

b.16078822  
o.10177267

G/235  
i 19919463

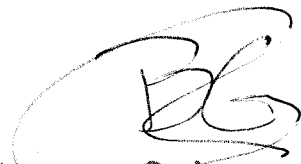
FLUIDO CREVICULAR Y 1  
OSTEOPOROSIS

T.D.  
G/235

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA

OSTEOCALCINA EN LA  
ENFERMEDAD PERIODONTAL Y  
LA OSTEOPOROSIS

TESIS DOCTORAL

  
Berta Goberna Pesudo  
Sevilla, 2003

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

---

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 065 número 238 del libro  
Correspondiente.

Sevilla, 24 de Julio de 2003

El Jefe del Negociado de Tesis

Pereza Raffille

**D. PEDRO BULLON FERNÁNDEZ, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático de Universidad del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla**

**D. RAMON PEREZ CANO, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático de Universidad del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla**

**D ANGEL MARTINEZ-SAHUQUILLO MARQUEZ, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular de Universidad del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla**

**CERTIFICAN**

**Que el trabajo titulado “Osteocalcina en la enfermedad periodontal y en la osteoporosis” desarrollado por D<sup>a</sup> Berta Goberna Pesudo , para optar al grado de Doctor ha sido realizado bajo nuestra dirección, estando conforme con su presentación como Tesis Doctoral.**

**Y para que así conste, firmamos el presente documento en Sevilla a 4 de julio de 2003**

  
**Fdo Prof. Pedro Bullón Fernández**

  
**Fdo Prof. Ramón Pérez Cano**

**Fdo Prof Angel Martinez-Sahuquillo**

**INDICE.**

<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>4</b>
	▪ <b>Encía normal</b>	<b>4</b>
	▪ <b>Gingivitis</b>	<b>7</b>
	▪ <b>Periodontitis.</b>	<b>11</b>
	▪ <b>Fluido crevicular</b>	<b>18</b>
	▪ <b>Osteocalcina</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>Material y Método.</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados.</b>	<b>30</b>
<b>5.</b>	<b>Discusión</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>52</b>

## INTRODUCCION

### ENCIA NORMAL:

#### HISTOLOGIA

Se considera una encía normal aquella que presenta un color rosado, su consistencia es firme y cuyo margen gingival presenta un aspecto festoneado, la papila interdental es firme, no sangra al ser sondada suavemente y ocupa todo el espacio disponible por debajo del área de contacto de los dientes vecinos (Lindhe 1998)

En la encía encontramos tres tipos de epitelio gingival.

- Epitelio oral o externo: es un epitelio escamoso estratificado, queratinizado o paraqueratinizado que cubre la superficie externa de la encía libre y la encía adherida. Su unión al tejido conectivo subyacente es ondulada con profundas papilas de tejido conectivo separadas por crestas epiteliales.
- Epitelio sulcular: Es un epitelio escamoso estratificado, no queratinizado y fino que recubre el surco gingival. Se extiende desde el límite coronal del epitelio de unión hasta la cresta del margen gingival. Este epitelio puede actuar como membrana semipermeable entre la placa bacteriana y los tejidos gingivales subyacentes. Se diferencia del epitelio oral en que su unión con el conjuntivo tiene menor número de papilas, sus espacios intercelulares son más amplios y se pueden localizar leucocitos entre las células epiteliales.
- Epitelio de unión: Es una banda de epitelio escamoso estratificado de espesor variable. Se han descrito tres zonas de adherencia epitelial, una apical en la que están presentes las células germinativas, una media considerada la de mayor adhesión y una coronal donde existe gran permeabilidad. La adherencia epitelial y las fibras gingivales que refuerzan la inserción al diente forman una unidad funcional denominada unión dentogingival

El espacio entre el epitelio bucal y el epitelio de unión está ocupado por tejido conectivo con gran cantidad de fibras colágenas, la mayoría de las

cuales están organizadas en densos haces bien delineados. Un análisis de la composición de la encía normal revela que aproximadamente el 40% de su volumen esta compuesto por estructuras epiteliales, el epitelio bucal es aproximadamente el 30% y el epitelio de unión el 10%, y el 60% restante esta compuesto por componentes del tejido conectivo, fibras colágenas, células, vasos y nervios; inmediatamente por debajo del epitelio de unión esta el plexo vascular.

El tejido predominante en la henchía es el tejido conectivo en el que podemos encontrar los siguientes tipos de células:

- Fibroblastos: Supone el 65% de la población celular total, esta dedicado a la producción de fibras colágenas y a la síntesis de la matriz de este tejido.
- Mastocitos: son responsables de la producción de ciertos componentes de la matriz, produce sustancias vasoactivas (enzimas proteolíticas, histamina y heparina) que puede controlar el flujo sanguíneo a través del tejido.
- Macrófagos: Su función principal es fagocítica y al igual que el mastocito participa activamente en la defensa del tejido contra sustancias extrañas o irritantes.

Este tejido posee también células inflamatorias de distintos tipos:

- Leucocitos polimorfonucleares
- Linfocitos
- Plasmocitos

## PLACA BACTERIANA COMO FACTOR INICIADOR

Cualquier superficie externa del cuerpo humano esta expuesta a la colonización por microorganismos, siendo de vital importancia que esta colonización sea capaz de esta en equilibrio con el huésped ya que precisamente de este equilibrio va a depender la salud del individuo. En la cavidad oral los microorganismos que se acumulan en las superficies dentales forman la denominada placa bacteriana.

Si se observa una preparación de placa bacteriana al microscopio por transiluminación vemos que aparecen multitud de bacterias de diversas morfologías, también aparecen células del huésped, tanto epiteliales

descamadas del epitelio bucal, como células hemáticas y sobre todo leucocitos polimorfonucleares

A partir de mediados de siglo se comenzaron a realizar estudios epidemiológicos que establecían que la existencia de depósitos dentarios, mineralizados o no, era el factor más importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Estudios más definitivos fueron los desarrollados posteriormente en los que se corroboró que el acumulo de placa bacteriana sobre los dientes induce sobre los tejidos dentarios inflamación (Lang y cols 1998). Este estado inflamatorio crea la posibilidad de un crecimiento bacteriano muy variado produciéndose un cambio continuo en la composición de la comunidad microbiana.

En una primera fase se comenzó a estudiar la composición de la placa bacteriana y si se producía una evolución microbiológica de la misma a lo largo del tiempo, para ello se realizó una investigación llevada a cabo por Løe en 1965 (Løe y cols 1965) en el que estudiaron la evolución de la acumulación de placa bacteriana durante un periodo de 2-3 semanas, analizando muestras de la misma en intervalos regulares y sometiénolas a examen bacteriológico, viendo que en un comienzo el 90% de las bacterias eran cocos y bacilos Gram+, el 10% restante eran Gram-. Durante los dos días siguientes no solo creció el número de bacterias, sino que variaron las proporciones de las mismas pasando los cocos y los bacilos Gram- a constituir una proporción mayor. Del 3º al 4º día aparecieron *fusobacterias* y bacterias filamentosas. Del 5º al 9º día espirilos y espiroquetas. Al partir del 7º día los cocos y bacilos Gram+ formaban solo el 50% del total de bacterias, viendo que la placa variaba a una placa bacteriana más anaerobia.

La flora incipiente que aparece en la encía sana a las pocas horas de la limpieza dentaria esta dominada por *estreptococos* sobre todo *Mitior*, mientras que *S. Sanguis* y *Milleri* solo aparecen en pequeñas cantidades; el *S. Mutans* esta ausente o solo aparece en pequeñas cantidades. En cuanto a bacilos Gram+ aparece un predominio del *Actinomices Viscosus*. También se encuentran en pequeñas cantidades bacilos anaerobios facultativos como *Haemophilus*, *Eikenella* y *Actinobacillus actinomicetemcomitans* (Aa) (Lindhe 1998).

## **GINGIVITIS:**

Cuando las bacterias se acumulan sobre el margen gingival durante tres o cuatro días aparece como resultado el desarrollo de una gingivitis, ello crea nuevas oportunidades para el crecimiento bacteriano facilitando una nueva composición mucho más complicada a la placa bacteriana en la que se pueden apreciar tres fases según aumenta el tiempo de prolongación en la encía de la placa bacteriana. En una primera fase aparecen predominantemente cocos Gram+ y Gram- y bacilos Gram+. En una segunda fase aparecen microorganismos filamentosos y durante la tercera fase espirilos y espiroquetas. Una vez instaurada la gingivitis la cantidad de bacterias anaerobias se incrementa respecto de las anaerobias facultativas.

Cuando se inicia el proceso de la gingivitis se producen una serie de transformaciones en los tejidos periodontales adyacentes, durante estas transformaciones inflamatorias aparecen cambios morfológicos en la zona mas coronal de la encía, que en un principio se ven como un cambio ligero de coloración y de textura de los tejidos marginales (Griffiths y cols 1992), pero que si el proceso inflamatorio continúa aparece un enrojecimiento más evidente de la encía y un aumento de la tendencia al sangrado de los tejidos blandos al sondaje.

Las alteraciones microscópicas aparecen incluso antes de que lo hagan las alteraciones clínicas, aparecen profundas alteraciones en la integridad del lecho microvascular por debajo del epitelio de unión, se aporta mas sangre al área por la dilatación de todos los componentes del plexo dentogingival, la presión hidrostática dentro de la microcirculación se eleva, junto con la formación de espacios intercelulares entre las células adyacentes a los capilares y vénulas lo cual produce un pronunciado aumento de la permeabilidad del lecho microvascular a los fluidos y proteínas (como fibrinógeno, inmunoglobulinas, anticuerpos específicos, péptido del complemento y albúmina así como toda otra serie de macromoléculas) , los cuales se filtraran en los tejidos.

Todo este complicado proceso inflamatorio tiene lugar por dos motivos:



1. Efectos directos de la colonización bacteriana. Los efectos patológicos de las bacterias sobre el periodonto a raíz de la colonización bacteriana sobre la superficie del diente son evidentes desde los primeros estadios del proceso. La colonización bacteriana aumenta la capacidad de los tejidos de desencadenar la respuesta inflamatoria, poniendo algunos ejemplos (Academy Reports 1999), se ha visto que el *Fusobacterium Nucleatum* produce productos bacterianos proinflamatorios que afectan directamente a la vascularización gingival, produciendo edema y aumento de la cantidad de fluido gingival. La *P.Gingivalis* produce enzimas como proteasas o colagenasas las cuales son capaces de degradar los tejidos periodontales adyacentes; también son capaces de degradar los tejidos algunos constituyentes bacterianos como los lipopolisacáridos (Theilande 1966).
2. Efectos indirectos de la colonización bacteriana. Procesos destructivos mediados por el huésped.

La mayor parte de todos estos mediadores endógenos de la inflamación tienen más de una función en el proceso y muchos de ellos pueden no tener efectos relacionados con su acción proinflamatoria

- Histamina: aparece en los mastocitos, los cuales están ampliamente distribuidos en el tejido conectivo. La histamina es la responsable de la vasodilatación de los vasos sanguíneos, aumentando así su permeabilidad. La activación de los mastocitos se puede producir por numerosos factores como péptidos del complemento, etc.
- Cininas: son péptidos producidos por la acción proteolítica de las calicreínas (proteasas que se encuentran en el plasma y en los exudados inflamatorios). Probablemente la más activa sea la bradisinina, dentro de cuyos efectos farmacológicos está el aumento de permeabilidad y facilitar la migración de leucocitos. La bradisinina probablemente actúe sobre los vasos sanguíneos desencadenando metabolitos del ácido araquidónico.
- Sistema del complemento: tiene numerosas funciones críticas en la inflamación, se trata de una serie de proteínas que pueden interactuar entre sí en cascada. Normalmente están presentes en estado precursor inactivado en el plasma o en el suero y son activados y depositados en los tejidos y el exudado gingival durante el desarrollo de la gingivitis y

de la periodontitis. Esto ofrece cierta protección para el huésped contra los ataques microbianos, aunque también puede producir daño tisular como consecuencia de la formación de mediadores proinflamatorios.

- Metabolitos del ácido araquidónico, prostaglandinas: Las prostaglandinas y son sintetizadas por los leucocitos y otras células como monocitos y fibroblastos (Academy Reports 1999) a partir del ácido araquidónico y tienen propiedades biológicas importantes en el proceso inflamatorio como reabsorción ósea (Lerner y cols 1998). La mayor parte del ácido araquidónico es producido dentro de los fosfolípidos de la membrana formando prostaglandinas.

Las Prostaglandinas son ácidos grasos insaturados hidroxilados de 20 carbonos identificados con una letra del alfabeto. Las prostaglandinas son importantes mediadores del proceso inflamatorio ya que en investigaciones se han detectado niveles elevados de PGE<sub>2</sub> en los tejidos gingivales inflamados y en el fluido gingival del surco. La PGE<sub>2</sub> es un mediador de la inflamación el cual se forma como resultado de la acción de la ciclooxigenasa sobre el ácido araquidónico. Esta prostaglandina se ha demostrado que tienen múltiples efectos tanto sobre las células estructurales, como sobre las células encargadas de la respuesta inflamatoria, incluyendo la producción de colagenasa como la activación de la actividad osteoclástica. (Offenbacher 1986)

- Radicales de oxígeno: a partir del contacto con los diversos microorganismos de la placa los neutrófilos muestran un gran incremento del consumo de oxígeno lo cual refleja la activación de una membrana de la superficie celular que transforma el oxígeno en diversos radicales como el anión superóxido (-O<sub>2</sub>), Radical hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lindhe 1998). Estas sustancias son imprescindibles para la actividad microbicida de los neutrófilos, aunque también pueden producir daños en los tejidos, lesionando células como fibroblastos y células endoteliales vasculares.

Una vez desencadenado el proceso inflamatorio, comienzan a emigrar desde el plexo vascular numerosas células como neutrófilos, monocitos-

macrófagos y células linfoideas, produciendo todo ello alteraciones también en los tejidos del periodonto.

- Proteasas liberadas por neutrófilos y macrófagos. Los exudados inflamatorios son enriquecidos con enzimas proteolíticas derivadas del plasma y de células de la lesión.
- Citoquinas. Son los mediadores producidos por linfocitos monocitos y macrófagos y por otros tipos celulares. Dentro de las citoquinas se relacionan más con la periodontitis las siguientes:
  - Interleuquina 1 (IL-1): es una citoquina proinflamatoria multifuncional, facilita la incorporación de células inflamatorias a las zonas de infección, produce reabsorción ósea (Kornman y cols 1998, Wiebe y cols 1996), estimula la liberación de PGE2 por monocitos y fibroblastos entre otros. Los niveles de IL-1 se encuentran incrementados en el fluido gingival de las zonas activas de enfermedad periodontal (Academy Reports 1999, Kornman y cols 1998).
  - Interleuquina 6 (IL-6):  
La interleuquina 6 IL-6 es una citoquina implicada en la regulación de la respuesta inmunitaria, la hematopoyesis y la respuesta inflamatoria.  
Se trata de un péptido de 184 aminoácidos derivado de un precursor intracelular de 240 aminoácidos. Muchos tipos de células, entre ellas linfocitos, monocitos y fibroblastos, sintetizan IL-6 en respuesta a determinados estímulos externos como son el daño tisular y la infección. La IL6 tiene múltiples actividades biológicas, entre ellas estimula la formación de osteoclastos los cuales estimulan la reabsorción ósea (Ishimi y cols 1990, Academy Reports 1999, Wiebe y cols 1996). Parece que existe una asociación bastante significativa entre los niveles de IL6 medidos en tejidos locales inflamados y/o en sangre periférica y la actividad de enfermedad periodontal en esas áreas. (Takahashi y cols 1994)

Durante el proceso inflamatorio existe un flujo constante de PMN que acuden en respuesta a factores quimiotácticos hacia la bolsa o surco gingival; aquí se ponen en contacto directo con la microflora subgingival.

## PERIODONTITIS

La periodontitis se define como el proceso de tipo infeccioso que afecta a los tejidos de soporte del diente, produciendo su pérdida. Vamos a hacer una revisión de la evolución desde una encía normal hasta el desarrollo de la enfermedad periodontal, tanto los cambios histológicos que se producen por la inflamación causada por la colonización bacteriana, como los factores sistémicos que pueden afectar a este proceso.

Realmente, aun no esta claro del todo en que momento se produce el paso de gingivitis a enfermedad periodontal, lo que es sabido es que en ausencia de bacterias la gingivitis y la periodontitis no se desarrollan, pero así como todos los individuos que no tienen una buena higiene oral desarrollan gingivitis, no todos los sujetos con gingivitis llegan a desarrollar una periodontitis.

Es sabido que estamos ante un proceso multifactorial, en el que se interrelacionan factores sistémicos del huésped con cambios en la microbiología de la placa bacteriana y que la enfermedad periodontal no es un proceso continuo, sino que está caracterizado por episodios de actividad seguido de episodios de no-actividad, por lo que la investigación microbiológica se centra en la identificación de los microorganismos asociados con los episodios de fase activa de la enfermedad (Lang 1998) para intentar ser utilizados como parámetros de detección y de prevención de la enfermedad periodontal.

En las primeras fases de la periodontitis la flora es muy parecida a la de la gingivitis, pero en los casos de periodontitis avanzada se ha sugerido que determinados patógenos se encuentran regularmente a unos niveles elevados en zonas de destrucción periodontal como son la *Fusobacteria* la *Porphyromonas Gingivalis* y el *Actinobacillus actinomicetemcomitans* (Aa):

- La *fusobacteria* es un microorganismo anaerobio que se puede encontrar en áreas subgingivales en ausencia de enfermedad periodontal apareciendo en

pequeñas cantidades. También en zonas de actividad periodontal es el microorganismo anaerobio más frecuente encontrado componiendo del 5 al 20% de la flora total (Lang y cols 1998).

- La *porphyromonas gingivalis* es un anaerobio estricto Gram- que se engloba dentro del grupo de los anaerobios negropigmentados, este microorganismo es particularmente prevalente en formas de periodontitis destructivas. Los anaerobios negropigmentados son productores de varias enzimas muy potentes como colagenasas y proteasas. De las lesiones refractarias al tratamiento frecuentemente se aísla *P.gingivalis*.
- En estudios relacionados con el Aa se ha visto que este microorganismo aparece en un número elevado en zonas que presentaban lesiones clínicas periodontales (Haffajee y Socransky 1994).

Como hemos visto, desde hace años se plantea la posibilidad de que la evolución de la enfermedad periodontal no sea un proceso continuo sino que se caracterice por episodios de brotes de actividad y de destrucción periodontal seguida de fases de inactividad. (Goodson y cols 1984). Goodson tras un estudio realizado concluye que quizás los pequeños brotes de enfermedad periodontal o incluso las pequeñas pérdidas continuas de inserción pueden no ser detectadas con los métodos convencionales de sondaje, aunque existe un creciente interés en desarrollar nuevas técnicas o métodos de sondaje para minimizar los errores en las mediciones (Breen y cols 1999)

Los periodos de destrucción activa de la enfermedad pueden ser producidos por factores de virulencia relacionados con los microorganismos colonizadores, así como por productos proinflamatorios liberados por el huésped. El proceso comienza cuando el huésped se enfrenta a una serie de microorganismos patógenos los cuales evaden o interfieren los mecanismos de defensa del huésped, por otro lado también se puede producir una reacción desmedida o incorrecta del huésped a la estimulación microbiana, quizás la realidad sea una combinación de las dos cosas.

Utilizando como modelo un microorganismo el cual parece que está claro que participa del proceso de destrucción como es el Aa, es sabido que coloniza el surco y que tiene capacidad para la destrucción de PMN y de monocitos/macrófagos interfiriendo en la primera defensa que tiene el huésped.

Esto desencadena una serie de acontecimientos que se siguen con el daño tisular producido por la gran descarga de productos lisosómicos liberados por los PMN destruidos. Al destruirse también Monocitos/macrófagos se altera la respuesta inmunitaria local, ya que estas células son las encargadas de la producción de anticuerpos. Además el Aa produce un factor inmunosupresor el cual activa a las células T supresoras.

Todo este proceso puede hacer que determinados microorganismos proliferen en el surco invadiendo el tejido conectivo subyacente.

Estos periodos de actividad son seguidos de otros de latencia de la enfermedad en los que se restauran todos los mecanismos defensivos del huésped.

Al ser la enfermedad periodontal un proceso multifactorial, no sólo hay que tener en cuenta los factores bacterianos, sino también los factores causales relacionados con la enfermedad, como son la respuesta del huésped y su susceptibilidad a padecer la enfermedad.

El concepto de susceptibilidad se obtiene de estudios epidemiológicos transversales en los cuales se toman los valores en un momento dado comparando una población sana de otra enferma; de ellos se deduce que en una población determinada los factores considerados clásicamente como etiológicos, es decir la placa y el cálculo producen una respuesta distinta dependiendo de las características del individuo, pudiendo variar de grado leve a severo. De todo esto se deriva la necesidad de realizar estudios sobre la etiopatogenia de la enfermedad periodontal, buscando indicadores que nos permitan diferenciar estos grupos de población. (Bullón y cols 1993)

En los últimos años el papel de los microorganismos como factor etiológico fundamental en la patogenia de la enfermedad periodontal está tomando perspectivas mucho más amplias de las que ha tenido en tiempos anteriores. Hemos pasado en unas décadas de pensar que la enfermedad periodontal era causada por una placa bacteriana no específica, a pensar que es producida por placa bacteriana específica la cual produce destrucción periodontal en determinados huéspedes que son susceptibles a este proceso. La enfermedad periodontal es un proceso multivariable en el que la presencia de determinados niveles de periodontopatógenos específicos no es lo único que nos puede servir para predecir la enfermedad. En los últimos años se ha constatado que

existen factores modificadores de muchas enfermedades crónicas comunes los cuales no causan en sí la enfermedad, pero que amplifican sus mecanismos haciendo su expresión clínica sea más severa, y se puede sugerir que algunos factores modificadores que amplifican el proceso inflamatorio gingival hacen a determinados sujetos susceptibles a padecer una periodontitis más severa (Korman 1998).

Lo fundamental es saber que elementos son importantes, así como la secuencia de acontecimientos necesarios para la expresión de la enfermedad, para ello contamos con los grandes avances que se están produciendo en la biología molecular los cuales nos están ayudando a comprender determinados aspectos de la síntesis, del metabolismo y de los mecanismos de acción de determinados microorganismos especialmente virulentos. Hoy sabemos que solo ciertos genotipos o tipos clonales de determinados patógenos tienen la capacidad de virulencia necesaria para poder producir la enfermedad periodontal en humanos, esto puede explicar en parte porque determinadas personas son portadoras de periodontopatógenos pero no llegan nunca a desarrollar la enfermedad (Offenbacher 1996).

Al ser la enfermedad periodontal un proceso multifactorial, no solamente causado por patógenos virulentos, en los últimos años se tiende a estudiar el fluido crevicular, ya que contiene la mayoría de los componentes pertenecientes al huésped tanto celulares, de los tejidos adyacentes, como humorales, los cuales migran del plexo vascular, así como componentes de la placa bacteriana subgingival. (Curtis y cols 1989)

## FACTORES SISTÉMICOS

Tanto el inicio como la progresión de la enfermedad periodontal se ven modificadas por factores sistémicos, y juegan un papel importante en la expresión tanto de la gingivitis como de la enfermedad periodontal, la forma en la que determinadas enfermedades influyen en el inicio como en la progresión y severidad de la inflamación del periodonto producida por placa varía según los sistemas o las funciones que se vean afectados. Dentro de los factores sistémicos algunos de los más importantes hoy en día son:

- Inmunodeficiencias primarias
- SIDA
- Diabetes mellitus
- Trastornos congénitos
- Enfermedad de Crohn
- Osteoporosis

#### Inmunodeficiencias primarias:

Los pacientes con alteraciones de los neutrófilos ya sean cuantitativas como cualitativas frecuentemente presentan sintomatología en el ámbito de la cavidad bucal apareciendo gingivitis, periodontitis o úlceras bucales. La periodontitis prepuberal o la periodontitis rápidamente progresiva puede aparecer en pacientes que presentan una disminución en el número de neutrófilos (Vrotsos 1996). También aparece una destrucción periodontal evidente en la neutropenia cíclica y en la neutropenia benigna familiar.

Encontramos alteraciones del periodonto en diferentes tipos de leucemias, fundamentalmente aparecen afectación gingival, de una severidad variable.

#### SIDA

Las alteraciones bucales y periodontales relacionadas con la infección por VIH son muy importantes, ya que muchas veces son la primera manifestación clínica de la enfermedad; las lesiones que pueden aparecer en este tipo de pacientes son muy diversas y varían desde una periodontitis muy severa, lesiones ulcerativas en la encía parecidas a la periodontitis necrotizante y la aparición de un eritema gingival lineal.

#### Diabetes mellitus:

La susceptibilidad de los pacientes diabéticos a la gingivitis y a la periodontitis no está bien demostrada ya que intervienen factores tan diversos como la duración, severidad, grado de control metabólico y niveles de higiene oral; aunque hay estudios en los que parece que los pacientes con diabetes de aparición temprana sufren más frecuentemente gingivitis (Genco 1996) y



vuelven a reiterar que la diabetes es un importante factor de riesgo sobre todo en pacientes con poco control metabólico.

Trastornos congénitos:

La hipofosfatemia se caracteriza por una deficiencia cuantitativa de fosfatasa alcalina lo cual resulta en una alteración de la cementogénesis, por lo que el cemento pierde la capacidad de insertar al periodonto, produciéndose una pérdida prematura de ambas denticiones.

En el síndrome de Ehlers- Danlos tipo VIII aparece un defecto en el colágeno tipo III que puede comprometer la inserción del diente en su alveolo. También se produce una pérdida prematura de los dientes en el síndrome Papillon-Lefèvre, pero aquí es por una destrucción del hueso alveolar de ambas denticiones (Mendieta 1993)

Los pacientes con síndrome de Down parecen tener una mayor susceptibilidad a la enfermedad periodontal severa y a la gingivitis ulcerativa necrotizante que los individuos sanos y que otros grupos de pacientes con discapacidad psíquica.

Enfermedad de Crohn

Parece que existe una relación entre la enfermedad de Crohn y la destrucción periodontal severa. Según algunos estudios esta relación se produce secundariamente a una función anormal de los neutrófilos (Vrotsos 1996). Aunque hay otros autores como Kalmar (Kalmar 1994) que afirman que son necesarios más estudios ya que no todos los pacientes que padecen enfermedad de Crohn presentan una función neutrófila anormal.

Osteoporosis

La osteoporosis es la enfermedad ósea más frecuente en la práctica clínica y se espera que esa cifra aumente por el paulatino incremento de la esperanza de vida de la población, la esperanza de vida ha aumentado mucho en las últimas décadas debido a mejoras muy importantes tanto en la calidad de vida como en los avances médicos. La prolongación de la vida durante años hace que la incidencia de enfermedades como el cáncer o la osteoporosis hayan aumentado mucho.

Más de un tercio de la población femenina del mundo occidental mayor de 65 años sufre signos o síntomas derivados de la osteoporosis (Von Wörmann y cols 1994),

La osteoporosis según la OMS se define como ***una enfermedad sistémica esquelética caracterizada por una disminución de la masa ósea y por una alteración de la microarquitectura del tejido óseo que provoca un aumento de la fragilidad del hueso y con ello un incremento del riesgo de fracturas.***

A su vez la osteopenia es la disminución de masa ósea por unidad de volumen con respecto a individuos del mismo sexo, raza y edad.

En ambos sexos existe un periodo de crecimiento del hueso cortical hasta la cuarta década de la vida, a continuación se inicia un periodo de pérdida progresiva de hueso cortical, y esta reducción es más rápida en la mujer que en el hombre. Las determinaciones de hueso cortical en el segundo metacarpiano muestran que a partir de los 40 años tienen lugar en las mujeres una pérdida ósea promedio de 5,7 % por década y que esta pérdida solo es de un 3,1% en el hombre. Las determinaciones de hueso trabecular de la cresta ilíaca dan un 5,5% de pérdida por década en las mujeres y un 1,6% en hombres (Farreras 1988). En el esqueleto humano hay un 80% de hueso compacto y un 20% de hueso trabecular, en el proceso normal de envejecimiento se pierde un 5% del primero y el 50 % del segundo, lo cual supone una pérdida global del 14%.

Hace años se consideraba que la osteoporosis era una enfermedad que solo afectaba a mujeres ancianas. Sin embargo, en la actualidad se sabe que la deficiencia de estrógenos es solo uno de los múltiples factores que contribuyen a la enfermedad, siendo muy importante también la raza, sexo constitución corporal, ingesta de calcio, el ejercicio físico, el estilo de vida y sobre todo la herencia genética. Una vez alcanzada la masa ósea máxima la cantidad de masa ósea que es reabsorbida por los osteoclastos es equilibrada por la neoformación ósea producido por los osteoblastos. Cuando esta compensación no es totalmente precisa se produce un equilibrio negativo que conlleva a una osteopenia y a una osteoporosis.

La osteopenia puede ser asintomática, para que aparezca sintomatología que nos permita hablar de osteoporosis, la pérdida ósea debe superar el umbral de resistencia mecánica que se establece en un déficit del  $11 \pm 3\%$ .

Según distintos autores la frecuencia de osteoporosis varía de un 12 a un 25% de los individuos con más de 50 años, y estas cifras van aumentando a medida que se eleva la edad de los grupos de población examinados.

En la mayoría de los casos la osteopenia se desarrolla hasta extremos importantes sin aparecer ningún tipo de molestias, no es raro descubrir esta patología como hallazgo casual al realizar algún examen radiológico, pero hay que tener en cuenta que la osteoporosis se hace evidente radiológicamente cuando los huesos han perdido del 30 al 60 % de su contenido en calcio, por lo cual solo se detectan los casos con la alteración bastante evolucionada.

## **FLUIDO CREVICULAR.**

Al ser la enfermedad periodontal un proceso multifactorial, no solamente causado por patógenos virulentos, en los últimos años se está tendiendo a estudiar el fluido crevicular, ya que contiene la mayoría de los componentes pertenecientes al huésped tanto celulares, de los tejidos adyacentes, como humorales, los cuales migran del plexo vascular, así como componentes de la placa bacteriana subgingival. (Curtis y cols 1989)

Durante muchos años el diagnóstico de la enfermedad periodontal ha estado basado en parámetros clínicos y radiográficos; aunque la evaluación de la inflamación gingival, profundidad de sondaje y evidencia radiográfica de reabsorción ósea siguen siendo la base de la evaluación del paciente, es cierto que en los últimos años la periodontología está comenzando a utilizar caminos muy diferentes de valoración de la enfermedad, dirigiendo más el diagnóstico hacia el entendimiento de la base patogénica de la enfermedad que basándose en apreciaciones clínicas.

La enfermedad periodontal está basada en la interacción de la microflora periodontal que encontramos en la cavidad oral y la respuesta multifactorial del huésped ante el proceso inflamatorio, determinados aspectos de esta interrelación huésped-microbio están comenzando a ser entendidos gracias al

análisis bioquímico de muestras de fluido crevicular recogidas en el surco gingival, las cuales están siendo utilizadas como herramientas de diagnóstico para entender la patogenia y la progresión de la enfermedad periodontal, así como la interrelación con otro tipo de enfermedades sistémicas. El entendimiento de las bases patológicas puede permitir el diagnóstico de lesiones bioquímicas antes de su progresión a lesión clínica. Al ser el fluido crevicular un exudado inflamatorio, el cual se produce al filtrarse líquido y proteínas del plasma de la microvascularización a través del tejido conectivo y el epitelio de unión hacia el surco gingival nos permite recoger de forma no invasiva mucha información sobre las bases del proceso inflamatorio que está teniendo lugar en un determinado momento.

El volumen de fluido gingival por sí mismo puede considerarse como un indicador del estado gingival, ya que la cantidad de fluido refleja los cambios en la permeabilidad del tejido (Griffiths y cols 92). Así como en la encía no inflamada aparece muy poco fluido gingival, durante todas las fases de la gingivitis la cantidad de exudado aumenta progresivamente. Dentro de las primeras 24 horas del comienzo del proceso inflamatorio se producen cambios muy importantes en el plexo microvascular por debajo del epitelio de unión, la presión hidrostática se eleva y se forman espacios intercelulares entre las células endoteliales adyacentes a capilares y vénulas. Todo ello produce un aumento del lecho microvascular a los fluidos y proteínas los cuales se filtran al surco gingival.

## **OSTEOCALCINA**

Durante estos últimos años han sido múltiples los marcadores estudiados en el fluido crevicular. Dentro de ellos los más interesantes son los que miden el metabolismo óseo. Esto es debido a que al ser la enfermedad periodontal un proceso de destrucción ósea puede ser interesante el estudio de estos marcadores que nos ayuden a explicar, más detalladamente, los factores etiopatogénicos implicados.

La Osteocalcina es un excelente marcador de formación de hueso, y se encuentra solo en el tejido óseo. Es una proteína Vitamina K dependiente, constituye el 10-20% de las proteínas no colágenas del hueso, siendo en este

grupo la más abundante. Es producida por los osteoblastos y tiene un papel relevante en la reabsorción ósea y en la mineralización. Contiene 489 aminoácidos y 3 residuos gamma-carboxiglutamil en posición 17, 21 y 24 que permiten fijar calcio e hidroxapatita con alta afinidad. Tiene capacidad quimiotáctica para los precursores celulares de los osteoclastos y los monocitos. Sus valores están entre 3-25 ng/ml, se encuentran elevados en los adolescentes y recién nacidos en quienes la concentración es 10 veces más alta, en preadolescentes es 2 a 3 veces mayor que en adultos. En las mujeres se registra un aumento desde la cuarta década de la vida reflejando un incremento en el recambio óseo (Price, Thompson 1995). Se han descrito valores elevados de osteocalcina en suero en períodos de recambio óseo rápido como la osteoporosis, mieloma múltiple y reparación de fracturas (Slovik 1984). La osteocalcina sérica se considera un marcador válido de recambio óseo cuando la reabsorción y formación ósea están correlacionadas, y un marcador específico de formación ósea cuando ambas no estén correlacionadas (Garnero 1998).

Algunos estudios han investigado la relación entre la osteocalcina del fluido crevicular y la enfermedad periodontal. Así, en 14 pacientes se vió una correlación con los parámetros clínicos y una ausencia en los caso de gingivitis (Kunimasu et al 1993). En otro trabajo, se refiere un incremento de la osteocalcina crevicular en gingivitis y peribdontitis (Nakashima 1994). En cambio en otro trabajo sus valores no son capaces de distinguir entre sitios activos e inactivos (Nakashima et al 1996). En un estudio longitudinal en perros demuestran una relación del nivel de osteocalcina crevicular con el recambio óseo, pero no sirve para predecir la pérdida ósea (Giannobile y cols 1995). También, en otro trabajo con 20 pacientes sus valores no son capaces de distinguir en el mismo paciente sitios con poca o mucha profundidad de bolsa (Lee y cols 1999). Parece que la osteocalcina crevicular puede ser indicativo del recambio óseo pero no me serviría como indicador de enfermedad periodontal. Esto podría ser debido a que influyen otros condicionantes de tipo sistémico en esos valores.

### 3- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la enfermedad periodontal es uno de los procesos de mayor trascendencia para nuestra sociedad debido a la alta prevalencia y los daños que produce. El 30 al 40% de la población por encima de los 35 años padece la enfermedad en sus fases iniciales y un 5 a 10% en su forma avanzada. La pérdida de la dentición no supone un peligro vital pero produce una disminución en la calidad de vida de la población adulta, generando un gasto económico importante. Hemos visto que en la patogenia del proceso no sólo está involucrado un factor infeccioso sino también sistémico. Algunas enfermedades generales se han asociado con una mayor susceptibilidad a la periodontitis. Entre ellas destaca la osteoporosis, muy frecuente en la mujer menopausica y que afecta al metabolismo óseo. No existen datos concluyentes que relacionen ambos procesos y a que pueda ser debido esa relación. Sería deseable conocer con mas detalle si existe esa interrelación entre ambos procesos y mejorar el diagnóstico de tal forma que nos ayuden a controlar mejor ambos procesos. Uno de los parámetros que podrían ayudar mas para el diagnóstico de ambos procesos y su posible interrelación es un marcador del recambio óseo como la osteocalcina.

Para ello nos hemos propuesto varios objetivos con el presente trabajo:

- Estudio bioquímico del fluido crevicular.
- Estudiar en mujeres menopausicas la periodontitis y la osteoporosis
- Relacionar la osteocalcina en suero, fluido crevicular y saliva con la periodontitis y la osteoporosis

## MATERIAL Y METODOS.

### Pacientes:

Las pacientes se han conseguido proponiendo a todas las mujeres mayores de 35 años, que acudían a la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla solicitando tratamiento dental durante los años 1998 al 2000, participar en el estudio. Se trataba de mujeres menopausicas ya sea fisiológica o inducida, que no estuvieran bajo tratamiento hormonal sustitutivo y sin diagnostico densitométrico de Osteoporosis.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Historia de enfermedad paratiroidea u otra enfermedad metabólica que afectara al hueso.
- Tratamiento previo durante largo tiempo con TSH.
- Pacientes con menos de tres dientes en boca.
- Tratamiento farmacológico que pudiera alterar el metabolismo óseo.
- Tratamiento hormonal sustitutivo.

A todos los pacientes se les pidió el consentimiento para participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen Macarena.

A todos ellos se les realiza:

#### A) Historia clínica

Se valoran los siguientes datos:

1. Edad
2. Edad a la que se inició la menopausia
3. Años transcurridos desde el inicio de la menopausia
4. Hábito de tabaco y alcohol

#### B) Exploración periodontal

Los exámenes periodontales se realizaron en los gabinetes de la Facultad de Odontología. El material utilizado fue espejo clínico y sonda

manual Hu-Friedy PSP12. La exploración fue realizada por el mismo explorador (el doctorando) previamente calibrado.

#### Determinación de los Niveles de Placa y Sangrado

La presencia de placa en las superficies dentarias se determinó por medio del Índice de Placa Visible, el cual deriva del índice de Placa de Sillness & Løe, siendo utilizado de forma simplificada, ya que se considera la presencia o no de placa visible que se realiza anotando la presencia de placa bacteriana en las superficies proximales, vestibular y lingual, después de secar cuidadosamente los dientes. La valoración se hizo a través de porcentaje.

#### Determinación de la Profundidad de Bolsa, Sangrado al sondaje y Nivel Clínico de Inserción

Se realizó anotando la profundidad de bolsa, midiendo en milímetros desde el margen gingival libre a la profundidad de sondaje, y el nivel de encía clínico, midiendo en milímetros la distancia desde el margen gingival libre con respecto a la línea amelocementaria en 6 superficies por diente, anotándose además la presencia de sangrado al sondaje. Como dato clínico se analizaron la profundidad de bolsa y el nivel clínico de inserción que se obtuvo de la suma de la profundidad de bolsa y del nivel encía. Cuando estaba presente el sangrado se anotó su presencia para cada sitio sondado, siendo calculado su porcentaje.

#### Diagnóstico Periodontal

El diagnóstico periodontal se estableció según el criterio establecido por Machtei y cols (1992). Se consideraron como portadoras de periodontitis (GP) las que presentaron sangrado en más de 5% de los sitios y presentaban pérdida de inserción superior o igual a 6 mm en dos o más sitios y 1 ó más



sitios con profundidad de sondaje igual o superior a 5 mm. El resto se clasificaron como sin periodontitis (GS).

### B) Densitometría ósea.

A las mujeres se les realizó una densitometría ósea en columna lumbar, a la altura de L2-L4 mediante densitómetro de **absorciometría fotónica dual por rayos X (QDR)**, HOLOGIC® QDR-1000.

Los valores de referencia obtenidos con el aparato que hemos usado y para la población de Sevilla son los siguientes:

	MEDIA	DE	MÍNIMO	MÁXIMO
20-29 años	1.014	0.109	0.905	1.123
30-39 años	1.058	0.094	0.964	1.152
40-59 años	1.002	0.142	0.860	1.144
50-59 años	0.938	0.133	0.805	1.071
60-69 años	0.872	0.111	0.761	0.983
70-79 años	0.871	0.101	0.770	0.972
80-90 años	0.823	0.160	0.663	0.983

El **umbral de fractura** se estableció en **0.820 gHA/cm<sup>2</sup>** (-2.5 DE)

Según su DMO, las mujeres fueron agrupadas en:

A) Normales (puntuación T > [-1] DE) que harían de **grupo control**,

B) De baja masa ósea, que sería el **grupo de estudio**, se agrupan como osteopénicas (puntuación T < [-1] DE y > [-2.5] DE), y osteoporóticas (puntuación T < [-2.5] DE).

### C) Osteocalcina

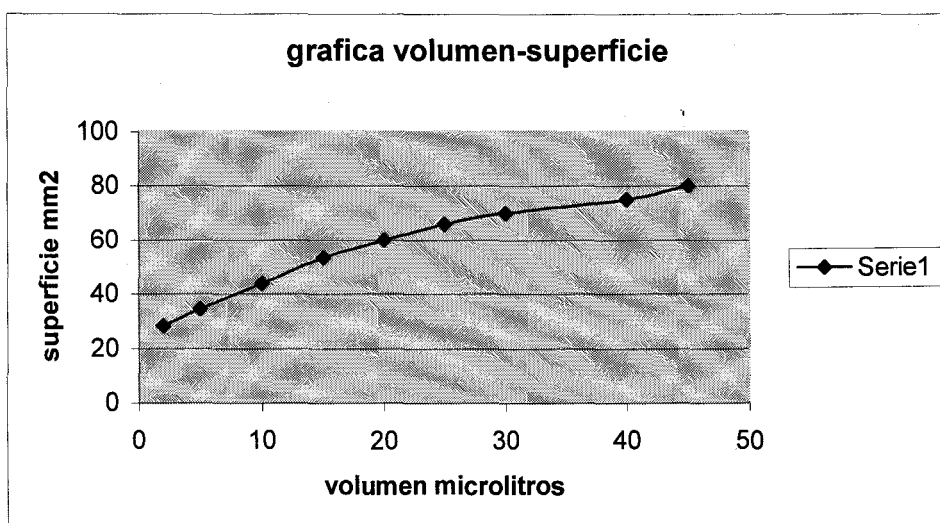
Se determina osteocalcina en tres medios: sangre, saliva y fluido crevicular. En sangre tomando una muestra de suero en ayunas.

Toma de la muestra de fluido crevicular y de saliva: Se utiliza un papel inerte, tipo Watmman 1, con el fin de conseguir por capilaridad la toma de la muestra.

Es importante conocer exactamente el volumen de líquido que absorbe el citado soporte, teniendo en cuenta que el soporte absorbe siempre el mismo

volumen para la misma superficie. Para ello el papel se corta a un tamaño estandarizado (4 mm de ancho y 2 cm de largo), la altura alcanzada por capilaridad deberá ser marcada para conocer con exactitud, una vez secado el papel, el número de mm<sup>2</sup> de los que disponemos para realizar las determinaciones posteriores. Como soporte hemos comprobado la correlación existente entre la superficie de papel y el volumen de fluido crevicular que es capaz de absorber por capilaridad.

VOLUMEN	SUPERFICIE
microlitros	mm <sup>2</sup>
2	28.8
5	34.5
10	44.0
15	53.4
20	60.0
25	66.0
30	70.0
40	75.0
45	80.0



*La tabla muestra la relacion volumen superficie obtenida en condiciones experimentales, en la cual se puede comprobar que la relacion volumen superficie es prácticamente lineal.*

El paciente se cita siempre a la misma hora del día, se aísla la zona con un separador de boca, se limpia la zona con gasa estéril y se coloca el papel en el surco gingival por un periodo de tiempo constante de 2 minutos. Se colocan 4 tiras en la zona anterior de la boca en los espacios interproximales de manera simultánea. Después del tiempo determinado retiramos la tira del espacio interproximal y procedemos a marcar el límite de la migración por capilaridad del fluido crevicular para saber la cantidad de  $\text{mm}^2$  obtenidos una vez que se haya secado la muestra. Dejamos las tiras secar a temperatura ambiente, tras lo cual son introducidas en tubos de vidrio vacutainer y almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . hasta su procesamiento.

En cada paciente, además de la toma anteriormente descrita se obtiene, asimismo, una muestra de saliva, para lo cual utilizamos tiras de papel idénticas a las citadas anteriormente. La muestra se toma siempre de la zona sublingual.

Las muestras, tanto de fluido crevicular como de saliva son identificadas en el extremo proximal de las tiras con la letra "S" en el caso de la saliva y la letra "F" en el caso del fluido crevicular, seguido de un número que corresponde a los pacientes numerados en el libro de protocolo.

Procesamiento de la muestra: Las muestras fueron remitidas al Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla realizándose el siguiente procedimiento:

1. Numerar los tubos cónicos tipo Eppendorf que van a ser utilizados.
2. Medir el número de milímetros de las tiras de papel que van a ser empleados para la dilución.  
De las muestras de saliva utilizamos 15 mm de la tira de papel impregnada con saliva.  
De fluido crevicular emplearemos el máximo de milímetros de cada tira según la cantidad de fluido que se ha recogido.
3. Rotulamos en los tubos tanto los milímetros que van a ser utilizados
4. Con una pipeta tipo Eppendorf añadimos  $200\ \mu\text{l}$  de solución tampón a las muestras de saliva y  $100\ \mu\text{l}$  de las de fluido crevicular, con el fin de reconstruir sus componentes.

5. Dejamos reposar al menos 24 horas con el tubo Eppendorf cerrado para evitar la evaporación y la concentración consiguiente.

#### Técnicas de análisis bioquímico:

##### Determinación del estado total antioxidante (Miller y cols 2001)

Principio del método: Se incuba 3 sulfonato de etilbenciazolina con peroxidasa y agua oxigenada para producir el catión radical ABTS. Tiene un color azul verdoso bastante estable el cual se mide en un fotocolorímetro a 600 nm. Al añadir antioxidante se produce una supresión del color proporcional al grado de su concentración. La lectura de la absorbancia es a los 3 minutos.

##### Determinación de ácido úrico (Krieg 1986)

Fundamento del método: El ácido úrico reacciona con agua y oxígeno en presencia de uricasa dando como producto de la reacción alantoina y agua oxigenada.

Debe conservarse los reactivos protegidos de la luz.

Los valores de referencia son para el hombre 3.4 - 7.0 mg/dL y en la mujer 2.4 - 5.7 mg/dL.

##### Determinación de inmunoglobulinas (Jonson 1993)

Se trata de un método diagnóstico para determinación cuantitativa de inmunoglobulinas en suero humano. El principio del método consiste en la presencia de anticuerpos específicos y una reacción de formación de inmunocomplejos capaces de dispersar un rayo de luz. Esta dispersión es proporcional a la concentración de inmunoglobulinas. La valoración se hace comparando con una curva estándar de concentraciones conocidas. Como reactivos utilizamos antisuero IgG humana, IgA humana e IgM humana. La medición se realiza mediante técnicas nefelométricas.

##### Determinación de interleuquina\_6 (IL-6) (Brailly y cols 1994)

La técnica utiliza anticuerpos monoclonales. Tanto las muestras como el estándar de la curva se incuban con acetilcolinesterasa. La actividad se mide por hidrólisis de un sustrato cromogénico.

#### Determinación de proteínas (Bradford 1976)

Es un método en el cual se produce la unión de coomassie azul brillante G-250 a proteínas.

Es un método muy rápido que se completa en 2 minutos y el color es estable hasta 1 hora.

#### Determinación de albúmina (Tietz 2002)

Esta técnica mide el cambio de color debido a la formación de complejos entre albúmina y verde de bromocresol.

Los valores de referencia para adultos son 3.5 – 5.0 g/dL.

#### Determinación de osteocalcina

Se procede a la determinación de osteocalcina (Banfi y cols 1994, Delmas 1993) mediante la técnica de electroquimioluminiscencia:

Técnica sándwich con una duración total de 18 min.

1ª incubación: 20 µl de muestra, un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti osteocalcina n-N-MID y un anticuerpo monoclonal específico anti osteocalcina N-MID marcado con quelato de rutenio forman un complejo sándwich.

2ª incubación: después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina.

La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. A continuación, se eliminan los elementos no fijados con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción

quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

Los resultados se obtienen a partir de una curva de calibración realizada en el sistema mediante una calibración a dos puntos y una curva maestra incluida en el código de barras del reactivo. La linealidad definida por el límite de detección y la concentración máxima de la curva de calibración se establece en 0,500-300 ng/ml. El límite de detección que equivale a la concentración más baja de Osteocalcina medible que puede distinguirse de cero y se calcula como la concentración situada a dos desviaciones estándar por encima del valor del calibrador de menor concentración de la curva estándar es de 0,500 ng/ml. El volumen mínimo que el analizador utiliza es de 20  $\mu$ l de muestra para realizar una determinación y está en función del tipo de tubo utilizado (volumen muerto).

#### E) Análisis estadístico

Se realiza la valoración de la media y desviación estándar de las variables continuas y para las variables discretas se estudiará la distribución de frecuencias. Para el análisis comparativo de variables discretas se utiliza el test de la chi-cuadrado. Para el análisis comparativo entre variables continuas se realiza el test de análisis de la varianza (ANOVA) para las variables de distribución normal, y si es significativo las diferencias entre grupos se establece con el test de Bonferroni. En las variables de distribución no normal se utiliza el test de Kruskal-Wallis. Para el análisis de correlación entre variables se utiliza el test de correlación de Pearson. El nivel de significación estadística para todos los test se establece en  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Descripción general de la muestra.

Las pacientes que componen la muestra son 150 mujeres que han acudido a la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla para tratamiento dental, de las cuales aceptaron participar en el estudio y completaron todas las pruebas de forma completa 81.

### A) DATOS GENERALES

#### EDAD

La edad media fue de 57,9 años (SD 8,29), con un rango de 38 a 77 años, la distribución fue la siguiente

Edad de la muestra	Total
Hasta 54 años	34 (42,0%)
De 55 a 64 años	30 (37,0%)
65 o más años	17 (21,0%)

#### HABITOS

Consumo de tabaco	Total
Mas de 20 cigarrillos	1 1,1%
Menos de 20 cigarrillos	3 3,4%
Nada	77 95,5%
<b>TOTAL</b>	<b>81</b> 100,0%

Solo el 4,5% de la muestra son mujeres fumadoras ya que la misma se compone en su totalidad de mujeres mayores de 50 años y socialmente no era una practica habitual.

Consumo de alcohol	Total
Mucho	1 1,1%
ocasionalmente	46 53,4%
nada	34 41,9%
<b>TOTAL</b>	<b>81</b> 100,0%

#### EDAD DE INICIO DE LA MENOPAUSIA

La media de edad de inicio de la menopausia era de 48,12 años, con una desviación estándar de 5,29. Las edades oscilaron entre los 30 y los 60 años. El 43,7% (n=36) tuvo la retirada antes de los 48 años y el 56,3% (n=45) después de los 49 años.

#### AÑOS DESDE INICIO RETIRADA DE LA REGLA

La media de años desde que se retiró la regla era de 10,04 años y la desviación estándar de 7,73. Los años oscilaron entre 1 (se les ha retirado ese año) y 29 años. El 28,8% (n=24) llevaba menos de 3 años, el 26,3% (n=21) llevaba entre 4 y 10 años, el 22,5% (n=18) llevaba entre 11 y 15 años y el 22,5% (n=18) llevaba mas de 15 años.

#### B) DATOS PERIODONTALES

De acuerdo a los parámetros reseñados en la población de 81 mujeres se encontró un 61,7% (n=50) con periodontitis (GP) y un 38,3% (n= 31) sin periodontitis (GS).



El nivel medio de bolsa fue de 1,96 (DS=0,04) con un rango entre 1,31-1,45 en GS y de 2,63 (DS=0,06) con un rango entre 1,76-3,88 en GP, la diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0,00$ ).

El nivel medio de pérdida de inserción fue de 2,09 (DS=0,05) con un rango entre 1,31-2,90 en GS, y de 3,54 (DS=0,14) con un rango entre 2,13-7,11 en GP, la diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0,00$ ).

El porcentaje de zonas con sangrado fue de 64,6 (DS=3,10) con un rango entre 25,4-94,0 en GS y de 74,7 (DS=2,43) con un rango entre 40,3-100 en GP, la diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0,01$ ).

El porcentaje de zonas con placa fue de 69,9 (DS=4,9 con un rango entre 0=100 en GS y de 68,8 (DS=4,1) con un rango entre 0-100 en GP, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,85$ ).

### C) DATOS DENSITOMETRICOS

Resultados de la densitometría ósea	Total
normal	40 (49,4%)
osteopenia	12 (14,8%)
osteoporosis	29 (35,8%)

De todas las pacientes que componen la muestra mas del 50% tiene alteraciones óseas de algún tipo, ya sea en forma inicial de osteopenia o ya diagnosticado como osteoporosis.

Como dato de antecedente sistémico de interés se preguntó por la posibilidad de haber padecido una fractura de cadera, ninguna mujer la sufrió, y fractura de muñeca con los siguientes resultados:

Fractura de muñeca	Total
Si	5 6.1%
No	77 93.9%
<b>TOTAL</b>	<b>82</b> 100.0%

#### D) OSTEOCALCINA

Los resultados de osteocalcina en suero fue un valor medio de 7,25 ng/ml (DS=3,63), teniendo en cuenta que los valores normales son en mujeres: 3.7-10.0 ng/ml (poner referencia bibliograf) la distribución fue la siguiente:

Descripcion	Normal o inferior	Superior a normal	
	n	n	%
Osteocalcina	65	10	13.3

El valor medio de osteocalcina en fluido crevicular es de 27,53 ng/ml (DS=26,2) y en saliva es de 5,39 ng/ml (DS=3,12).

#### E) CRUCE VARIABLES

##### a) Periodontitis

Cuando estudiamos la edad según el diagnóstico de periodontitis observamos que aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas ( $p=0,13$ ) en el grupo de mas de 65 años hay una mayor proporción de personas con periodontitis.

	Edad hasta 54 años	Edad de 55 a 64 años	Edad 65 años o más
GS	14 41,2%	14 46,7%	3 17,6%
GP	20 58,8%	16 53,3%	14 82,4%

Si analizamos los valores medios de bolsa según la edad no obtenemos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,59$ )

Edad hasta 54 años n=34	Edad de 55 a 64 años n=30	Edad 65 años o más n=17
2,37 DS=0,55	2,31 DS=0,50	2,48 DS=0,48

Si analizamos los valores medios de pérdida de inserción según la edad obtenemos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,04$ )

Edad hasta 54 años n=34	Edad de 55 a 64 años n=30	Edad 65 años o más n=17
2,85 DS=1,14	2,81 DS=0,85	3,58 DS=1,25

El análisis en estos mismos grupos de edad de los niveles de placa y sangrado no dieron diferencias estadísticamente significativas.

En el análisis de la edad de retirada de la regla no obtenemos diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,32$ ) según el diagnóstico de periodontitis

	Antes de los 48 años	Después de los 48 años
<b>GS</b>	<b>11</b> 31,4%	<b>19</b> 42,2%
<b>GP</b>	<b>24</b> 68,6%	<b>26</b> 57,8%

En el análisis de los años de retirada de la regla no obtenemos diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,47$ ) según el diagnóstico de periodontitis

	Hasta 3 años	De 4 a 11 años	De 11 a 15 años	Mas de 15 años
<b>GS</b>	<b>10</b> 43,5%	<b>8</b> 38,1%	<b>8</b> 44,4%	<b>4</b> 22,2%
<b>GP</b>	<b>24</b> 56,5%	<b>13</b> 61,9%	<b>10</b> 55,6%	<b>14</b> 77,8%

Cuando analizamos los años de retirada de la regla agrupados con menos de 15 años y con mas de 15 años no encontramos diferencias estadísticamente significativa en los valores de bolsa ( $p=0,47$ ); pero sí en los de pérdida de inserción (2,87 hasta 15 años; 3,48 en mas de 15 años,  $p=0,03$ ), en los de sangrado (66,19 hasta 15 años; 77,41 mas de 15 años;  $p=0,08$ ) y en los de placa (66,92 hasta 15 años; 80,75 más de 15 años;  $p=0,06$ ).

En el análisis de los datos densitométricos no obtenemos diferencias estadísticamente significativa ( $p=0,58$ ) según el diagnóstico de periodontitis

	Densitometría normal	Densitometría: osteopenia	Densitometría osteoporosis
<b>GS</b>	<b>16</b> 40,0%	<b>3</b> 25,0%	<b>12</b> 38,3%
<b>GP</b>	<b>24</b> 60,0%	<b>9</b> 75,5%	<b>17</b> 61,7%

En el análisis de los valores medios de densidad de masa ósea en GS fue de 0,9063 y en GP fue de 0,9007, no obteniendo diferencias estadísticamente significativa ( $p=0,87$ ).

Estos datos se ven corroborados cuando analizamos los valores medios de bolsa ( $p=0,34$ ) y pérdida de inserción ( $p=0,13$ ) en estos mismo grupos de densitometría, pues no son diferencias estadísticamente significativas.

## b) Análisis del fluido crevicular

### Capacidad total antioxidante

Los radicales libres son moléculas que contienen uno o más electrones libres. Se trata de moléculas muy reactivas que pueden causar daño y muerte celular. Estos radicales están continuamente en formación en el cuerpo humano.

El organismo se protege de los radicales libres por los sistemas antioxidantes. De este modo tenemos los antioxidantes primarios que transforman los radicales libres como es el caso de la superoxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Igualmente hay antioxidantes secundarios como las vitaminas E, C y terciarios como las enzimas reparadoras de ADN.

Una reducción de la actividad antioxidante total o una actividad anormal de la superoxido dismutasa se relacionan con diversas enfermedades como la artritis reumatoide, enfermedad Crohn y la fibrosis quística.

Hemos estudiado la capacidad antioxidante en el fluido crevicular con el fin de comprobar si es posible su determinación y su posible utilización en procesos periodontales. En la literatura sólo aparecen estos estudios en saliva, no en fluido crevicular, y su relación el ritmo circadiano.

En el suero la capacidad antioxidante es de 0.8 a 1.7 mmol/L. En el caso del fluido crevicular hemos obtenido los siguientes resultados. Para  $n=6$  la saliva contiene  $0.113 \pm 0.008$  mmol/L frente a  $0.408 \pm 0.2$  mmol/L en fluido crevicular.

Como podemos observar la capacidad antioxidante del fluido crevicular es entre 3 y 5 veces superior a la de la saliva, lo que demuestra que el fluido crevicular tiene una capacidad antioxidante mucho mayor que la de la saliva y que se acerca a los niveles del suero.

En cualquier caso la determinación de la capacidad antioxidante en fluido crevicular es una técnica estandarizada que permite la medición cuantitativa de la misma.

#### Ácido úrico.

Es un producto del catabolismo de las purinas. Los límites normales de las concentraciones séricas son en el caso de la mujer de 2.4 a 5.7 mg/dL y en el hombre de 3.4 a 7.0 mg/dL.

La concentración que hemos encontrado para n= 6 pacientes, ha sido en saliva 1.6 mg/dL y en fluido crevicular 3.3 mg/dL.

Tenemos que recordar que el ácido úrico tiene un efecto antioxidante fisiológico y es de interés su aparición tanto en saliva como en fluido crevicular.

#### Inmunoglobulinas.

Son producidas por los plasmocitos como respuesta a la presencia de un antígeno. En una primera fase se producen IgM seguidos del resto de las inmunoglobulinas.

La determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas nos proporciona importante información sobre el sistema inmunitario. Concentraciones elevadas se relacionan con infecciones agudas y crónicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades hepáticas.

La IgA se la considera como la inmunoglobulina de los epitelios. Circula en sangre y al llegar a la célula epitelial se une a un péptido de conexión, glicoproteína denominada pieza secretoria que se ubica entre dos moléculas de IgA formando un dímero. El complejo formado por dímero y la pieza de secreción aparece en la superficie del epitelio como un mecanismo defensivo del mismo.

Hemos medido IgA e IgM tanto en fluido crevicular como en saliva. Se trata de un método cuantitativo que expresa la concentración de inmunoglobulinas en mg/dL.

En el caso de la IgA, es indetectable en saliva mientras que en el fluido crevicular tenemos  $33.18 \pm 6.2$ . Para n= 8.

En el caso de la IgM es así mismo indetectable en saliva mientras que el fluido crevicular obtenemos  $6.3 \pm 1.05$ . Para n= 8.

En ambas inmunoglobulinas nos hemos encontrado unas concentraciones importantes en fluido crevicular mientras que en saliva son tan bajas que no son detectables .

#### Interleuquina-6 (IL-6)

Se trata de una citoquina implicada en la regulación de la respuesta inmunitaria así como de la respuesta inflamatoria.

Es una proteína de 184 aminoácidos derivada de un precursor de mayor tamaño que sufre una glicosilación y fosforilación.

Muchos tipos de células sintetizan IL-6 en respuesta a varios estímulos. Entre las células se incluyen fibroblastos, macrófagos, mastocitos y células endoteliales.

Se han descrito multitud de actividades biológicas entre las que destacamos la diferenciación de linfocitos B, la activación de linfocitos T y la inducción de la síntesis de proteínas en fase aguda.

Hemos determinado en fluido crevicular la IL-6 utilizando anticuerpos monoclonales. En las muestras de fluido crevicular obtenidas los resultados son los siguientes para n= 8. En saliva encontramos  $28.8 \pm 2.3$  pg/mL frente a una concentración en fluido crevicular de  $124.1 \pm 8.4$  pg/mL.

Los resultados muestran que la concentración en fluido crevicular es entre 4 y 5 veces superior a la saliva.

#### Proteínas totales.

El conocimiento de la concentración de proteínas tanto en fluido crevicular como en saliva es importante ya que las proteínas de la saliva representan las enzimas que se segregan en las glándulas salivares como son la amilasa y la lipasa. Por el contrario las proteínas en el fluido crevicular representan la participación de las mismas en el exudado del surco gingival.

Se ha aplicado la técnica por Bradford. Se trata de un método muy sensible capaz de cuantificar las proteínas en microgramos. El método es rápido y sensible.

Para n= 6 hemos encontrado una concentración en saliva de 0.6 mg/dL mientras que en fluido crevicular alcanza 107.8 mg/dL.

Como ha ocurrido en otros parámetros una vez más se demuestra que la concentración de proteínas es muy distinta en la saliva que en el fluido crevicular.

c) Osteocalcina en sangre

Según la siguiente tabla vemos que los niveles de osteocalcina en sangre, según los parámetros de normalidad, no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,38$ ) según la edad.

	Hasta 54 años	De 55 a 64 años	Mas de 65 años
Normal o inferior	27	19	16
Superior a normal	4	7	5

El análisis de los valores medios de los datos en sangre de osteocalcina según el diagnóstico periodontal no nos permite establecer diferencias estadísticamente significativas

Descripcion	GS	GP	p
Osteocalcina	7,76	6,83	0,27

Cuando comparamos los valores medio de bolsa en cada paciente según la osteocalcina en sangre categorizada en dos grupos (normal y superior al normal) no obtenemos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,06$ ).

Hasta 10	Mas de 10
2,33	2,62
DS=0,48	DS=0,64

Cuando comparamos los valores medio de pérdida de inserción en cada paciente según la osteocalcina en sangre categorizada en dos grupos (normal y superior al normal) obtenemos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,04$ ).



Hasta 10	Mas de 10
2,88	3,53
DS=0,93	DS=1,63

Cuando comparamos los valores medio de sangrado en cada paciente según la osteocalcina en sangre categorizada en dos grupos (normal y superior al normal) obtenemos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,04$ ).

Hasta 10	Mas de 10
68,39	78,97
DS=17,53	DS=16,46

Cuando comparamos los valores medio de zonas con placa en cada paciente según la osteocalcina en sangre categorizada en dos grupos (normal y superior al normal) no obtenemos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,26$ ).

Hasta 10	Mas de 10
68,95	78,11
DS=27,85	DS=25,80

En los valores en sangre según la densitometría no se observan diferencias estadísticamente significativas

Descripción	Normal	Osteopenia	Osteoporosis	p
Osteocalcina	7,20	6,07	7,93	0,34

Al realizar el test de correlación de Pearson entre los valores de osteocalcina en sangre con el nivel medio de bolsa, el nivel de inserción, el sangrado y la placa no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

d) Osteocalcina en saliva

Según la siguiente tabla vemos que los niveles de osteocalcina en saliva no tienen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,45$ ) según la edad.

Hasta 54 años	De 55 a 64 años	Mas de 65 años
5,72 DS=3,61	4,82 DS=2,91	5,73 DS=2,42

El análisis de los valores medios de los datos en saliva de osteocalcina según el diagnóstico periodontal no nos permite establecer diferencias estadísticamente significativas

Descripcion	GS	GP	p
Osteocalcina	4,90 DS=3,15	5,71 DS=3,12	0,26

Cuando comparamos los valores medio de bolsa en cada paciente según la osteocalcina en saliva categorizada en tres grupos no obtenemos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,07$ ).

Hasta 3	De 3,01 a 6,9	Mas de 7
2,20 DS=0,49	2,51 DS=0,53	2,32 DS=0,46

Cuando comparamos los valores medios de pérdida de inserción se observa unas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,01$ ), en el análisis con el test de Bonferroni las diferencias son entre los grupos C - A.

Hasta 3	De 3,01 a 6,9	Mas de 7
2,52 DS=0,74	3,36 DS=1,2	2,87 DS=0,93

Cuando observamos los valores del sangrado no se observan unas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,17$ )

Hasta 3	De 3,01 a 6,9	Mas de 7
67,56	74,94	67,2
DS=17,68	DS=18,69	DS=16,07

Cuando observamos los valores de la placa no se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,49$ )

Hasta 3	De 3,01 a 6,9	Mas de 7
66,67	73,34	64,83
DS=30,06	DS=24,55	DS=33,74

Al realizar el test de correlación de Pearson entre los valores de osteocalcina en saliva con el nivel medio de bolsa, el nivel de inserción, el sangrado y la placa no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

En los valores de osteocalcina en saliva según la densitometría no se observan diferencias estadísticamente significativas

Descripcion	Normal	Osteopenia	Osteoporosis	p
Osteocalcina	5,28	6,13	5,25	0,68

#### e) Osteocalcina en fluido crevicular

Según la siguiente tabla vemos que los niveles de osteocalcina en fluido crevicular aumenta progresivamente según aumenta la edad de las pacientes, pero las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,65$ ).

Hasta 54 años	De 55 a 64 años	Mas de 65 años
24,57	28,64	31,47
DS=23,90	DS=45,32	DS=15,93

El análisis de los valores medios de los datos en fluido crevicular de osteocalcina según el diagnóstico periodontal sí nos permite establecer diferencias estadísticamente significativas.

Descripción	GS	GP	p
Osteocalcina	17,76 DS=14,43	33,58 DS=29,98	0,007

Cuando comparamos los valores medio de bolsa en cada paciente según la osteocalcina categorizada en tres grupos obtenemos diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,001$ ), según el test de Bonferroni las diferencias son al comparar entre el grupo C – A y C - B

A) Hasta 12	B) De 12,01 a 30	C) Mas de 30
2,14 DS=0,31	2,30 DS=0,56	2,63 DS=0,52

Cuando comparamos los valores medios de pérdida de inserción se observa una tendencia que no es corroborada por la significación estadística ( $p=0,051$ )

Hasta 12	De 12,01 a 30	Mas de 30
2,64 DS=1,04	2,93 DS=1,10	3,35 DS=1,07

Cuando observamos los valores del sangrado se observa unas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,01$ ), estas diferencias según el test de Bonferroni son al comparar entre los grupos C - A

A) Hasta 12	B) De 12,01 a 30	C) Mas de 30
64,81 DS=19,49	69,14 DS=15,63	77,90 DS=16,21

Cuando observamos los valores de la placa no se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,83$ )

Hasta 12	De 12,01 a 30	Mas de 30
<b>66,38</b>	<b>70,04</b>	<b>70,88</b>
DS=29,76	DS=31,00	DS=25,50

Al realizar el test de correlación de Pearson entre los valores de osteocalcina en fluido crevicular se encuentra relación estadísticamente significativa con el nivel medio de bolsa ( $ind=0,35$ ,  $p=0,002$ ) y el sangrado ( $ind=0,25$ ,  $p=0,02$ ), pero no para la media del nivel de inserción ( $ind=0,18$ ,  $p=0,119$ ) ni para la placa ( $ind=-0,08$ ,  $p=0,483$ ).

Cuando comparamos con el test de correlación de Pearson los valores de osteocalcina en sangre, saliva y fluido crevicular me da en todos los casos unas diferencias estadísticamente no significativas.

En los valores de osteocalcina en el fluido crevicular según los datos densitométricos no aparecieron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,10$ )

Densitometría Normal	Densitometría: Osteopenia	Densitometría: osteoporosis
<b>25,76</b>	<b>42,26</b>	<b>23,87</b>
DS=23,90	DS=45,32	DS=15,93

## **DISCUSION**

**El principal objetivo** que nos planteamos en nuestro trabajo ha sido estudiar en mujeres menopausicas la periodontitis y la osteoporosis. Para ello el primer problema que nos planteamos es como escogíamos la muestra. Elegimos realizarla a través de los pacientes que acuden a solicitar tratamiento en la Facultad de Odontología, ya que su motivo no era, en un principio, tener sintomatología tanto de la osteoporosis como de la periodontitis, lo que pudiera sesgar los resultados. Además, es una muestra representativa del tipo de paciente que acude a nuestras consultas y al que debemos de aconsejar sobre su salud oral y sistémica, por lo que tiene trascendencia desde un punto de vista de utilidad clínica.

Para el diagnóstico de enfermedad periodontal utilizamos el concepto de Machtei (Machtei y cols 1992) en el que distingue que es periodontitis y que ha sido ampliamente utilizado por distintos trabajos. Con ello dividimos a la población según si tiene o no periodontitis y lo relacionamos con los otros parámetros de tipo clínico y de laboratorio. Así, intentamos cumplir con el objetivo de relacionar la osteoporosis y los valores de osteocalcina con la periodontitis y ver si pueden tener los hallazgos alguna utilidad clínica.

La metodología de laboratorio utilizada es la que habitualmente se utiliza en el servicio de Bioquímica del Hospital Virgen Macarena de nuestra ciudad. Con ello tenemos la seguridad de un laboratorio con amplia experiencia en el campo de la bioquímica y que habitualmente realiza estos test diagnósticos en otros pacientes. Un problema metodológico que intentamos hacer era la cuantificación de los valores de osteocalcina en fluido crevicular. Hemos de tener en cuenta las dificultades de recogida de la muestra. No podemos obtener la misma cantidad que en suero y la forma de recogerla es con papel absorbente. Para ello utilizamos papel absorbente Watmann 1 con un tamaño determinado y en el cual mediamos la cantidad de líquido que se reabsorbe por capilaridad. Realizando una correlación entre la superficie y volumen, puedo cuantificar la osteocalcina. Es la misma técnica utilizada en publicaciones realizadas por ese laboratorio (Gonzalez y cols 1988) y otros (Lukacs y cols 2003).

En cuanto a las características de los hábitos de la muestra destaca el bajo índice de consumo de tabaco y alcohol. El tabaco es uno de los factores mas involucrados en la periodontitis en los últimos años. En nuestro grupo prácticamente los valores son desechables por lo que podemos considerar que son valores que no influyen en los resultados. Por otra parte, estos datos son los propios de la población española, que si bien en el grupo de población de edad mas joven el consumo de tabaco es alto y se igualan las cifras entre hombres y mujeres, en este grupo de población siguen siendo bajas.

La edad de inicio de la menopausia tenía una media entorno a los 48 años y un rango que iba desde los 30 a los 60. En los valores más bajos debemos tener en cuenta que contábamos en el grupo con 18 pacientes que fueron histerectomizadas (20,9%). La media de los años transcurridos desde la menopausia en nuestra muestra fue de 10 años, encontrándose bien repartido el grupo, pues prácticamente la mitad se encontraba por encima de este valor y la otra mitad por debajo, el rango estaba entre 1 y 29 años,.

Los datos periodontales nos muestran un 60% de las mujeres con periodontitis. En el trabajo de Brown y cols (1998) encuentran que la periodontitis en la población con edad similar a la de nuestra muestra es del 45%. En nuestro país los trabajos de tipo epidemiológico utilizan el índice CPITN y muestran en una población masculina de nuestra ciudad, con edades entre 35 y 44 años un código 3 (profundidad de sondaje 3-5mm) en un 53% de los sujetos y un código 4 (profundidad de sondaje >5mm) en 4% (Gonzalez 1989). En el último estudio epidemiológico realizado a nivel nacional (Llodra y cols 2002) encuentran en la población de 65 a 74 años un código 3 del 35% y un código 4 del 8%. En un principio parecen ser los resultados de nuestro trabajo una mayor prevalencia de la periodontitis, esto se ve reflejado en la literatura. Peor para que la comparación de nuestros resultados fuera adecuada debemos de utilizar datos que reflejen la periodontitis en la mujer menopausica. Así, en un trabajo realizado en mujeres con mas de 65 años refieren que la periodontitis avanzada definida como pérdida de inserción superior a 6 mm en un o mas sitios está presente en el 49% de las mujeres (Weyant y cols 1999). En otro trabajo estudian a 70 mujeres menopausicas utilizando nuestros mismos criterios para

diagnosticar la periodontitis y encuentran un 40% de la muestra afectada (Machtei y cols 1992). En nuestro trabajo encontramos que los valores del grupo de periodontitis en cuanto al nivel medio de bolsa, nivel medio de pérdida de inserción y el porcentaje de zonas con sangrado son superiores en el grupo de periodontitis con diferencias estadísticamente significativas. En cambio, el porcentaje de zonas con placa da resultados sin diferencias. Esto me hace considerar a la población de menopausia con periodontitis que debe tener algún factor de riesgo añadido con el que ante la misma cantidad de placa se produce periodontitis.

En cuanto a los datos densitométricos es de destacar que la mitad de las mujeres menopausicas tenían una afectación ósea. Nuestros resultados coinciden con lo referido por varios autores. Así, en un trabajo realizado en nuestro país encuentran una prevalencia de la osteoporosis del 40% en mujeres con 50 a 59 años de edad (Díaz y cols 2001). En otros trabajo hechos en el extranjero muestran unos valores del 60,4% (Woodson y cols 1995) y del 58% (Black y cols 1995). En otro artículo estudian a 80 mujeres y encuentran un 35% osteopénicas y un 15% osteoporóticas (Jonasson y cols 2001).

Dentro del análisis del cruce de variables en primer lugar examinamos la influencia de la edad en el estado periodontal. Como dato destacable pudimos observar como la pérdida de inserción era mayor en el grupo de mas de 65 años, con diferencias estadísticamente significativas, pero las diferencias no eran significativas para los otros parámetros. Esto refleja lo expuesto en casi todos los estudios epidemiológicos, un incremento de la gravedad de la periodontitis conforme es mayor la edad de la población, y que se corrobora al analizar la variable de años de retirada de la regla agrupada en menos y más de 15 años. En ella observamos como hay valores mayores en pérdida de inserción, sangrado y placa.

Como dato destacable no hemos podido relacionar los resultados de la densitometría con ningún parámetro de enfermedad periodontal. Cuando se compara con los trabajos de la literatura observamos que existen distintas formas de diagnosticar cada uno de los procesos y distintas poblaciones utilizadas. Nos vamos a referir fundamentalmente a los trabajos en los cuales se utiliza el nivel de inserción y la profundidad de bolsa para medir la



periodontitis. Así, Machtei y cols (1992) estudia la relación entre osteopenia y periodontitis ,en una población de mujeres menopausicas. El diagnóstico de periodontitis y osteopenia lo establecen de igual manera a nosotros. No consiguen demostrar una relación estadísticamente significativa entre la pérdida de inserción y la densidad ósea, pero sí con la pérdida de dientes y la altura de la cresta alveolar. En otro trabajo en el que estudian a 286 mujeres entre 46 y 55 años y no encuentran correlación entre profundidad de bolsa y la densidad ósea (Elders y cols 1992). Weyant y cols (1999) refieren un estudio realizado en 292 mujeres mayores de 65 años de edad y no encuentran relación de la densidad ósea con pérdida de inserción periodontal, profundidad de bolsa y sangrado. En otro trabajo realizado en 70 mujeres menopausicas con edades entre 51 y 78 años encuentran una correlación estadísticamente significativa de la altura del hueso interproximal medido con radiografías y la densidad ósea medida en el trocánter y fémur, pero no con el nivel de inserción clínica periodontal (Tezal y cols 2000). Tampoco en un estudio con 155 mujeres menopausicas con edades entre 41 y 70 años encuentran correlación entre el nivel de inserción clínica y la densidad ósea medida en la columna y en el fémur (Pilgram y cols 2002). Esto hace referir en una revisión de la literatura, a Wactawaski-Wende (2001) de que no existe una correlación entre el nivel de inserción clínico y la densidad ósea, lo que confirma nuestros datos, sólo se ha podido demostrar una correlación con la pérdida de dientes y la altura del hueso alveolar.

En cuanto al análisis de los resultados del fluido crevicular podemos considerar los diversos aspectos estudiados. En primer lugar el estado total antioxidante: en la literatura sólo aparecen estudios sobre la capacidad antioxidante en saliva con el objetivo de relacionarlo con el ritmo circadiano. Según Moore la secreción de saliva tras un estímulo está relacionada con un incremento en la presencia de antioxidantes en la misma. Según el mismo autor una explicación posible podría ser la salida del fluido crevicular desde el surco gingival a la saliva por la acción de músculos y lengua al aumentar la presión ejercida por los mismos durante la masticación.

Nosotros encontramos en las muestras tomadas de fluido crevicular y de saliva que la capacidad antioxidante del fluido crevicular es entre 3 y 5 veces superior al de la saliva, lo que nos indicaría que este fluido tiene una capacidad antioxidante mucho mayor que la encontrada en la saliva.

En cuanto a las Inmunoglobulinas, según los resultados en nuestras pacientes tanto la IgA como la IgM medidas en saliva presentan concentraciones muy bajas, prácticamente indetectables, mientras que los niveles que aparecen en fluido crevicular son elevados y en muchos casos superiores a los encontrados en el suero

La IL-1 amplifica la respuesta inmune de los tejidos periodontales ya que los macrófagos están presentes en los tejidos gingivales tanto si están sanos como si están inflamados. Estos macrófagos son los que producen la IL-1. Grieve volvió a encontrar que la IL-1 beta está elevada en las muestra tomadas de zonas donde se ha producido movimiento dentario.

La IL-6 está implicada en la regulación de la respuesta inflamatoria y la respuesta inmunitaria. Es un indicador primario y rápido de la inflamación aguda. Hemos conseguido determinar en el fluido crevicular IL-6 de una manera cuantitativa, expresada en pg/mL. En cualquier caso la cantidad de IL-6 que aparece en el fluido crevicular es mucho mayor que la que aparece en la saliva.

Respecto a las proteínas totales en 1989 en el estudio realizado por Curtis y Gillet, probaron que la concentración total de proteínas presentes en el fluido crevicular no era constante. La irritación mecánica incrementa el paso de elementos del suero al surco gingival. Por todo ello hay que ser muy cuidadoso en la toma de la muestra para irritar lo menos posible los tejidos y evitar el paso de proteínas del suero al fluido crevicular.

Nosotros hemos cuantificados proteínas totales tanto el fluido crevicular como en la saliva. Los valores en saliva son prácticamente indetectables siempre que la toma de la muestra se efectúe a una hora lejana a la de la comida. Por el contrario los niveles de proteínas totales son elevados en fluido crevicular, oscilando entre 80 y 160 mg/dL.

Por ello podemos deducir que los estudios bioquímicos en fluido crevicular de la capacidad antioxidante, IgA, IgM, IL-6, proteínas, etc... muestran que

las concentraciones son independientes de las encontradas en la saliva y que la metodología es la adecuada para estudios de patología periodontal. La aportación mas notoria de nuestro trabajo ha sido el estudio de la osteocalcina en los tres compartimentos: sangre, fluido crevicular y saliva, y su relación con el resto de los parámetros.

Al analizar los tres valores con el diagnóstico periodontal (si o no periodontitis) observamos que las diferencias son estadísticamente significativas en el caso del fluido crevicular y no para la saliva y la sangre. En cuanto al resto de parámetros periodontales fueron significativas las diferencias para pérdida de inserción en sangre y saliva y para sangrado en sangre. En fluido crevicular fue significativo para bolsa y sangrado. Hemos de destacar, que en el caso de saliva y fluido crevicular al no existir un valor umbral, pues no existen datos de normalidad en la bibliografía, procedimos a categorizarlos en tres grupos. Podemos decir que nuestros resultados en fluido crevicular se relacionan con periodontitis pero no existe esa relación con los valores en sangre y saliva. Datos confirmados por los trabajos referidos en la introducción.

Cuando utilizamos los valores de osteocalcina para ver su relación con el diagnóstico de osteoporosis vemos que no pudimos constatar diferencias significativas en ninguno de los tres valores. La utilidad de la osteocalcina en sangre como predictor de la osteoporosis ha sido examinado en 295 mujeres por encima de 67 años, sin estar en tratamiento con estrógenos. Los autores (Bauer 1999) concluyen que aunque lo asocian con una mayor rapidez en la pérdida de hueso tienen un valor limitado considerado individualmente. Esto se contradice con los resultados de otros modelos experimentales, en ratones se ha podido comprobar que es un determinante de la formación de hueso (Ducy 1996) y "in vitro" se constata que tiene un papel en el proceso de reabsorción ósea (Chenu 1994). Peor hemos de tener en cuenta que la osteocalcina es producida por los osteoblastos y que una fracción pequeña se segrega directamente en la circulación (Lian 1988). Este detalle podría explicar porque la osteocalcina en fluido crevicular me da datos relacionados con la periodontitis, que es un proceso de remodelamiento a escala local y no da resultados sistémicos en sangre y saliva.

## CONCLUSIONES

- Los estudios bioquímicos en fluido crevicular de la capacidad antioxidante, IgA, IgM, IL-6 y proteínas muestran que las concentraciones son independientes de la saliva y que la metodología es la adecuada para estudios de patología periodontal.
- La periodontitis y la osteoporosis son dos enfermedades con altos índices de prevalencia en la población estudiada.
- Los valores de osteocalcina en fluido crevicular se relacionan con la periodontitis, pero no en sangre y saliva.
- Los valores de osteocalcina en fluido crevicular, sangre y saliva no se han relacionado con la osteoporosis.

## BIBLIOGRAFIA.

- Academy Reports. The pathogenesis of periodontal diseases. J Periodontol 1999, 70: 457-470.
- Banfi,G.; Daverio,R.: In vitro Stability of osteocalcin. Clin Chem 1994. 40:833-834.
- Bauer, D.C., Sklarin, P.M., Stone, K.L., Black, D.M., y cols. Biochemical markers of bone turnover and prediction of hip bone loss in older women: the study of osteoporotic fractures. J Bone Miner Res 1999; 14: 1404-1410.
- Black, D.M., Bauer, D.C., Lu, Y., Tabor, H., Genant, H.K. Cumming SR and the Osteoporotic Fractures Research Group. J Bone Min Res 1995; 10(Suppl 1): S140.
- Bradfird, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72: 248-254
- Brailly,H; Montero, F.A.; Zuber,C.E.; Flavetta, S.; Grassi.J.; Houssiau;F.; Van Snich,J: Total interleukin 6 in plasma measured by immunoassay. Clin Chem 1994.40:116-123.
- Breen, J.H.;Johnson,N.W.;Ragers,P.A.: Site-specific attachment level change detected by physical probing in untreated chronic adult periodontitis: Review studies 1983-1997. Periodontol 1999, 70:312-328.
- Brown, L.J., Oliver, R.C., Löe, H. Periodontal diseases in the U.S. in 1981: prevalence, severity, extent, and role in tooth mortality. J Periodontol 1989; 60:363-370.
- Bullón,P; Rios,J.V.;Machuca,G.;Martinez-Sahuquillo,A.;Velasco,E.: Puesta al día en periodoncia.Periodoncia1993,2:78-88.
- Castro del Pozo,S.: Manual de patología general.Editorial Masson,S.A. 1993.
- Chenu, C., Colucci, S., Grano, M. Zigrino, P., Barattolo, R., y cols. Osteocalcin induce chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. J Cell Biol 1994; 127: 1149-1158.
- Curtis,M.A.;Gillett,I.R.;Griffiths,G.S.;Maiden,M.F.;Sterne, J.A.:Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: Laboratory markers from analysis of gingival crevicular fluid. J.Clin.Periodontol .1989, 16:1-11.
- Delmas,P.D.: Biochemicals markers of bone turnover 1993. J Bone Miner Res. 2:549-555.

- Delmas, P.D., Wahner, H.W., Mann, K., Riggs, B.L. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis of serum bone gla protein. *J Lab Clin Med* 1993; 102: 470-476.
- Delmas, P.D. Wahner, H.W., Mann, K., Riggs, B.L. Effects of renal function on plasma levels of bone gla protein *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 57: 102-1030
- Díaz, M., García, J.J., Carrasco, J.L., Honorato, J., Pérez-Cano, R., Rapado, A., Alvarez, C. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. *Med Clin (Barc)* 2001; 116:86-88.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B. y cols. Increased bone formation in osteoclin deficient mice. *Nature* 1996; 382:448-452.
- Elders, P.J., Habets, L.L., Netelenbos, J.C., van der Linden, L.W., van der Stelt, P.F. The relation between periodontitis and systemic bone mass in women between 46 and 55 years of age. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 492-496.
- Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. Ediciones Doima Barcelona (11 edición) 1988.
- Fink, P.C.: Measurement of proteins with the Behring nephelometer; a multicentre evaluation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989.27:261.
- Garnero, P., Delmas, P.D. New developments in biological markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1996; 59:2-9.
- Garnero, P., Delmas, P.D. Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27:303-323.
- Genco, R.G.: Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996; 67:1041-1049.
- Giannobile, W.V., Lynch, S.E., Denmark, R.G., Paquette, D.W., Fiorellini, J.P., Williams, R.C. Crevicular fluid osteocalcin and pyridoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as marker of rapid bone turnover in periodontitis. A pilot study in beagle dogs. *J Clin Periodontol* 1995;22: 903-910.
- Gonzalez, C., Guerrero, J.M., Elorza, F.L., Molinero, P., Goberna, R. Evaluation of maternal serum alfa-protein assay using dry blood spot samples. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 79-84.

- Gonzalez, V., Bullón, P. Estudio epidemiológico piloto de salud oral y necesidades de tratamiento en un grupo de adultos de 35-44 años en Sevilla. Archivos de Odontostom Prev y Comun 1989; 1:25-31.
- Goodson, J.M.: Diagnosis of periodontitis by physical measurement: interpretation from episodic disease hypothesis. J periodontol 1992, 63:373-382.
- Goodson, J.M.; Tanner, A.C.; Haffajee, A.D.; Sornberger, G.C.; Socransky, S.S.: Patterns of progression and regression of destructive periodontal disease. Journal of clinical Periodontology 1984, 9:472-481.
- Grieve, W. G. Prostaglandin E (PGE) and Interleukin-1B (IL-1 B) levels during human orthodontic tooth movement. Am. J. Orthodontics. 1994: 105, 369-374.
- Griffiths, G.S., Sterne, J.A.; Wilton, J.M.; Eaton, K.A. ; Johnson, N.W.: Association Between volume and flow of rate of gingival crevicular fluid and clinical assessments of gingival inflammation in a population of British male adolescents. J Clin Periodontol 1992; 19:464-470.
- Haffajee, A.D.; Socransky, S.S.: Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. Periodontology 2000 1994, 5:78-111
- Honda, M.; Kitamura, K.; Mizutani, Y.; Oishi, M.; Arai, M.: Quantitative analysis of serum IL-6 and its correlation with increased levels of serum IL-2R in HIV-induced diseases. Journal Immunol 1990. 145:4059-4064.
- Ishimi, Y.; Miyaura, C.; Jin, C.H.: IL-6 is produced by osteoclasts and induces bone resorption. J Immunol 1990. 145:3297-3303.
- Johnson, A.M.: A New International reference preparation for proteins in human serum. Arch Pathol Lab Med 1993. 117:29-35.
- Jonasson, G., Bankvall, G., Kiliaridis, S. Estimation of skeletal bone mineral density by means of the trabecular pattern of the alveolar bone, its interdental thickness, and the bone mass of the mandible. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2001; 92: 346-60
- Kalmar, J.R.: Crohn Disease: orofacial considerations and disease pathogenesis. Periodontology 2000 1994, 6:101-115.
- Kanata, M.: Genetics in oro-facial growth and disease. International Dental Journal, 1995, 45: 227-244.
- Kornman, K.S.; di Giovine, F.S.: Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. Ann Periodontol 1998, 3(1):327-38.

- Krieg, M. Comparative quantitative clínico-chemical analysis. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* 1986; 24:863-870.
- Kunimasu, K., Mataki, S., Tanaka, H., Mine, H., Kyiki, M., Hosoda, K., Kato, Y., Kato, K. A cross-sectional study on osteocalcin levels in gingival crevicular fluid from periodontal patients. *J Periodontol* 1993; 64:865-869.
- Kushner, P.R.:Osteoporosis: La epidemia silente.Tiempos medicos 1998, 553:7-24.
- Lamster,I.B.; Grbic,J.T.: Diagnosis of periodontal disease based on analysis of the host response.*Periodontology* 2000 1995; 7:83-99.
- Lang,N.P.;Attström,R.;Löe,H.:Proceedings of the European Workshop on Mechanical Plaque Control. Quintessence books Berlin. 1998.
- Lee, A.J., Walsh,, T.F., Hodges, S.J., Rawlinson, A. Gingival crevicular fluid osteocalcin in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 252-256.
- Lerner, U.H., Modeer,T.; Krekmanova,L.; Claesson,R.; Rasmussen,L.: Gingival crevicular fluid from patients with periodontitis contains bone resorbing activity. *Eur J Oral Sci* 1998, 106(3): 778-87.
- Lian, J.B., Gundberg, C.M. Osteocalcin. Biochemical consideration and clinical applications. *Clin Orthop* 1988: 226: 267-291.
- Llodra-Calvo, J.C., Bravo-Perez, M., Cortes-Marticorena, F.J. Encuesta de salud oral en España (2000) *RCOE* 2002; 7:19-63.
- Lindhe,J.L. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Editorial Munksgaard. Copenhagen 1998.
- Lindhe,J.; Okamoto,H.;Yoneyama,Y.;Haffajje,A.; Socransky,S.S.: Periodontal loser in untreated adult subjects. *J Clin Periodontol* 1989, 16:671-678.
- Löe,H.; Theilande,E.; Jensen,S.B.: Experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontology* 1965, 36: 177-187.
- Löe,H.; Anerud,A.;Boyden,H.;Morrison,E.; Natural history of periodontal disease in man.Rapid, moderate and no loss of attachment in sri lanka laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 431-440.
- Lukacs, Z., Santavuori, P., Keil, A., Steinfeld, R., Kohlshutter, A. Rapid and simple assay for the determination of tripartidyl peptidase and palmitoyl thioesterase activities in dried blood spots. *Clin Chem* 2003; 49: 509-511.
- Machtei, E.E., Christersson, L.A., Grossi, S.G., Dunford, R., Zambon, J.J., Genco, R.J. clinical criteria for the definition of established periodontitis. *J Periodntol* 1992; 63: 207-215.



- Mendieta,C.; Reeve, C.M.: Periodontal manifestations of systemic disease and management of patients with systemic disease. *Current Opinion in Periodontology* 1993:18-27.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. and Davies, M. J.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in neonates. *Clinical Science* 2001: 84,407-412,2.
- Moore, S. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Rad. Res.* 1999: 21, 417-425.
- Nakashima, K., Roehrich, N., Cimasoni, G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relation to periodontal status. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 327-333.
- Nakashima, K., Giannopoulou, C., Andersen, E., Roehrich, N., Brochut, P., Dubrez, B., Cimasoni, G. A longitudinal study of various crevicular fluid components as markers of periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 832-838.
- Offenbacher,S.: Periodontal Disease: Pathogenesis. *Ann Periodontol* . 1996, 1: 824-878.
- Offenbacher,S.; Odle,M.B.; Van Dyke,T.E.: The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J periodontol Res* 1986, 21: 101-112.  
S.A. Buenos Aires.1992.
- Pilgram, T.P., Hildebolt, C.F., Dotson, M., Cohen, S.C., Hauser, J.F., Kardaris, E., Civitelli, R. Relationship between clinical attachment level and spine and hip bone mineral density: data from a healthy postmenopausal women. *J Periodontol* 2002; 73: 298-301.
- Price, C.P., Thompson, C.P. The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. *Ann Biochem* 1995; 32:244-260
- Rosenquist, C. Ovist, P., Bjarnason, N., Christiansen, C. Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by ELISA with two monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1995; 41:1439-1445
- Slovik, D.M., Gundberg, C.M., Neer, R.M. Lian, J.B. Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements in a hospital setting. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59:228-230.
- Smith, Q.T.;Au,G.S.;Freese,P.L.;Osborn,J.B.;Stoltemberg,J.L.: Five parameters of gingival crevicular fluid from eight surfaces in periodontal health and disease. *Periodont Res* 1992, 27:466-475.
- Sternberg,S.A.; Gordon,M.: Who are older adults? Demographics and major health problems. *Periodontology* 2000 1998, 16:9-15.

- Takahashi,K.;Takashiba,S.;nagai,A.;Takigawa,M.;Myoukai,F.;Kurihara, H.; Murayama,Y.: Assesment of interleukin 6 in the pathogenesis of periodontal disease. J periodontol 1994.65: 147-153.
- Tezal, M., Wactawski-Wende, j., Grossi, S.G., Ho, A.W., Dunford, R., Genco, R.J. Relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. J Periodontol 2000; 71: 1492-1498.
- Theilande, E.; W ritht,W.H.; Jensen,S.B.; Loe,H.: Experimental gingivitis in man.II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. Journal of Periodontal Research 1966, 1:1-13.
- Tietz, N. W. Textbook of clinical chemistry. Saunders, Philadelphia. 2002, pag 589.
- Van Snick,J.: Interleukin 6: an overview. Annu Rev Immunol 1990. 8: 353-78.
- Von Wowern,N., Klausen,B.; Kollerup,G.: Osteoporosis: A risk factor in periodontal disease. J Periodontol 1994, 65:1134-1138.
- Vrotsos,J.A.; Vrahopoulos;T.P.: Effects of systemic diseases on the periodontum. Current opinion in Periodontology 1996, 3:19-26.
- Wactawaski-Wende,J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. Ann Periodontol 2001;; 6: 197-208.
- Wiebe,S.H; Hafezi,M.; Sanduh,H..S.; Sims,S.M.; Dixon, S.J.: Osteoclast activation in inflammatory periodontitis. Oral Dis 1996, 2(2): 167-80.
- Weyant, R.J., Pearlstein, M.E., Churak, A.P., Forrest, K., Famili, P., Cauley, J.A. The association between osteopenia and periodontal attachemtn loss in older women J Periodontol 1999; 70:982-991.
- Woodson, G.C. Adequate screening for axial osteoporosis with densitometry requires measurement of the hip and spine. J Bone Min Res 1995; 10(Suppl 1): S475

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

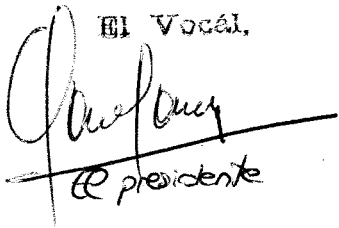
ESCUELA DE ODONTOLÓGICA

Reunido el Consejo de la Facultad de Odontología, en Sesión Ordinaria, celebrada el día 24 de Enero de 1954, a las 10.00 horas, en el aula magna de la Facultad de Odontología, con asistencia de los señores miembros del Consejo de la Facultad de Odontología, se acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE a la tesis doctoral de DIÑA BERTA MATILDE SOBERNA PESUDO titulada OSTEOCALCINA EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y LA OSTEOPOROSIS.

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE  
POR UNANIMIDAD.

Sevilla, 24 de ENERO

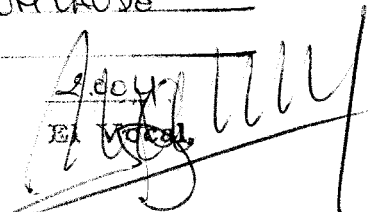
El Vocal,

  
El presidente

El Vocal,

  
El Secretario,

El Vocal,

  
El Doctorado

