de otras especies, validando así su especificidad.

El *A. actinomycetemcomitans* sólo fue encontrado en una muestra del grupo pre-trasplante.

El microorganismo *P. gingivalis* se identificó en una muestra del grupo pre-trasplante y en una del grupo post-trasplante. El *T. denticola* se encontró únicamente en dos muestras del grupo pre-trasplante. El microorganismo *F. nucleatum* se observó en todos los grupos. La presencia de

Tabla 2. Datos demográficos de la población estudiada.

Variables	Anemia de Fanconi		Control (n=13)	P
	Pre-trasplante (n=13)	Post-trasplante (n=8)		
Edad en años ± DP (intervalo)	10,60 ± 3,93 (6-18)	11,74 ± 3,12 (6-17)	10,54 ± 3,75 (6-18)	0,449
Género:				
Masculino	8	4	8	0,844
Femenino	5	4	5	
Renta familiar 1	1	1	2	0,144
Edad de detección de la anemia ± DP (intervalo)	6,33 ± 3,19 (1-13)	6,90 ± 3,95 (1-13)	-----	0,602

¹ Salarios mínimos de Brasil. Un salario equivalente a U\$300.

los microorganismos varió del 30% en el grupo control al 58% en el grupo Pré-trasplante. No fueron encontradas diferencias estadísticas entre los grupos. La distribución de los microorganismos por grupo se presenta en la **Tabla 3**.

Discusión

Este es el primer estudio que evalúa la prevalencia de microorganismos periodontopatógenos en niños con anemia de Fanconi antes y después del trasplante, en la placa dental. Por este motivo, las bacterias incluidas en este trabajo son de aquellas consideradas más relevantes por la literatura científica^{16,17}.

Uno de los principales aspectos de prevención de enfermedades periodontales es la identificación de los individuos con alto riesgo. La presencia de patógenos es uno de los indicadores más importantes periodontales¹⁸ y como las personas con anemia de Fanconi son susceptibles a infecciones el propósito de este estudio fue detectar cuatro bacterias asociadas con la enfermedad periodontal en esta población.

La frecuencia de los microorganismos periodontales en la placa supragingival de los grupos pre-trasplante, post-trasplante y control fueron

62%, 38% y 30%, respectivamente. En un único individuo del grupo pre-trasplante se observó la presencia de los cuatro microorganismos analizados. En el grupo post-trasplante se observó la presencia de *P. gingivalis* y *F. nucleatum* y en el grupo control sólo se observó *F. nucleatum*.

La ausencia del *P. gingivalis* en el grupo control y del *T. denticola* en los grupos post-trasplante y control fue similar a la observada por Kimura et al.¹² en 144 niños sanos de entre dos y 13 años de edad. Por otra parte, Nowzari et al.³ observaron la presencia de *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum* en la placa dental de un paciente de 11 años de edad con AF y periodontitis agresiva. Sin embargo, el *T. denticola* y el *P. gingivalis* no fueron analizados.

La presencia de *A. actinomycetemcomitans* también se ha observado con frecuencia en pacientes jóvenes con periodontitis agresiva¹⁹, en los pacientes después de un trasplante de médula ósea⁷, en sujetos jóvenes sistémicamente sanos¹² y los jóvenes con y sin gingivitis²⁰. La presencia de microorganismos en diferentes situaciones clínicas y sistémicas confirma la teoría de la caja de la tarjeta ecológico en el que sólo la presencia del microorganismo no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad²¹.

Tabla 3. Prevalencia y distribución de las bacterias investigadas en cada grupo.

Bacteria	Anemia de Fanconi		Control (n=13)	p
	Pre-trasplante (n=13)	Post-trasplante (n=8)		
A. actinomycetemcomitans	1 (8%)	0	0	0,435
F. nucleatum	1 (8%)	1 (12%)	0	0,467
P. gingivalis	2 (16%)	0	0	0,180
T. denticola	7 (58%)	3 (38%)	4 (30%)	0,475

Pattni et al.⁷ encontraron una alta prevalencia de *P. gingivalis* en sujetos con leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, el mieloma, mielodisplasia y linfoma no Hodgkin, todos antes del trasplante de médula ósea. Tres meses después del trasplante hubo una reducción del 12% al 5% y seis meses después no se detectó la presencia de *P. gingivalis* en los mismos individuos. La justificación de la reducción de la *P. gingivalis* fue el uso de la terapia con medicamentos antibióticos. En el presente estudio la terapia con antibióticos no se puede considerar como un factor de reducción de la frecuencia de los microorganismos en la placa dental, ya que los individuos en los que no se detectaron los microorganismos investigados no utilizaban antibióticos en el momento del estudio.

Por otro lado, el grupo pre-trasplante puede haber mostrado una frecuencia más alta de los microorganismos en la placa supragingival debido al régimen de acondicionamiento antes del trasplante, que promueve la pancitopenia, resultando en la vulnerabilidad a las infecciones virales, fúngicas y bacterianas²².

Entre los microorganismos estudiados el *F. nucleatum* fue el que apareció con más frecuencia. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que *F. nucleatum* es un colonizador primario y coagregador de los microorganismos en la placa dental, por lo tanto, los otros microorganismos se adhieren a la placa a través de enlaces con el *F. nucleatum* y requieren un tiempo más largo para la colonización^{23,24}. Por otra parte, la baja frecuencia de los microorganismos de la película supragingival en este estudio también puede haber sido por

la dificultad de estandarizar el tiempo entre la última vez que los participantes cepillaron los dientes y la colecta de la placa. Por ejemplo, microorganismos como el *A. actinomycetemcomitans* necesitan de seis horas para comenzar a aparecer en la placa y con niveles extremadamente bajos²⁵.

Lyko et al.²⁶ evaluaron la presencia y distribución de los mismos 4 microorganismos en la saliva de niños con anemia de Fanconi. Los resultados mostraron que no hay diferencia entre la presencia de los microorganismos y las combinaciones entre ellos. Esto sugiere que las condiciones sistémicas de los individuos con anemia de Fanconi no interfieren con la presencia de estas bacterias en la saliva.

Conclusión

Los resultados del estudio sugieren que las alteraciones sistémicas encontradas en los individuos con AF no afectan la distribución de las cuatro bacterias analizadas. Los métodos de detección de PCR y placa dental proporcionan un método rápido y preciso para la detección de la presencia de patógenos periodontales en la cavidad oral esta población y se necesitan más estudios comparando la presencia de estas especies en la placa dental y el desarrollo de la enfermedad periodontal en pacientes con AF.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior (CAPES).

Referencias

1. Alter BP, Kupfer G, Fanconi Anemia, en: Pagon AR, Bird TD, Dolan CR, Stephens R (Eds.), GeneReviews, Seattle; 1993-2003.

2. MacMillan ML, Wagner JE, Haematopoeitic cell transplantation for Fanconi anaemia - when and how?, *Br J Haematol* 2010; 149:14–21.
3. Nowzari H, Jorgensen MG, Ta TT, Contreras A, Slots J. Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report, *J Periodontol* 2010; 72:1601-1606.
4. Majorana A, Schubert MM, Porta F, Ugazio AG, Sapelli PL. Oral complications of pediatric hematopoietic cell transplantation: diagnosis and management. *Support Care Cancer* 2000; 8:353-365.
5. Lucas VS, Roberts GJ, Beighton D. Oral health of children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplant.* 1998;22(8):801-808.
6. Yalman N, Sepet E, Aren G, Mete Z, Kulekçi, G, Anak S. The effect of bone marrow transplantation on systemic and oral health in Fanconi's aplastic anemia. *J Clin Pediatr Dent* 2001; 25:329-332.
7. Pattni R, Walsh LJ, Marshall RI, Cullinan MP, Seymour GJ, Bartold PM. Changes in the periodontal status of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Periodontol* 2000; 71:394-402.
8. Modéer T, Wondimu B. Periodontal diseases in children and adolescents. *Dent Clin North Am* 2000; 44: 633–658.
9. Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 132–158.
10. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78–111.
11. Umeda M, Miwa Z, Takeuchi Y, et al. The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. *J Periodontal Res* 2004; 39:398–404.
12. Kimura S, Ooshima T, Takiguchi M, et al. Periodontopathic bacterial infection in childhood. *J Periodontol* 2002; 73:20–26.
13. 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; 11:266–73.
14. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of Putative Pathogens in Subgingival Specimens by 16S Ribosomal DNA Amplification with the Polymerase Chain Reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20:305-7.
15. Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J Med Microbiol* 2007; 56:110-118
16. Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 2010; 53:70–88.
17. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135–187.
18. Sakai VT, Campos MR, Machado MA, Lauris JR, Greene AS, Santos CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 2007; 17:192-1997.
19. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:860-6.
20. Gafan GP, Lucas VS, Roberts GJ, Petrie A, Wilson M, Spratt DA. Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:4141–4146.
21. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003; 149:279-294.
22. Sonis AL, Waber DP, Sallan S, Tarbell NJ. The Oral Health of Long-term Survivors of Acute Lymphoblastic Leukaemia: a Comparison of Three Treatment Modalities. *Oral Oncol.* 1995; 31:250-252.
23. Salako NO, Rotimi VO, Preeta R, Khodakhast F. The bacteriology of the supragingival plaque of child dental patients in Kuwait. *Med Princ Pract.* 2004; 13:191-5.
24. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 2006;42:47-79.
25. Li J1, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1311-8.
26. Lyko K1, Bonfim C, Benelli EM, Torres-Pereira CC, Amenábar JM. Salivary detection of periodontopathic bacteria in Fanconi's anemia patients. *Anaerobe.* 2013 Dec;24:32-5.

Recibido: 02-05-2014

Aceptado: 16-05-2014

Correspondencia: Prof. Dr. José M. Amenábar, Departamento de Estomatología Universidad Federal de Paraná, Brasil. Av. Lothário Meissner 632, Jardim Botânico. Curitiba-Paraná-Brasil. CEP: 80210-170. Teléfono: +55-41-3360-4024. Fax: +55-41-3360-4053. Email: jamenaba@ufpr.br