



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**

**“ESTUDIO DE TRANSMISIÓN DE PERIODONTOPATÓGENOS  
ENTRE PAREJAS PRE Y POSTRATAMIENTO PERIODONTAL”**

**Carmen Bernal Ortega**  
**Sevilla, 2015**

Deseo expresar mi agradecimiento a los Profesores D. Pedro Bullón Fernández, D<sup>a</sup> Lorena López Cerero y D<sup>a</sup> María del Carmen Machuca Portillo de la Universidad de Sevilla por su dirección y orientación en el diseño y elaboración de este trabajo.



**Departamento de Estomatología  
Facultad de Odontología**



**Medalla y Encomienda  
Orden Civil de Sanidad**

**D. Pedro Bullón Fernández**, Catedrático del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, **Dña. Lorena López Cerero**, Profesora Asociada del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, y **Dña. María del Carmen Machuca Portillo**, Profesora Titular del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, en calidad de directores del Proyecto de Tesis de la Licenciada en Odontología **Dña. Carmen Bernat Ortega**.

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo de investigación **“ESTUDIO DE TRANSMISIÓN DE PERIODONTOPATÓGENOS ENTRE PAREJAS PRE Y POSTRATAMIENTO PERIODONTAL”**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y cumple todos los requisitos para optar al Grado de Doctor.

Lo que firman en Sevilla a 13 de Octubre de 2015

Prof. Pedro Bullón Fernández

Profa. Lorena López Cerero

Profa. M<sup>a</sup> del Carmen Machuca Portillo

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

<b>1. DEFINICIÓN DE PERIODONTITIS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES.....</b>	<b>2</b>
<b>2. 1 Características de las principales formas clínicas</b>	
<b>3. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Factores de riesgo y de susceptibilidad</b>	
<b>3.2 Efectos sistémicos</b>	
<b>4. ETIOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Revisión histórica de las teorías sobre la etiología de las enfermedades periodontales</b>	
<b>4.2 Microbiología de las enfermedades periodontales</b>	
<b>4.2.1 Características de una bacteria periodontopatógena</b>	
<b>4.2.2 Bacterias periodontopatógenas</b>	
<b>5. DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Exploración clínica y radiológica</b>	
<b>5.2 Importancia del diagnóstico microbiológico en Periodoncia</b>	
<b>5.3 Métodos de diagnóstico microbiológico</b>	
<b>6. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD.....</b>	<b>50</b>
<b>6.1 Modelos de infección</b>	
<b>6.2 Mecanismos de transmisión</b>	
<b>6.3 La periodontitis como una enfermedad transmisible</b>	
<b>6.4 Posibles vías de transmisión de bacterias periodontales</b>	
<b>6.5 Consecuencias de la transmisión</b>	
<b>7. PREVENCIÓN.....</b>	<b>64</b>

<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>68</b>
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....</b>	<b>69</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
<b>1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....</b>	<b>70</b>
1.1 Criterios de selección	
1.2 Cronograma	
<b>2. EXPLORACIÓN DE LOS PACIENTES.....</b>	<b>71</b>
2.1 Exploración clínica	
2.2 Estudio radiológico	
2.3 Tratamiento periodontal	
<b>3. EXPLORACIÓN DE LAS PAREJAS.....</b>	<b>73</b>
3.1 Exploración clínica	
3.2 Estudio radiológico	
3.3 Tratamiento perodontal	
<b>4. TOMA DE MUESTRAS.....</b>	<b>74</b>
4.1 Toma de muestras en la primera visita de los pacientes	
4.2 Toma de muestras al mes y a los seis meses de los pacientes	
4.3 Toma de muestras en la primera visita de las parejas	
4.4 Toma de muestras a los seis meses de las parejas	

<b>5. PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1 Procedimiento para cultivo microbiológico</b>	
<b>5.1.1 Composición de los medios</b>	
<b>5.1.2 Inoculación en los medios de cultivo</b>	
<b>5.1.3 Incubación</b>	
<b>5.1.4 Lectura</b>	
<b>5.2 Muestras para PCR</b>	
<b>5.2.1. Extracción y purificación del ácido nucleico</b>	
<b>5.2.2. PCR cuantitativa</b>	
<b>5.2.3. Tipificación</b>	
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>81</b>
<b>7. ANEXO: Consentimiento informado de los pacientes y sus parejas.....</b>	<b>83</b>
<b>VI. RESULTADOS</b>	
<b>1. CASUÍSTICA.....</b>	<b>85</b>
<b>2. SITUACIÓN CLÍNICA PERIODONTAL INICIAL Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....</b>	<b>87</b>
<b>3. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS.....</b>	<b>91</b>
<b>3.1. Resultados de cultivo bacteriano</b>	
<b>3.1.1. Cuantificación de recuentos bacterianos en los pacientes y las parejas antes y después del tratamiento periodontal</b>	
<b>3.2. PCR Cuantitativa</b>	
<b>3.2.1. Detección y cuantificación de <i>Aa</i> Y <i>Pg</i> en los pacientes y las parejas antes y después del tratamiento</b>	
<b>3.3. Comparación de los resultados de cultivo bacteriano y PCR cuantitativa</b>	

## **VII. DISCUSIÓN**

<b>1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y ESTADO CLÍNICO DE LAS PAREJAS SELECCIONADAS.....</b>	<b>113</b>
<b>2.1. Características demográficas</b>	
<b>2.2. Estado clínico de las parejas seleccionadas</b>	
<b>2. TÉCNICAS DE ESTUDIO EMPLEADAS: CULTIVO Y PCR CUANTITATIVA.....</b>	<b>115</b>
<b>3. PRESENCIA DE PERIODONTOPATÓGENOS EN EL ÁREA SUBGINGIVAL Y EN LA SALIVA.....</b>	<b>118</b>
<b>4. COMPARACIÓN DE HALLAZGOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN ENFERMOS PERIODONTALES Y SUS CÓNYUGES.....</b>	<b>120</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>128</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>

# I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

## 1. DEFINICIÓN DE PERIODONTITIS

El término “**periodonto**” (estructura de sostén dental) engloba cuatro tejidos blandos y duros distintos: la encía, el cemento radicular, el hueso alveolar y el ligamento periodontal, que une las dos últimas estructuras.

La **periodontitis** es una enfermedad inflamatoria del aparato de sostén dentario. Está caracterizada por una destrucción del tejido conectivo, ligamento periodontal y del hueso alveolar, que a menudo conlleva la pérdida de piezas dentarias. El signo de destrucción periodontal es la “**bolsa periodontal**” originada por la pérdida de inserción, con proliferación en profundidad del epitelio de unión y su transformación en epitelio de la bolsa (Müller-Glauser y Schroeder 1982).

Los **factores determinantes** para la génesis y progresión de la destrucción periodontal son, por una parte las características patogénicas de **microorganismos** implicados, y por otra, la **respuesta del huésped**, considerando como tal su estado inmunitario y sus características genéticas. Y un aspecto adicional que es la presencia de **factores de riesgo**, tanto ambientales (por ejemplo el tabaquismo) como sistémicos (por ejemplo padecer diabetes) (Kornman y cols 1997a, Salvi y cols 1997). Las enfermedades periodontales son producidas por la interacción de un agente microbiano, único o múltiple, considerado como el factor etiológico primario necesario, pero no suficiente; un huésped más o menos susceptible, y unos factores de riesgo que van a modular la susceptibilidad o resistencia del huésped a desarrollar la enfermedad (Page y Kornman 1997).



## 2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

Desde 1982 (Page y Schroeder), se reconocen bajo el concepto de “**enfermedades periodontales**” las alteraciones inflamatorias de la encía y del periodonto. La **gingivitis** y la **periodontitis** son infecciones bacterianas caracterizadas por la presencia de inflamación y destrucción tisular, reversible en el caso de la gingivitis e irreversible en la periodontitis.

La clasificación de las enfermedades periodontales está en continua remodelación, debido a los nuevos hallazgos clínicos y a la investigación. Hasta hace poco se aceptaba universalmente la **nomenclatura de la American Academy of Periodontology (AAP) de 1989**, que establecía cinco clases: periodontitis del adulto (PA) (I), periodontitis de aparición temprana (EOP) (II), con otras subdivisiones [periodontitis prepuberal (PP), periodontitis juvenil (PJ), periodontitis rápidamente progresiva (PRP)], periodontitis asociada a enfermedades sistémicas (III), periodontitis ulcerativa necrotizante aguda (GUNA/PUNA) (IV) y la periodontitis refractaria resistente al tratamiento (PR) (V).

La utilización de esta clasificación presentaba numerosos defectos, ya que no permitía diferenciar cuadros clínicos con evolución y necesidades terapéuticas diferentes debido a un considerable solapamiento de las diferentes enfermedades y un énfasis inapropiado en la edad y en la ratio de progresión de la enfermedad (Armitage 1999).

A finales de 1999, durante un seminario en Oak-Brook (Illinois, EE.UU), miembros destacados de la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y de la Federación Europea de Periodoncia (EFP) elaboraron la clasificación (tipos I-VIII) (Armitage 1999) que se muestra en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales de 1999 (**Conferencia internacional de la Academia Americana de Periodoncia para la clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales, 1999**):

I.	Enfermedades gingivales
II.	Periodontitis crónica
III.	Periodontitis agresiva
IV.	Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas
V.	Enfermedades periodontales necrosantes
VI.	Abscesos del periodonto
VII.	Periodontitis asociada con lesiones endodónticas
VIII.	Deformidades y condiciones adquiridas o del desarrollo

Tabla 2. Comparación de las clasificaciones de las enfermedades periodontales de 1989 y 1999.

<b>Modificación de las clasificaciones 1989/99</b>	<b>1989 5 clases</b>	<b>1999 8 tipos</b>
Sustitución del término "Periodontitis del adulto" por "Periodontitis crónica"	I PA	II PC
Sustitución del término "Periodontitis de aparición temprana" ("early onset") por "Periodontitis agresiva"	II EOP (PP, PJ, PRP)	III PA
Sustitución del término "Periodontitis asociada a enfermedades sistémicas" por "Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas"	III	IV
Sustitución del término "Periodontitis ulcerativa necrotizante" por "Enfermedades periodontales necrosantes"	IV GUNA/PUNA	V GUN/P
Ampliación: "Enfermedades gingivales"	-	I

Ampliación: “Abscesos del periodonto”	-	VI
Ampliación: “Periodontitis asociada con lesiones endodónticas”	-	VII
Ampliación: “Deformidades y condiciones adquiridas o del desarrollo”	-	VIII
Supresión de la “Periodontitis refractaria” como categoría individual	V PR	-

Esta nueva clasificación tampoco está exenta de críticas; Wolf y cols (2005a) la consideran poco práctica debido a su extensión y a la inexistencia de abreviaturas para los cuadros clínicos más frecuentes, salvo para PC, PA y GUN/PUN. Además, la clasificación atribuye la misma importancia a enfermedades con diferente prevalencia, y apenas tiene en cuenta el carácter multifactorial (riesgos) de las periodontitis. Mientras que enfermedades condicionantes de enorme importancia en la actualidad están ausentes (enfermedades infecciosas como VIH/SIDA), algunas patologías, como el absceso pericoronar, figuran en lugar destacado.

## **2. 1 Características de las principales formas clínicas de periodontitis**

### **PERIODONTITIS CRÓNICA O DEL ADULTO**

Es la forma más frecuente de periodontitis. Tiene mayor prevalencia en los adultos, pero también puede hallarse en niños y en adolescentes (Flemming 1999). Se calcula que en la población general el 40% de los mayores de 35 años tiene periodontitis moderada y entre el 4 y el 8% padece periodontitis avanzada (González y Bullón 1989). Se desarrolla de forma lenta y progresiva, a partir de una gingivitis durante la pubertad o después de ella, pero los síntomas, como pérdida ósea y de inserción, no se observan hasta más tarde (entre los 30 y los 40 años). Suele presentar una evolución lenta (“crónica”), pudiendo experimentar una exacerbación aguda en cualquiera de sus estadios con la consiguiente pérdida de inserción.

Las **manifestaciones clínicas** más usuales son la inflamación gingival, sangrado al sondaje en el área de la bolsa gingival, formación de bolsa periodontal, pérdida de inserción y pérdida de hueso alveolar. Puede observarse además una hipertrofia o retracción de la encía, exposición de furcas, aumento de la movilidad dental, desplazamiento y pérdida dental en algunos casos a edades avanzadas, a no ser que se produzcan recurrencias debido al debilitamiento del estado inmunitario.

La enfermedad puede manifestarse de manera localizada (tipo IIA) o bien generalizada (tipo IIB), según haya menos del 30% o más de sitios afectados en la boca. Es más común una distribución localizada no homogénea, con defectos óseos más profundos, sobre todo en los molares y en segundo lugar en los dientes anteriores (Wolf y cols 2005b). La periodontitis crónica puede clasificarse también conforme a la severidad de zonas afectadas. La severidad puede diferenciarse según el nivel de pérdida de inserción clínica en: leve (PIC: 1-2 mm), moderada (PIC: 3-4 mm) o severa (PIC:  $\geq 5$  mm) (Kinane y Lindhe 2005a).

Dentro de la naturaleza crónica de la inflamación, ha sido objeto de debate la propia **evolución de la enfermedad**. En 1984 Socransky y cols sugirieron un modelo teórico para describir la naturaleza de la progresión de la enfermedad periodontal: la “hipótesis de los brotes”, según la cual la periodontitis progresa con episodios sucesivos de exacerbación y remisión. La pérdida de soporte ocurre en determinados momentos, como episodios recurrentes, seguidos de períodos de inactividad con inflamación reducida (Bullón y cols 1993). Se ha llegado al consenso de que es un **proceso crónico con períodos de agudización** (Borrell y Papapanou 2005). Factores adicionales, como el tabaquismo intenso, pueden acentuar la progresión e influir en la posibilidad de desarrollar o no la enfermedad avanzada (Kinane y Lindhe 2005a).

El tiempo de evolución es un factor muy importante que va a determinar el alcance de las lesiones. La prevalencia en la población de la periodontitis crónica, así como la extensión y la severidad se incrementa con la **edad**

(Flemming 1999, Papapanou 1996, Grossi y cols 1995, Grossi y cols 1994), sin embargo, el momento de inicio y la velocidad de progresión varían entre diferentes individuos y probablemente estén relacionadas con **factores de riesgo genéticos y ambientales**. Teniendo en cuenta el envejecimiento de la población que se espera que se produzca en los países desarrollados, se prevee un incremento, aún no estimado, en el número de periodontitis en el futuro (Loesche y Grossman 2001).

La periodontitis crónica suele ser una forma de enfermedad periodontal de avance lento que en cualquier estadio puede exacerbarse y generar pérdida adicional de inserción y de hueso. En un estudio basado en el sitio de la afección, la incidencia global anual de pérdida de inserción clínica varió entre 0,3% y 4,2% de los dientes (Flemming 1999), lo cual indica que es muy variable la cantidad de sitios que realmente muestran progresión en un plazo determinado. La media anual de pérdida de inserción clínica y de pérdida ósea comunicada varía entre 0,04 y 1,04 mm. La distribución de esta progresión anual indica que sólo una pequeña proporción de la población muestra una alta velocidad media de avance de la enfermedad.

## **PERIODONTITIS AGRESIVA O DE INICIO TEMPRANO**

Comprende un grupo de procesos poco frecuentes (ver epidemiología), a menudo severos y rápidamente progresivos, caracterizados por un comienzo temprano de los síntomas y con una agrupación de casos dentro de la misma familia. En el seminario internacional de 1999 sobre clasificación, la Periodontitis Agresiva fue definida con las siguientes **características comunes** principales (Lang y cols):

- ✓ Historia clínica sin particularidades
- ✓ Pérdida de inserción y destrucción ósea rápidas
- ✓ Agrupación familiar

La rapidez en la instauración y desarrollo de las lesiones hace referencia a la gravedad clínica del proceso, no existiendo un consenso preciso en cuanto a la cronología.

La periodontitis agresiva está relacionada con la adquisición exógena de especies bacterianas con factores de virulencia específicos y, además, puede asociarse a un **nivel alto de susceptibilidad** del sujeto (Tonetti y Mombelli 1999). El diagnóstico de esta enfermedad requiere descartar que se trate de una manifestación periodontal de enfermedades sistémicas como enfermedades hematológicas, neoplasias, infecciones como el SIDA, etc.... Se distinguen dos formas, una localizada y otra generalizada, según estén afectados menos o más del 30% de las localizaciones respectivamente.

Entre las **características secundarias** (Lang y cols 1999) se consideran:

- ✓ Que la acumulación de placa y cálculo no concuerda con la gravedad de la destrucción periodontal.
- ✓ Que se suele encontrar una proporción elevada de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y, en algunos casos, de *Porphyromonas gingivalis*.
- ✓ La respuesta quimiotáctica de los neutrófilos es defectuosa
- ✓ Fenotipo de macrófagos con hiperrespuesta, que incluye la producción elevada de PGE<sub>2</sub> y de IL-1 $\beta$  en respuesta a las endotoxinas bacterianas.
- ✓ La progresión de la pérdida de inserción y de la pérdida ósea puede ser autolimitada.

## **PERIODONTITIS AGRESIVA GENERALIZADA**

Es poco frecuente, y habitualmente se diagnostica en menores de 30 años, aunque los pacientes pueden ser mayores. Presenta una tasa de progresión rápida y una naturaleza episódica pronunciada de la destrucción de la inserción y del hueso alveolar de soporte. Los factores de riesgo y los mediadores proinflamatorios que reducen el estado inmunitario pueden agravar el cuadro clínico. Existe pérdida de inserción interproximal generalizada que afecta al menos a tres dientes permanentes, que no son primeros molares ni incisivos. El grado de gravedad y la distribución de la pérdida de inserción son muy variables. Se produce una pérdida ósea rápida. La encía se encuentra más o menos inflamada y aparecen síntomas frecuentes de actividad.

En su patogenia destaca un aumento de la migración y una reducción de la quimiotaxis de los granulocitos neutrófilos y de los monocitos. Así mismo se observa una escasa respuesta con anticuerpos séricos contra los agentes infecciosos (Tonetti y Mombelli 1999).

## **PERIODONTITIS AGRESIVA LOCALIZADA**

Es poco común, y se inicia en la pubertad, aproximadamente a los 13 años; su curso es rápido y con brotes. La presentación suele ser localizada en primer molar/incisivos con pérdida de inserción interproximal al menos en dos dientes permanentes, uno de los cuales es un primer molar; no afecta a más de dos dientes que no son primeros molares o incisivos. En la fase inicial hay pocos signos de inflamación gingival. Aparecen pérdidas óseas angulares.

También se ha señalado una reducción de la quimiotaxis de los granulocitos neutrófilos y de los monocitos, una disminución de la fagocitosis de los neutrófilos que además presentan una carencia de receptores. Igualmente aparece una enérgica respuesta de anticuerpos séricos contra los agentes infecciosos. En el suero de estos pacientes se han encontrado

anticuerpos específicos contra la leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Tonetti y Mombelli 1999).

### 3. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

La epidemiología de las enfermedades periodontales ha sido y continúa siendo un tema bastante controvertido. Un requisito fundamental para todo estudio epidemiológico es contar con una definición precisa de la enfermedad que se investiga. Uno de los problemas con el que nos enfrentamos para revisar la epidemiología de esta patología es la disparidad de criterios en la **definición de periodontitis** recogida en los estudios epidemiológicos durante la última década, por lo que los hallazgos de los diferentes grupos investigadores no son fáciles de evaluar. Resulta difícil comparar distintos estudios que emplean parámetros diferentes y métodos de medición no calibrados entre sí. Estas incongruencias en las definiciones afectan inevitablemente a las cifras conocidas sobre la distribución de la enfermedad.

Las diferencias más importantes entre los diversos estudios radican en los parámetros y procedimientos de exploración clínica. Un **examen clínico** óptimo de las condiciones periodontales debe incluir el sondaje perimetral en torno a todos los dientes, sin embargo, por razones prácticas, la mayor parte de los estudios epidemiológicos han empleado métodos parciales de registro. La discrepancia entre los hallazgos obtenidos por medio del examen parcial o total de la boca puede ser sustancial. Por ejemplo, Baelum y cols (1993), utilizando datos de un estudio transversal de 1.121 kenyanos de entre 15 y 65 años, compararon los resultados de exámenes de la boca completa con los obtenidos por el uso de 10 dientes índice. El estudio mostró que el registro parcial infraestima la existencia de bolsas (moderadas o profundas) en todos los grupos. La proporción de pacientes con bolsas  $\geq 6$  mm que hubieran sido excluidas si sólo se hubieran explorado los dientes índice fue del 55% en el grupo de 25-29 años, del 39% (40-44 años) y del 23% (50-54 años). Por ello el uso del sistema IPCNT (índice periodontal comunitario y de necesidades de tratamiento) en estudios epidemiológicos de la enfermedad periodontal ha sido



evaluado críticamente en numerosas publicaciones (Papapanou y Lindhe 2005, Borrell y Papapanou 2005, Jenkins y Papapanou 2001, Andriankaja y cols 2006).

A la heterogeneidad de medidas exploratorias habría que añadir que la mayoría de los **estudios epidemiológicos** publicados son estudios transversales, y no longitudinales. Hay una clara necesidad de estudios longitudinales prospectivos que dirijan hipótesis a partir de datos de estudios transversales y que incluyan factores de riesgo establecidos como covariables junto con nuevas exposiciones de interés, particularmente de trabajos de investigación diseñados como ensayos controlados o a doble ciego (Borrell y Papapanou 2005).

Los hallazgos de estudios epidemiológicos realizados en la década de 1950 sobre la **periodontitis en adultos**, muestran la alta prevalencia de la enfermedad periodontal destructiva en la población adulta en general y un claro aumento en la prevalencia de la enfermedad con el **envejecimiento**. Scherp en 1964, en una revisión sobre la epidemiología de la enfermedad periodontal, constató que 1º) la enfermedad periodontal parece ser un problema mayor de salud pública mundial que afecta a la mayoría de la población adulta después de los 35-40 años; 2º) la enfermedad comienza como gingivitis a edad temprana y si se deja sin tratar, termina en periodontitis destructiva progresiva; 3º) más del 90% de la variación en la severidad de la enfermedad periodontal en la población puede explicarse por la edad y por la higiene bucal. Los principios descritos dominaron hasta finales de la década de 1970.

Los estudios realizados durante la década de 1980 brindaron una clasificación más completa de las características de especificidad por sitio de la enfermedad periodontal, y de la alta variación de estados periodontales entre distintas poblaciones y dentro de ellas. En 1986 Baelum y cols mostraron que la enfermedad periodontal avanzada no estaba distribuida uniformemente en la población. El 75% de las localizaciones con pérdida de inserción  $\geq 7$ mm se encontraba en el 31% de los sujetos. La mayoría de los sujetos examinados mostraban problemas periodontales mínimos, mientras que un **grupo limitado**

**estaba afectado por enfermedad avanzada.** Estos mismos autores, en 1988, sugirieron que “la enfermedad periodontal destructiva no debe ser contemplada como una consecuencia inevitable de la gingivitis que en última instancia lleva a una pérdida de dientes considerable” y requiere una caracterización más precisa de los rasgos de destrucción periodontal en las personas particularmente susceptibles.

Varios estudios epidemiológicos publicados en los últimos 20 años verifican los principios enunciados. Las **formas severas de periodontitis afectan a una minoría de sujetos** en los países, en proporciones que no superan el 10-15% de la población (Papapanou 1996, Albandar y cols 1999). El porcentaje de estos sujetos aumenta considerablemente con el **envejecimiento** y parece alcanzar su pico a los 50-60 años (Horning y cols 1990, Flemming 1999) (tabla 3). El aumento de pérdida de dientes que se registra en este grupo de edad explicaría la declinación ulterior de la prevalencia.

Tabla 3. Prevalencia de la periodontitis crónica expresada en porcentajes en sujetos con pérdida de inserción clínica (PIC), comprendidos en diversos grupos etarios (Flemming 1999)

Edad (años)	PIC (3-4 mm)	PIC $\geq$ 5 mm
18-35	9-35	0,3-6
36-55	18-70	12-27
> 55	44-81	35-51

En un metaanálisis sobre 42 estudios realizados en Europa, Estados Unidos y en Latinoamérica que emplearon el IPCNT, Miyazaki y cols (1991 a,b) constataron que, en general, a pesar de la enorme variación en los resultados, las gingivitis y las periodontitis leves están muy extendidas; y en cambio los fenómenos de gran pérdida ósea sólo se observan en el 10-15% de la población. Papapanou y Lindhe (2005) resaltan la dificultad de evaluar hasta

que punto los resultados pueden estar influidos por las limitaciones del sistema de registro parcial empleado.

La prevalencia de periodontitis severa no se distribuye de manera uniforme entre las diversas **razas, etnias o grupos socioeconómicos**. Hay estudios que parecen indicar una mayor prevalencia de la enfermedad periodontal en individuos de raza negra de hasta tres veces más (Grossi y cols 1994, 1995). Sin embargo, un análisis detallado de la literatura confirma que estos hallazgos se podrían achacar a condicionantes socioeconómicos y culturales en las poblaciones estudiadas. Hobdell (2001), en una revisión de la literatura, concluye que, el incremento de determinadas enfermedades orales, entre ellas las enfermedades periodontales destructivas, puede atribuirse en parte a la creciente disparidad entre poblaciones ricas y pobres, tanto en ámbitos nacionales como internacionales, que posiblemente se está exacerbando por la globalización económica.

La enfermedad **en los niños y en los adolescentes** suele comportarse de otra forma. La información sobre variantes de periodontitis que afectan a la dentición primaria (periodontitis prepuberal localizada/generalizada) proviene de informes de casos clínicos y **no hay datos** disponibles sobre su prevalencia y distribución en la población general. Los criterios usados en estudios que incluyeron muestras de niños (Shlossman y cols 1986, Sweeney y cols 1987) no son uniformes, de ahí que los datos sobre prevalencia varíen de forma significativa. Shlossman y cols (1986) utilizaron un valor del nivel de inserción  $\geq 2\text{mm}$  como punto de referencia y mostraron que en una muestra de indios pimes hubo una prevalencia de 7,7% en los de 5-9 años y de 6,1% en los de 10-14 años. Sweeney y cols (1987) examinaron radiografías de 2.264 niños de 5-11 años, derivados de una clínica universitaria para el tratamiento odontológico e informaron que existía una pérdida ósea clara en las radiografías en uno o más molares en 19 niños (0,8%), 16 de los cuales eran negros, 2 caucásicos y 1 asiático. En cambio, conocemos datos más precisos sobre la **periodontitis localizada agresiva (LJP)**. Su prevalencia varía en poblaciones geográfica o racialmente diferentes. La mayoría de los estudios

muestran una incidencia entre el 0,1 y 0,5% (Saxén 1980, Løe y Brown 1991). En personas de **raza** blanca la enfermedad parece afectar más a las mujeres y la prevalencia es baja (aproximadamente 0'1%). En otras razas y en particular en la negra, su frecuencia es mayor (probablemente en niveles superiores al 1%) y la relación por **sexo** parece invertirse, afectando más a varones (Løe y Brown 1991, Melvin y cols 1991).

En cuanto a la **pérdida de dientes**, numerosos trabajos publicados señalan que la gran mayoría de las extracciones hasta los 40-45 años se deben a caries. Sin embargo, en grupos de edad más avanzada, la enfermedad periodontal y la caries se igualan. En general, se estima que la periodontitis provoca el 30-35% de todas las extracciones dentales, mientras que la caries supone el 50% de estas. Stephens y cols (1991) examinaron las razones para la extracción dental en 909 pacientes de edades comprendidas entre 14 y 91 años. La caries fue la principal causa (63%), seguida de la periodontitis (34%). En los grupos de edad adulta, los porcentajes eran aproximadamente los mismos. Reich y Hiller (1993) llevaron a cabo un estudio para recoger información sobre las principales causas de pérdida dental en estados del este de Alemania. La caries fue el motivo de la exodoncia del 20,7% de todas las extracciones, mientras que la enfermedad periodontal fue la razón de extracción del 27,3%. De acuerdo con los 68 dentistas participantes en el estudio alemán, la enfermedad periodontal es el motivo más frecuente de extracción dental en personas con más de 40 años, mientras que para aquellos por debajo de esa edad, la caries y las extracciones de terceros molares eran las razones más frecuentes. En otro estudio, McCaul y cols (2001) observaron que la caries y sus secuelas era la principal razón de pérdida de todos los tipos de dientes salvo los incisivos inferiores cuya extracción se debía principalmente a razones periodontales.

### **3. 1 Factores de riesgo y de susceptibilidad**

El término “**factor de riesgo**” hace referencia a un aspecto del comportamiento o del estilo de vida, una exposición al medio ambiente o una

característica congénita o heredada que acompaña a una enfermedad determinada, según demuestran los estudios epidemiológicos. Puede asociarse con una mayor probabilidad de manifestación de una enfermedad en particular, sin que sea necesariamente un factor causal y es, por definición, modificable. A diferencia de los “factores de riesgo modificables”, los factores inmodificables o de fondo, como la edad, el sexo o el genotipo son reconocidos como “**factores de susceptibilidad**”. En general hay un consenso en la literatura reciente sobre la identificación de factores de riesgo de periodontitis; sin embargo hay una falta de ensayos específicamente dirigidos a la distinción entre factores de riesgo que afectan al comienzo de la enfermedad (**factores de riesgo verdaderos**) y aquellos que afectan a su **progresión**, o incluso **factores pronóstico** determinantes del curso de la enfermedad bajo tratamiento. Las principales características individuales, condiciones clínicas, y enfermedades sistémicas que han sido investigadas en estudios epidemiológicos como supuestos factores de susceptibilidad y factores de riesgo modificables, incluyen edad, sexo, raza, polimorfismos genéticos específicos, estatus socioeconómico, placa dental, microbiota subgingival específica, tabaco, diabetes mellitus, obesidad, infección por VIH, osteoporosis y factores psicosociales (Genco 1996a, Albandar 2002, Borrell y Papapanou 2005).

El tabaco (Gelskey 1999), la diabetes mal controlada (Grossi y Genco 1998) y altos niveles de colonización por bacterias específicas (Genco y Kornman 1996b) se han señalado como verdaderos factores de riesgo (Papapanou 1996), mientras que un gran número de factores putativos, incluyendo polimorfismos genéticos específicos, han sido identificados en estudios de asociación (Schenkein 2002).

Vamos a revisar a continuación los llamados **factores inmodificables o de fondo**. Aunque la prevalencia de la enfermedad periodontal aumenta con la **edad**, la relación entre ésta y la periodontitis no está clara. Todos los estudios que han examinado grandes poblaciones respecto a prevalencia, extensión y avance de la enfermedad periodontal, han encontrado más enfermedad periodontal en grupos de edad avanzada (Grossi y cols 1994, 1995). Así por ejemplo, Mumghamba y cols (1995) en un estudio sobre 1.764 sujetos en

Tanzania, que evaluó la asociación entre la enfermedad periodontal y diversos factores de riesgo, mostró que una de los factores principales asociados con la enfermedad periodontal era la edad, con una odds ratio de 4.06 y 5.05 para los grupos de edad más avanzados, de 35-44 años y  $\geq 45$  años respectivamente. Aunque la pérdida de inserción y de hueso alveolar moderada es común en personas mayores, la periodontitis severa no es una consecuencia natural del envejecimiento. La repercusión de la edad puede representar el efecto acumulativo de la exposición prolongada a verdaderos factores de riesgo (Papapanou y cols 1991). Borrell y Papapanou (2005), en una revisión de la literatura, afirman que la “susceptibilidad individual” a la enfermedad periodontal parece ser más importante que la edad, y sujetos con elevada susceptibilidad manifiestan la enfermedad a una edad más temprana.

Aunque no hay diferencias inherentes establecidas entre **hombres y mujeres** en la susceptibilidad a la periodontitis, los hombres muestran peor salud periodontal que las mujeres (Burt 1999). En la *Third Nacional Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), U.S., Albandar y cols (1999), observaron que los umbrales de pérdida de inserción  $\geq 3\text{mm}$ ,  $\geq 4\text{mm}$  y  $\geq 5\text{mm}$  se observaron, respectivamente, en el 23%, 44% y 55% más de hombres que mujeres. Cuando los porcentajes de dientes con pérdida de inserción se compararon en los dos grupos de género, los porcentajes correspondientes fueron de 48%, 65% y 93%, respectivamente. Un patrón similar de una incidencia más elevada de enfermedad en hombres que en mujeres, se observó en las medidas de profundidad de sondaje y recesión gingival del mismo estudio. Esto parece ser un reflejo de mejores prácticas de higiene oral entre las mujeres (Christensen y cols 2003, Albandar y cols 1999). En la NHANES III, Albandar y cols (1999) encontraron que los hombres como media tenían un 21% más de dientes con cálculo dental que las mujeres. Borrell y Papapanou (2005) señalan que es biológicamente posible que existan diferencias en la respuesta inmuno-inflamatoria del huésped, pero no ha sido demostrado.

No se han documentado diferencias consistentes entre **grupos étnicos** cuando se tienen en cuenta la edad y la higiene oral (Burt 1999). Además la

raza/etnia y el estado socioeconómico están fuertemente relacionados. En un estudio reciente, encontraron que los sujetos de raza blanca que vivían en barriadas con nivel socioeconómico bajo tenían cuatro veces más probabilidad de tener trastornos de salud oral que sus equivalentes en barriadas de alto nivel (Borrell y cols 2004).

La periodontitis afecta en mayor grado a determinadas familias (en algunas, el porcentaje de hermanos afectados alcanza el 40-50% [Boughman y cols 1992]), sobre todo las formas agresivas. En general, se considera que hay suficiente base científica a favor de la presencia de factores genéticos en la aparición de periodontitis agresivas, aunque no se dispone de datos de gemelos y hermanos adoptados que permitan separar la influencia genética del riesgo de exposición al mismo entorno familiar. En las periodontitis crónicas, en cambio, la evidencia de la participación genética es menos manifiesta y es difícil de discriminar dado el sesgo de la posible existencia de reservorios en el hogar y transmisión intrafamiliar.

En los últimos años ha habido un incremento exponencial en el número de publicaciones que examinan una multitud de **polimorfismos genéticos** (variaciones del gen IL-1, IL-10, TNF, etc.) como factores de severidad y susceptibilidad de periodontitis (Schenkein 2002). Entre las citocinas que regulan las reacciones inflamatorias figura la IL-1, cuya producción está regulada por los genes IL-1A e IL-1B. Las mutaciones de un único par de bases son bastante frecuentes; la secuencia de bases normal en el gen se denomina alelo 1, y la modificada, alelo 2. La mutación donde la base citosina es sustituida por la timina en la posición del nucleótido -889 (IL-1A) y en la posición del nucleótido +3953 (IL-1B) da lugar a una propensión acentuada a la inflamación. Se da el nombre de “genotipo IL-1 positivo” al genotipo que posee esta mutación en los dos alelos del gen, o al menos, heterocigóticamente en ambos genes IL (genes IL-1A e IL-1B).

El primer estudio que describió una relación entre los polimorfismos codificantes de los genes IL-1 y la periodontitis fue presentado por Kornman y cols en 1997b, mostrando una asociación con la severidad de la periodontitis

en pacientes de raza blanca no fumadores (OR 18,9 en grupos de edad comprendidos entre 40 y 60 años). Sin embargo, la falta de asociación entre el genotipo IL-1 compuesto también ha sido comunicada para pacientes con periodontitis crónica y agresiva (Hodge y cols 2001, Rogers y cols 2002). Cullinam y cols (2001) realizaron un estudio en 295 sujetos con gingivitis y periodontitis moderada, que fueron seguidos durante 5 años y en quienes se determinó el genotipo IL-1 compuesto. El 39% de los individuos era portador de este genotipo. En los no fumadores mayores de 50 años, con genotipo IL-1 compuesto se observaron profundidades de sondaje mayores que en los negativos para este genotipo. Además se encontró una interacción significativa entre el genotipo IL-1 compuesto y la edad, el hábito de fumar y la presencia de *Porphyromonas gingivalis*, hecho que sugiere que ese genotipo es un factor de susceptibilidad contribuyente, pero no esencial para la progresión de la enfermedad periodontal. Sin embargo, Borrell y Papapanou (2005) afirman que no hay suficiente evidencia epidemiológica que establezca de forma convincente ninguno de los polimorfismos genéticos estudiados como un verdadero factor de riesgo.

A diferencia de los factores de fondo, existen otros que son **adquiridos**, ambientales y de conducta/comportamiento. Así, el **nivel socioeconómico o educacional** bajo se ha relacionado con mayores índices de enfermedad periodontal; su papel puede atribuirse a diferencias en la posibilidad de acceder a medios y oportunidades que faciliten comportamientos preventivos (Albandar 2002, Borrell y Papapanou 2005). Por otra parte, un hábito tóxico como el **tabaquismo** está considerado hoy en día como un factor de riesgo verdadero (Machuca y cols 2000); el fumador severo tiene 2,5 a 7 veces más probabilidad de desarrollar una periodontitis crónica (Kinane y Chestnutt 2000). En un estudio de Haber y cols (1993) encontraron que en una población joven (19 a 30 años), el 51-56% de las periodontitis se asociaban con el hábito de fumar.

Entre las enfermedades sistémicas, la **diabetes mellitus** es un factor de riesgo verdadero de periodontitis, especialmente en sujetos con mal control metabólico y larga duración de la enfermedad (Grossi y Genco 1998, Taylor y cols 1998, Lalla y cols 2004). En un estudio longitudinal de dos años Taylor y



cols (1998) evaluaron el riesgo de pérdida de hueso alveolar mediante radiografías panorámicas en 14 diabéticos no-insulinodependientes mal controlados, en 7 con diabetes mejor controlada y 338 no diabéticos, y encontraron que la odds ratio de desarrollar pérdida ósea a lo largo del tiempo era 2.2 en los diabéticos mejor controlados comparados con los individuos no diabéticos, y 5.3 en los diabéticos mal controlados comparados con los mejor diabéticos controlados. Lalla y cols (2004) estudiaron la asociación entre diabetes mellitus y enfermedad oral en 150 adultos con diabetes y 150 sujetos control, procedentes de una población urbana con bajo nivel socioeconómico, y hallaron un incremento del 50% de pérdida ósea alveolar en los diabéticos comparados con el grupo control.

Aunque numerosas publicaciones de la pasada década señalan un incremento en la prevalencia y la severidad de la periodontitis en sujetos **VIH-seropositivos** (Robinson y cols 1996, McKaig y cols 1998), otros, o no apoyan esta idea o indican que las diferencias en el estado periodontal entre sujetos VIH-seropositivos y VIH-seronegativos son mucho más limitadas de lo que se creía en un principio. Lamster y cols (1997) concluyeron que la progresión de la enfermedad periodontal en presencia de infección por HIV depende de la competencia inmunitaria del huésped y de la respuesta inflamatoria local a la microbiota subgingival típica y atípica. Datos de su laboratorio demuestran una respuesta alterada de mediadores de la inflamación (beta-glucoronidasa e interleuquina-1 beta). La alteración se manifiesta como la ausencia de la fuerte correlación esperada entre la actividad de los leucocitos polimorfonucleares en el surco gingival y las mediciones clínicas de la enfermedad periodontal existente, así como niveles elevados de interleukina-1 beta en localizaciones con profundidades de sondaje aumentadas. Hofer y cols (2002) demostraron que sujetos HIV-positivos que cumplían cuidadosamente el tratamiento periodontal, podían mantenerse periodontalmente, de manera similar a los sujetos no infectados. El examen de las muestras de placa tomadas de localizaciones con periodontitis en individuos seropositivos indicó que la microbiota subgingival era muy similar a la observada en los sujetos con periodontitis no infectados con el VIH, excepto que se encuentren ocasionalmente microorganismos no frecuentes (Rams y cols 1991). Rams y

cols (1991) en un estudio con 14 sujetos infectados con el VIH que presentaban periodontitis, hallaron *A.actynomycetemcomitans*, *C.rectus*, *P.micros* y *P.intermedia* en un promedio de 7-16% de la microbiota cultivable en pacientes positivos para esta especie. Además, los niveles de espiroquetas fueron mayores, mientras que los de *Candida albicans* y de bacilos entéricos gramnegativos resultaron bajos. Así, la microbiota de lesiones en individuos seropositivos resultó bastante parecida a la de los sujetos seronegativos.

Recientemente se han apuntado nuevos factores como **obesidad, la osteopenia /osteoporosis** (Tezal y cols 2000) **y factores psicosociales**, aunque se necesitan ensayos mas amplios para confirmar estos hallazgos (Genco 1996a, Albandar 2002, Borrell y Papapanou 2005).

### **3.2 Efectos sistémicos de las enfermedades periodontales:**

- **Influencia sobre la patología cardiovascular**
- **Repercusión durante el embarazo**
- **Repercusión de la diabetes Mellitus**

Recientemente se han observado asociaciones entre la presencia de lesiones periodontales y procesos patológicos de naturaleza sistémica como la patología cardiovascular, el embarazo o la diabetes mellitus. Se han relacionado las **enfermedades periodontales** con un mayor riesgo de desarrollar patologías cardiovasculares debido a bacteriemias de origen bucal (Beck y Offenbacher 2005, Renvert y cols 2006), y a otros fenómenos patológicos acompañantes como la hiperreactividad de los macrófagos y de otros fagocitos, la liberación de endotoxinas, o la producción de distintas citoquinas (Li y cols 2000). Se ha constatado mediante técnicas de amplificación genéticas la presencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en las placas de ateroma de 146 sujetos (Haraszthy y cols 2000a). En un estudio de cohortes prospectivo DeStefano y cols (1993) encuentran un 25%

más de riesgo de enfermedad coronaria en pacientes con periodontitis avanzada.

Por otra parte, se han relacionado también con la posibilidad de parto **pre-término** y recién nacidos con bajo peso (Romero y cols 2002, López y cols 2002). Así, Marin y cols (2005) observan en gestantes mayores de 25 años, que la enfermedad periodontal está asociada significativamente con los recién nacidos de bajo peso. Asimismo se ha demostrado que estas madres tienen niveles más elevados de prostaglandinas en el fluido crevicular que las madres con recién nacidos de peso normal (131.4 +/- 21.8 vs. 62.6 +/- 10.3) (Offenbacher y cols 1998). Dasanayake y cols (2001) hallaron que los casos prematuros y de bajo peso tenían títulos más altos, con significación estadística, contra *Porphyromonas gingivalis* (media 58.05, SE = 20.00 microg/ml) frente a los casos control (media 13.45, SE = 3.92 microg/ml; P= 0.004).

La periodontitis puede ser también un factor de riesgo para la **diabetes**. Se ha demostrado que el tratamiento periodontal mejora el control metabólico del diabético. Stewart y cols (2001) estudiaron 72 pacientes con diabetes tipo II, la mitad de los cuales recibieron tratamiento periodontal mecánico durante 18 meses. Los pacientes de ambos grupos mostraron descensos estadísticamente significativos en los niveles de HbA1c (una reducción del 17,1% en el grupo de tratamiento y una reducción del 6,7% en el grupo control). Rodrigues y cols (2003) asignaron de forma aleatoria 30 pacientes con diabetes tipo 2 a dos grupos de tratamiento, un grupo recibió terapia periodontal no quirúrgica con amoxicilina/ácido clavulánico y el otro recibió sólo terapia periodontal mecánica. A los 3 meses los niveles de HbA1c se redujeron en ambos grupos, pero la reducción fue estadísticamente significativa sólo en el grupo que recibió únicamente raspado y alisado radicular.

## 4. ETIOLOGÍA

Como en otras patologías con una importante implicación de los procesos inflamatorios, desde hace casi un siglo se están buscando causas bacterianas que originan la aparición de la periodontitis. Mientras que antes predominaba la “hipótesis de la placa inespecífica”, desde los años setenta se ha ido responsabilizando a un número creciente de bacterias específicas como causantes de la enfermedad.

### 4.1. Revisión histórica de las teorías sobre la etiología de la enfermedad periodontal

#### 1880 – 1930 Agentes etiológicos específicos

La búsqueda de los agentes etiológicos de las enfermedades periodontales comenzó en la “era de oro de la microbiología” (1880-1920). Entonces, la identificación de los agentes etiológicos estuvo muy influida por la naturaleza de las técnicas disponibles, una situación parecida a la actual, y se sugirieron cuatro grupos de microorganismos etiológicos: amebas, espiroquetas, fusiformes y estreptococos. La importancia del papel de las espiroquetas y de las bacterias fusiformes en la infección de Vincent (1899) o “boca de trinchera” fue ampliamente reconocida en las dos décadas siguientes. A principios de 1900, se pensó que la invasión bacteriana a los tejidos periodontales era un fenómeno importante en la patogenia. Durante este período se publicaron numerosos trabajos de investigación que sugirieron ciertos **agentes etiológicos específicos**.

En la década de 1920, un grupo de microbiólogos orales y médicos, partiendo de las observaciones realizadas por Vincent, sugirieron que la enfermedad periodontal era el resultado de “**infecciones mixtas**”. A principios de 1930, los investigadores comprobaron que las mezclas de microorganismos tomadas de infecciones pulmonares o de la placa subgingival podían inducir la aparición de lesiones al inyectarlas subcutáneamente en animales de experimentación, causando infecciones mixtas transmisibles. Investigaciones

posteriores que utilizaron mezclas de bacilos anaerobios gramnegativos, incluyendo *Bacteroides melaninogenicus*, causaron también infecciones transmisibles (Macdonald y cols 1956).

### **1930 – 1940 Escepticismo, disminuye el interés por los microorganismos**

Debido a la búsqueda de agentes etiológicos incorrectos, terapias inadecuadas, la multiplicidad de enfermedades e hipótesis sobre su etiología (“atrofia alveolar difusa”, “falta de función”, etc.), **desapareció el concepto del origen infeccioso y de una terapia causal**, atribuyendo la causa a defectos constitucionales, trauma oclusal, atrofia difusa y considerando a las bacterias contribuyentes secundarios de la inflamación (Socransky y Haffajee 2005).

### **1950 – 1970 Hipótesis de la placa inespecífica**

Dada la ineficacia de los tratamientos que se estaban empleando a finales de la década de 1950 basados en el concepto de defectos constitucionales o el trauma oclusal, un grupo de clínicos destacó la necesidad de **controlar la placa** en la prevención y el tratamiento de las enfermedades periodontales. Se partió de la idea de que había una relación directa entre la cantidad de bacterias y la intensidad del efecto patógeno, sin tener en cuenta la relevancia de las diferencias biológicas en la composición de la placa. Se creía que los individuos con enfermedad periodontal avanzada eran más sensibles a la placa bacteriana, o bien, mantenían una higiene oral deficiente. Según esta teoría [denominada “**hipótesis de la placa inespecífica**” (Theilade 1986)], toda acumulación de microorganismos en el margen gingival, independientemente de su naturaleza, o por debajo de él produciría irritantes que generarían inflamación, que en ocasiones, sería la responsable de la destrucción del tejido periodontal. A mediados de los años sesenta los estudios experimentales de Löe y cols (1965, 1967) y de Theilade y cols (1966) demostraron que la acumulación de bacterias en los dientes provocaba una respuesta inflamatoria reproducible en los tejidos gingivales, y que la eliminación de la placa llevaba a la desaparición de esa sintomatología. En esa

línea de pensamiento, numerosos investigadores sostenían que la gingivitis era el inicio de la enfermedad periodontal y que su evolución terminaba por destruir los tejidos periodontales.

En la década de 1960 se reavivó el interés por la etiología microbiana específica. Sin embargo, el énfasis durante esta década estuvo en el **control mecánico de la acumulación de placa**, hecho que concordaba con el concepto predominante de que la enfermedad periodontal se debía a una **acumulación bacteriana inespecífica**. Este concepto todavía está vigente y es la base de las técnicas preventivas en la mayoría de las clínicas dentales. También está claro que el control no específico de la placa no puede evitar de manera eficaz el desarrollo, avance o recaída de todas las formas de enfermedad periodontal.

### **1970 – 2009 Hipótesis de la placa específica**

A partir de los años 70 se desarrollaron procedimientos de cultivo bacteriano que permitían la recuperación de un mayor número de especies bacterianas anaerobias y, además, se diseñaron nuevas técnicas de identificación.

El reconocimiento de **diferencias en la composición de muestras de placa** subgingival tomadas de sitios afectados y sanos en el mismo individuo, y entre individuos con diferentes formas clínicas de enfermedad periodontal a partir de diversos estudios llevados a cabo en la década de 1970 (Slots 1976; Tanner y cols 1979), llevó a la realización de investigaciones que intentaban relacionar los **microorganismos específicos** con la etiología de diferentes enfermedades periodontales.

Se observó que la tendencia de las áreas inflamadas a sufrir una destrucción hística permanente era de naturaleza más específica, porque no todas las gingivitis parecían avanzar de forma ineludible hacia la periodontitis. Se señalaron como posibles patógenos algunos de los microorganismos localizados habitualmente en las lesiones periodontales en concentraciones

superiores a las observadas en sujetos sanos. Si la enfermedad era ocasionada por un grupo determinado de especies bacterianas, la eliminación continua de la placa no sería la única actitud profiláctica o terapéutica, y la supresión o reducción concreta de las bacterias patógenas podría ser una alternativa. Este concepto de la periodontitis causada por patógenos específicos se conoce como “**hipótesis de la placa específica**” (Loesche 1979).

## **4.2 Microbiología de las enfermedades periodontales**

Actualmente se considera que la etiología de la periodontitis es una **infección bacteriana específica** (Loesche y Grossman 2001). Las enfermedades periodontales son enfermedades infecciosas que, aunque poseen muchas propiedades similares a las infecciones microbianas de otras zonas del organismo, presentan rasgos en los cuales difieren. De forma similar a lo que ocurre en otras enfermedades infecciosas, la colonización por patógenos periodontales puede que no conduzca a una destrucción periodontal evidente o manifiesta, considerándose un factor causal **necesario, pero no suficiente**, considerando la importancia de los determinantes patogénicos intraespecie, el tiempo de exposición y la respuesta inflamatoria del individuo. Otro rasgo en común es que parecen estar causadas por un **grupo relativamente definido de microorganismos**, que pueden actuar solos o en combinación. Igualmente, presenta aspectos comunes a otras enfermedades infecciosas, como la necesidad de los microorganismos de adherirse a una o más superficies, de “reconocer” el medio, de la activación o inhibición de factores de virulencia, y de la necesidad de superar o sortear los sistemas de defensa del huésped. A diferencia de otras localizaciones infecciosas, en la boca, los dientes aportan superficies rígidas no descamativas para los depósitos bacterianos, dispuestas de tal manera que parte de ellas están expuestas al medio externo y otra parte se encuentra en contacto con los tejidos conjuntivos. De esta forma los microorganismos colonizan una superficie relativamente estable, y permanecen continuamente en la proximidad de los tejidos del periodonto, lo que supone un riesgo tanto para esos tejidos como para el huésped.

Las enfermedades periodontales son, junto a la caries, las enfermedades infecciosas más comunes que afectan al ser humano. La característica más destacada de estas enfermedades es que están causadas por microorganismos que residen en **biocapas externas** al organismo (**placa dental supra y subgingival**) que se organizan/adhieren sobre los dientes o las superficies periodontales. Estas biopelículas están formadas por microcolonias de células bacterianas (15-20% del volumen), no distribuidas de manera aleatoria, que se encuentran rodeadas por una densa matriz de exopolisacáridos –sobre la cual se pueden depositar otros materiales tanto orgánicos como inorgánicos (Socransky y Haffajee 2002). La biopelícula promueve **propiedades metabólicas** que no serían posibles si las bacterias se encontraran en estado planctónico, y proporciona un **medio protector** para la colonización y multiplicación de microorganismos, aumentando la resistencia de estos a los mecanismos defensivos del huésped y a los agentes antimicrobianos (Socransky y Haffajee 200a).

Por lo general se desconoce el **reservorio de los patógenos**. En su mayor parte las especies encontradas en los seres humanos son específicas de ese entorno y, no suelen hallarse en el ambiente ni en la microbiota subgingival de otras especies animales y se considera que el reservorio podría ser el ser humano (Van Winkelhoff y Boutaga 2005). Por ello se cree que la transmisión en las familias o entre personas no emparentadas desempeña un papel esencial en la transmisión de estos patógenos (Petit y cols 1993ab, Saarela y cols 1993, Preus y cols 1994).

La formación de una biocapa sobre una superficie limpia, dura y no descamativa, como el diente, tras su inmersión en un medio líquido, como la cavidad oral, se desarrolla en varias fases. Inmediatamente después de su inmersión o después de la limpieza, se produce la **adsorción de macromoléculas** hidrófobas [glucoproteínas salivales e inmunoglobulinas] a la superficie formando una biopelícula (la película adquirida). La **adhesión bacteriana** a esta capa supone la incorporación de los formadores primarios de la placa: cocos y bacilos grampositivos facultativos. Este fenómeno se produce



en dos etapas: la primera, **reversible**, en la que las bacterias se adhieren débilmente, y a continuación se alcanza un status **irreversible** en el que la unión se consolida. Los **colonizadores primarios se multiplicarán** para formar colonias favoreciendo el crecimiento de la matriz extracelular. Sobre receptores de estas bacterias se producirá la **adición secuencial de más especies**, entre ellas gramnegativos anaerobios estrictos, hasta formar una biocapa más compleja y madura, cuya heterogeneidad se incrementará con el tiempo (Marshall 1992) (Fig 1.). Estos aspectos los desarrollamos con mayor detalle al describir los efectos sinérgicos de los periodontopatógenos (4.2.2 Bacterias periodontopatógenas).

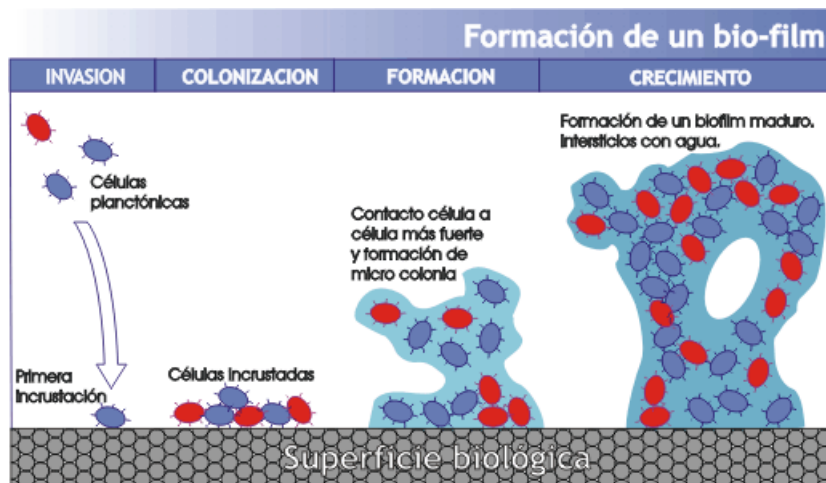


Fig 1. Etapas de la formación de una biocapa.

La formación de esta estructura tan compleja necesita tiempo, que, en función de las condiciones ambientales del surco gingival y las características patológicas de los componentes de la flora subgingival, explicarían la asociación encontrada en los estudios epidemiológicos entre la edad y la gravedad de las lesiones.

La composición de la flora supra e infragingival difiere, ya que se observan diferencias de composición y de cantidad. El aporte sanguíneo local y los componentes del líquido gingival facilitan el crecimiento de las **especies bacterianas gramnegativas** con mayor potencial periodontopático. Debido a la dificultad de obtener muestras de placa subgingival preservada en su posición

entre la encía y los tejidos duros del diente, sólo se dispone de algunos estudios sobre su estructura interna (Listgarten 1976, Westergaard y cols 1978).

La estructura de la placa supra y subgingival es similar, en particular, en casos de gingivitis sin bolsas profundas. Las bacterias incluyen cocos gramnegativos y grampositivos, bacilos y microorganismos filamentosos. Se observan espiroquetas y bacterias flageladas, especialmente en la zona más apical de la placa. La capa superficial suele ser menos densa, con leucocitos interpuestos entre la placa y la superficie epitelial del surco (Listgarten 1976).

En la bolsa periodontal, la estructura de la placa adquiere mayor complejidad. Se distinguen **cuatro nichos ecológicos subgingivales de composición probablemente diferente**: a) la superficie del diente (placa adherida), b) el medio líquido del exudado gingival (placa laxamente adherida), c) la pared blanda de la bolsa y d) la superficie del epitelio de unión (Listgarten y cols 1975, 1976). Aún no se ha investigado en profundidad la composición bacteriana de estos reservorios, desconociéndose la influencia de cada uno de ellos en la patogenia de la enfermedad. Los estudios de Listgarten y cols (1975, 1976 y 1979) mostraron que la superficie orientada hacia el tejido blando almacena una cantidad mayor de espiroquetas, bacterias flageladas y cocos y bacilos gramnegativos. Estos estudios llevaron a la teoría de los complejos de Sokransky y su disposición espacial en el surco. Estudios posteriores han detectado la presencia de grandes cantidades de bacterias periodontopatógenas en la biocapa que recubre la superficie epitelial (*P. gingivalis*, *Tr. denticola* y *T. forsythia*) (Kigure y cols 1995, Dibart y cols 1998).

#### **4.2.1 Características de una bacteria periodontopatógena**

En la cavidad oral se ha detectado hasta ahora la presencia de más de 700 microorganismos distintos, empleando técnicas de cultivo y métodos moleculares, y más de 400 de ellos se hallan en las bolsas periodontales (Paster y cols 2006), los cuales normalmente se mantienen en un equilibrio ecológico fisiológico con el organismo huésped. Lo que conocemos hasta

ahora es que del conjunto de bacterias orales, un subgrupo de especies bacterianas, las denominadas especies periodontopatógenas, son capaces de desencadenar la destrucción del periodonto. El desequilibrio que produce este subgrupo suele corregirse espontáneamente o tras la aplicación de medidas terapéuticas (Socransky y Haffajee 2005a).

Debido a la complejidad de la flora subgingival, fue necesario establecer la relación causal, para lo cual Haffajee y Socransky (1994) adaptaron los postulados de Koch para utilizarlos en la identificación de patógenos periodontales y propusieron los siguientes criterios:

1. **Asociación:** elevadas odds ratios en enfermedad al compararlo con sujetos sanos.
2. **Eliminación:** conversión de enfermedad a salud cuando las bacterias son eliminadas.
3. Desarrollo de una **respuesta inmunitaria específica del huésped.**
4. Presencia de **factores de virulencia.**
5. Evidencia de **estudios en animales** corroborando las observaciones en humanos: la inoculación en animales desarrolla la enfermedad.
6. Apoyo de estudios de **evaluación de riesgo.**

En conjunto, estos apartados señalan que la consideración de una especie como periodontopatógena, no se basa en un solo criterio, sino en el “peso de la evidencia” de una evaluación. No sólo es importante su asociación con la enfermedad, sino la mejora de la enfermedad tras la “eliminación” de los patógenos con el tratamiento, la activación de la respuesta del huésped a la infección específica, la constatación de la presencia de factores de virulencia, la creación de cuadros clínicos similares a la periodontitis en la experimentación animal y el apoyo de estudios prospectivos en los que puede evaluarse el riesgo de progresión de la enfermedad por la presencia de un microorganismo en determinados niveles.

#### 4.2.2 Bacterias periodontopatógenas

Basándose en los criterios descritos por Socransky, el Congreso Mundial de Periodoncia (Genco y Kornman 1996b) identificó tres especies como patógenos periodontales: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *P.gingivalis* (Pg) y *Tannerella forsythia* (Tf) (anteriormente conocida como *Bacteroides forsythus*).

**Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aggregatibacter actinomycetemcomitans)**: Fue la primera especie reconocida en el “consenso de patógenos periodontales”, inicialmente por su asociación con lesiones de LJP, y más tarde por la reducción de sus niveles en sujetos tratados con éxito, la respuesta elevada de anticuerpos para esta especie, la inducción de la enfermedad en animales de experimentación y la presencia de numerosos factores de virulencia (Haffajee y Socransky 1994).

*Actinobacillus actinomycetemcomitans* pertenece al género *Actinobacillus*, de la familia *Pasteurellaceae*. Es un bacilo pequeño, gramnegativo, capnofílico, no móvil, sacarolítico, de extremos redondeados, que crece en medios de cultivo formando colonias pequeñas y convexas con un centro en “forma de estrella” (Murray y cols 1999). El nicho ecológico primario de Aa es el área subgingival (Slots y cols 1980), aunque se encuentra frecuentemente en superficies dentales supragingivales, en las mucosas de la cavidad oral y también puede aparecer en saliva (Socransky y cols 1999).

Recientemente se ha propuesto la reclasificación de este microorganismo en función del gen que codifica la nicotinamida fosforibosil transferasa (enzima que permite a Aa y algunos *Haemophilus* crecer sin factor V). La propuesta englobaría a Aa dentro del género *Aggregatibacter* junto con *H. aphrophilus* y *H. segnis* (Norskov-Lauritsen y Kilian 2006).

Numerosas líneas de investigación apoyan su papel etiológico como un verdadero patógeno periodontal, sobre todo en relación con periodontitis agresivas (Slots y Ting 1999, Fives-Taylor y cols 1999, Socransky y cols 1999).

*Aa* no sólo ha sido encontrado en diferentes formas de periodontitis, sino también en sujetos periodontalmente sanos. Asikainen y cols (1991) obtuvieron muestras de placa subgingival y de saliva estimulada de 293 sujetos, 232 con periodontitis y 61 periodontalmente sanos, y detectaron *Aa* en el 62,5% de las muestras de los sujetos sanos y en el 71,9% de las muestras de los individuos con periodontitis.

*Aa* es una especie heterogénea en cuanto a su capacidad patogénica. Se han reconocido seis **serotipos** de *Aa* (Henderson y cols 2002). El serotipo b es el más frecuentemente asociado con periodontitis agresiva localizada, y el considerado más virulento y patogénico (Henderson y cols 2002). Zambon y cols (1983a) estudiaron 29 pacientes con PJI y observaron que la incidencia del serotipo b era aproximadamente dos veces superior que los serotipos a o c, sugiriendo un mayor potencial patógeno de este serotipo. Por otra parte, Haraszthy y cols (2000b), empleando una técnica de PCR, detectaron este tipo clonal virulento en 39 de 71 sujetos con LJP. Este serotipo es muy homogéneo genéticamente, se han detectado pocos clones diseminados en grandes áreas geográficas, a diferencia de los otros serotipos que son muy heterogéneos (Haubek y cols 1996) El serotipo a<sub>7</sub> ha sido implicado en formas adultas de la enfermedad periodontal destructiva, pero su papel está menos claro (Zambon 1983b).

En esta especie se han identificado varios factores de virulencia: una leucotoxina, una toxina de distensión celular, mecanismos de adherencia como la producción de pili y proteínas específicas y, por último los carbohidratos extracelulares. La leucotoxina es una toxina de la familia RTX, a la que pertenecen la alfa-hemolisina de *Escherichia coli* y la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* (Lally y cols 1999). Esta toxina interfiere con el funcionamiento de los polimorfonucleares humanos, induce la apoptosis de los leucocitos y, a altas concentraciones, es capaz de formar poros transmembrana provocando la muerte celular (Baehni y cols 1979).

En estudios recientes se planteó la posibilidad de que sólo un subgrupo de tipos clonales de *Aa* fuera el causante de la PJI. En un estudio, DiRienzo y

McKay (1994) sobre 800 aislamientos de miembros de 18 familias con al menos un miembro con PJP activa o una historia documentada de la enfermedad y uno o más hermanos, menores de 13 años, sin evidencia clínica de LJP y 32 sujetos control, identificaron un **genotipo** específico de *Aa* que parecía estar asociado con la PJP y fue asociado con la conversión de salud periodontal a enfermedad. Identificaron también dos clones que fueron aislados exclusivamente en sujetos periodontalmente sanos (RFLP Tipo XIII y XIV). Brogan y cols (1994) y otros evidenciaron que el tipo clonal virulento (JP2) mostraba una producción 10 a 20 veces aumentada de leucotoxina respecto a una cepa de *Aa* mínimamente tóxica (652) y se hallaba frecuentemente en pacientes de origen norteafricano (Haubek y cols 1996, 2002). Haubek y cols (2001) estudiaron 217 muestras de placa de niños marroquíes con EOP, 131 (60,4%) fueron positivas en el cultivo para *Aa*. En los pacientes que fueron positivos para *Aa*, se recuperaron 19 aislados en los que se observó una delección de 530 bp en la zona del promotor del gen que codifica la leucotoxina, *ltx*. La consecuencia de esta delección es una producción aumentada de la toxina. Se halló una fuerte asociación entre la presencia del clon JP2 de *Aa* y EOP (OR=29,4).

Además, se ha identificado la producción de una segunda toxina, *cdt*, capaz de inducir la apoptosis de linfocitos T y B, pero no afecta a los fibroblastos (Shenker y cols 1982). Esta toxina de distensión celular es similar a la asociada a *Campylobacter jejuni*, *E. coli* y *Shigella* spp (Pickett y Whitehouse 1999). El efecto más significativo de ambas toxinas es la interrupción de la actividad leucocitaria y linfocitaria, produciéndose un mayor reclutamiento de células inflamatorias. Como consecuencia de esta hiperreactividad, se produce el daño tisular del tejido conectivo y óseo.

El grupo clonal JP2 tiene una capacidad de colonización persistente no observada en otras variantes genéticas de esta especie. En un estudio realizado en 365 niños marroquíes, Haubek y cols (2009) observaron que casi la mitad de los pacientes estaban infectados de forma continua por este microorganismo y que esto estaba relacionado (RR = 13.9) con una forma agresiva de la enfermedad. En este tipo de aislados se ha identificado una "isla

de colonización extendida” (widespread colonization island o WCI). Esta isla, denominada complejo WCI, es un conjunto de 14 genes que codifican proteínas (*flp-rcp-tad*) responsables de la adherencia, autoagregación y formación de la biocapa (Planet y cols 2003). Adicionalmente a este complejo, se ha detectado en esta especie la producción de un polímero extracelular de D-glucosamina, denominada PGA, que actúa en la formación de la biocapa como cemento que facilita la autoagregación (Kaplan y cols 2003).

Por último, los pacientes con periodontitis juvenil presentan niveles de anticuerpos séricos contra *Aa* claramente elevados en comparación con los de sujetos sanos (Listgarten y cols 1981, Ebersole y Taubman 1994). Listgarten y cols (1981) determinaron los niveles de anticuerpos séricos contra cuatro cepas de *Aa* utilizando una técnica de inmunofluorescencia indirecta en tres grupos de 21 pacientes cada uno con periodontitis juvenil, periodontitis crónica y sin periodontitis y encontraron que los niveles medios de anticuerpos contra *Aa* estaban significativamente elevados ( $p < 0.05$ ) en el grupo de periodontitis juvenil para tres de las cepas que contenían una leucotoxina.

**Porphyromonas gingivalis**: Es un miembro del género *Porphyromonas*, de la familia *Bacteroidaceae*; pertenece al grupo de los *Bacteroides* de pigmentación negra que forman colonias de color negro-amarronado. Es un coco-bacilo gramnegativo, anaerobio estricto, no móvil, y asacarolítico, que forma pequeñas colonias convexas (1-2mm) con una típica pigmentación marrón oscura o negra (Murray y cols 1999). El nicho ecológico de *Pg* es el área subgingival (Slots 1979, Danser y cols 1995), aunque se puede encontrar de manera ocasional en las mucosas orales y en saliva. Van Winkelhoff y cols (1988) encontraron *Pg* en seis de ocho muestras de saliva de pacientes con periodontitis sin tratar en recuentos de 6 a 20 x 10<sup>6</sup> UFC/ml. Es considerado un verdadero patógeno periodontal, más comúnmente asociado con la periodontitis crónica (Slots y Ting 1999, Socransky y cols 1999, Holt y cols 1999).

Madianos y cols (1997), en un estudio in vitro, observaron que *Pg* puede inhibir la migración de los PMN a través de la barrera epitelial. Además en otro estudio in vitro, Sandros y cols (2000) demostraron que *Pg* afecta a la producción o degradación de citocinas por células de mamíferos. Esta especie se ha encontrado en escasa cantidad en sujetos sanos o con gingivitis, y se detecta con mayor frecuencia en las formas destructivas de la enfermedad (Haffajee y Socransky 1994). Wolf y cols (1993) observaron que la OR de encontrar altos niveles de *Pg* era de 3.9 en bolsas > 5mm. También se ha demostrado que aumenta su número o frecuencia de detección en localizaciones deterioradas. Así, en un estudio sobre 16 pacientes con EOP se detectó mediante PCR la presencia de *Pg* en el 71,9% de las localizaciones activas (Kamma y cols 2001). Además se ha asociado con un riesgo elevado de gravedad y progreso de la enfermedad. Grossi y cols (1995) encontraron que la colonización subgingival por *Pg* estaba asociada con una pérdida ósea severa (OR 1,73).

El hecho de que pueda estar presente *Pg* en bolsas periodontales activas y en surcos gingivales sanos sugiere que es una especie heterogénea con subpoblaciones de elevada y baja patogenicidad (Frandsen y cols 2001). Se han empleado diversos métodos de tipificado molecular para la caracterización de clones patógenos. Sin embargo, el poder discriminatorio y la reproducibilidad de estos métodos son variables. Estudios basados en la secuenciación de varios genes esenciales, metodología denominada Multilocus Type Sequencing o MLST, sugieren que esta especie es panmítica. En este sentido llama la atención que el 7% del genoma de esta especie contiene secuencias repetitivas, especialmente secuencias de inserción o IS. Estas secuencias originan una alta frecuencia de recombinación intraespecífica, aunque con escasa repercusión a nivel proteico, pero que produce un alto grado de polimorfismo (Koehler y cols 2003).

En esta especie bacteriana se observa una mayor variabilidad en el espacio intergénico de los genes codificantes de ribosomas (ISR) que en el propio gen 16S ARNr que se usa habitualmente para determinar filogenia. (Rumpf y cols 2000). Griffen y cols (1999) analizando las secuencias IRS,



determinaron la existencia de 11 heteroduplex o variantes genéticas mientras que en otros estudios, como el de Ley y cols (Leys y cols 1999), se han encontrado hasta 22 variantes clonales. En ambos estudios se detectó *Pg* en el 79% de los sujetos con periodontitis y en el 25% de los individuos sanos ( $p < 0,0001$ ), pero lo más interesante fue la asociación de algunas variantes genéticas, como la HW83, la h49417 y la hHG1691, que estaban significativamente asociadas a enfermedad. La probabilidad de encontrar hW83 y h49417 fue (para cada una de ellas) casi diez veces superior en pacientes con periodontitis que en sujetos sanos, pero el intervalo de confianza del 95% fue menor para la hW83. Estos datos indican que la virulencia en la periodontitis humana varía entre las cepas de *Pg*, e identifican un subgrupo muy virulento.

En un estudio de Enersen y cols (2006) se analizaron un total de cuarenta cepas de *Pg* procedentes de 9 países de 4 continentes mediante MLST (multilocus sequence typing); 38 de pacientes con periodontitis crónica y 2 de un estudio en monos *Macaca fascicularis* con periodontitis. Utilizando esta metodología se identificaron un total de **33 patrones**, y se hallaron clones idénticos o relacionados en aislamientos de diferentes regiones geográficas. **Estos resultados mostraron signos de una estructura poblacional clonal, con un nivel de recombinación no tan elevado como el que se había sugerido previamente para esta especie.** Este estudio proporciona evidencia adicional de una alta diversidad genética de la especie, pero a pesar de la amplia recombinación, existe algún grado de clonalidad en la subpoblación patógena de *Pg*.

En esta especie se han identificado varios determinantes de patogenicidad: el polisacárido capsular, o antígeno K, las hemaglutininas, la fimbria y las gingipaínas. Únicamente los clones virulentos están capsulados y poseen los genes codificantes de los enzimas responsables de la síntesis de la cápsula (Aduse-Opoku y cols 2006). Los anticuerpos producidos por los pacientes periodontales están dirigidos frente a esta estructura polisacárida (O'Brien-Simpson y cols 2000) y se ha observado que es responsable de reducir la respuesta inmune de los fibroblastos (Brunner y cols 2010) Las

gingipainas son cistein proteasas que están presentes en la superficie de *P. gingivalis* y que poseen un alto poder proteolítico además de poseer dominios de adhesinas. La actividad de las gingipainas está relacionada con la destrucción tisular y la pérdida de inserción observada en la enfermedad periodontal (Eley y Cox 1996), así como en su capacidad de adherencia interbacteriana y a células como fibroblastos, eritrocitos, leucocitos y células epiteliales. De forma adicional, esta especie expresa 5 hemaglutininas en la superficie implicadas en la adhesión a receptores oligosacáridos de células humanas (Bodet y cols 2007). Respecto al tipo de fimbria, en estudios recientes se ha observado que los aislados virulentos se caracterizan por expresar el alelo tipo II de la fimbria A, mientras que los que no están asociados con patología expresan el tipo I (Kato y cols 2007). La fimbria, junto con las gingipaínas-adhesinas y las hemaglutininas, juegan un papel decisivo en la adherencia bacteriana de *P. gingivalis*.

La adhesión constituye la etapa inicial de la invasión de tejidos periodontales de esta especie. La adhesión desencadena una serie de señales en la célula humana, mediante la activación de quinasas, que provocan la formación de una invaginación de la membrana que acaba rodeando a la bacteria e internalizándola (Houalet-Jeanne y cols 2001). Una vez en el interior de la célula es capaz de multiplicarse dentro de la vesícula invaginada (Houalet-Jeanne y cols 2001) y también de propagarse a células contiguas sin pasar por el espacio extracelular (Yilmaz y cols 2006) y de esta forma diseminarse en los tejidos y escapar a la acción de los fagocitos.

**Tannerella forsythia (Bacteroides fusiformes/ forsythus):** Es un bacilo fusiforme muy pleomórfico, gramnegativo de crecimiento lento (requiere entre 7 y 14 días para la formación de colonias diminutas), anaerobio, no móvil y asacarolítico (Murray y cols 1999). Su nicho ecológico es el área subgingival, aunque se ha encontrado también en las amígdalas, en el dorso de la lengua y en la saliva. Es una especie difícil de cultivar. Su crecimiento mejora con el cocultivo con *F. nucleatum* y con la inclusión de ácido N-acetilmurámico en el

medio de cultivo, *Tf* tiene un requerimiento infrecuente de este factor, que es un componente esencial de la pared celular de peptidoglicano (Wyss 1989).

Los determinantes de patogenicidad observados en esta especie han sido su capacidad de adherencia y de inducción de la apoptosis celular. La pared bacteriana de *T. forsythia* es la responsable de la adherencia a células epiteliales (Sabet y cols 2003) y a otras especies bacterianas como *P. gingivalis* y *T. denticola*, propiedad muy significativa para la formación de biocapas en las bolsas periodontales. Recientemente, el fenómeno de apoptosis, caracterizado por la activación de las caspasas, endonucleasas eucariontas, se ha relacionado con la destrucción de tejidos periodontales (Bantel y cols 2005). Las lipoproteínas de la membrana bacteriana de esta especie son capaces de activar las caspasas 3 y 8 de varias líneas celulares humanas (Hasebe y cols 2004).

Además de las tres especies descritas, se ha demostrado una asociación moderada para otras bacterias aisladas de la microbiota subgingival como ***Campylobacter rectus (Cr)***, ***Eubacterium nodatum (En)***, ***Fusobacterium nucleatum (Fn)***, ***Peptostreptococcus micros (Pm)***, ***Prevotella intermedia (Pi)*** y ***Prevotella nigrescens (Pn)***, ***Streptococcus intermedius (Si)*** y varias espiroquetas, como ***Treponema denticola (Td)*** (Genco y Kornman 1996b). La mayoría de estos patógenos pertenecen a la microflora oral normal y se encuentran presentes normalmente en casos de gingivitis y en sujetos sanos, por lo que su papel en la etiología es menos evidente.

Estudios preliminares han sugerido a determinados grupos de especies como iniciadores o posibles contribuyentes a la patogenia de la enfermedad periodontal: ***Eikenella corrodens (Ec)***, **bacilos entéricos**, **especies de *Pseudomonas*** y **de *Staphylococcus*** y **levaduras** (Genco y Kornman 1996b). Algunas de estas especies como, especies de *pseudomonas* y de bacilos entéricos, se encuentran raramente, y en relativamente poca cantidad, en la población occidental. Su papel etiológico parece también poco claro.

Recientemente se ha implicado a virus, como el **de Epstein-Barr, el citomegalovirus humano, el virus del papiloma y el del herpes simple** en la etiología y evolución de las enfermedades periodontales. La infección gingival viral podría producir un deterioro de los mecanismos del huésped a la microflora subgingival local, lo que favorecería la colonización por patógenos periodontales y el desarrollo de la enfermedad inflamatoria destructiva (Contreras y Slots 2000, Ling y cols 2004). Estos genomas víricos han sido aislados de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica (Contreras y Slots 1996), agresiva (Michalowicz y cols 2000) y periodontitis asociada con enfermedades sistémicas en estudios transversales (Contreras y cols 2001).

### **Efectos sinérgicos de los periodontopatógenos**

Hoy en día las enfermedades periodontales se consideran infecciones bacterianas mixtas. Las bacterias no actúan como especies individuales, sino que existen **asociaciones específicas** entre las especies bacterianas en las biopelículas. Socransky y cols (1998) elaboraron una clasificación que incluía la presencia de seis grupos microbianos dentro de la placa dental, que se asocian al colonizar la superficie dental, a los que asignaron un código de colores en función de su patogenicidad (Fig. 2). Examinaron más de 13.000 muestras de placa subgingival procedentes de 185 adultos y emplearon análisis de conglomerados y técnicas de ordenación de comunidad.

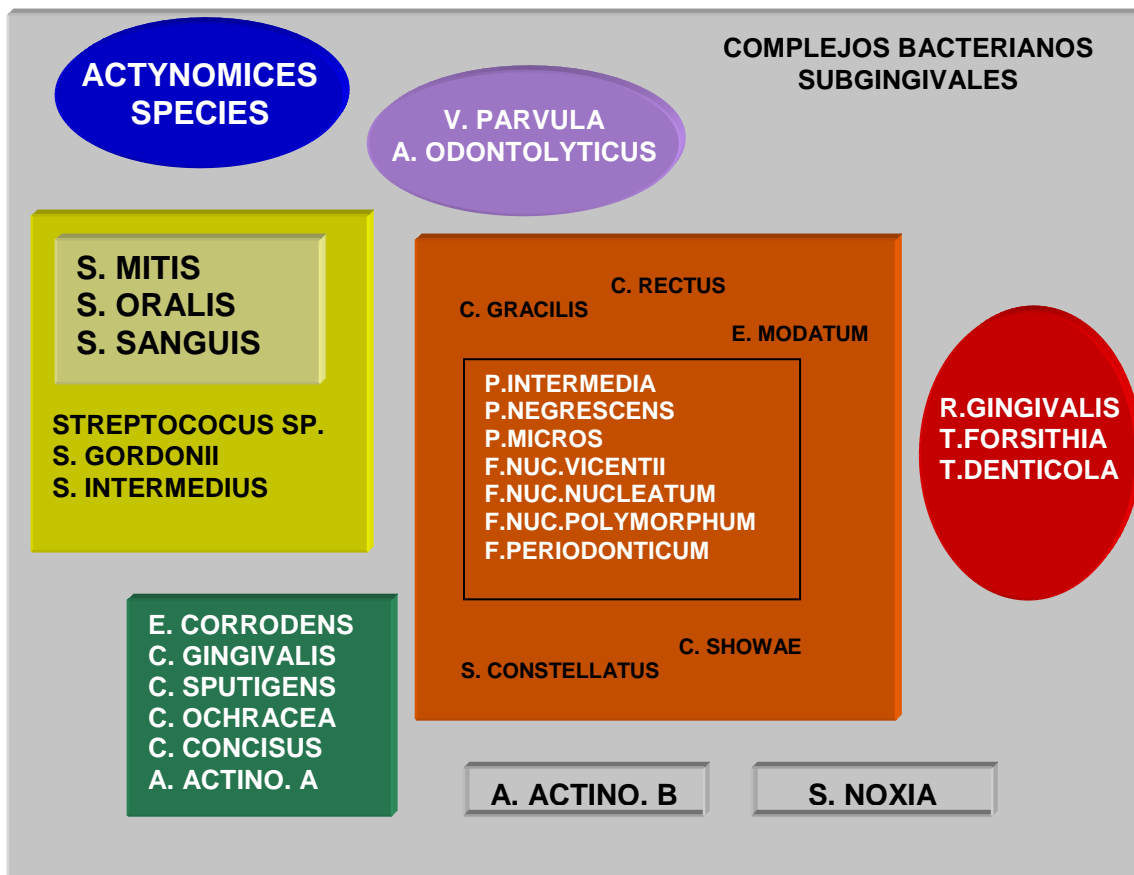


Fig. 2. Esquema de la asociación entre especies subgingivales (Socransky y cols 1998).

- Azul: *Actinomyces spp*
- Amarillo: bacterias del género *Streptococcus*.
- Verde: *Capnocytophaga spp*, *A. actinomycetemcomitans serotipo a*, *E. corrodens* y *Campylobacter concisus*.
- Púrpura: *Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvula*
- Naranja: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Streptococcus constellatus*.
- Rojo: ***Porphyromonas gingivalis***, ***Tannerella forsythia*** y ***Treponema denticola***.
- Bacterias que no pertenecen a ningún complejo microbiano, como es el caso de ***A. actinomycetemcomitans serotipo b***.

Los cuatro primeros grupos de especies son colonizadores iniciales del surco gingival y forman parte de la flora supragingival normal, presente en pacientes sanos y también en pacientes sin dientes. Las especies del complejo naranja preceden a la aparición de los periodontopatógenos y favorecen la formación de biocapas de especies más patógenas, especialmente *Fusobacterium* y *Prevotella*. Este complejo es necesario para la estabilidad de la biocapa. La sucesión bacteriana facilita la maduración de las poblaciones de la placa, y se cree que el establecimiento de los agentes periodontopatógenos depende de los cambios en la diversidad bacteriana que se producen a medida que la biocapa se desarrolla (Socransky y cols 1998).

Las especies de *Actinomyces* son las que parecen dominar en la placa supragingival y subgingival de individuos sanos y enfermos. Sin embargo, a medida que se avanza **del medio supragingival al subgingival y de la salud a la enfermedad**, hay una **disminución en las especies de *Actinomyces* y un predominio de los miembros del complejo rojo y naranja**.

Las características más destacables que interviene en la formación de las biocapas bacterianas y que explican la arquitectura observada en los complejos de Socransky son la agregación bacteriana y el comensalismo entre especies. Dentro de la agregación bacteriana hay que distinguir la autoagregación y la coagregación. La autoagregación es la propensión a agregarse células de la misma especie, característica común a los colonizadores primarios y a muchos patógenos. Específicamente, tanto *Aggregatibacter* como *Porphyromonas* son conocidos por sus propiedades autoagregativas, que incluso definen el taxon en el caso de *A. actinomycetemcomitans*. Esta propiedad confiere ventajas frente a especies no autoagregativas, debido a que aumenta la unión en biocapas en fases iniciales de formación (Elliot y cols 2006).

La coagregación se produce entre bacterias de distintas especies. Los fenómenos de coagregación están mediados por componentes de la superficie bacteriana, en muchos casos proteínas sensibles a proteasas, que reconocen y se unen a receptores específicos de otra especie. Esta comunicación interbacteriana explica la sucesión ordenada y organizada de especies

bacterianas orales en la arquitectura de las biocapas subgingivales. Un esquema representativo se muestra en la figura 3 a partir de los trabajos de Kolenbrander y cols (2002). Kolenbrander y cols (2002) demostraron relaciones similares a las de los complejos microbianos de Socransky y Haffajee en estudios de coagregación in vitro, en los que examinaron las interacciones entre pares de especies bacterianas de la cavidad bucal diferentes, lo que sugiere que la coagregación podría ser un determinante ecológico relevante en el desarrollo de la biodiversidad de la placa supragingival y subgingival. Entre las especies orales analizadas, *Fusobacterium nucleatum*, perteneciente al complejo naranja de Socransky, ha demostrado unas capacidades únicas, mediando en la coagregación de los primeros colonizadores con las especies patógenas como *P. gingivalis*. Se ha observado que la presencia de *F. nucleatum* favorece el crecimiento de *P. gingivalis* incluso en ambientes atmosféricas desfavorables (Diaz y cols 2002). Por otra parte, la detección de *T. forsythia* en una bolsa periodontal con frecuencia se ve acompañada con la presencia simultánea de *P. gingivalis*.

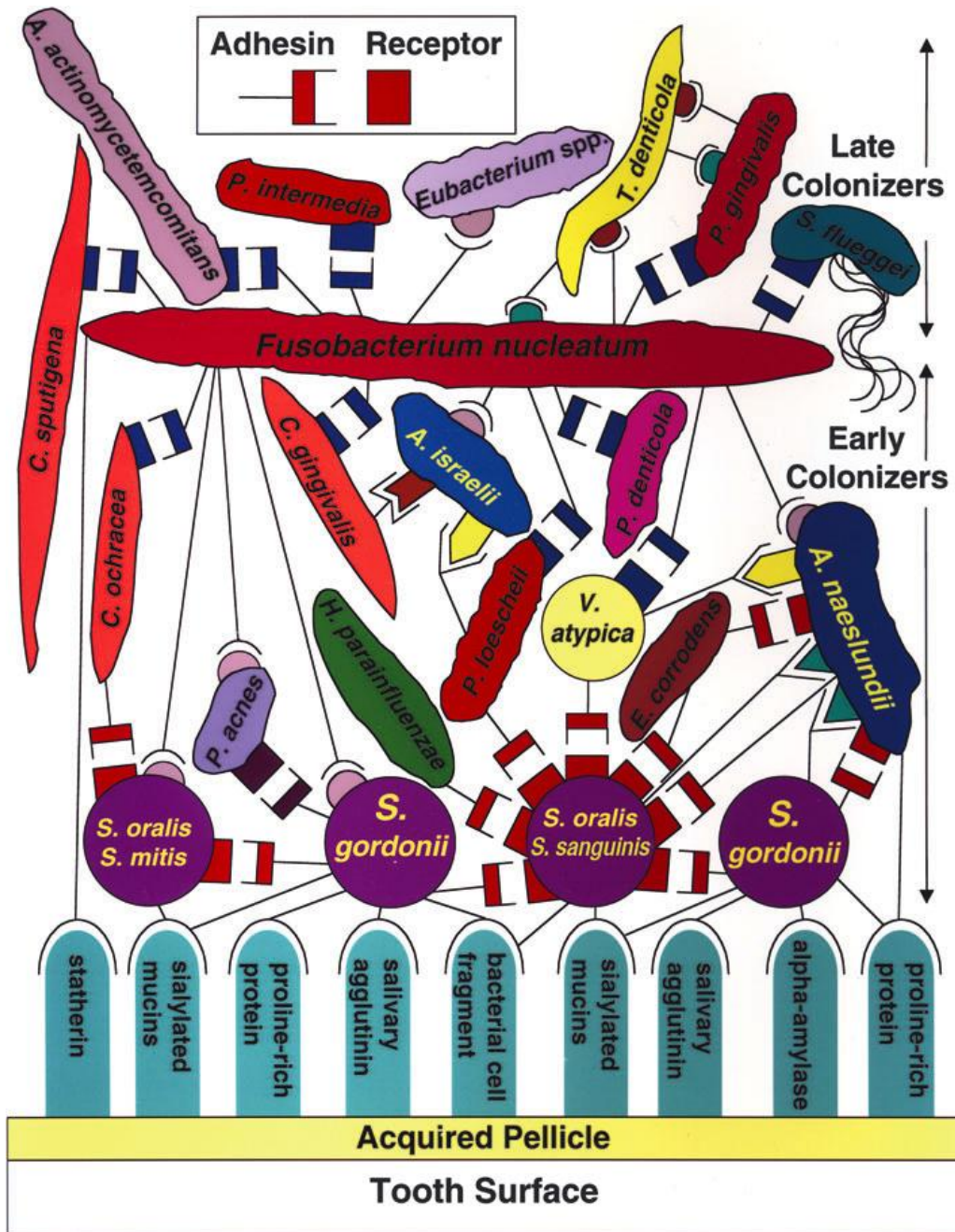


Figura 3. Esquema representativo de la coagregación bacteriana en la placa subgingival (Kolebrander y cols 2002).



## 5. DIAGNÓSTICO

### 5.1 Diagnóstico de la periodontitis

En el diagnóstico debemos considerar tres aspectos: el motivo de consulta, los cambios inflamatorios de la encía y los signos de destrucción periodontal. Los **motivos de consulta** son, con frecuencia, signos y síntomas tardíos de la enfermedad e incluyen la movilidad y migraciones dentarias, recesiones gingivales, abscesos periodontales y halitosis. El **grado de inflamación gingival** se evalúa mediante un examen visual y el sangrado al sondaje, que detecta la presencia de inflamación subgingival. La **lesión inflamatoria destructiva del periodonto** da lugar a una migración apical del epitelio de unión y a una afectación de los tejidos periodontales profundos (cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar). Las manifestaciones clínicas principales de la enfermedad son la presencia de profundidades de sondaje superior a 3 mm y la recesión gingival. La pérdida de inserción clínica (suma de la recesión gingival más la profundidad de bolsa al sondaje) junto con el estudio radiológico, mediante serie periapical, nos permite valorar la pérdida de soporte óseo y realizar un diagnóstico completo de la afectación periodontal.

Las bolsas con mayor profundidad de sondaje tienen más riesgo de progresión que las poco profundas, tanto en pacientes tratados como en los no tratados; además, cuanto mayores son las profundidades de sondaje mayor es el riesgo de progresión de la enfermedad en el futuro (Greenstein 1997a). El **sangrado al sondaje** es el indicador más preciso de actividad de la lesión (Lang y cols 1986), sin embargo, hay que tener en cuenta que los signos de inflamación pueden estar ausentes en períodos de inactividad o ser signos inespecíficos de inflamación gingival. Lang y cols (1990), en un estudio prospectivo de dos años y medio de duración concluyeron que el hecho de que el valor predictivo positivo de progresión de enfermedad fuera sólo del 6% y el valor predictivo negativo del 98% hace que la ausencia continua de “sangrado al sondaje” sea un predictor fiable del mantenimiento de la salud periodontal.

Es necesario además, valorar otros aspectos como la edad de comienzo y la tasa de progresión del proceso (si tenemos datos clínicos o radiológicos anteriores del mismo paciente). La extensión del proceso indicará si un caso es diagnosticado como localizado o generalizado, y la severidad de la destrucción periodontal nos indicará si estamos ante un caso inicial, moderado o avanzado. Es importante determinar la presencia de factores de susceptibilidad y de riesgo que pueden influir negativamente en el resultado del tratamiento y en la evolución durante el mantenimiento.

## **5.2 Importancia del diagnóstico microbiológico en Periodoncia**

La utilidad del diagnóstico microbiológico persigue varios objetivos en la consecución final de una eficacia terapéutica. En primer lugar se trata de **distinguir tipos microbiológicos** de infecciones periodontales, para **seleccionar a los pacientes** que deben recibir tratamiento antibiótico sistémico (periodontitis agresiva, refractaria, recurrente, combinadas con enfermedades sistémicas, periodontitis crónica muy avanzada e implantología). La **elección del tratamiento óptimo** pretende la eliminación de los gérmenes y trata de **evitar la aparición de resistencias**.

Varios estudios han probado la utilidad de la identificación microbiológica como ayuda en el plan de tratamiento, como el trabajo de Rosenberg y cols (1993) que investigaron la eficacia de obtener datos basales de cultivo y datos de sensibilidad en pacientes con periodontitis del adulto. Individuos diagnosticados de PC, PRP o PR fueron seguidos durante un período de 6 años. Más del 95% de los pacientes con PC fueron tratados con éxito únicamente con terapia mecánica; aproximadamente la mitad de los pacientes con PRP fueron tratados con éxito sin antibióticos y, todos los pacientes con PR necesitaron antibióticos sistémicos. La mayoría de los sujetos con PC mostraban una o dos especies de microorganismos al inicio, y éstas eran eliminadas o reducidas a niveles muy bajos mediante la terapia mecánica. Por el contrario, los pacientes con PRP o PR presentaban múltiples especies y

requerían antibióticos sistémicos junto con la terapia mecánica para detectar descensos de recuentos de bacterias en la microflora subgingival.

Asimismo el diagnóstico microbiológico ayuda a establecer **cuando se debe terminar el tratamiento** periodontal activo, y contribuye a definir la frecuencia del mantenimiento. Renvert y cols (1996) evaluaron el efecto clínico del tratamiento dirigido a la supresión de *Aa* y *Pg* por debajo de los niveles de detección, y *Pi* por debajo del 5% de la flora cultivable de la bolsa periodontal. La presencia de *Aa*, *Pg* y *Pi*, solos o en combinación, se correlacionó con cambios en el nivel de inserción a nivel individual. Chaves y cols (2000) demostraron que la presencia de *Pg* tenía un valor predictivo en su **progresión** y en la pérdida de hueso alveolar (valor predictivo positivo 84%, valor predictivo negativo 85%, odds ratio 31.9,  $p < 0.0001$ ). En el mismo sentido, Tran y cols (2001) comprobaron que los pacientes en los que persistía *Tf* tenían 5.3 veces más probabilidades de desarrollar pérdida de inserción que aquellos que no lo tenían. En otro estudio (Dahlen y Rosling 1998) se evaluó si la presencia de *Aa*, *Pg* y *Pi*, detectados por cultivo podía discriminar entre pacientes con enfermedad periodontal recurrente, con enfermedad periodontal tratada o sujetos periodontalmente sanos. Aunque los tres microorganismos se encontraban significativamente más frecuentemente en sitios enfermos, se concluyó que una muestra positiva para los tres indicaría una falsa señal de actividad de la enfermedad. Sin embargo, una muestra negativa para las tres bacterias indica fuertemente ausencia de actividad de la enfermedad.

Por último, las técnicas de diagnóstico microbiológico permiten seleccionar pacientes con necesidad de tratamiento periodontal previo a la colocación de implantes (especialmente si tienen historia de periodontitis) (Van Winkelhoff 2000a), y aportan información sobre la transmisión horizontal y vertical de patógenos periodontales (Van Winkelhoff 2005a).

### 5.3 Métodos de diagnóstico microbiológico

La variabilidad que se observa en los diferentes estudios que analizan la prevalencia de periodontopatógenos en diferentes grupos de pacientes se debe en parte a los diferentes métodos de detección empleados. Las tres especies cultivables, y especialmente *Pg* y *Tf*, son bacterias difíciles de obtener con medios habituales en el laboratorio. La incorporación de métodos moleculares específicos para estas bacterias, no dependientes del cultivo, ha permitido incrementar la **sensibilidad en la detección**.

#### 1. Tipos de pruebas microbiológicas

A. **Cultivos**: La obtención de cultivos bacterianos es uno de los métodos de diagnóstico clásicos más antiguos, dirigido a caracterizar la composición de la microflora subgingival, y continúa siendo el método de referencia (**gold standard**) para determinar la utilidad de nuevas pruebas diagnósticas en microbiología. Mediante cultivos selectivos y no selectivos obtenemos colonias de *Aa*, *Pg* y *Tf* (Liébana 2002).

Las técnicas de cultivo presentan sin embargo algunas **limitaciones**: Las bacterias deben mantenerse vivas durante el transporte; los periodontopatógenos suelen ser anaerobios, y pueden causar problemas en la toma y las condiciones de transporte al laboratorio ( $O_2$ , temperatura, medio nutritivo); el cultivo requiere tiempo, conocimientos microbiológicos y un equipamiento adecuado de laboratorio con los costes correspondientes. Además las bacterias anaerobias orales crecen muy lentamente, y, en ocasiones, hay que esperar unas tres semanas para obtener un resultado definitivo. Por otra parte algunas especies bacterianas son difíciles de cultivar (Sakamoto y cols 2002), a lo que hay que añadir que la sensibilidad del cultivo puede ser muy baja, especialmente en medios no selectivos, con límites de detección entre  $10^3$  -  $10^4$  bacterias, por lo que patógenos específicos que se encuentren en pequeñas cantidades pueden no ser detectados.

## B. Pruebas inmunológicas:

La identificación inmunológica de las bacterias se efectúa mediante anticuerpos monoclonales (Ac) que deben reaccionar frente a determinados antígenos (Ag) específicos (estructuras como pili, fimbrias; mayoritariamente hidratos de carbono y glucoproteínas). Para hacer visible la unión Ag-Ac se emplean sustancias colorantes o fluorescentes. La **inmunofluorescencia** permite observar la reacción Ag-Ac en el microscopio de fluorescencia (luz ultravioleta). Las bacterias fijadas en el portaobjetos se ligan, mediante sus antígenos superficiales específicos para cada tipo, a los anticuerpos específicos añadidos, que llevan adheridas moléculas fluorescentes. En los procedimientos con inmunofluorescencia **directa** el Ac está marcado con una enzima fluorescente, y se acopla sin intermediarios al antígeno bacteriano. En las **técnicas indirectas**, en un primer tiempo se forma un complejo Ag bacteriano / Ac específico, y en un segundo tiempo se añade un segundo Ac, esta vez marcado con un fluorocromo, que se fija sobre el primer Ac (Wolf y cols 2005c). Zambon y cols (1985) mostraron que las técnicas de inmunofluorescencia indirecta eran comparables con el cultivo bacteriano en su capacidad para identificar *Aa* y *Pg* en muestras de placa subgingival. La sensibilidad de la inmunofluorescencia indirecta comparada con el cultivo fue del 91 al 100% mientras que la especificidad varió del 87 al 89%. Listgarten y cols (1995) compararon la utilidad diagnóstica de las técnicas indirectas y el cultivo para la detección de *Aa*, mostrando una sensibilidad más alta de las técnicas indirectas (41,8%) y una tasa de detección significativamente más elevada (39,4% para el cultivo frente al 81,8% para las técnicas indirectas).

Las pruebas de **ELISA (enzimo-inmunoanálisis)** se basan en una reacción cromática. A diferencia de los métodos anteriores que usan el microscopio, en este caso la lectura es automática y en un autoanalizador. Quizás su principal ventaja reside en el examen simultáneo de numerosas muestras, o para la valoración de titulaciones (Liébana 2002).

Las pruebas inmunológicas para bacterias orales proporcionan una estimación cuantitativa o semicuantitativa de los microorganismos marcadores.

Estos métodos han mostrado una mayor sensibilidad y especificidad que el cultivo bacteriano en la detección de *Aa*, *Pg* y *Tf*; sin embargo requieren el uso de anticuerpos monoclonales para asegurar una elevada especificidad y los límites de detección son similares o inferiores que los del cultivo ( $10^3$  -  $10^4$ ). Snyder y cols (1996) encontraron un límite de detección de  $10^5$  para *Aa* y  $10^6$  para *Pg*. Tienen además la ventaja de que no exigen una toma de muestras rigurosa y un transporte metodológico para asegurar la viabilidad de las bacterias. Sin embargo están limitadas por el número de anticuerpos que se ponen a prueba, no sirven para estudiar la susceptibilidad a los antibióticos y hay una falta de estudios clínicos bien controlados que los validen (Sanz y cols 2004).

### **C. Pruebas bacterianas enzimáticas. Test BANA**

Determinadas bacterias periodontopatógenas como *Tf*, *Pg*, *Td* o *Capnocytophaga spp*, producen una enzima similar a la tripsina capaz de degradar el sustrato sintético N- $\alpha$ -benzoilo-DL-arginina-2-naftilamida o BANA. Uno de los productos de descomposición es la  $\beta$ -naftilamida, que puede hacerse visible mediante una reacción cromática y utilizarse para la identificación de gérmenes. El test BANA (Perioscan<sup>®</sup>), aunque es relativamente barato y rápido, no sirve para detectar *Aa*, y se ha visto que otros gérmenes de la bolsa poco patógenos también pueden ser BANA positivos. Loesche y cols (1992) propuso el empleo de esta reacción BANA en las muestras de placa subgingival para detectar la presencia de cualquiera de estos patógenos periodontales y así servir como un marcador de actividad de la enfermedad, mostrando que las bolsas poco profundas tenían solo un 10% de reacciones BANA positivas, mientras que las bolsas profundas (7mm) mostraban un 80-90% de reacciones BANA positivas.

#### D. Técnicas de biología molecular

Son técnicas directas que permiten realizar el diagnóstico microbiológico a partir de la muestra clínica, mediante la amplificación de un componente bacteriano, el ácido nucleico, hasta un nivel detectable en unas pocas horas.

La metodología comprende las siguientes fases: obtención del ácido nucleico a partir de la muestra clínica, amplificación por un procedimiento enzimático (reacción en cadena de la polimerasa: PCR) y, por último, detección del producto amplificado. Pueden emplearse diferentes técnicas para su detección (sondas, checkerboard DNA-DNA, PCR), lo cual es necesario para identificar la especie bacteriana que posee el ADN aislado.

Socransky y cols (1994) describieron una técnica de hibridación de ADN en cámara que permitía detectar y determinar los niveles de un gran número de especies bacterianas subgingivales simultáneamente a partir de una o varias muestras de placa; "checkerboard DNA-DNA". Para ello emplearon sondas de ADN de genoma completo marcadas con digoxigenina, consiguiendo la hibridación simultánea del ADN desnaturalizado de 43 muestras con 43 sondas diferentes de ADN. Papapanou y cols (1997) analizaron 283 muestras de placa subgingival y compararon este método con el cultivo para la identificación de bacterias subgingivales (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*). Tomando el cultivo como referencia, la sensibilidad de detección de la técnica checkerboard oscilaba entre 0,17 y 0,86, con una especificidad de 0,17 a 1,0, y una fiabilidad diagnóstica de 0,51 a 0,81 dependiendo de la especie bacteriana.

El método más sensible disponible para la detección de secuencias de ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ashimoto y cols (1996) desarrollaron un método de detección por PCR basado en las secuencias 16s del ARNr para determinar la prevalencia de *Aa*, *Tf*, *Cr*, *Rc*, *Pg*, *Pi*, *Pn*, y *Td*. Los

resultados en cultivo y PCR coincidían en el 28% (*Tf*) y en el 71% (*Aa*) de las muestras. La mayor discrepancia ocurrió en los casos de muestras PCR-positivo, cultivo-negativo. Esto se debió al menor límite de detección de la PCR, entre 25 y 100 células, en comparación con el cultivo ( $10^4$ - $10^5$  UFC/ml). Eick y Pfister (2002) compararon una PCR comercial de la secuencia 16s del ARNr para *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Tf* y *Td* con el cultivo bacteriano. La PCR era capaz de detectar *Pg* y *Tf* más frecuentemente que el cultivo, con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 76% para *Pg*. *Aa* era detectado de forma similar con ambos métodos. De igual manera Riggio y cols (1996) estudiaron la detección de *Aa* y *Pg* en muestras de placa subgingival de pacientes periodontales mediante PCR y cultivo en un total de 170 muestras de placa de 43 pacientes. *Aa* y *Pg* fueron detectados, cada uno de ellos en 40 (24%) de las muestras mediante PCR, mientras que por cultivo se detectó *Aa* y *Pg* en 25 (15%) y 18 (11%) de las muestras, respectivamente. Sin embargo, la PCR estándar proporciona sólo información cualitativa sobre las bacterias estudiadas, y por tanto, su uso es limitado.

La PCR en tiempo real con cebadores especie-específicos es un método preciso y sensible para una cuantificación fiable de especies bacterianas individuales (Sanz y cols 2004). Los cebadores principalmente empleados en métodos diagnósticos basados en PCR para la detección de bacterias periodontales son normalmente las secuencias 16s ARNr (Ashimoto y cols 1996). Lyons y cols (2000) empleando un sistema TaqMan determinaron la cantidad de *Pg* en muestras de placa subgingival. Usando cebadores especie-específicos y una sonda fluorescente, la detección de ADN de diluciones seriadas de células de *Pg* fue lineal en un amplio rango de concentraciones de ADN (coeficiente de correlación = 0,96). Shelbourne y cols (2000) usaron también una sonda TaqMan para cuantificar *Tf* con cebadores basados en las secuencias 16s del ARNr. Al comparar esta PCR cuantitativa con el test de ELISA observaron idénticos resultados en 36 de las 54 muestras estudiadas y obtuvieron un falso positivo y 17 falsos negativos con el test de ELISA usando la PCR como método estándar. Sin embargo cada bacteria puede contener una cantidad variable de secuencias 16s del ARNr, y por tanto, estos cebadores pueden no ser adecuados para un análisis cuantitativo. Por ello, el empleo de



cebadores basados en una copia única de una secuencia genética es más adecuado. Morillo y cols (2004) desarrollaron un método para la cuantificación de *Aa*, *Pg* y *Tf* de muestras de placa subgingival basado en la tecnología de la “PCR en tiempo real Taq-man”. Para ello se obtuvieron estas especies bacterianas tras el cultivo de cepas de referencia y se llevó a cabo el recuento microscópicamente. Los cebadores para la PCR fueron seleccionados de las secuencias de los genes LktC (*Aa*), Arg-gingipain (*Pg*) y BspA antigen (*Tf*) para la obtención de amplicones por debajo de los 100 pares de bases. La PCR en tiempo real basada en la Taq-man se ajustó para cuantificar cada especie separadamente. Se calcularon los valores de los umbrales de los ciclos para cada especie de acuerdo al número inicial de copias. Se obtuvo una elevada sensibilidad ( $10^1$  copias para *Aa* y *Tf* y  $10^2$  para *Pg*) y especificidad para la detección de las tres especies bacterianas (no se demostró reacción cruzada con ninguna de las especies estudiadas). Además, la técnica demostró una buena “repetibilidad” en los valores umbrales de ciclo obtenidos para cada número inicial de copias, mostrando coeficientes de variación por debajo del 5% para cada bacteria.

## **6. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD**

### **6.1 Modelos de infección**

Para poder entender las diferencias entre las diversas bacterias periodontopatógenas hay que distinguir la infección oportunista de la endógena. Microorganismos comensales, constituyentes de la flora normal de las personas, pueden causar enfermedades infecciosas cuando se diseminan desde sus nichos ecológicos normales a zonas del cuerpo estériles. Estos microorganismos pueden sobrevivir en el nuevo medio si son capaces de unirse a la superficie del huésped y de resistir su respuesta inmune. La enfermedad se desarrolla especialmente en personas con mecanismos defensivos alterados (p. ej., por intervenciones quirúrgicas, enfermedades sistémicas, utilización incorrecta de antibióticos,...) y se denomina “**infección oportunista**”.

Las patologías causadas por microorganismos comensales se denominan “**infecciones endógenas**”, para las cuales la transmisión de microorganismos de huésped a huésped no es necesaria. En la cavidad oral un incremento de la carga bacteriana y una alteración concomitante en la composición microbiana de la placa dental puede causar gingivitis. Estos agentes se caracterizan a menudo por una baja patogenicidad intrínseca y pueden causar enfermedad cuando aparecen en zonas del cuerpo inusuales o en elevadas concentraciones en o cerca de sus hábitats normales.

Microorganismos que normalmente no se encuentran presentes en huéspedes sanos y que pueden causar enfermedades infecciosas se denominan “**patógenos exógenos**”. La mayoría de los patógenos humanos no sólo aparecen en sujetos enfermos, si no también en portadores sanos que pueden actuar como reservorio y servir como foco de infección.

Las **enfermedades infecciosas transmisibles** son capaces de diseminarse de persona a persona. La prevención de la transmisión de un agente infeccioso es la mejor medida de prevenir la enfermedad en una población; sin embargo, en enfermedades multifactoriales que se asocian con una compleja microflora, como son las enfermedades periodontales, el problema de la transmisión es más complejo (Van Winkelhoff y Boutaga 2005b).

Es discutible si *Aa* y *Pg* forman parte de la flora oral normal, dada la escasa frecuencia con que se identifican en sujetos periodontalmente sanos o con gingivitis, y por el hecho de que presentan características de **patógenos exógenos** más que de oportunistas (Genco y cols 1986, van Winkelhoff y cols 1994) (tabla 4). Además se encuentran más a menudo en las formas destructivas de la enfermedad (Van Winkelhoff y cols 2002, Boutaga y cols 2003, Yang y cols 2004).

Tabla 4. Características de los patógenos exógenos y endógenos (van Winkelhoff y cols 1994).

<b>Patógeno</b>	<b>Exógeno</b>	<b>Endógeno</b>
Flora indígena	<i>No, transitoria</i>	<i>Sí, permanente</i>
Prevalencia	<i>Baja</i>	<i>Alta</i>
Patogenicidad	<i>Alta, enfermedad</i>	<i>Baja, oportunista</i>
Virulencia	<i>Alta</i>	<i>Baja</i>
Tipos de clones	<i>Pocos</i>	<i>Muchos</i>
Clones presentes	<i>Uno</i>	<i>Muchos</i>
Eliminación	<i>Posible</i>	<i>No, permanente</i>
Respuesta de anticuerpos	<i>Puede ser alta</i>	<i>Nulos a bajos</i>
Niveles en salud	<i>Bajos o nulos</i>	<i>Bajos a moderados</i>
Factor predisponente	<i>No requiere</i>	<i>Cambios previos</i>
Asociado – enfermedad	<i>A menudo</i>	<i>Posible</i>
Estado de portador	<i>Sí</i>	<i>No</i>
Período incubación	<i>Corto</i>	<i>Indefinido</i>
Infección subclínica	<i>Posible</i>	<i>Posible</i>
Nivel umbral	<i>No claro</i>	<i>No claro</i>
Prevención	<i>Supresión o eliminación</i>	<i>Supresión</i>

Van Winkelhoff y cols (2002), utilizando técnicas de cultivo, demostraron la baja frecuencia de detección *Pg* en sujetos sanos (10.6%) y encontraron una asociación significativa de este patógeno con la enfermedad periodontal destructiva (OR = 12.3). *Aa* se halló sólo en el 12.8% de los individuos sin periodontitis. Boutaga y cols (2003) aplicaron una técnica de PCR en tiempo real para detectar *Pg* y *Aa* en individuos sanos y enfermos; *Aa* y *Pg* fueron detectados en el 18% y 9.9%, respectivamente, de los sujetos sin periodontitis. Yang y cols (2004) emplearon una técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar *Pg* y *Tf* en sujetos sanos y con periodontitis, demostrando *Pg* en el 85.7% y *Tf* en el 60.7% de los individuos enfermos frente al 23.1% y 39,6%, respectivamente, en los que estaban sanos.

Algunos investigadores han sugerido que estas bacterias deben ser consideradas patógenos exógenos (Genco y cols 1986, Van Winkelhoff y cols 2002; Boutaga y cols 2003; Yang y cols 2004; Van Winkelhoff y Boutaga

2005b), y por lo tanto si realmente lo fueran, evitar la exposición a ellos sería un objetivo importante en su profilaxis; el tratamiento estaría orientado a eliminarlos. Por tanto, su mera presencia, especialmente si se trata de clones de elevada patogenicidad (por ejemplo el ya comentado clon hW83 de *Pg*), sería indicativa de intervención terapéutica. En cambio, ante una infección endógena el objetivo sería reducir su cuantía en las zonas subgingivales (Van Winkelhoff y cols 1996).

La asociación entre elevados **niveles de colonización** por patógenos periodontales específicos y la **progresión** de la enfermedad periodontal ha sido corroborada por datos longitudinales en poblaciones no tratadas, aclarando la importancia del concepto de carga bacteriana más que la mera presencia de colonización. Papapanou y cols (1997), en un estudio durante un período de diez años, mostraron que la colonización por *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *Campylobacter rectus*, y *T. denticola* en niveles que excedían ciertos umbrales conllevaba una probabilidad significativamente elevada (OR >4) de tener bolsas profundas y sitios que mostraban progresión. Hamlet y cols (2004), en un estudio de tres años, demostraron OR de 8.16 para la pérdida de inserción en adolescentes con una colonización persistente por *Tf*.

La prevalencia y el nivel de colonización por estos patógenos se ha observado que varía significativamente entre poblaciones de diferentes localizaciones geográficas (Sanz y cols 2000; Haffajee y cols 2004). Haffajee y cols (2004) encontraron importantes diferencias al examinar la composición de la microbiota subgingival en sujetos con periodontitis crónica de Brasil, Chile, Suecia y E.E.U.U.. Vieron que *Td* era más frecuente en los individuos brasileños, y *Tf* y *Pg* en los chilenos. *Pg* constituía el 7.5, 11.9, 1.6 y 6,6% de la microbiota en sujetos de Brasil, Chile, Suecia y USA ( $p < 0,001$ ), mientras que las proporciones de *Td* eran 6.7, 4.2, 0.8 y 2.3, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, las proporciones de *Tf* oscilaban entre el 6,2 y el 8,5% y no diferían significativamente entre los países. Sin embargo no se debe descartar que las variaciones encontradas pueden estar influenciadas por las diversas técnicas empleadas (Van Winkelhoff y Boutaga 2005b).

## 6.2 Mecanismos de transmisión

El comportamiento de un microorganismo patógeno depende de la interacción entre **el huésped, el patógeno y el medio**. Cambios en cualquiera de estos factores afectarán a la probabilidad de transmisión. Muchas bacterias pasan de persona a persona principalmente por **contacto directo**. La **transmisión indirecta** ocurre a través de agentes intermedios como alimentos, agua o aerosoles. Cuando la transmisión ocurre directamente de padres a hijos (vía sanguínea, saliva, leche,...) se denomina **vertical**. En cambio cuando un sujeto infecta a individuos no relacionados por contacto, vía respiratoria o fecal-oral, etc., se llama **horizontal**. Los factores destacables en la transmisión son: la **fuerza** (individuos con enfermedad activa, portadores sanos), la **cantidad de microorganismos** transmitidos, la **frecuencia de contactos** efectivos y la **supervivencia en el medio**.

## 6.3 La periodontitis como una enfermedad transmisible

Comúnmente se piensa que las bacterias asumen una función destacada en la patogénesis de la enfermedad periodontal destructiva. Por tanto, conocer si la transmisión de bacterias juega un **papel en la periodontitis** es de gran relevancia. Sin embargo, el significado clásico de transmisión de un patógeno no puede ser aplicado en la periodontitis dada la complejidad del componente bacteriano en esta enfermedad.

Estudios recientes permiten afirmar que las periodontitis severas se agrupan en familias. Van der Velden y cols (1993) estudiaron clínica y microbiológicamente 23 familias, con más de 3 hermanos con miembros que tenían periodontitis para ver el efecto sobre el estado periodontal de la relación entre hermanos. Los resultados muestran un efecto significativo de la relación entre hermanos sobre: la placa bacteriana, el cálculo, la pérdida de inserción, la presencia de espiroquetas en la lengua y en las bolsas periodontales, *P. gingivalis* en la encía y en la saliva y *P.intermedia* en la saliva. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las periodontitis se agrupan en familias. Basándose

en las investigaciones de estos autores, Van Winkelhoff y Boutaga (2005b) señalan que habría que considerar factores genéticos, de comportamiento y ambientales, incluyendo la transmisión de posibles patógenos periodontales.

Las especies subgingivales no suelen aparecer en el ambiente (suelo, aire, agua) ni tampoco en la microflora de otras especies animales. Su **hábitat natural es la cavidad oral**. Existen excepciones, como la detección de la misma cepa de *Aa* en un paciente con PJL y en el perro de la familia mediante análisis de la endonucleasa de restricción (Preus y Olsen 1988). Las especies aisladas en animales son fenotípica y genotípicamente diferentes a las aisladas en humanos (Karjalainen y cols 1993, Menard y Mouton 1995)

La mayoría de los estudios sobre transmisión bacteriana en periodontitis se han centrado en ***Aa* y *Pg***. Estas bacterias han sido seleccionadas por su frecuente asociación con diferentes formas de enfermedad periodontal destructiva (Slots y Ting 1999) y su potencial patógeno (Haffajee y Socransky 1994; Holt y cols 1999, Fives-Taylor y cols 1999). No existen datos de comparación de aislamientos de *Tf* entre individuos.

En la actualidad, los llamados “métodos de tipificado de periodontopatógenos” se emplean para comparar las bacterias. Hay que tener en cuenta que la detección de las mismas especies bacterianas en miembros de una misma familia no prueba su transmisión (van Winkelhoff y Boutaga 2005b). Es necesario tipificar (comparar los aislados) las bacterias aisladas y para ello se dispone de dos estrategias diferentes, el estudio de las características fenotípicas y genotípicas.

Métodos de fenotipado: Se basan en las características fenotípicas de las especies bacterianas. Los más usados son:

- Biotyping (biotipado): Utiliza los resultados de pruebas bioquímicas para determinar caracteres fisiológicos y asignar miembros de la misma especie a diferentes grupos
- Test de sensibilidad antibiótica

- Serotipia (Serological typing): Emplea una serie de anticuerpos, obtenidos a partir de animales, para identificar diferentes determinantes antigénicos de la superficie bacteriana
- Fagotipia (Phage typing): Diferentes cepas de una especie presentan distinta sensibilidad para la actividad lítica de bacteriófagos.

Estudios moleculares: Permiten distinguir entre aislamientos epidemiológicamente no relacionados por la variación genética del ADN cromosómico de una especie bacteriana.

- Análisis de la endonucleasa de restricción (Restriction Enzyme Análisis -REA-): Mediante estas enzimas, de corte o restricción, se fracciona el ADN en secuencias. Los fragmentos se separan por su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa. Diferentes cepas de la misma especie bacteriana tienen distintos patrones de restricción en sus secuencias de ADN. Van Steenberg y cols (1993) emplearon esta técnica para tipificar *Pg* y encontraron que, con una excepción, cada individuo estaba colonizado por un sólo tipo clonal de *Pg*. Observaron que los patrones de ADN de todos los aislamientos de *Pg* de individuos no relacionados eran distintos. Este hecho también se encontró para *Aa* empleando este mismo método (Petit y cols 1993a,b).
- Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism -RFLP-): El ADN cromosómico es cortado con enzimas de restricción, y los fragmentos son separados en un gel de agarosa. Posteriormente se transfieren a una membrana-soporte donde se hibridan con sondas específicas marcadas. Éstas se unen los fragmentos que tienen secuencias de nucleótidos complementarias. Las variaciones en el número y tamaño de los fragmentos detectados por hibridación se denominan RFLPs. DiRienzo y McKay (1994) empleando este método, identificaron un genotipo específico de *Aa* (grupo RFLP II) que parecía estar relacionado con la periodontitis juvenil y que mostró la mayor correlación con la conversión de salud periodontal a enfermedad ( $p < 0,002$ ).
- Ribotipia (Ribotyping): Este método usa ADN cromosómico, y una sonda de ARN ribosómico (ARNr) que proporciona diferentes perfiles. Dado que todos los aislamientos bacterianos tienen uno o más operones de ARNr distribuidos en el cromosoma, y ya que estas secuencias son altamente conservadas,

todos los aislamientos bacterianos pueden ser tipificados usando sondas dirigidas a las secuencias de ADN con lugares de ARNr. Alaluusua y cols (1993) estudiaron 54 aislamientos de *Aa* obtenidos a partir de 9 familias (12 niños y 11 padres). En 5, los aislamientos pertenecientes a la misma familia tenían idénticos patrones de hibridación. En otras 3 familias, cada miembro albergaba sólo un ribotipo de *Aa*. Sólo en un grupo familiar la madre tenía dos ribotipos, uno común con la hija y uno diferente. Este estudio confirma resultados previos sobre la transmisión intrafamiliar de *Aa*.

- Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE): El genoma bacteriano es digerido con una enzima de restricción que tiene relativamente pocos sitios de reconocimiento, y así genera aproximadamente 10-30 fragmentos que son separados por electroforesis de campo pulsante para producir un patrón de bandas. Valcarcel y cols (1997) aplicaron este método para el tipificado de 19 cepas de *Aa* y obtuvieron un alto grado de polimorfismo con 13 perfiles distintos.
- Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores (primers) arbitrarios (Arbitrarily primed [AP-PCR]): Este tipo de técnica de PCR usa un cebador corto que no está dirigido a amplificar ninguna secuencia específica del ADN bacteriano. Los productos resultantes representarán una variedad de fragmentos de ADN de diferente tamaño según las bases. Asikainen y cols (1996) emplearon esta técnica para tipificar aislamientos de *Aa* de miembros de las mismas familias. En 11 de 12 grupos familiares encontraron idénticos genotipos de *Aa*, sugiriendo la transmisión de este microorganismo.
- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): Es una PCR de una secuencia común, seguida de una restricción que proporciona fragmentos diferentes. Van Winkelhoff y cols (2000b), empleando esta técnica demostraron que los aislamientos de *Aa* de un padre y su hijo que padecía periodontitis eran indistinguibles, sugiriendo la transmisión del microorganismo.

Los marcadores fenotípicos o genéticos únicos entre aislamientos bacterianos independientes son un prerequisite para estudiar la distribución de distintas cepas bacterianas entre individuos. Las cepas de una misma especie pueden mostrar una virulencia variable, y tipificar estas cepas puede ayudar a distinguir entre representantes patogénicos y menos patogénicos de una especie.



**Estudios de transmisión:** La información referida a la transmisión de periodontopatógenos por contactos humanos puede ser relevante para determinar factores de riesgo de la enfermedad y desarrollar estrategias preventivas. Se ha señalado que los dos patógenos periodontales principales, *Aa* y *Pg*, **se agrupan en familias** (Zambon y cols 1983b, Gunsolley y cols 1990, van der Velden y cols 1993, Petit y cols 1994), sin embargo las casuísticas que apoyan estos datos son cortas y las metodologías no han sido uniformes.

Mediante la utilización de métodos de tipificación molecular, se ha podido evidenciar que padres e hijos pueden compartir clones idénticos de *Aa* y *Pg* o bien estar infectados por cepas diferentes. Se encontraron patrones distintos para las cepas aisladas de familias diferentes (DiRienzo y Slots 1990, Alaluusua y cols 1993, Petit y cols 1993a, b). Petit y cols (1993a, b) observaron que *Aa* podía transmitirse entre miembros de una misma familia, pero con una baja frecuencia, un 15% para los niños y un 8% entre parejas. Preus y cols (1994) al comparar las cepas de *Aa* mediante AP-PCR, detectaron en seis de siete familias diferentes genotipos de *Aa* en ambos conyugues. En cambio en los hijos se aisló un genotipo idéntico al de uno de sus padres.

Se ha descrito también que ambos miembros de la pareja comparten los mismos clones, lo que indica que estas especies pueden ser transmitidas entre parejas. Van Steenberghe y cols (1993) demostraron que, en seis de ocho parejas, los pacientes periodontales y sus cónyuges compartían los mismos clones aislados de *Pg*, ya que mostraban patrones de restricción indistinguibles. Saarela y cols (1993) encontraron en dos de cuatro parejas los mismos serotipos y ribotipos de *Aa*, y dos de cuatro parejas que compartían los mismos ribotipos de *Pg*.

Tuite-McDonnell y cols (1997) en un estudio sobre transmisión de *Pg* en 104 familias, empleando una técnica de detección por PCR, demostraron que el contacto con un miembro familiar infectado incrementa sustancialmente el riesgo relativo de colonización de los cónyuges (4), de los niños y sus padres

(3), los niños y sus madres (4.7), adultos y sus madres (2.4), y hermanos (2.4). Los cónyuges de individuos infectados tenían casi cuatro veces más probabilidad de ser colonizados que los cónyuges de sujetos no colonizados. Esto sugiere la posibilidad de transmisión entre parejas. Sin embargo, no observaron ninguna relación entre la transmisión y el tiempo de casados, lo que indica que la transmisión probablemente ocurre en los primeros años de matrimonio.

Asikainen y cols (1996) estudiaron la frecuencia de transmisión entre parejas casadas, y de padres a hijos de *Aa* (47 familias) y *Pg* (31 familias) comparando mediante AP-PCR. La transmisión entre las parejas de *Aa* se produjo en el 36% de las mismas y de *Pg* en el 20%. La transmisión de padres a hijos de *Aa* tuvo lugar en el 32% de las familias. *Pg* no se transmitió de padres a hijos en ninguna de las familias estudiadas.

Aunque disponemos de pocos estudios, no sólo se ha podido evidenciar la transmisión, sino que además se ha observado que los clones compartidos entre las parejas poseen factores de patogenicidad implicados en una colonización más eficaz. Asano y cols (2003) demostraron que el gen que codifica las fimbrias de las cepas de *Pg* pertenece al tipo II, más eficaz en la unión a células epiteliales, en 5 de seis parejas cuyos patrones de PFGE eran idénticos. Esto sugiere que sólo aquellos clones con determinados factores de virulencia tienen capacidad de colonización y transmisión entre individuos con una relación estrecha.

Van Winkelhoff y Boutaga (2005b), en una revisión de la literatura que incluye ocho estudios de transmisión, señalan que la **frecuencia de transmisión** vertical de *Aa* oscila entre el 30% y el 60%, mientras que la transmisión vertical de *Pg* sólo se observa ocasionalmente. La frecuencia de transmisión horizontal entre parejas de *Aa* varía entre el 14% y el 60%, y entre el 30% y el 75% para *Pg*.

#### 6.4 Posibles vías de transmisión de bacterias periodontales

*Aa* y *Pg* pueden encontrarse en el área subgingival, en la saliva, en la placa supragingival y en la mucosa de la cavidad oral de pacientes con periodontitis (Van Winkelhoff y cols 1988, Socransky y cols 1999). En pacientes con periodontitis la placa supragingival normalmente contiene una mayor proporción de *Pg* que en sujetos sanos. Socransky y cols (1999) encontraron recuentos de  $0,6 \times 10^5$  y  $0,1 \times 10^5$  UFC/ml en la placa supragingival de sujetos enfermos y sanos respectivamente; e igualmente de  $1,4 \times 10^5$  y de  $0,1 \times 10^5$  UFC/ml en la subgingival. Ambas especies se diseminan intraoralmente a través de saliva contaminada, y colonizan la placa supragingival antes de afectar el área subgingival (Socransky y cols 1999). La infección subgingival ocurre en sitios con y sin pérdida de inserción periodontal. Se ha especulado que las bolsas profundas de sujetos con la enfermedad actúan como reservorios para diseminar la infección a zonas sanas (Riviere y cols 1996).

No hay evidencia de que las bacterias periodontales puedan ser transmitidas a través de aerosoles, pero sí parece probable que la **saliva** y el **contacto mucoso directo** sean vías de transmisión de estas bacterias. Los objetos inanimados (instrumentos odontológicos, cepillos dentales) también pueden servir como vehículo de transmisión (Christersson y cols 1985, Glass y Lare 1986).

*Aa* y *Pg* pueden ser cultivados a partir de la saliva de pacientes con periodontitis (Van Winkelhoff y cols 1988). La transmisión de bacterias orales de un individuo a otro depende de la cantidad de bacterias transmitidas, de su virulencia y capacidad intrínseca de colonización y del número de veces que son transmitidas. El contacto mucoso a través de los besos puede ser por tanto una vía posible de inoculación directa de estos patógenos en otra persona. La supervivencia de patógenos periodontales en la saliva fuera de la cavidad oral no se conoce. La inoculación indirecta puede ocurrir cuando un cepillo de dientes contaminado se utiliza durante las siguientes horas a su uso. Müller y cols (1989), empleando técnicas de cultivo, examinaron los cepillos de dientes de 21 pacientes con enfermedad periodontal destructiva, todos tenían *Aa* en

cuantía moderada a elevada en la placa subgingival. El 29% de los cepillos contenían cantidades detectables de *Aa*. Inmediatamente después del cepillado esta cifra se elevaba al 62%, pero disminuía al 50% después de una hora. Quirynen y cols (2001), investigaron el índice de supervivencia de especies periodontopatógenas y cariogénicas en cepillos dentales, con y sin pasta de dientes, y en cepillos interdentes de 12 pacientes con periodontitis, y demostraron que los detergentes de la pasta de dientes disminuían el índice de supervivencia de especies patógenas en los cepillos (2 logaritmos a nivel basal, otros 2 logaritmos a las 4 horas y un logaritmo adicional a las 8 horas para las especies aerobias y anaerobias), pudiendo así limitar el riesgo de traslado de las bacterias.

La dosis mínima de infección y el número de exposiciones requeridas para la transmisión de *Aa* o *Pg* de una persona a otra se desconoce, pero parece probable que ambos parámetros influyan en la odds ratio de transmisión.

## **6.5 Consecuencias de la transmisión**

Las consecuencias clínicas de la transmisión de *Aa* o *Pg* de una persona enferma a otra no se conocen. En ocasiones, a pesar de poseer el agente infectante, las parejas de los pacientes con periodontitis no desarrollan la enfermedad. Esto puede ser atribuido a la respuesta del huésped, a sus mecanismos de defensa frente a las bacterias, a un antagonismo entre bacterias, aunque también cabe la posibilidad de que se deba a una menor patogenicidad de las bacterias infectantes (Greenstein 1997b). Por ejemplo, Christersson y cols (1985) demostraron que las sondas periodontales eran capaces de distribuir patógenos desde localizaciones enfermas a sanas en pacientes con PJI. Sin embargo, la monitorización de 16 localizaciones mediante cultivo que fueron contaminadas por *Aa* tras la inserción de una sonda, reveló que *Aa* persistió en sólo 8 localizaciones tras una semana, 2 localizaciones después de 2 semanas, y no se halló en ninguna localización transcurridas 3 semanas. Por tanto, a pesar de la transmisión microbiológica,

los pacientes fueron capaces de resistir al desarrollo de nuevas localizaciones colonizadas por *Aa*. Los autores sugirieron que esto se puede haber debido al efecto de limpieza de las bolsas por el fluido crevicular gingival, a un antagonismo bacteriano, o, con más probabilidad, a la respuesta inmune del paciente.

Numerosos trabajos indican que *Aa* y *Pg* pueden ser encontradas en sujetos sin destrucción periodontal manifiesta (Petit y cols 1993a,b, Van Steenberg 1993, Van Winkelhoff 2002). Estas especies probablemente pueden persistir en equilibrio con el huésped y la microflora residente durante años, sin embargo, no está claro qué factores microbiológicos o del huésped determinan el inicio de la destrucción periodontal a partir de la infección por estos patógenos.

Hay estudios que sugieren que la **cohabitación** con una persona con periodontitis puede **influnciar el estado periodontal** de la pareja (Petit y cols 1994, Von Troil-Linden y cols 1995; Van Winkelhoff y Boutaga 2005b). Aunque no se pueden descartar factores causales ambientales comunes, los resultados de varios estudios sugieren que la transmisión de microorganismos virulentos es un factor importante (Tuite-McDonnell y cols 1997; Asano y cols 2003) sin embargo, son necesarios más estudios para probar esta hipótesis.

Petit y cols (1994) investigaron la prevalencia de microorganismos periodontopatógenos y la destrucción periodontal en las parejas y los hijos de pacientes adultos con periodontitis, en un grupo de 24 familias, con 49 niños. Por debajo de los 5 años, ninguno de los niños tenía CAL, mientras que entre los 5-15 años, el 26,5% tenían 1-5 sitios con 1-3 mm de CAL. Un total de 16 parejas tenían una forma leve a moderada de periodontitis, con al menos un sitio con 1 a 4 mm de CAL y 5 parejas tenían destrucción periodontal severa con sitios que mostraban al menos 8 mm de CAL. En 18 de 24 pacientes los resultados confirmaron *Pg*. Este microorganismo se encontró en un niño de 5 años y en 11 de las parejas. Por otra parte, *Aa* se detectó en 13 pacientes, 5 niños y 5 de las parejas. Si un niño albergaba uno de los periodontopatógenos, al menos uno de los padres era también positivo para esa bacteria.

Von Troil-Linden y cols (1995), llevaron a cabo un examen clínico, radiológico y microbiológico de las condiciones periodontales en dos grupos de parejas casadas para valorar similitudes entre marido y mujer. Los sujetos enfermos (n=10) tenían una periodontitis avanzada y los sanos (n=10) presentaban un estado periodontal normal. Las muestras fueron cultivadas para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* and *Peptostreptococcus micros*. La media de frecuencia de detección de bolsas moderadamente profundas (4-5 mm) y profundas ( $\geq 6$  mm) fue significativamente mayor en las parejas de los sujetos enfermos que en las parejas de los sanos. Se hallaron bolsas profundas en seis parejas de los individuos enfermos y sólo en dos parejas de los sujetos sanos. Los enfermos y sus cónyuges tenían *Aa*, *Pg*, *P. intermedia*, *C. rectus* and *P. micros* en 4, 6, 9, 9 y 4 parejas respectivamente. Los sanos y sus parejas tenían estos patógenos en 0, 1, 9, 5 y 3 parejas, respectivamente. *Pg* se encontró en 7 parejas de los individuos enfermos y sólo en 2 de los sujetos sanos.

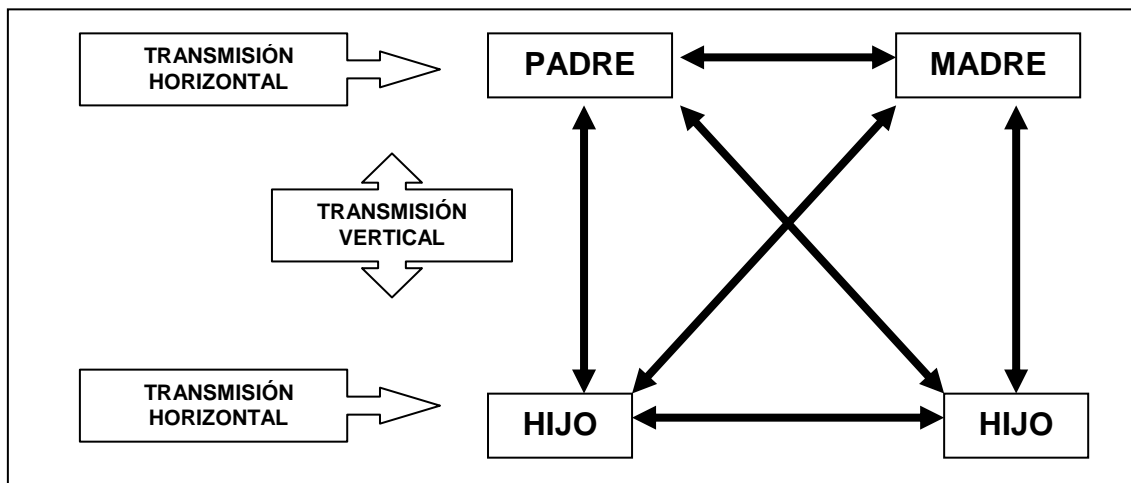
Aunque se ha demostrado la **transmisión intrafamiliar** (Petit y cols 1994, Von Troil-Linden y cols 1995; Asikainen y cols 1996), parece probable que también se produzca **entre individuos no relacionados**, hasta por un contacto casual. Cabe destacar que ya a principios de 1900 algunos autores sugirieron que los brotes severos de GUNA después de la primera guerra mundial se debieron a la transmisión de bacterias virulentas, lo que respalda la idea de que los patógenos periodontales pueden transmitirse con facilidad de una persona a otra, especialmente cuando se trata de clones muy virulentos de *Aa* y *Pg*. Así, parece probable que nuevas especies o diferentes cepas de la misma especie pueden ser adquiridas con relativa frecuencia por un individuo en diferentes etapas de su vida. La posibilidad de que halla una **recidiva** o una **nueva infección** podría repercutir en el enfoque terapéutico (Von Troil-Lindén y cols 1996).

## 7. PREVENCIÓN

La eficacia de la actuación odontológica sobre la enfermedad y su prevención requiere la colaboración del paciente, que debe ser formado e informado en el mantenimiento de su salud. El odontólogo, no sólo necesita unos conocimientos actualizados en el diagnóstico periodontal y en su terapéutica, sino también capacidad de comunicación con el paciente.

La **prevención primaria** trata de la información, instrucción en higiene oral y de medidas profilácticas (oral y antibiótica si procede). El principal agente desencadenante de la gingivitis y de la periodontitis es la **placa bacteriana**, sin la cual no se desarrolla la inflamación marginal. Por lo tanto, la prioridad recae sobre la **prevención y la eliminación de la placa** y el tártaro dental, y en la motivación del paciente para mantener una higiene oral adecuada. Además se debe actuar sobre los elementos locales que favorecen el depósito de placa: factores iatrogénicos (restauraciones, prótesis inadecuadas), apiñamientos, etc. Eliminar el 100% de placa es prácticamente imposible, por lo que hay que procurar obtener un grado óptimo de higiene oral (índice de placa), para impedir sus efectos patológicos, y mantenerlo en el tiempo.

Tradicionalmente, el abordaje terapéutico de las periodontitis se hacía desde la visión del paciente de forma aislada, sin considerar el entorno de relación personal. En la actualidad debemos incluir el criterio de riesgo de la **transmisión** derivado de la convivencia con personas afectadas. Por ello, estaría justificada la revisión rutinaria de las parejas de pacientes periodontales, y la recomendación de tener especial precaución con sus hijos.



Para cortar estas vías de transmisión se deben adoptar diversas medidas como la revisión odontológica de los individuos y su tratamiento cuando proceda, y uso higiénico individual de los utensilios, tanto para la limpieza bucodental como los de la alimentación.

Basándonos en los conocimientos actuales, la realización de técnicas microbiológicas de screening (despistaje) y la prevención de la transmisión de clones específicos virulentos de *Aa* puede ser viable y efectivo para prevenir algunas formas de enfermedad periodontal.

*Pg* es recuperada frecuentemente de sujetos adultos enfermos, y la transmisión de este patógeno parece estar restringida a individuos en ese grupo de edad. La transmisión horizontal de *Pg* puede ser controlada mediante el tratamiento periodontal, que engloba la eliminación o supresión significativa del patógeno en individuos enfermos, y con un alto nivel de higiene oral (Van Winkelhoff y Boutaga 2005b).

La respuesta del huésped a la infección es determinante en la aparición y evolución de una periodontitis, La actuación sobre factores de riesgo modificables que a su vez influyen en la susceptibilidad y en la microflora subgingival, tales como el tabaco, el estrés o enfermedades sistémicas que



favorecen o contribuyen a causar una periodontitis es también una parte destacada de la prevención (Albandar 2002).

La **prevención secundaria** trata del diagnóstico precoz de la enfermedad y del tratamiento antiinfeccioso, mientras que la **prevención terciaria** incluye la detección y prevención de la reaparición de la enfermedad tratada (necesidad de un mantenimiento periodontal).

## II. OBJETIVOS

1. Evaluar en muestras de placa subgingival y de saliva la presencia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, y su desaparición o disminución al mes y a los 6 meses de finalizar el tratamiento periodontal (cultivo y PCR en tiempo real).
2. Determinar si disminuyen o modifican su cuantía en las parejas debido al tratamiento del paciente.
3. Evaluar la evolución clínica después del tratamiento y a los 6 meses de su finalización, y compararla con la evolución microbiológica.

### **III. HIPÓTESIS**

1. Entre parejas se transmiten bacterias periodontopatógenas y se comparten los mismos clones, aunque sólo uno de los miembros muestre o desarrolle patología periodontal.
2. La flora oral de la pareja asintomática puede servir de reservorio y transmitir microorganismos al paciente que ya ha finalizado el tratamiento.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**

El objeto de nuestro trabajo es investigar la transmisión de la periodontitis crónica entre parejas, enfermedad que destruye los tejidos que circundan a los dientes. Los datos publicados son escasos, y se apoyan en series cortas de individuos, dificultad que hemos tratado de resolver.

La trascendencia de la transmisión de bacterias periodontopatógenas entre parejas es un tema controvertido. La dificultad de los estudios reside tanto en la disponibilidad de un número suficiente de casos, como en su seguimiento y en la utilización de técnicas diagnósticas altamente sensibles y específicas. Precisamente el objetivo de esta Tesis es desarrollar una base sólida de investigación para analizar la transmisión de dichas bacterias, comparando su presencia y su cuantía en pacientes periodontales y en sus parejas, antes y después de efectuar un tratamiento periodontal correcto. Una de las cuestiones que trataremos de dilucidar es la posibilidad de recolonización o reinfección por periodontopatógenos una vez que un individuo ha sido tratado con éxito. Para estructurar la investigación hemos diseñado un árbol de decisiones para la obtención de muestras, pruebas de diagnóstico microbiológico (incluyendo recientes procedimientos de biología molecular) y tratamiento.

## V. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

**1. SELECCIÓN DE PACIENTES:** Se efectuó entre individuos estudiados en la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, 16 sujetos con sus respectivas parejas, en total 32 casos. Todos fueron informados sobre el estudio y dieron su consentimiento por escrito (ver apartado 7). Previamente, el Comité de Ética de la Facultad dio su aprobación al trabajo.

**1.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN:** Cada individuo debía reunir los siguientes requisitos:

- Periodontitis crónica
- Edad superior a 35 años
- Con al menos 20 dientes
- Sin enfermedades sistémicas (diabetes, HTA, procesos inflamatorios crónicos, cáncer, etc)
- Sin tratamiento periodontal, al menos durante el año precedente
- Sin tratamiento antibiótico en los 3 meses previos
- Con relación heterosexual de al menos 2 años de cohabitación

La Periodontitis fue definida, según los criterios de Machteii y cols (1992), por:

- la presencia de pérdida de inserción clínica  $\geq 6$  mm en 2 o más dientes,
- y uno o más sitios con profundidad de bolsa al sondaje  $\geq 5$  mm.

**1.2 CRONOGRAMA:** Se aplica a los pacientes y a las parejas

**1.2.1 Primera visita:** Exploración clínica, radiológica y elección de zonas de estudio microbiológico.

**1.2.2 Segunda visita:** Toma de muestras para estudios microbiológicos.

**1.2.3 Tratamiento:** Se cita el paciente una semana después para tratamiento.

**1.2.4 Tercera visita:** Evaluación clínica al mes, y toma de muestras.

**1.2.5 Cuarta visita:** A los 6 meses, última valoración clínica y toma de muestras.

Las parejas sanas se excluyen evidentemente del tratamiento.

## 2. EXPLORACIÓN DE LOS PACIENTES

**2.1. Exploración Clínica (Periodontograma):** Todas las medidas fueron tomadas por un mismo examinador empleando una sonda periodontal manual milimetrada (Michigan N-11, OMS) en seis superficies de cada diente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual y disto-lingual). La exploración periodontal se recogió en un diagrama específico, donde se anotaron las siguientes medidas:

1. *Profundidad de sondaje:* Distancia medida desde el margen gingival hasta el nivel de penetración de la sonda cuando se aplica una fuerza moderada ( $25\text{Nw}/\text{cm}^2$ ).
2. *Nivel del margen gingival libre:* Medida de la relación del margen gingival libre (porción más coronal de la encía libre) con respecto a la línea amelocementaria (o margen de la preparación). Puede ser "0" (a nivel de la LAC), "+" (por encima de la LAC), o "- " (por debajo de la LAC).
3. *Nivel de inserción cínico:* Es la distancia del LAC al fondo de la bolsa. Representa la suma de la recesión más la profundidad de sondaje (cuando el margen gingival se encuentra apical al LAC). El NIC es igual a la PS si el margen gingival está a nivel del LAC y es inferior a la PS cuando el margen gingival se sitúa en una posición coronal al LAC.

4. *Sangrado gingival al sondaje*: Sangrado que se produce durante los primeros 20-30" tras realizar el sondaje. Se toma en los puntos de sondaje como presencia o ausencia.
  
5. *Índice de placa* (Silness y Løe 1964): Califica los depósitos de placa en una escala de 0 a 3: "0" ausencia de placa; "1" al pasar la sonda periodontal a lo largo del margen gingival se extrae placa; "2" acúmulo moderado de placa en el surco gingival, sobre el margen gingival y/o el diente visible; "3", placa abundante en estos mismos sitios.

**2.2. Estudio radiológico:** Se llevó a cabo mediante una serie periapical completa (14 radiografías) para evaluar la pérdida ósea radiológica: *distribución y localización de la pérdida ósea* (si afecta a toda la dentición o es localizada); *tipo de pérdida ósea* (horizontal, vertical o angular y del lecho alveolar); *importancia de la pérdida ósea* (distancia de la cresta marginal a la LAC, afectación de furcas, bolsas infraóseas, inserción residual) y *causa de la pérdida del soporte periodontal* (irritantes yatrógenos, presencia de cálculo, factores anatómicos radiculares, posición dental, problemas endodónticos o endoperiodontales).

**[Toma de muestra (ver apartado 4)]**

### **2.3. Tratamiento periodontal**

Todos los pacientes recibieron información e instrucción en medidas de higiene oral en la primera sesión de tratamiento mecánico, y el nivel de higiene se reforzó en citas posteriores. El tratamiento mecánico incluyó raspado y alisado radicular por cuadrantes, en sesiones semanales; cuatro en total, durante un período de un mes.

Al mes de finalizar el tratamiento se reevaluó a los pacientes con una nueva exploración periodontal con especial atención al sangrado. En esta evaluación se decidió si el paciente era dado de alta para pasar a controles periódicos, o si debía volver a tratar alguna zona, e incluso plantear la indicación de cirugía periodontal en sitios que sangraban al sondaje y con profundidades de bolsa  $\geq 5$  mm (Kaldahl y cols 1993). Seis meses después del tratamiento se exploraron los mismos parámetros clínicos.

### **3. EXPLORACIÓN DE LAS PAREJAS**

**3.1 Exploración clínica:** Idéntica a la del paciente

**3.2 Estudio radiológico:** Se realizó una serie periapical completa sólo en las parejas que padecían periodontitis (según el punto 2).

**[Toma de muestra (ver apartado 4)]**

**3.3 Tratamiento periodontal:** Los cónyuges que presentaban periodontitis recibieron el mismo tratamiento que los pacientes, y a los sujetos periodontalmente sanos se les hizo una tartrectomía con cureta y pulido. Al mes de completar el tratamiento en las parejas con periodontitis, se llevó a cabo una reevaluación, decidiendo darles de alta para pasar a controles periódicos, tratar nuevamente alguna zona o bien someterlos a cirugía periodontal. Seis meses después del tratamiento se exploraron los mismos parámetros clínicos.



## 4. TOMA DE MUESTRAS

### *Muestras periodontales:*

- 1) El procedimiento seguido consistió en aislar la zona con rollos de algodón, retirar la placa supragingival con una cureta y secar el exceso de saliva con una gasa (sin usar chorro de aire).
- 2) Se introducía una punta de papel absorbente estéril del nº 50 (Maillefer®) hasta el fondo de la bolsa durante 30 segundos y se extraía evitando que entrara en contacto con saliva o con la mucosa oral.
- 3) Se incluía en 2 ml de VMGA-III que se destinaba a procesamiento por cultivo.
- 4) Se tomaba otra muestra de la misma bolsa para efectuar los métodos moleculares, durante el mismo periodo de tiempo, y se introducía en un tubo Eppendorf estéril.

### *Muestras de saliva:*

- 1) El paciente segregaba saliva durante 5 minutos y se recogía en un recipiente estéril.
- 2) Se tomaban 2 mililitros de saliva con una pipeta estéril, añadiendo uno en un tubo Eppendorf estéril y otro en el medio VMGA-III.

### **4.1 Toma de muestras microbiológicas en la primera visita de los pacientes**

En cada enfermo se obtuvieron:

- Cuatro muestras de placa subgingival de 2 bolsas con una profundidad de sondaje  $\geq 5$ mm
- Dos muestras de un punto con una profundidad de sondaje  $\leq 3$  mm,
- 2 ml de saliva

### **4.2 Toma de muestras microbiológicas al mes y a los seis meses de los pacientes**

El procedimiento se repitió al mes y a los seis meses de finalizar el tratamiento.

#### **4.3 Toma de muestras microbiológicas en la primera visita de las parejas**

En la pareja, si padecía periodontitis se seguía una metodología igual que el enfermo, y si era periodontalmente sana se obtenían cuatro muestras de dos dientes que hubiesen sido sondados y 2 ml de saliva.

#### **4.4 Toma de muestras microbiológicas a los seis meses de las parejas**

El procedimiento se repitió a los seis meses de finalizar el tratamiento.

### **5. PROCESADO DE LAS MUESTRAS**

#### **5.1 Procedimiento para cultivo microbiológico**

##### **5.1.1 Composición de los medios**

- **Medio VMGA-III** (Möller 1966)

Objetivo: Permitir la viabilidad de la muestra durante el tiempo de traslado al laboratorio.

El medio contiene Bacto gelatina (5 %), Thiona peptona (0,05 %), Bacto agar (0,002 %), L-cisteína-HCL (0,05 %), azul de metileno (0,003 %),  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,024 %), KCl (0,042 %), NaCl (0,1 %), Ácido tioglicólico (0,05 %), Na glicerofosfato (1 %), Acetato fenilmercúrico (0,0005 %),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 %).

- **Medio VMG-1** (Murray y cols 1999)

Objetivo: Medio para diluir las muestras.

Contenido: triptosa (0,25 %), thiona E peptona (0,25 %) y ClNa 0,5 %).

- **Agar Brucella selectivo** (Murray y cols 1999)

Objetivo: Crecimiento de anaerobios.

Contenido: Agar Brucella (4,5 %), Bacto agar (0,3 %), vitamina K (0,005 %), sangre desfibrinada al 5%, hemina (0,005 %), vancomicina (0,002 %) y gentamicina (0,02 %).

- **Agar Brucella** (Murray y cols 1999)

Objetivo: Cultivo de anaerobios.

Contenido: Agar Brucella (4,5 %), Bacto agar (0,3 %), vitamina K (0,005 %), sangre desfibrinada al 5%, hemina (0,005 %).

- **Medio TSBV (Tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin)** (Slots 1982)

Objetivo: Cultivo de *A. actinomicetemcomitans*

Contenido: Trypticase Soy Agar (4 %), extracto de levadura (0,1 %), suero de caballo (10 %), bacitracina (0,075 %), y vancomicina (0,005 %).

- **Medio Dentaïd-1** (Alsina y cols 2001)

Objetivo: Cultivo de *A. actinomicetemcomitans*

Contenido: Brain heart infusion agar (BHIA), extracto de levadura (0,5 %), fumarato sódico (0,15 %), formato sódico (0,1 %) y vancomicina (0,009 %).

### 5.1.2 Inoculación en los medios de cultivo

Las muestras se inoculaban en los medios de cultivo en un plazo máximo de 2 horas.

1. Los tubos que contienen las puntas de papel incluidas en el medio de transporte se agitan durante 30" en un vórtex para liberar los microorganismos de las puntas de papel al medio.
2. Se efectúan diluciones seriadas 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 y se siembran en TSBV, Dentaid-1, Agar Brucella y Agar Brucella selectivo.

### 5.1.3 Incubación

Las placas sembradas en medios específicos para anaerobios (Agar-Brucella y Agar Gentamicina-Vancomicina) se introducen y se reincuban en condiciones de anaerobiosis utilizando jarras OXOID de 2,5 l con el sistema AnaeroGen<sup>TM</sup> (OXOID Ltd.). Las jarras se incuban en una estufa a 35°C +/- 2°C.

Los medios específicos para *Aa* (TSBV y Dentaid-1) se incuban en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### 5.1.4 Lectura

- Para determinar si existe crecimiento de anaerobios se examinan las placas a los 7 y 14 días empleando una lupa estereoscópica.
- Para efectuar el recuento se selecciona la dilución en la que se visualiza crecimiento de 5-100 colonias.
- Las colonias con morfología compatible con *Pg*, *Aa* y *Tf* se subcultivan en medio sin antibiótico y se conservan congeladas a -80°C

## 5.2 MUESTRAS PARA PCR

### 5.2.1. Extracción y purificación del ácido nucleico

Durante la primera fase el objetivo principal es conseguir romper o lisar la célula bacteriana, sin destruir o deteriorar los ácidos nucleicos, bien el ácido desoxirribonucleico (ADN) o bien el ácido ribonucleico (ARN). Se han utilizado diferentes métodos químicos, enzimáticos y físicos para obtener ADN en suficiente cantidad y calidad para su análisis con sondas de ADN o PCR que permiten detectar y en algunos casos cuantificar las bacterias marcadoras periodontopatógenas.

Para el empleo de técnicas de diagnóstico molecular es necesario **extraer y purificar el ADN** bacteriano de las muestras, liberándolo de otras sustancias, principalmente proteínas, que puedan interferir en las siguientes fases.

La extracción del ADN se llevó a cabo con el kit QIAamp<sup>®</sup> DNA (Qiagen<sup>®</sup>) según las indicaciones del fabricante. Procedimiento:

1. Preparar dos baños de agua caliente, uno a 70 °C y otro a 95 °C.
2. Centrifugar las muestras de saliva a 13.000 rpm durante 15min a 4°C. y desechar el sobrenadante, dejando el “pellet”.
3. Añadir a la muestra 200 µl de tampón de lisis ATL para romper las membranas y 20 µl de proteinasa K para destruir los componentes proteicos de las células. Agitar en el vórtex 30” para asegurar una lisis eficaz. Incubar a 70°C durante 10 minutos para activar la proteinasa K. Centrifugar brevemente para eliminar las gotas de la parte interna de la tapa.
4. Añadir 200 µl de tampón de lisis AL y mezclar de nuevo en el vórtex 15”. Incubar 5 minutos a 95°C (se inactiva la proteinasa K) y centrifugar brevemente.

5. Añadir 200 µl de etanol y agitar en el vórtex 15". Incubar 5 minutos a 95°C y centrifugar brevemente.
6. Transferir los 620 µl del tubo eppendorff a la columna QIAmp Spin en un tubo colector de 2 ml sin mojar el borde, cerrar la tapa para evitar la formación de aerosoles y centrifugar 1min a 8.000 rpm.
7. Colocar la columna QIAmp Spin en un tubo colector de 2 ml limpio y desechar el colector que contiene el fluido filtrado.
8. Añadir 500 µl de tampón AW1 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar dos minuto a 8.000 rpm.
9. Colocar un tubo colector nuevo y desechar el que contiene el fluido filtrado.
10. Añadir 500 µl de tampón AW2 sin mojar el borde, cerrar la tapa y centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm
11. Colocar la columna QIAmp spin en un tubo eppendorff de 1,5 ml y desechar el colector con el fluido filtrado.
12. Añadir 250 µl de tampón de elución AE y centrifugar 2 minutos a 8.000rpm.
13. El ADN purificado se almacena a -80°C.

### **5.2.2 PCR cuantitativa**

Se llevará a cabo mediante PCR en tiempo real

Amplificación de fragmentos específicos

### *Cebadores*

**A. *actinomycescomitans*:** cebadores específicos del gen *lktC* (leucotoxina) previamente descritos (Morillo y cols 2003) que amplifica un fragmento de 77 pb entre la posición 736 a 812.

*Aa*-forward 5'-ACGCAGACGATTGACTGAATT-TAA-3'

*Aa*-reverse 5'-GATCTTCACAGCTATA-TGGCAGCTA-3'

**P. *gingivalis*:** cebadores específicos del gen *ARg-gingipaina* previamente descritos (Morillo y cols 2003) que amplifica un fragmento de 71 pb de la posición 1308 a 1379

*Pg*-forward 5'CCTACGTG-TACGGACAGAGCTATA-3'

*Pg*-reverse 5'-AGGATCGCTCAGCGTAGCATT-3'

### *Amplificación*

Se utilizará la *Taq* polimerasa de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen final de reacción de 25 ml conteniendo 3 ml de ADN molde y buffer y nucleótidos ajustados al volumen.

La reacción se llevará a cabo de cada microorganismo por separado utilizando un ABI Prism 7700 con el siguiente programa:

- 2 minutos a 50° C
- 10 min a 95° C
- 40 ciclos de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 60° C

### *Cuantificación*

Se realizará por comparación de las curvas de disociación de las muestras respecto a cantidades conocidas de los fragmentos amplificados clonados en un vector.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este estudio estadístico, para cada una de las tablas que aparecen, fue necesario realizar contrastes del tipo

$$\begin{cases} H_0: \mu_A = \mu_B \\ H_1: \mu_A \neq \mu_B \end{cases} \quad (1)$$

o la generalización del mismo con  $n$  variables/muestras en lugar de 2; salvo para la tabla "9B", para la que se realizó un contraste del tipo

$$\begin{cases} H_0: \pi_A = \pi_B \\ H_1: \pi_A \neq \pi_B, \end{cases} \quad (2)$$

Se utilizó, para ambos tipos de contrastes, el programa estadístico SPSS.

### **Contraste (1)**

El primer paso para realizar el contraste (1) fue comprobar la normalidad de las variables/muestras cuyas medias se comparaban. Para verificar dicha propiedad se usó el *Test de Normalidad de Shapiro-Wilk*, asumiendo normalidad si tanto para la variable/muestra  $A$  como para la variable/muestra  $B$  (o para todas las variables/muestras, en su versión general), se obtenía un  $p > 0'05$ .

A partir del resultado de dicho test, se continuó de dos formas:

- Si  $p \leq 0'05$ , se usaron técnicas *no paramétricas*.
- Si  $p > 0'05$ , se usaron técnicas *paramétricas*.

Tanto a la hora de realizar contrastes paramétricos como no paramétricos, se tuvo en cuenta si las variables/muestras a comparar eran independientes o relacionadas. Así, se obtuvieron realmente cuatro formas de proceder a partir de la comprobación de normalidad:



- No paramétricas:
  - Muestras independientes: *Test U de Mann-Whitney (H de Kruskal-Wallis en la versión general del contraste)*
  - Muestras relacionadas: *Test de Wilcoxon (Friedman en la versión general del contraste)*
- Paramétricas:
  - Muestras independientes: *Prueba T para muestras independientes (ANOVA de un factor en la versión general del contraste)*
  - Muestras relacionadas: *Prueba T para muestras relacionadas*

Asímismo, cuando se realizaron las comprobaciones paramétricas anteriores, se debió observar, antes de tomar el *p-valor* correspondiente al contraste que interesaba desde un principio (1), el valor de *p* resultante del *Test de Levene para igualdad de varianzas*, para saber si se debía tomar el *p-valor* correspondiente a la *suposición de varianzas iguales o varianzas desiguales*. Hecho esto, se pudieron recopilar los distintos *p-valores* resultantes.

### **Contraste (2)**

Por su parte, para el contraste (2), el primer paso a seguir fue construir una *Tabla de Contingencia* (tabla 2x2) para cada contraste, y tras ello, realizar la prueba *Chi cuadrado*, recogiendo el *p-valor* correspondiente para el contraste deseado.

## **7. ANEXO**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES**

**ESTUDIO: Estudio de transmisión de periodontopatógenos entre parejas pre y postratamiento periodontal**

El paciente:

Con DNI:

Mayor de edad, fecha de nacimiento:

Ha sido informado de:

“Se le invita a participar en un estudio sobre la posibilidad de transmisión de bacterias orales de unos individuos a otros. Para ello se le tomarán unas muestras de los dientes con puntas de papel absorbente antes de empezar el tratamiento periodontal, y al transcurrir un mes y a los seis meses de finalizar el tratamiento. La toma de estas muestras no interfiere con el tratamiento que le ha recomendado su dentista, ya que el mismo y el control de la evolución se llevarán a cabo según las indicaciones habituales. El tratamiento que se le va a realizar es el mismo que se le hace a cualquier otra persona con su mismo problema.”

Usted puede abandonar la participación en el estudio cuando lo desee, sin que ello suponga una interrupción en el tratamiento o una modificación del mismo”.

Sevilla,                      de                      de 200

Firma



## VI. RESULTADOS

### 1. CASUÍSTICA

Se seleccionaron **16 pacientes periodontales** que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, y **se solicitó la colaboración de sus parejas. En total 32 sujetos** con un tiempo de relación medio de 20,5 años (rango: 6 a 40).

El grupo de **pacientes** incluía más varones que mujeres (12 varones y 4 mujeres) y sus **parejas** eran 12 mujeres y 4 varones. La edad media era similar entre los pacientes y sus parejas; 45,6 años (rango: 37 y 63) y 42,9 años (rango: 26 y 60) respectivamente. El porcentaje de pacientes y parejas ocupadas, no ocupadas y amas de casa fue similar también entre ambos grupos. Igualmente el porcentaje de fumadores también se equiparaba entre los pacientes y sus respectivas parejas. De las parejas, 6 (37,5%) tenían cónyuges enfermos con periodontitis, y los 10 restantes estaban sanos (tablas 1, 2).

De las 16 parejas que comenzaron el estudio 12 lo completaron. Dos parejas (una sin periodontitis crónica “sana” y una con periodontitis crónica “enferma”) abandonaron el estudio antes de la segunda toma de muestras y otras dos parejas (una sana y una enferma) antes de la tercera toma de muestras.

**Tabla 1.** Características demográficas de los **16 pacientes** y sus **16 parejas**.

	<b>Pacientes (n=16)</b>	<b>Parejas (n=16)</b>
	<b>Media</b>	<b>Media</b>
Edad	45,6	42,9
Tiempo de relación	20,4	20,4
	%	
Sexo (varones/mujeres)		
Varones	75,0	25,0
Mujeres	25,0	75,0
Fumadores		
Sí	31,3	31,3
No	62,5	68,8
Ex-fumadores	6,3	0,0
Ocupación		
Ocupados	62,5	62,5
No ocupados	25,0	12,5
Amas de casa	12,5	25,0

**Tabla 2.** Características demográficas de los **16 pacientes** y sus **16 parejas (sanas y enfermas)**.

	<b>Pacientes (n=16)</b>	<b>Parejas sanas (n=10)</b>	<b>Parejas enfermas (n=6)</b>
	<b>Media</b>	<b>Media</b>	<b>Media</b>
Edad	45,6	39,2	49,0
Tiempo de relación	20,4	19,5	22,0
	%		
Sexo (varones/mujeres)			
Varones	75,0	20,0	33,3
Mujeres	25,0	80,0	66,7
Fumadores			
Sí	31,3	20,0	50,0
No	62,5	80,0	50,0
Ex-fumadores	6,3	0,0	0,0
Ocupación			
Ocupados	62,5	60,0	66,7
No ocupados	25,0	0,0	33,3
Amas de casa	12,5	40,0	0,0

## 2. SITUACIÓN CLÍNICA PERIODONTAL INICIAL Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

Se realizó una exploración clínica completa (periodontograma) a los 32 individuos que comenzaron el estudio. De los 32 casos, 22 fueron diagnosticados de Periodontitis Crónica.

Al comparar los hallazgos clínicos de los **pacientes y los cónyuges enfermos**, se observó que los pacientes enfermos tenían proporciones medias superiores de localizaciones con PS 4-5mm y  $\geq 6$ mm, y de localizaciones con pérdida de nivel de inserción clínico avanzado ( $\geq 5$ mm). Así mismo, al comparar las características clínicas de todos los **sujetos enfermos** con las de los **cónyuges sanos**, se comprobó que los enfermos tenían proporciones medias muy superiores de localizaciones con PS 4-5mm y  $\geq 6$ mm, y de localizaciones con pérdida de nivel de inserción clínico moderado y avanzado.

De igual forma, la proporción media de localizaciones que mostraban sangrado al sondaje eran superiores en los pacientes periodontales respecto a los cónyuges, enfermos o sanos. Sin embargo, el índice de placa bacteriana era similar entre pacientes y cónyuges enfermos, y superior en los sujetos enfermos respecto a los cónyuges sanos. Las características clínicas de los pacientes y las parejas se exponen en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3.** Características clínicas de los **16 pacientes** (antes del tratamiento).

	<b>Media (% Localizaciones) (Exploración Inicial)</b>
	<b>Pacientes (n=16)</b>
Profundidad de Sondaje	
≤ 3 mm	55,95
4-5mm	35,39
≥ 6 mm	8,65
Nivel de pérdida de inserción clínico	
Leve PIC=1-2mm	23,58
Moderada PIC=3-4mm	41,12
Avanzada PIC≥5mm	35,30
Sangrado al sondaje	
Positivo	50,69
Negativo	49,31
Índice de placa	
0	34,75
1	22,25
2	22,94
3	20,05

**Tabla 4.** Características clínicas de las 16 parejas (antes del tratamiento).

	<b>Media (% Localizaciones) (Exploración Inicial)</b>	
	<b>Parejas Enfermas (n=6)</b>	<b>Parejas Sanas (n=10)</b>
Profundidad de Sondaje		
≤ 3 mm	80,86	93,22
4-5mm	17,90	6,78
≥ 6 mm	1,23	0,00
Nivel de inserción clínico		
Leve PIC=1-2mm	37,04	65,08
Moderada PIC=3-4mm	46,30	34,05
Avanzada PIC≥5mm	16,67	0,87
Sangrado al sondaje		
Positivo	39,04	23,38
Negativo	60,96	76,62
Índice de placa		
0	30,25	59,02
1	19,91	25,40
2	24,54	13,71
3	25,31	1,88

Al mes de finalizar el tratamiento mecánico mediante raspado y alisado radicular se reevaluó a los pacientes con una nueva exploración periodontal. De los 22 pacientes, 10 recibieron cirugía periodontal y tratamiento antibiótico con Amoxicilina 875 mg/8h, 7 días durante el período postoperatorio. Seis meses después del tratamiento se exploraron los mismos parámetros clínicos.

La tabla 5 muestra la respuesta clínica al tratamiento periodontal, al mes y a los 6 meses, de los 12 pacientes que completaron el estudio, y la tabla 6 expone la evolución clínica de los 4 cónyuges enfermos (los 8 restantes estaban sanos y no recibieron tratamiento periodontal). Los parámetros clínicos muestran una disminución progresiva del porcentaje de localizaciones con profundidad de sondaje de 4-5 mm y ≥ 6mm, un descenso de las localizaciones con pérdida de inserción clínica moderada y avanzada, así como de los índices de sangrado al sondaje y placa bacteriana.



**Tabla 5.** Evolución clínica de los pacientes (n=12)

	<b>Media (% Localizaciones) Pacientes (n=12)</b>		
	<b>Exploración Inicial</b>	<b>Exploración 2 (1 mes)</b>	<b>Exploración 3 (6 meses)</b>
Profundidad de Sondaje			
≤ 3 mm	55,38	77,70	87,92
4-5mm	35,48	19,52	11,59
≥ 6 mm	9,14	2,79	0,50
Nivel de inserción clínico			
Leve PIC=1-2mm	23,66	36,18	32,53
Moderada PIC=3-4mm	40,74	33,94	35,38
Avanzada PIC≥5mm	35,60	29,88	32,09
Sangrado al sondaje			
Positivo	45,70	29,88	20,94
Negativo	54,30	70,12	79,06
Índice de placa			
0	36,74	58,18	48,39
1	21,74	19,39	25,46
2	22,52	14,61	16,05
3	19,00	7,82	10,10

**Tabla 6.** Evolución clínica de las parejas enfermas (n=4)

	<b>Media (% Localizaciones) Parejas (n=4)</b>		
	<b>Exploración Inicial</b>	<b>Exploración 2 (1 mes)</b>	<b>Exploración 3 (6 meses)</b>
Profundidad de Sondaje			
≤ 3 mm	26,64	27,33	29,68
4-5mm	3,29	2,42	1,43
≥ 6 mm	0,18	0,06	0,12
Nivel de inserción clínico			
Leve PIC=1-2mm	13,44	15,33	15,43
Moderada PIC=3-4mm	13,20	12,00	11,71
Avanzada PIC≥5mm	3,46	2,48	4,09
Sangrado al sondaje			
Positivo	9,98	8,73	7,99
Negativo	20,13	21,09	23,23
Índice de placa			
0	10,63	13,33	13,38
1	6,33	7,15	4,96
2	7,47	5,58	6,63
3	5,68	3,76	6,26

### 3. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

#### 3.1. Resultados de cultivo bacteriano

##### 3.1.1. Cuantificación de recuentos bacterianos en los pacientes y las parejas, antes y después del tratamiento periodontal

En la comparación de los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo empleados, según el tipo de sujeto estudiado (paciente y pareja), antes del tratamiento (muestras 1), se observan recuentos bacterianos totales superiores en los pacientes al compararlos con las parejas, siendo estas diferencias significativas en el recuento de anaerobios pigmentados. Esto puede ser debido a que la mayoría de las parejas estaban sanas (el 62,5% no padecían peridontitis crónica) (tabla 7).

Tabla 7. Comparación de los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo empleados, según el tipo de sujeto estudiado (paciente y pareja), antes del tratamiento (muestras 1)

Medios	Media de Log <sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1)		
	Paciente (n=64)	Pareja (n=55)	p
TSBV	2,0	1,6	0,199
Dentaid	2,1	2,0	0,63
Medio no selectivo para anaerobios totales	4,3	3,9	0,118
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,6	1,5	0,81
Medio selectivo para anaerobios totales	3,4	2,8	0,089
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	2,1	1,3	<b>0,01*</b>

\*diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Al estimar los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo empleados según la profundidad de bolsa de los dientes (< / ≥ 4mm) antes del tratamiento (muestras 1), se demuestran valores significativamente mayores de anaerobios pigmentados en las muestras subgingivales profundas (tabla 8).

**Tabla 8. Comparación de los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo empleados según la profundidad de bolsa de los dientes (< / ≥ 4mm) antes del tratamiento (muestras 1)**

<b>Medios</b>	<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1)</b>		<b>P</b>
	<b>&lt; 4mm (n = 70)</b>	<b>≥ 4mm (n=49)</b>	
TSBV	2,2	1,3	0,064
Dentaid	2,4	1,5	0,038
Medio no selectivo para anaerobios totales	4,1	4,1	0,838
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,1	2,1	<b>0,002**</b>
Medio selectivo para anaerobios totales	2,7	3,7	0,073
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	1,4	2,3	0,07

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

En las tablas 9, 10 y 11 se obtuvieron recuentos de anaerobios significativamente mayores, tanto de cifras totales como de colonias pigmentadas, al aumentar el índice de placa y si existía sangrado. En la muestra examinada el hábito tabáquico no afectaba significativamente al recuento de anaerobios.

**Tabla 9. Comparación de los recuentos bacterianos de anaerobios totales y pigmentados en relación con la posibilidad de tabaquismo (fumador, no fumador y ex-fumador) antes del tratamiento (muestras 1)**

	<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1)</b>			<b>P</b>
	<b>Fumar Sí (n=38)</b>	<b>No (n=77)</b>	<b>Ex Fumadores (n=4)</b>	
<b>Medios</b>				
Medio no selectivo para anaerobios totales	4,1	4,1	3,9	0,928
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,9	1,4	1,9	0,314
Medio selectivo para anaerobios totales	3,0	3,2	2,8	0,629
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	1,4	1,9	0,7	0,208

**Tabla 10. Comparación de los recuentos bacterianos de anaerobios totales y pigmentados según las características clínicas de la localización de la toma de muestra (sangrado al sondaje) antes del tratamiento (muestras 1)**

	<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1)</b>		<b>P</b>
	<b>Sangrado al sondaje</b>		
<b>Medios</b>	<b>Positivo (n=38)</b>	<b>Negativo (n=49)</b>	
Medio no selectivo para anaerobios totales	3,5	3,6	0,687
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,6	1,6	0,826
Medio selectivo para anaerobios totales	3,1	2,3	0,063
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	1,9	1,3	0,057

**Tabla 11. Comparación de los recuentos bacterianos de anaerobios totales y pigmentados según las características clínicas de la localización de la toma de muestra (índice de placa bacteriana) antes del tratamiento (muestras 1)**

<b>Medios</b>	<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1)</b>				<b>P</b>
	<b>Placa Bacteriana</b>				
	<b>0 (n=37)</b>	<b>1 (n=20)</b>	<b>2 (n=17)</b>	<b>3 (n=13)</b>	
Medio no selectivo para anaerobios totales	3,3	3,6	3,5	4,2	<b>0,041*</b>
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,6	1,5	1,7	1,8	0,946
Medio selectivo para anaerobios totales	2,0	2,6	3,2	3,6	<b>0,041*</b>
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	1,1	1,3	2,3	2,4	<b>0,021*</b>

\*diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Se miden valores superiores de recuentos bacterianos en individuos enfermos respecto a sujetos sanos, en los diferentes medios de cultivo estudiados en las muestras tomadas antes del tratamiento periodontal, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para los anaerobios totales y pigmentados (muestras 1) (tabla 12)

**Tabla 12. Comparación de los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo empleados en sujetos sanos y enfermos antes del tratamiento (muestras1)**

<b>Medios</b>	<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1)</b>		<b>P</b>
	<b>Sanos (n=32)</b>	<b>Enfermos (n=87)</b>	
TSBV	1,4	2,0	0,08
Dentaid	1,9	2,1	0,487
Medio no selectivo para anaerobios totales	3,7	4,2	0,07
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,5	1,6	0,699
Medio selectivo para anaerobios totales	2,4	3,4	<b>0,008**</b>
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	1,1	2,0	<b>0,026*</b>

\*diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

En la tabla 13 se observa que se equiparan los valores de los recuentos bacterianos de los sujetos enfermos a los valores de los individuos sanos 6 meses después del tratamiento.

**Tabla 13. Comparación de los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo empleados en sujetos sanos y enfermos postratamiento (muestras 3)**

<b>Medios</b>	<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 3)</b>		
	<b>Sanos (n=26)</b>	<b>Enfermos (n=64)</b>	<b>P</b>
TSBV	1,5	1,1	0,366
Dentaid	1,8	1,3	0,246
Medio no selectivo para anaerobios totales	3,4	3,5	0,596
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,9	2,5	0,177
Medio selectivo para anaerobios totales	2,0	2,3	0,378
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	0,7	0,7	0,735

El seguimiento de los sujetos sanos y enfermos, entre la evaluación inicial y 6 meses tras el tratamiento, demostró que había diferencias muy significativas en los recuentos bacterianos de los enfermos, que disminuían con el tratamiento. En los sujetos sanos estas diferencias eran casi significativas en el recuento de anaerobios totales, que se reducía por el tratamiento en los enfermos (tabla 14).

**Tabla 14. Comparación de los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo empleados en sujetos sanos y enfermos, antes y después (6 meses) del tratamiento (muestras 1 y muestras 3)**

Medios	Media de Log <sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1 vs Muestras 3)				<i>p</i> (sanos)	<i>p</i> (enfermos)
	Antes (M1)		Después (M3)			
	Sanos (n=26)	Enfermos (n=64)	Sanos (n=26)	Enfermos (n=64)		
TSBV	1,5	2,0	1,5	1,1	0,758	<b>0,001**</b>
Dentaid	2,0	2,1	1,8	1,3	0,476	<b>0,001**</b>
Medio no selectivo para anaerobios totales	3,8	4,2	3,4	3,5	0,096	<b>0,001**</b>
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,4	1,6	1,9	2,5	0,538	<b>0,004**</b>
Medio selectivo para anaerobios totales	2,8	3,5	2,0	2,3	0,055	<b>0,001**</b>
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	1,2	2,1	0,7	0,7	0,246	<b>0,001**</b>

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

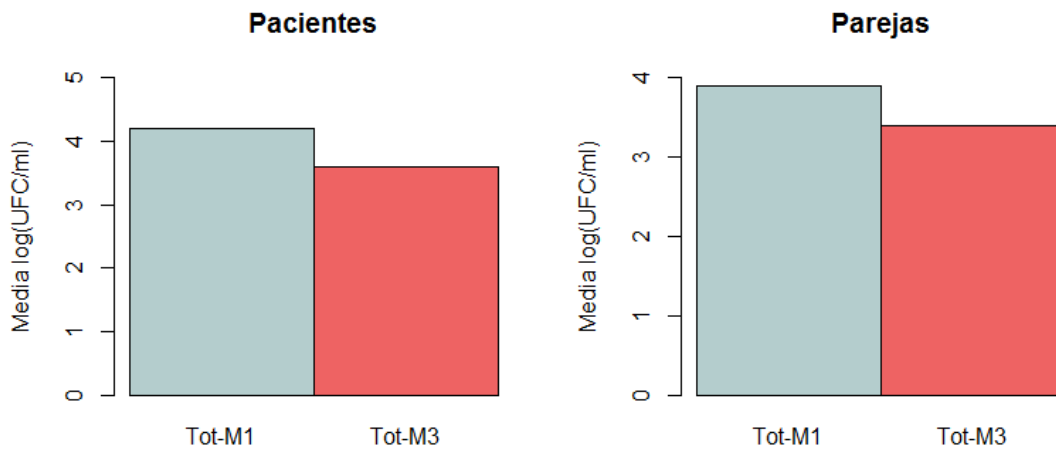
Como se puede ver hay una disminución muy significativa en los recuentos de anaerobios totales al comparar las muestras tomadas antes del tratamiento periodontal (muestras1) y 6 meses después (muestras3) tanto en los pacientes como en las parejas (tabla 15, gráfico 1).

**Tabla 15. Seguimiento evolutivo de los recuentos de anerobios totales a lo largo del tiempo en Medio no selectivo (muestras 1 y muestras 3)**

<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1 vs Muestras 3)</b>			
<b>Tipo de sujeto</b>	<b>Medio no selectivo para anaerobios</b>		
	<b>Totales - M1 (n=90)</b>	<b>Totales - M3 (n=90)</b>	<b>P</b>
Pacientes	4,2 (n=48)	3,6 (n=48)	<b>0,008**</b>
Parejas	3,9 (n=42)	3,4 (n=42)	<b>0,007**</b>

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

**Gráfico 1. Seguimiento evolutivo de los recuentos de anerobios totales a lo largo del tiempo en Medio no selectivo (muestras 1 y muestras 3)**





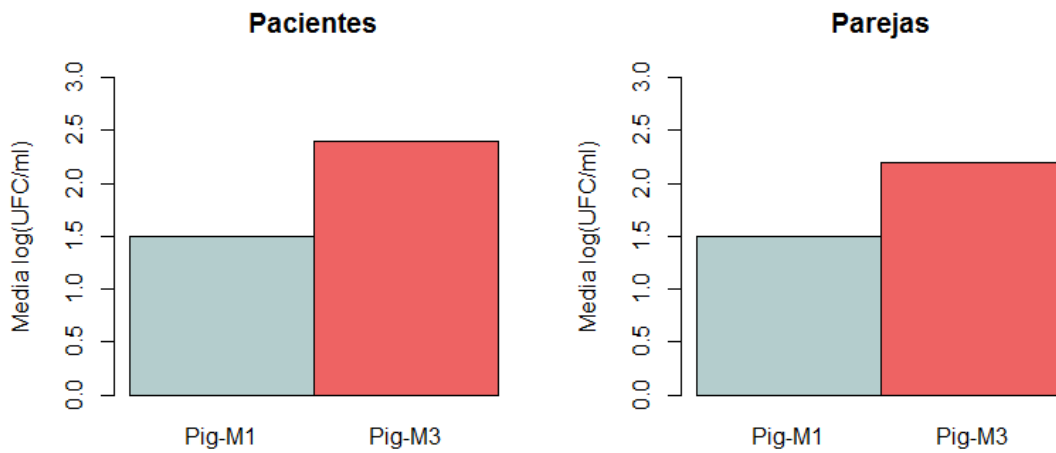
Los recuentos de anaerobios pigmentados se incrementan después del tratamiento periodontal (muestras 3) únicamente en los pacientes y no en las parejas (tabla 16, gráfico 2).

**Tabla 16. Seguimiento evolutivo de los recuentos de anerobios pigmentados a lo largo del tiempo en Medio no selectivo (muestras 1 y muestras 3)**

<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1 vs Muestras 3)</b>			
<b>Tipo de sujeto</b>	<b>Medio no selectivo para anaerobios Pigmentados</b>		<b>P</b>
	<b>- M1 (n=90)</b>	<b>- M3 (n=90)</b>	
Pacientes	1,5 (=48)	2,4 (n=48)	<b>0,014*</b>
Parejas	1,5 (n=42)	2,2 (n=42)	0,161

\*diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Gráfico 2. Seguimiento evolutivo de los recuentos de anerobios pigmentados a lo largo del tiempo en Medio no selectivo (muestras 1 y muestras 3)**



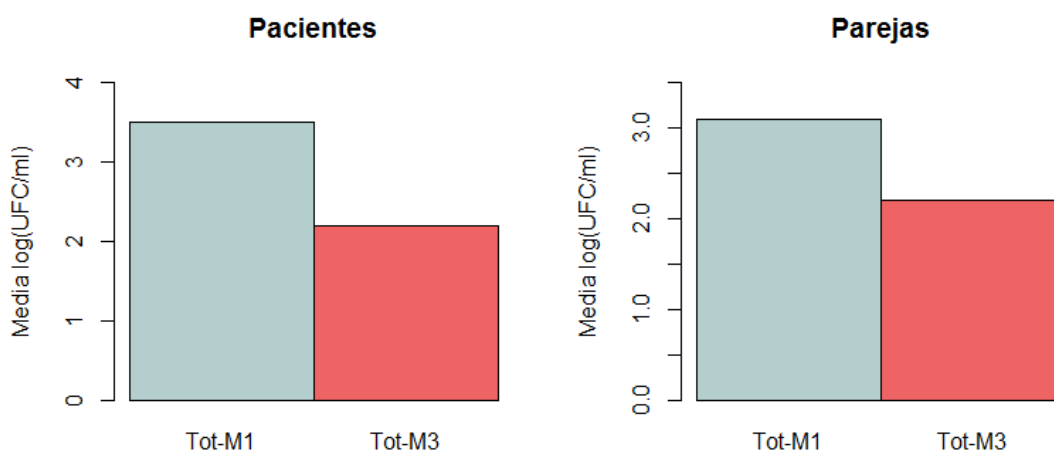
Se observa una reducción estadísticamente muy significativa de los recuentos de anaerobios totales tras la terapéutica tanto en los pacientes como en las parejas (muestras 3) (tabla 17, gráfico 3).

**Tabla 17. Seguimiento evolutivo de los recuentos de anerobios totales a lo largo del tiempo en Medio selectivo (muestras 1 y muestras 3).**

<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1 vs Muestras 3)</b>			
<b>Tipo de sujeto</b>	<b>Medio selectivo para anaerobios</b>		
	<b>Totales - M1 (n=90)</b>	<b>Totales - M3 (n=90)</b>	<b>P</b>
Pacientes	3,5 (n=48)	2,2 (n=48)	<b>0,001**</b>
Parejas	3,1 (n=42)	2,2 (n=42)	<b>0,002**</b>

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

**Gráfico 3. Seguimiento evolutivo de los recuentos de anerobios totales a lo largo del tiempo en Medio selectivo (muestras 1 y muestras 3)**



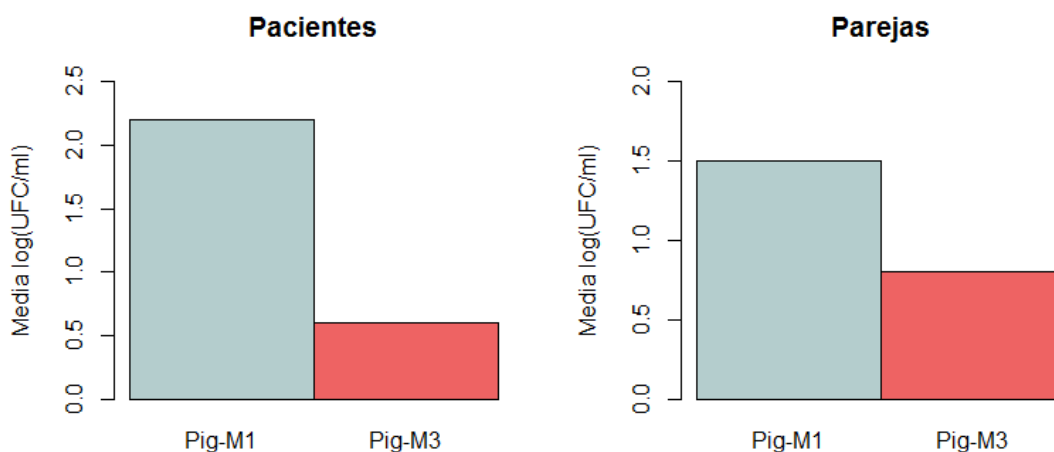
Como en la tabla anterior se comprueba una disminución en la cuantificación de colonias pigmentadas 6 meses después del tratamiento siendo esta diferencia muy significativa en los pacientes y casi significativa en las parejas (tabla 18, gráfico 4).

**Tabla 18. Seguimiento evolutivo de los recuentos de anerobios pigmentados a lo largo del tiempo en Medio selectivo (muestras 1 y muestras 3)**

<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1 vs Muestras 3)</b>			
<b>Tipo de sujeto</b>	<b>Medio selectivo para anaerobios</b>		
	<b>Pigmentados - M1 (n=90)</b>	<b>Pigmentados - M3 (n=90)</b>	<b>P</b>
Pacientes	2,2 (n=48)	0,6 (n=48)	<b>0,001**</b>
Parejas	1,5 (n=42)	0,8 (n=42)	0,076

\*diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

**Gráfico 4. Seguimiento evolutivo de los recuentos de anerobios pigmentados a lo largo del tiempo en Medio selectivo (muestras 1 y muestras 3)**



Las mediciones reflejan valores muy superiores en las muestras de saliva en comparación a las obtenidas de localizaciones periodontales, siendo estas diferencias estadísticamente muy significativas para los medios TSBV, Dentaïd, y medio no selectivo y selectivo para anaerobios totales (tabla 19).

**Tabla 19. Comparación de los recuentos totales en saliva y diente antes del tratamiento periodontal (muestras1)**

<b>Medios</b>	<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1)</b>		
	<b>Saliva (n=32)</b>	<b>Diente (n=87)</b>	<b>P</b>
TSBV	3,9	1,0	<b>0,001**</b>
Dentaïd	4,4	1,2	<b>0,001**</b>
Medio no selectivo para anaerobios totales	5,5	3,6	<b>0,001**</b>
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,4	1,6	0,399
Medio selectivo para anaerobios totales	4,4	2,6	<b>0,001**</b>
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	2,1	1,6	0,199

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

Los recuentos totales son superiores en las muestras de saliva al compararlas con las muestras periodontales de igual forma que las muestras 1 (tabla 20).

**Tabla 20. Comparación de los recuentos totales en saliva y diente después del tratamiento (muestras3)**

<b>Medios</b>	<b>Media de Log<sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 3)</b>		
	<b>Saliva (n=24)</b>	<b>Diente (n=66)</b>	<b>P</b>
TSBV	3,4	0,5	<b>0,001**</b>
Dentaïd	3,6	0,7	<b>0,001**</b>
Medio no selectivo para anaerobios totales	5,4	2,8	<b>0,001**</b>
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	4,0	1,7	<b>0,001**</b>
Medio selectivo para anaerobios totales	4,0	1,6	<b>0,001**</b>
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	1,2	0,5	0,076

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

Se objetiva una disminución significativa de los valores tanto en las muestras de saliva como en las muestras periodontales, aunque los valores continuaron siendo superiores en las muestras de saliva respecto a las periodontales 6 meses después del tratamiento periodontal (tabla 21).

**Tabla 21. Comparación de los recuentos totales en saliva y diente antes y después del tratamiento (muestras 1 y muestras 3)**

Medios	Media de Log <sub>10</sub> UFC/ml (Muestras 1 vs Muestras 3)					
	Antes (M1)		Después (M3)		p(saliva)	p(diente)
	Saliva (n=24)	Diente (n=66)	Saliva (n=24)	Diente (n=66)		
TSBV	3,9	1,1	3,4	0,5	0,259	<b>0,003**</b>
Dentaid	4,5	1,2	3,6	0,7	<b>0,041*</b>	<b>0,017*</b>
Medio no selectivo para anaerobios totales	5,5	3,6	5,4	2,8	0,92	<b>0,001**</b>
Medio no selectivo para anaerobios pigmentados	1,1	1,7	4,0	1,7	<b>0,001**</b>	0,806
Medio selectivo para anaerobios totales	4,9	2,7	4,0	1,6	<b>0,003**</b>	<b>0,001**</b>
Medio selectivo para anaerobios pigmentados	2,3	1,7	1,2	0,5	<b>0,041*</b>	<b>0,001**</b>

\*diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

### 3.2. PCR Cuantitativa

#### 3.2.1. Detección y cuantificación de Aa Y Pg en los pacientes y las parejas antes y después del tratamiento

La media de Log de PCR Pg y PCR Aa es superior en los pacientes al compararla con las parejas, siendo las diferencias muy significativas en la media de recuento por PCR Pg (tabla 22).

Tabla 22. Media de Log de PCR Pg y PCR Aa en pacientes y parejas antes del tratamiento (muestras 1 PCR)

	Pacientes	Parejas	<i>p</i>
<b>Media de PCR<sub>PG-LOG</sub> (M1)</b>	3,2 (n=30)	2,0 (n=30)	<b>0.002**</b>
<b>Media de PCR<sub>AA-LOG</sub> (M1)</b>	0,8 (n=30)	0,7 (n=30)	0.624

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

Se constatan unos valores superiores en la media de Log de PCR Pg respecto a la media de Log de PCR Aa, tanto en las muestras de saliva como en las de dientes. Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas al comparar la media de Log de PCR Pg y de PCR Aa en las muestras de saliva y periodontales (tabla 23).

Tabla 23. Media de Log de PCR Pg y PCR Aa en saliva y dientes antes del tratamiento (muestras 1 PCR)

	Saliva	Dientes	<b><i>P</i></b>
<b>Media de PCR<sub>PG-LOG</sub> (M1)</b>	2,5 (n=30)	2,7 (n=30)	0,458
<b>Media de PCR<sub>AA-LOG</sub> (M1)</b>	0,9 (n=30)	0,6 (n=30)	0,502

Los datos de la tabla 24 reflejan medias de Log de PCR *Pg* superiores en sujetos enfermos, siendo la diferencia muy significativa, sin embargo no se observan discrepancias significativas entre las medias de Log de PCR *Aa* de individuos sanos y enfermos.

**Tabla 24. Media de Log de PCR *Pg* y PCR *Aa* en sujetos sanos y enfermos antes del tratamiento (Muestras 1 PCR)**

	Sanos	Enfermos	<i>P</i>
<b>Media de PCR<sub>PG-LOG</sub> (M1)</b>	1,6 (n=18)	3,0 (n=42)	<b>0,002**</b>
<b>Media de PCR<sub>AA-LOG</sub> (M1)</b>	0,8 (n=18)	0,7 (n=42)	0,891

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

En la exploración al mes del tratamiento la media de Log de PCR *Pg* fue inferior en los pacientes al enfrentarla con las parejas, sin embargo la media de Log *Aa* fue superior en los pacientes, obteniéndose un resultado de PCR negativo en las parejas (tabla 25).

**Tabla 25. Media de Log de PCR *Pg* y PCR *Aa* en pacientes y parejas 1 mes después del tratamiento (muestras 2 PCR)**

	Pacientes	Parejas	<i>p</i>
<b>Media de PCR<sub>PG-LOG</sub> (M2)</b>	1,8 (n=28)	3,2 (n=6)	0.081
<b>Media de PCR<sub>AA-LOG</sub> (M2)</b>	0,5 (n=28)	0,0 (n=6)	0.333

La tabla 26 contrasta la media de Log de PCR *Pg* y PCR *Aa* en muestras de saliva y muestras periodontales 1 mes después de la terapéutica. Se observan unos valores similares en la media de Log de PCR *Pg* y en la media de Log de PCR *Aa*, en las muestras de saliva y en las muestras periodontales, no observándose diferencias significativas (tabla 26).

**Tabla 26. Media de Log de PCR *Pg* y PCR *Aa* en saliva y dientes 1 mes después del tratamiento (muestras 2 PCR)**

	Saliva	Dientes	<b><i>P</i></b>
<b>Media de PCR<sub>PG-LOG</sub> (M2)</b>	2,2 (n=17)	2,0 (n=17)	0,726
<b>Media de PCR<sub>AA-LOG</sub> (M2)</b>	0,5 (n=17)	0,3 (n=17)	0,902

En la valoración a los 6 meses del tratamiento se observó que la media de Log de PCR *Pg* continuó siendo inferior en los pacientes al compararla con la de las parejas. La media de Log de *Aa* fue similar en ambos grupos (tabla 27).

**Tabla 27. Media de Log de PCR *Pg* y PCR *Aa* en pacientes y parejas 6 meses después del tratamiento (muestras 3 PCR)**

	Pacientes	Parejas	<i>p</i>
<b>Media de PCR<sub>PG-LOG</sub> (M3)</b>	1,3 (n=22)	1,8 (n=22)	0.248
<b>Media de PCR<sub>AA-LOG</sub> (M3)</b>	0,4 (n=22)	0,4 (n=22)	0.953



Al comparar la media de Log de PCR *Pg* y de PCR *Aa* en las muestras de saliva y muestras periodontales tomadas 6 meses después del tratamiento, no se observaron diferencias significativas en ambos tipos de muestras (tabla 28).

**Tabla 28. Media de Log de PCR *Pg* y PCR *Aa* en saliva y dientes 6 meses después del tratamiento (muestras 3 PCR)**

	Saliva	Dientes	<b><i>P</i></b>
<b>Media de PCR<sub>PG-LOG</sub> (M3)</b>	1,7 (n=22)	1,5 (n=22)	0,697
<b>Media de PCR<sub>AA-LOG</sub> (M3)</b>	0,5 (n=22)	0,3 (n=22)	0,89

Al cotejar los datos de los sujetos sanos y enfermos 6 meses después del tratamiento se pudo comprobar que los valores de la media de Log *Pg* y de la media de Log *Aa* eran similares en individuos sanos y enfermos (tabla 29).

**Tabla 29. Media de Log de PCR *Pg* y PCR *Aa* en sujetos sanos y enfermos 6 meses después del tratamiento (Muestras 3 PCR)**

	Sanos	Enfermos	<b><i>P</i></b>
<b>Media de PCR<sub>PG-LOG</sub> (M3)</b>	2,0 (n=14)	1,4 (n=30)	0,192
<b>Media de PCR<sub>AA-LOG</sub> (M3)</b>	0,7 (n=14)	0,3 (n=30)	0,281

En la tabla 30 el seguimiento reveló una disminución de la media de Log de *Pg* y de *Aa* en los pacientes. Esta disminución fue estadísticamente significativa para la media de Log de *Pg* de las muestras periodontales de los pacientes.

**Tabla 30. Seguimiento cuantitativo por PCR antes y después del tratamiento (1 mes y 6 meses) (muestras 1, 2 y 3 PCR).**

	<b>Log PCR</b>							
	<b>Muestras 1</b>		<b>Muestras 2</b>		<b>Muestras 3</b>		<b>p</b>	<b>p</b>
	Saliva	Diente	Saliva	Diente	Saliva	Dientes	Saliva	Dientes
Paciente								
PG	2,7	3,4	1,8	1,8	1,4	1,4	0,103	<b>0,026*</b>
AA	0,8	1,0	0,4	0,0	0,6	0,2	0,926	0,368
Pareja								
PG	3,0	2,4	3,6	2,7	2,0	2,0	0,148	0.717
AA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-

\*diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<b>Número de muestras en cada caso</b>	<b>Log PCR</b>					
	<b>Muestras 1</b>		<b>Muestras 2</b>		<b>Muestras 3</b>	
	<b>Saliva</b>	<b>Diente</b>	<b>Saliva</b>	<b>Diente</b>	<b>Saliva</b>	<b>Diente</b>
Paciente						
PG	10	10	10	10	10	10
AA	10	10	10	10	10	10
Pareja						
PG	3	3	3	3	3	3
AA	3	3	3	3	3	3

El seguimiento cualitativo mostró que no había diferencias significativas en el porcentaje de positivos de *Pg* y *Aa* en los pacientes y las parejas al evaluar las tres muestras a la vez (tabla 31). No se aisló *Aa* inicialmente en las muestras de ningún sujeto, paciente o pareja, por cultivo, pero se evidenció por PCR en 2 enfermos, persistiendo en ellos tras el tratamiento. Se observa como *Pg* se detecta al diagnóstico por PCR en 87.5% de los pacientes, y en 81.25% de las parejas (43,75% “portadoras” sanas, 37.5% parejas enfermas).

**Tabla 31. Seguimiento cualitativo por PCR: porcentaje de positivos antes y después del tratamiento (1 mes y 6 meses): Muestras 1, frente a 2 y 3 PCR**

	% PCR							
	Muestras 1		Muestras 2		Muestras 3		<i>p</i>	
	Saliva	Diente	Saliva	Diente	Saliva	Diente	Saliva	Diente
Paciente								
PG	80,0%	90,0%	60,0%	60,0%	50,0%	60,0%	0,366	0,240
AA	20,0%	20,0%	10,0%	0,0%	20,0%	10,0%	0,787	0,329
Pareja								
PG	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	66,7%	100,0%	0,325	-
AA	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	-	-

Número de muestras POSITIVAS en cada caso		% PCR					
		Muestras 1		Muestras 2		Muestras 3	
		Saliva	Diente	Saliva	Diente	Saliva	Diente
Paciente							
	PG	8	9	6	6	5	6
	AA	2	2	1	0	2	1
Pareja							
	PG	3	3	3	3	2	3
	AA	0	0	0	0	0	0

Número de muestras NEGATIVAS en cada caso		% PCR					
		Muestras 1		Muestras 2		Muestras 3	
		Saliva	Diente	Saliva	Diente	Saliva	Diente
Paciente							
	PG	2	1	4	4	5	4
	AA	8	8	9	10	8	9
Pareja							
	PG	0	0	0	0	1	0
	AA	3	3	3	3	3	3

### 3.3. Comparación de los resultados de cultivo bacteriano y PCR cuantitativa

Al examinar los resultados del cultivo frente a los de PCR en los pacientes y las parejas antes del tratamiento, constatamos unos recuentos superiores de *Pg* en los pacientes respecto a las parejas, tanto en cultivo como en PCR, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Los valores de *Aa* son similares (tabla 32).

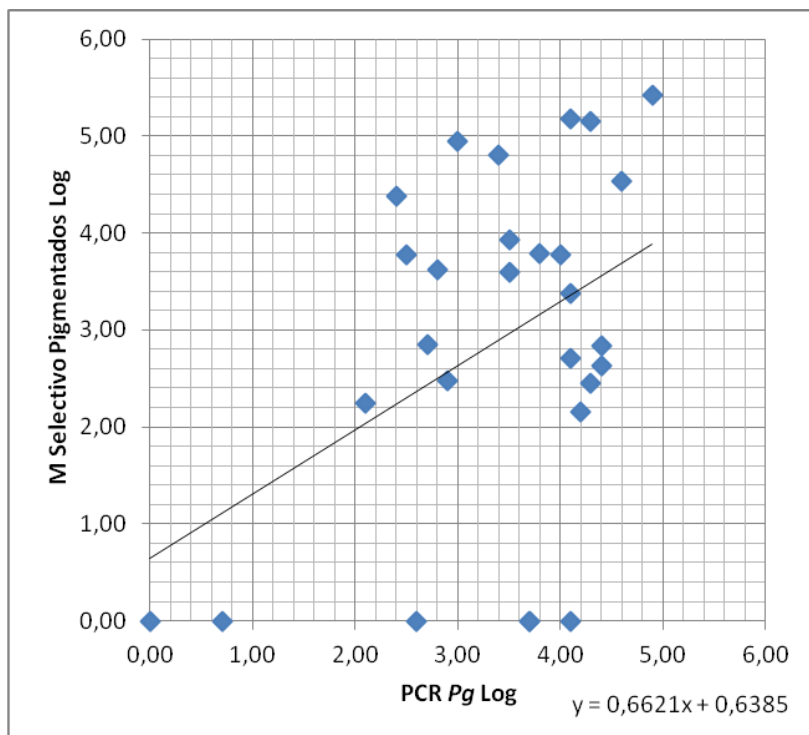
**Tabla 32. Cultivo frente a PCR respecto a pacientes y parejas antes del tratamiento (Muestras 1 PCR)**

	<b>Log (Muestras 1)</b>		
	<b>Paciente</b>	<b>Pareja</b>	<b>P</b>
<b>Recuento de <i>Pg</i></b>			
Cultivo Medio Selectivo			
Pigmentados (Log)	2,1 (n=64)	1,3 (n=55)	<b>0,01*</b>
PCR (Log)	3,2 (n=30)	2,0 (n=30)	<b>0,002**</b>
<b>Recuento <i>Aa</i></b>			
Cultivo TSBV (Log)	2,0 (n=64)	1,6 (n=55)	0,199
Dentaid (Log)	2,1 (n=64)	2,0 (n=55)	0,63
PCR (Log)	0,8 (n=30)	0,7 (n=30)	0,624

\*diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); \*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

El análisis de regresión mostró que los recuentos obtenidos por PCR fueron superiores a los del cultivo (gráfico 5).

**Gráfico 5. Análisis de regresión de recuento de anaerobios pigmentados en medio selectivo frente a PCR *Pg* en los pacientes (muestras 1)**



Los resultados del cultivo frente a los de PCR en fumadores y no fumadores antes del tratamiento, no presentan diferencias significativas ni en los recuentos de *Pg* ni en los de *Aa* (tabla 33).

**Tabla 33. Cultivo frente a PCR respecto a fumadores y no fumadores antes del tratamiento (Muestras 1 PCR)**

	<b>Log (Muestras 1)</b>		
	<b>Fumadores</b>	<b>No fumadores</b>	<b>P</b>
<b>Recuento de <i>Pg</i></b>			
Cultivo Medio Selectivo			
Pigmentados (Log)	1,4 (n=38)	1,9 (n=77)	0,176
PCR (Log)	2,1 (n=20)	2,8 (n=40)	0,188
<b>Recuento <i>Aa</i></b>			
Cultivo TSBV (Log)	1,8 (n=38)	1,9 (n=77)	0,973
Dentaid (Log)	1,7 (n=38)	2,3 (n=77)	0,14
PCR (Log)	0,7 (n=20)	0,7 (n=40)	0,875

Los datos de cultivo frente a los de PCR en muestras de saliva y periodontales antes del tratamiento, muestran que por cultivo se obtienen valores muy superiores de anaerobios totales y pigmentados en las muestras de saliva al compararlas con las de localizaciones periodontales. Sin embargo las cuantificaciones por PCR de *Pg* no reflejan diferencias entre las muestras de saliva y las periodontales. La media de recuento por PCR *Pg* fue inferior (diferencia muy significativa) a la media de recuento de anaerobios totales en muestras de saliva y fue superior a la media de recuento de anaerobios pigmentados en muestras periodontales (diferencia muy significativa) (tabla 34).

**Tabla 34. Cultivo (anaerobios totales y pigmentados) frente a PCR *Pg* respecto a saliva y dientes antes del tratamiento (Muestras 1 PCR)**

	<b>Cultivo</b>		<b>PCR (Muestras 1)</b>	<b><i>p</i></b>	<b><i>P</i></b>
	<b>Log MST</b>	<b>Log MSP</b>	<b>PCR<sub>PG-LOG</sub></b>		
Saliva	4,4	2,1	2,5	<b>0.001**</b>	0.806
Dientes	2,6	1,6	2,7	0.625	<b>0.001**</b>

**MNST: medio no selectivo anaerobios totales; MNSP: medio no selectivo anaerobios pigmentados; MST: medio selectivo anaerobios totales; MSP: medio selectivo anaerobios pigmentados.**

\*\*diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ )

El seguimiento evolutivo en las medias de cultivo y en las medias y porcentajes de positivos de PCR antes del tratamiento y 6 meses después del mismo, pone de manifiesto un descenso de los recuentos bacterianos y del porcentaje de positivos a *Pg* y *Aa* transcurridos 6 meses del tratamiento periodontal (tabla 35).

**Tabla 35. Comparación de medias de cultivo y medias y porcentaje de positivos de PCR antes y después del tratamiento (Muestras 1 y Muestras 3)**

	Cultivo						PCR			
	Log TSBV	Log Dent	Log MST	Log MNSP	Log MST	Log MSP	PCR <sub>PG-</sub> LOG	PCR <sub>AA-</sub> LOG	%+Pg	%+Aa
M 1	1,9	2,1	4,1	1,5	3,3	1,9	2,5	0,8	78,57%	16,67%
M 3	1,2	1,4	3,5	2,3	2,2	0,7	1,6	0,4	61,90%	14,29%

Número de muestras en cada caso										
	Cultivo						PCR			
	Log TSBV	Log Dent	Log MST	Log MNSP	Log MST	Log MSP	PCR <sub>PG-</sub> LOG	PCR <sub>AA-</sub> LOG	%+Pg	%+Aa
M 1	90	90	90	90	90	90	42	42	42	42
M 3	90	90	90	90	90	90	42	42	42	42

**MNST: medio no selectivo anaerobios totales; MNSP: medio no selectivo anaerobios pigmentados; MST: medio selectivo anaerobios totales; MSP: medio selectivo anaerobios pigmentados.**

## VII. DISCUSIÓN

A continuación pasamos a discutir los hallazgos más relevantes encontrados en la tesis. La discusión se ha estructurado en función de los datos clínicos y microbiológicos.

### 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y ESTADO CLÍNICO DE LAS PAREJAS SELECCIONADAS.

#### 1.1 Características demográficas

La selección de las parejas que se incluyeron en el estudio se basó en la situación clínica periodontal de los pacientes. Los **pacientes periodontales** fueron 16 individuos con periodontitis crónica no tratada, al menos durante el año precedente, sin enfermedades sistémicas, con una edad superior a 35 años, un mínimo de 20 dientes, y que no habían recibido tratamiento antibiótico en los 3 meses previos. El único criterio que debían cumplir **los cónyuges** era que hubiesen mantenido una relación de al menos 2 años de cohabitación con los pacientes periodontales para asegurar que hubiese transcurrido un tiempo suficiente para la transmisión horizontal de las bacterias, y para el desarrollo de la periodontitis en los cónyuges. Finalmente el tiempo de relación de las parejas fue muy superior al mínimo que se estableció, entre 6 años y 40 años. Por tanto en el momento de la selección se desconocían las características demográficas y el estado periodontal de los cónyuges.

Se utilizaron **criterios de selección** muy estrictos para conseguir que el estudio se llevase a cabo sobre un grupo homogéneo, y se consiguió que pacientes y parejas acudiesen a sus citas en los plazos establecidos. Una de las mayores dificultades del estudio fue la **fidelización** de pacientes y parejas, y lograr su asistencia permanente a citas y controles clínicos, terapéuticos y tomas de muestras. Por este motivo, de 16 parejas completaron el estudio 12.



La **media de edad** de los pacientes y las parejas era muy similar, 45,6 (rango: 37 a 63) y 42,9 años (rango: 26 a 60) respectivamente, y el **porcentaje de fumadores** era el mismo en ambos grupos (31,3%), así como el **porcentaje de individuos ocupados** (62,5%).

## 1.2 Estado clínico de las parejas seleccionadas

Cuando se comparó el estado clínico de los pacientes periodontales y sus cónyuges, se observó que de las 16 parejas, 6 padecían periodontitis crónica, y 10 estaban sanas periodontalmente.

Cuando se compararon los hallazgos clínicos de los **pacientes y los cónyuges enfermos**, se observó que los pacientes enfermos tenían proporciones medias superiores de localizaciones con PS 4-5mm y  $\geq 6$ mm, y de localizaciones con pérdida de nivel de inserción clínico avanzado ( $\geq 5$ mm). Así mismo, al comparar las características clínicas de todos los **sujetos enfermos** con las de los **cónyuges sanos**, se comprobó que los enfermos tenían proporciones medias muy superiores de localizaciones con PS 4-5mm y  $\geq 6$ mm, y de localizaciones con pérdida de nivel de inserción clínico moderado y avanzado. De igual forma, la proporción media de localizaciones que mostraban sangrado al sondaje eran superiores en los pacientes periodontales respecto a los cónyuges, enfermos o sanos. Sin embargo, el índice de placa bacteriana era similar entre pacientes y cónyuges enfermos, y superior en los sujetos enfermos respecto a los cónyuges sanos. Las diferencias en hábitos de higiene personales pueden explicar en parte los resultados clínicos, puesto que los sujetos sanos mostraban índices de placa bacteriana y sangrado muy inferiores a los de los enfermos.

En nuestro trabajo, a diferencia de otros publicados, sólo el 37,5% de las parejas padecía periodontitis. Petit y cols (1994) investigaron la prevalencia de destrucción periodontal en 24 parejas que habían permanecido unidas durante al menos 8 años. Un total de 16 parejas tenían una forma leve a moderada de periodontitis, con al menos una localización con pérdida de inserción clínica de

1 a 4 mm, y 5 parejas tenían destrucción periodontal severa con localizaciones que mostraban al menos 8 mm de pérdida de inserción clínica. Von Troil-Linden y cols (1995), en el examen clínico de 20 parejas que habían estado casadas un mínimo de 10 años, encontraron que el 80% de los cónyuges mostraban al menos periodontitis inicial. La diferencia en la prevalencia de cónyuges sanos y enfermos puede explicarse por el criterio utilizado al definir la periodontitis crónica. En nuestro estudio, la Periodontitis fue definida por la presencia de pérdida de inserción clínica  $\geq 6$  mm en 2 o más dientes, y una o más localizaciones con profundidad de sondaje  $\geq 5$  mm.

Estos y otros estudios sugieren por tanto una asociación entre las condiciones clínicas periodontales entre cónyuges. Debe señalarse también que, debido al número limitado de parejas en las distintas publicaciones, las conclusiones a cerca de la prevalencia de enfermedad en los cónyuges de sujetos con periodontitis crónica deberían ser interpretadas con cautela.

## **2. TÉCNICAS DE ESTUDIO EMPLEADAS: CULTIVO Y PCR CUANTITATIVA**

En nuestro estudio se emplearon dos tipos distintos de muestras (saliva y exudado de muestra subgingival) y dos métodos de diagnóstico microbiológico, el cultivo y la PCR en tiempo real. En primer lugar se llevó a cabo el cultivo en medios tanto enriquecidos como medios selectivos específicos para *Aa* y *Pg* de muestras periodontales y de saliva de pacientes y de sus parejas, antes y después del tratamiento. En segundo lugar se efectuó la detección y cuantificación de estas mismas bacterias mediante un método molecular de amplificación (PCR cuantitativa en tiempo real). La amplificación se realizó con cebadores específicos y la cuantificación se realizó mediante una comparación con una recta obtenida de las dianas clonadas en diferentes diluciones.

Como cabía esperar, los resultados obtenidos con los dos métodos empleados fueron muy distintos. Coinciden con los de otros estudios que han analizado la prevalencia de periodontopatógenos en diversos grupos de pacientes con diferentes métodos de detección, mostrando una gran

variabilidad de los resultados al utilizar distintos procedimientos. Ashimoto y cols (1996) desarrollaron un método de detección por PCR basado en las secuencias 16s del ARNr para determinar la prevalencia de *Aa*, *Tf*, *Cr*, *Rc*, *Pg*, *Pi*, *Pn*, y *Td*. Los resultados en cultivo y PCR coincidían en el 28% (*Tf*) y en el 71% (*Aa*) de las muestras. En el análisis de Ashimoto y col. la mayor discrepancia ocurrió en los casos de muestras PCR-positivo, cultivo-negativo. Esto se debió al menor límite de detección de la PCR, entre 25 y 100 células, en comparación con el cultivo ( $10^4$ - $10^5$  UFC/ml). De igual forma Riggio y cols (1996) estudiaron la detección de *Aa* y *Pg* en muestras de placa subgingival de pacientes periodontales mediante PCR y cultivo en un total de 170 muestras de placa de 43 pacientes. *Aa* y *Pg* fueron detectados, cada uno de ellos en 40 (24%) de las muestras mediante PCR, mientras que por cultivo se detectó *Aa* y *Pg* en 25 (15%) y 18 (11%) de las muestras, respectivamente.

Las técnicas de cultivo presentan sin embargo algunas **limitaciones**: las bacterias deben mantenerse vivas durante el transporte. Los periodontopatógenos suelen ser anaerobios, y pueden causar problemas en la toma y las condiciones de transporte al laboratorio ( $O_2$ , temperatura, medio nutritivo); el cultivo requiere tiempo, conocimientos microbiológicos y un equipamiento adecuado de laboratorio, con los costes correspondientes. Además las bacterias anaerobias orales crecen muy lentamente, y, en ocasiones, hay que esperar unas tres semanas para obtener un resultado definitivo. Por otra parte algunas especies bacterianas son difíciles de cultivar (Sakamoto y cols 2002).

Conociendo las limitaciones de las técnicas de cultivo para la obtención de colonias de bacterias orales, se llevó a cabo un procesado de las muestras muy riguroso. Las muestras se procesaron en un tiempo inferior a 1 hora desde que fueron tomadas y el medio de transporte elegido permite la viabilidad de anaerobios como *Pg*. En nuestro trabajo se empleó el método de cultivo, dado que la obtención de cultivos bacterianos continúa siendo el método de referencia (**gold standard**) en microbiología. Mediante cultivos selectivos y no selectivos obtenemos colonias de anaerobios totales y pigmentados, así como de capnófilos (Liébana 2002). En cuanto al recuento efectuado mediante

cultivo, utilizamos un recuento total de anaerobios pigmentados en vez de la identificación individual de cada colonia, obteniendo un marcador indirecto de la presencia de *Prevotella* y *Porphyromonas* spp.

Dado que la sensibilidad del cultivo puede ser muy baja, especialmente en medios no selectivos, con límites de detección entre  $10^3$  -  $10^4$  bacterias por lo que patógenos específicos que se encuentren en pequeñas cantidades pueden no ser detectados, se utilizó una técnica de biología molecular: la PCR cuantitativa en tiempo real. El procesado de las muestras mediante dicha técnica permitió no sólo la detección de los dos patógenos sino también su cuantificación, pudiendo compararse posteriormente los resultados con el cultivo.

La PCR en tiempo real con cebadores especie-específicos es un método preciso y sensible para una cuantificación fiable de especies bacterianas individuales (Sanz y cols 2004). Los cebadores más empleados para la detección de bacterias periodontales son normalmente las secuencias 16S ARNr (Ashimoto y cols 1996). Esta estrategia obliga a la utilización posterior de sondas para las secuencias intra-diana específicas de cada especie, lo que dificulta desde el punto de vista técnico y económico la detección cuantitativa de estos patógenos.

Otros investigadores han explorado diseños de diana que de entrada ya son específicos de cada especie, con lo cual la detección no requiere de sondas específicas. Morillo y cols (2004) desarrollaron un método para la cuantificación de *Aa*, *Pg* y *Tf* de muestras de placa subgingival basado en la tecnología de la "PCR en tiempo real" no basada en este tipo de dianas, que requieren del uso posterior de. Para ello se obtuvieron estas especies bacterianas tras el cultivo de cepas de referencia, y se llevó a cabo el recuento microscópicamente. Los cebadores para la PCR fueron seleccionados de las secuencias de los genes *LktC* (*Aa*), *Arg-gingipain* (*Pg*) y el antígeno *BspA* antigen (*Tf*) para la obtención de amplicones por debajo de los 100 pares de bases. Se calcularon los valores de los umbrales de los ciclos para cada

especie de acuerdo al número inicial de copias. Se obtuvo una elevada sensibilidad ( $10^1$  copias para *Aa* y *Tf* y  $10^2$  para *Pg*) y especificidad para la detección de las tres especies bacterianas (no se demostró reacción cruzada con ninguna de las especies estudiadas). Además, la técnica demostró una buena repetitividad en los valores umbrales de ciclo obtenidos para cada número inicial de copias, mostrando coeficientes de variación por debajo del 5% para cada bacteria. Debido a los excelentes resultados obtenidos con estos cebadores en cuanto a especificidad, se eligieron para este trabajo este tipo de dianas.

### **3. PRESENCIA DE PERIODONTOPATÓGENOS EN EL ÁREA SUBGINGIVAL Y EN LA SALIVA.**

En nuestro trabajo se efectuaron los recuentos bacterianos en medios de **cultivo** específicos para *Aa* (TSBV y Dentaid) y para anaerobios (medio selectivo y no selectivo) a partir de muestras de localizaciones periodontales y de saliva de los pacientes y las parejas, antes y después del tratamiento. Así mismo se realizó la detección y cuantificación de *Aa* y *Pg* mediante **PCR cuantitativa en tiempo real** en los pacientes y las parejas en muestras de saliva y periodontales, antes y después del tratamiento.

Los recuentos bacterianos totales en los distintos medios de cultivo empleados, según el origen de la muestra (saliva o diente) antes del tratamiento periodontal, reflejaron valores muy superiores en las muestras de saliva al compararlas con las obtenidas de localizaciones periodontales, siendo estas diferencias estadísticamente muy significativas para los medios TSBV, Dentaid, y medio no selectivo y selectivo para anaerobios totales. Esto es debido a que los recuentos mediante cultivo son totales de la población de *Prevotella* y *Porphyromonas*, todos los anaerobios pigmentados. En cambio, mediante PCR estamos cuantificando de forma específica *Pg*. Lo mismo ocurre con los medios TSBV y Dentaid, en lo que no se ha llevado a cabo una identificación individual de las colonias, sino que se ha realizado un recuento total de capnófilos, mientras que la PCR estaba dirigida frente a *Aa*.

En cualquier caso, tanto los recuentos totales mediante cultivo como los recuentos específicos mediante PCR reflejan una disminución por efecto del tratamiento. Al comparar los recuentos bacterianos totales en muestras de saliva y muestras periodontales antes y después del tratamiento, observamos una disminución significativa de los recuentos en ambos tipos de muestras, aunque los valores continuaron siendo superiores en las muestras de saliva 6 meses después del tratamiento. Esto refleja que el tratamiento tiene un impacto sobre al menos toda la flora anaerobia de especies de Gram negativo pigmentados y que estos, de forma indirecta, podrían ser indicadores de la disminución de *Pg*, pero no en todos los casos, ya que no encontramos una buena correlación entre los recuentos de anaerobios pigmentados y los recuentos por PCR.

En el estudio microbiológico mediante PCR en tiempo real no se apreciaron diferencias significativas al comparar los recuentos de *Pg* y de *Aa* entre las muestras de saliva y muestras periodontales tanto las tomadas antes del tratamiento y como las tomadas 6 meses después. Este es un hecho remarcable, que muestra que la flora bucal forma una población homogénea en toda la boca.

Coincidiendo con nuestros resultados, otros estudios han demostrado que *Aa* y *Pg* pueden encontrarse en el **área subgingival, en la saliva, en la placa supragingival y en la mucosa** de la cavidad oral de pacientes con periodontitis (Van Winkelhoff y cols 1988, Socransky y cols 1999). Van Winkelhoff y cols 1988 demostraron que *Aa* y *Pg* pueden ser cultivados a partir de la **saliva** de pacientes con periodontitis. Socransky y cols (1999) encontraron recuentos de  $0,6 \times 10^5$  y  $0,1 \times 10^5$  UFC/ml en la **placa supragingival** de sujetos enfermos y sanos respectivamente; e igualmente de  $1,4 \times 10^5$  y de  $0,1 \times 10^5$  UFC/ml en la subgingival. Ambas especies se diseminan intraoralmente a través de **saliva contaminada**, y colonizan la placa supragingival antes de afectar el área subgingival (Socransky y cols 1999). La **infección subgingival** ocurre en sitios con y sin pérdida de inserción periodontal.

El seguimiento cuantitativo por PCR pre-tratamiento, 1 mes y 6 meses después, reveló una disminución de la media del únicamente en el recuento de *Pg* en las muestras de saliva y en las muestras periodontales en los pacientes. No se apreciaron disminuciones estadísticamente significativas en el caso de Aa ya que el número de pacinetes positivos fue muy bajo (2).

En nuestro estudio al comparar los recuentos bacterianos obtenidos en los diferentes medios, se encontraron valores significativamente superiores de anaerobios pigmentados en las muestras subgingivales profundas, respecto a las que tenían PS < 4mm. Se ha especulado que las **bolsas profundas de sujetos** con la enfermedad actúan como reservorios para diseminar la infección a zonas sanas (Riviere y cols 1996).

No hay evidencia de que las bacterias periodontales puedan ser transmitidas a través de aerosoles, pero sí parece probable que la **saliva** y el **contacto mucoso directo** sean vías de transmisión. Los objetos inertes (instrumentos odontológicos, cepillos dentales) también pueden servir como vehículo de transmisión (Christersson y cols 1985, Glass y Lare 1986). Christersson y cols 1985 demostraron que las sondas periodontales podían distribuir patógenos desde localizaciones enfermas a sanas en pacientes con PJI. Glass y Lare 1986.

#### **4. COMPARACIÓN DE HALLAZGOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN ENFERMOS PERIODONTALES Y SUS CÓNYUGES.**

Al comparar los recuentos bacterianos en los diferentes medios de cultivo empleados en los **pacientes y las parejas antes** del tratamiento periodontal, se observaron recuentos bacterianos totales superiores en los pacientes al compararlos con las parejas, siendo estas diferencias significativas en el recuento de anaerobios pigmentados. Esto puede ser debido a que la mayoría de las parejas estaban sanas (el 62,5% no padecían periodontitis

crónica). El **seguimiento evolutivo** de los recuentos de anaerobios totales y pigmentados a lo largo del tiempo (antes del tratamiento y 6 meses después) demostró un descenso significativo de los recuentos, tanto en los pacientes como en las parejas, transcurridos 6 meses del tratamiento periodontal.

Al agrupar los pacientes y las parejas según su estado periodontal **en la evaluación inicial (enfermos y sanos)**, se pudo comprobar que los individuos enfermos mostraban valores superiores de recuentos bacterianos en todos los medios de cultivo empleados, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para los anaerobios totales y pigmentados. **Transcurridos 6 meses del tratamiento periodontal se observa que se equiparan los valores de los recuentos bacterianos de los sujetos enfermos a los valores de los individuos sanos.**

**Cabe resaltar que en el seguimiento evolutivo de las parejas sanas,** entre la evaluación inicial y 6 meses tras el tratamiento del enfermo, se demostró que había diferencias muy significativas en los recuentos bacterianos, y casi significativas en el recuento de anaerobios totales, que se reducía por el tratamiento en los enfermos.

Por otro lado, el estudio microbiológico mediante PCR cuantitativa en los **pacientes y las parejas en el examen inicial** mostró recuentos de *Pg* y *Aa* superiores en los pacientes. Al agrupar a estos y a las parejas en sujetos **sanos y enfermos** la media del recuento por PCR de *Pg* fue muy superior en sujetos enfermos (diferencia muy significativa), sin embargo el recuento de *Aa* fue similar en ambos grupos. En la evaluación a los **6 meses** del tratamiento se observó que la media de recuento por *Pg* fue inferior en los pacientes al compararla con la de las parejas. También en esta ocasión, el recuento de *Aa* fue similar en ambos grupos. Al comparar los sujetos sanos y los enfermos 6 meses después del tratamiento se pudo comprobar que los valores de los recuentos por PCR de *Pg* y de *Aa* eran similares en sanos y enfermos.

Estos hallazgos microbiológicos concuerdan con la **respuesta clínica al tratamiento** de los pacientes periodontales, en los que se pudo apreciar una



disminución progresiva del porcentaje de localizaciones con profundidad de sondaje de 4-5 mm y  $\geq 6$ mm, un descenso de las localizaciones con pérdida de inserción clínica moderada y avanzada, así como de los índices de sangrado al sondaje y placa bacteriana.

Numerosos trabajos indican que ***Aa* y *Pg* pueden ser encontradas en sujetos sin destrucción periodontal manifiesta** (Petit y cols 1993a,b, Van Steenberg 1993, Van Winkelhoff 2002). Estas especies probablemente pueden persistir en equilibrio con el huésped y la microflora residente durante años, sin embargo, no está claro qué factores microbiológicos o del huésped determinan el inicio de la destrucción periodontal a partir de la infección por estos patógenos.

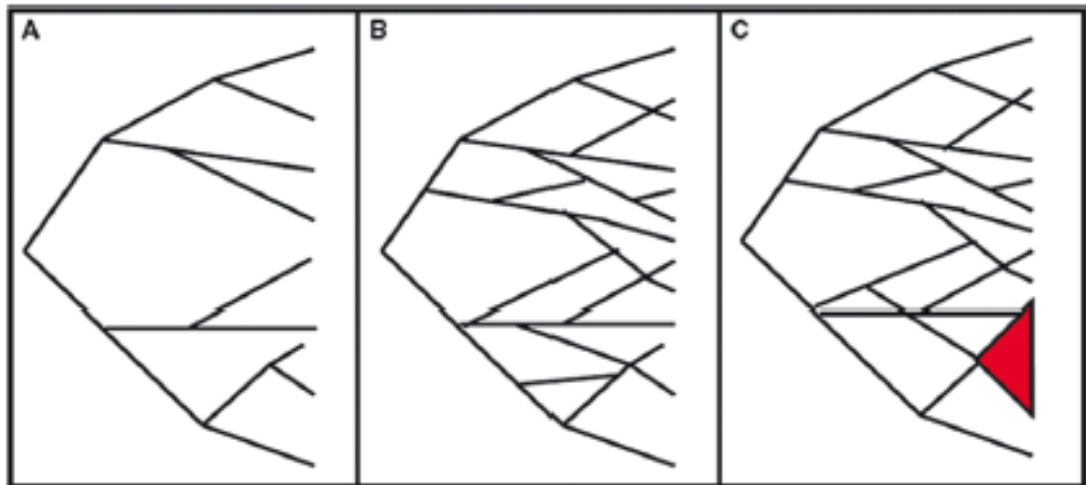
El hecho de que se sigan detectando recuentos de *Pg* tanto en las parejas como en los pacientes tras el tratamiento también puede deberse al tipo de clones que están colonizando a estos individuos y a la variable patogenicidad de cada uno de los clones. Desde 2006, se dispone de un sistema de clasificación de clones mediante Multi Locus Type Sequence (MLST) para *Pg*. Este esquema, vigente hoy en día, fue definido por el grupo de Enersen y col. en la Universidad de Oslo (Enersen y cols 2006). El esquema propuesto por Enersen reducía el número de genes conservados a analizar de 10 que proponía Koehler y cols (Koehler y cols 2003) a 8 debido a que dos de los genes que se incluyen en el esquema de Koehler creaban problemas de amplificación (*EFE-Tu* y *dnak*). Finalmente el esquema que ha prevalecido es el siguiente: *ftsQ*, *hagB*, *gdpxJ*, *pepO*, *mcmA*, *recA*, and *pga*. Al estudiar 40 aislados de diferente origen y obtenidos tanto de seres humanos como de animales, se constató que las especies de animales correspondían a otra especie (*P. gulae*) y que *Pg* coloniza exclusivamente al hombre.

Utilizando el método MLST para estudiar la distribución de la población de *Pg*, se observó que la población bacteriana de esta especie en parte tiene una estructura panmítica, con alto nivel de recombinación, y en parte clonal (Enersen y cols 2006, Enersen 2011). Los tres tipos de poblaciones se muestran en la figura 1. Por el momento hay descritos hasta 183

secuenciotipos (STs) en la base de *Pg*. Los dendogramas realizados con estos STs muestran agrupamientos o clusters entre aislados detectados en áreas geográficas muy distantes y en diferentes periodos temporales, demostrando con esto la existencia de una parte de la población con un comportamiento clonal. Cuando se han analizado factores de patogenicidad como la fimbria mayor o FimA, responsable de la adhesión y activación de la endocitosis en el interior de las células endoteliales humanas, se ha distinguido 6 secuencias distintas (I-VI) (Fujiwara y cols 1993). En los casos con periodontitis crónica, los aislados más frecuentes son aquellos con fimA del tipo II, IV y Ib. En cambio, en los pacientes sanos periodontalmente predominan los del tipo I, III y V (Amano 2003). Algunos clones se encuentran más asociados a enfermedad, determinados por la secuencia de fimA y por la agrupación de secuenciotipos. Esto demuestra la existencia de clones virulentos que no se encuentran en pacientes sanos.

Dentro del mismo individuo se han encontrado varios clones, aunque no suele ser un fenómeno muy frecuente y parece está circunscrito a pacientes con periodontitis crónica. En un estudio llevado a cabo en 15 pacientes con periodontitis crónica, se detectaron entre 1 y 8 secuenciotipos diferentes por bolsa (Enersen y cols 2008). Esto puede ser debido al intercambio genético dentro de la misma bolsa a lo largo del tiempo, considerandose más una “deriva genética” que una colonización múltiple. Esta deriva iría conducida tanto por el estrés de supervivencia en las bolsas como por el estrés producido por el sistema inmunitario del huésped.

**Figura 1.** Modificada de Enersen M. (47).



A=clonal; B=panmítica; C=panmítica con diseminación clonal

Hay estudios que sugieren que la **cohabitación** con una persona con periodontitis puede **influenciar el estado periodontal** de la pareja (Petit y cols 1994, Von Troil-Linden y cols 1995). Aunque no se pueden descartar factores causales ambientales comunes, los resultados de varios estudios sugieren que la transmisión de microorganismos virulentos es un factor importante (Tuite-McDonnell y cols 1997; Asano y cols 2003) sin embargo, son necesarios más estudios para probar esta hipótesis.

Petit y cols (1994) investigaron la prevalencia de microorganismos periodontopatógenos y la destrucción periodontal en las parejas y los hijos de pacientes adultos con periodontitis, en un grupo de 24 familias, con 49 niños. Por debajo de los 5 años, ninguno de los niños tenía CAL, mientras que entre los 5-15 años, el 26,5% mostraban 1-5 sitios con 1-3 mm de CAL. Un total de 16 parejas presentaban una forma leve a moderada de periodontitis, con al menos un sitio con 1 a 4 mm de CAL, y 5 parejas evidenciaban destrucción periodontal severa con sitios que poseían al menos 8 mm de CAL. En 18 de 24 pacientes los resultados confirmaron *Pg*. Este microorganismo se encontró en un niño de 5 años, y en 11 de las parejas. Por otra parte, *Aa* se detectó en 13 pacientes, 5 niños y 5 de las parejas. Si un niño albergaba uno de los

periodontopatógenos, al menos uno de los padres era también positivo para esa bacteria.

Von Troil-Linden y cols (1995), llevaron a cabo un examen clínico, radiológico y microbiológico de las condiciones periodontales en dos grupos de parejas casadas para valorar similitudes entre marido y mujer. Los sujetos enfermos (n=10) tenían una periodontitis avanzada, y los sanos (n=10) presentaban un estado periodontal normal. Las muestras fueron cultivadas para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* and *Peptostreptococcus micros*. La media de frecuencia de detección de bolsas moderadamente profundas (4-5 mm) y profundas ( $\geq 6$  mm) fue significativamente mayor en las parejas de los sujetos enfermos que en las parejas de los sanos. Se hallaron bolsas profundas en seis parejas de los individuos enfermos, y sólo en dos parejas de los sujetos sanos. Los enfermos y sus cónyuges poseían *Aa*, *Pg*, *P. intermedia*, *C. rectus* and *P. micros* en 4, 6, 9, 9 y 4 parejas respectivamente. Los sanos y sus parejas tenían estos patógenos en 0, 1, 9, 5 y 3 parejas, respectivamente. *Pg* se encontró en 7 parejas de los individuos enfermos, y sólo en 2 de los sujetos sanos.

Tuite-McDonnell y cols (1997) en un estudio sobre transmisión de *Pg* en 104 familias, empleando una técnica de detección por PCR, demostraron que el contacto con un miembro familiar infectado incrementa sustancialmente el riesgo relativo de colonización de los cónyuges (4), de los niños y sus padres (3), los niños y sus madres (4.7), adultos y sus madres (2.4), y hermanos (2.4). Los cónyuges de individuos infectados tenían casi cuatro veces más probabilidad de ser colonizados que los cónyuges de sujetos no colonizados. Esto sugiere la posibilidad de transmisión entre parejas. Sin embargo, no observaron ninguna relación entre la transmisión y el tiempo de casados, lo que indica que la transmisión probablemente ocurre en los primeros años de matrimonio.

Asano y cols (2003) demostraron que el gen que codifica las fimbrias de las cepas de *Pg* pertenece al tipo II, más eficaz en la unión a células epiteliales, en

5 de seis parejas cuyos patrones de PFGE eran idénticos. Esto sugiere que sólo aquellos clones con determinados factores de virulencia tienen capacidad de colonización y transmisión entre individuos con una relación estrecha.

Aunque se ha demostrado la **transmisión intrafamiliar** (Petit y cols 1994, Von Troil-Linden y cols 1995; Asikainen y cols 1996), parece probable que también se produzca **entre individuos no relacionados**, hasta por un contacto casual. Asikainen y cols (1996) estudiaron la frecuencia de transmisión entre parejas casadas, y de padres a hijos de *Aa* (47 familias) y *Pg* (31 familias) comparando mediante AP-PCR. La transmisión entre las parejas de *Aa* se produjo en el 36% de las mismas y de *Pg* en el 20%. La transmisión de padres a hijos de *Aa* tuvo lugar en el 32% de las familias. *Pg* no se transmitió de padres a hijos en ninguna de las familias estudiadas.

Por otra parte, cabe destacar que ya a principios de 1900 algunos autores sugirieron que los brotes severos de GUNA después de la primera guerra mundial se debieron a la transmisión de bacterias virulentas, lo que respalda la idea de que los patógenos periodontales pueden transmitirse con facilidad de una persona a otra, especialmente cuando se trata de clones muy virulentos de *Aa* y *Pg*. Así, parece probable que **nuevas especies o diferentes cepas** de la misma especie pueden ser adquiridas con relativa frecuencia por un individuo en diferentes etapas de su vida. La posibilidad de que halla una **recidiva** o una **nueva infección** podría repercutir en el enfoque terapéutico (Von Troil-Lindén y cols 1996).

Existen varios aspectos en el desarrollo de este trabajo que deberían ser el inicio de estudios posteriores. El número de parejas captadas, con las características de cohabitación que requeríamos para este estudio, es limitado. Por este motivo, teniendo en cuenta que la prevalencia de infección por *Aa* es muy baja en nuestro país en individuos de esta edad, no hemos podido analizar el efecto de transmisión ni del tratamiento sobre pacientes con *Aa*. Sería necesario aumentar el número de parejas estudiadas o seleccionarlas previamente en función de la detección previa de *Aa*. Por otra parte, existen pocos trabajos que analicen de forma cuantitativa el efecto del tratamiento

periodontal entre parejas y que además comparen mediante tipado molecular la existencia de la misma cepa en ambos miembros de la pareja. Otra línea que debería ser explorada es el impacto de la presencia de clones clasificados como virulentos y la evolución que presentan a lo largo del tratamiento y la repercusión que tiene sobre la pareja. Todos estos aspectos permitirían mejorar el diseño de los tratamientos periodontales.

De los datos obtenidos en esta Tesis se desprende que, dado que la terapéutica periodontal reduce las cifras de periodontopatógenos en los sujetos enfermos, y que en las parejas sanas estas cifras también se reducen de manera correlativa, **en la práctica clínica el tratamiento de los pacientes ayudaría a prevenir el desarrollo de periodontitis en los cónyuges sanos.** Así mismo, **al tratar a un paciente con periodontitis crónica será necesaria la revisión odontológica del cónyuge,** y su tratamiento cuando proceda.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en saliva demuestran que este tipo de muestra, mucho menos invasiva y fácil de obtener, es válida para la monitorización mediante técnicas moleculares.
2. Existe una buena correlación del recuento de anaerobios pigmentados y del recuento específico de *Pg* con la mejoría obtenida durante el tratamiento.
3. Podemos determinar un nivel de recuento de periodontopatógenos, tanto por cultivo como por PCR, indicador de enfermedad o de salud periodontal. Esto puede servir como herramienta adicional para la monitorización del tratamiento.
4. Los recuentos de *Pg* en saliva indican la colonización homogénea general de la boca y la posibilidad de transmisión a través del contacto con saliva.
5. La terapéutica periodontal reduce las cifras de periodontopatógenos en los sujetos enfermos con mejoría de los parámetros clínicos, y globalmente se reducen las tasas bacterianas en sus parejas, tanto por PCR cuantitativa como en los cultivos microbiológicos.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aduse-Opoku J, Slaney JM, Hashim A, Gallagher A, Gallagher RP, Rangarajan M, et al. Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2006; 74: 449-60.
2. Alaluusua S, Saarela M, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Ribotyping shows intrafamilial similarity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. *Oral Microbiol Immunol*. 1993, 8: 225-9.
3. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol*. 1999, 70: 13-29.
4. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2002, 29: 177-206.
5. Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 509-13.
6. Amano A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2003, 74: 90-6.
7. Andriankaja OM, Genco RJ, Dorn J, Dmochowski J, Hovey K, Falkner KL, Scannapieco F, Trevisan M. The use of different measurements and definitions of periodontal disease in the study of the association between periodontal disease and risk of myocardial infarction. *J Periodontol*. 2006, 77: 1067-73.
8. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999, 4: 1-6.
9. Asano H, Ishihara K, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Relationship between transmission of *Porphyromonas gingivalis* and fimA type in spouses. *J Periodontol*. 2003, 74: 1355-60.
10. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of



- gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1996, 11: 266-73.
11. Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *J Periodontol*. 1991, 62: 203-6.
  12. Asikainen S, Chen C, Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1996, 11: 387-94.
  13. Baehni P, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Taichman NS. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun*. 1979, 24: 233-43.
  14. Baelum V, Fejerskov O, Karring T. Oral hygiene, gingivitis and periodontal breakdown in adult Tanzanians. *J Periodontal Res* 1986, 21: 221-32.
  15. Baelum V, Manji F, Fejerskov O, Wanzala P. Validity of CPITN's assumptions of hierarchical occurrence of periodontal conditions in a Kenyan population aged 15-65 years. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1993, 21: 347-53.
  16. Bantel H, Beikler T, Flemmig Tf, Schulze-Osthoff K. Caspase activation is involved in chronic periodontitis. *FEBS Lett* 2005; 579: 5559-64.
  17. Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*. 2005, 76: 2089-100.
  18. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis. *Pathol Biolog* 2007; 55: 154-62.
  19. Borrell LN, Buró BA, Neighbors HW, Taylor GW. Social factors and periodontitis in an older population. *Am J Public Health* 2004, 94: 748-54.
  20. Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005, 32: 132-58.
  21. Boughman JA, Astemborski JA, Suzuki JB. Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol* 1992, 19: 233-9.

22. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. J Clin Microbiol. 2003, 41: 4950-4.
23. Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. Infect Immun. 1994, 62: 501-8.
24. Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, van Winkelhoff AJ, Crielaard W. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. BMC Microbiol 2010; 10: 5.
25. Bullón P, Ríos JV, Machuca G, Martínez-Sahuquillo A, Velasco E. Susceptibilidad y actividad periodontal: conceptos actuales. Periodoncia 1993, 3: 78-88.
26. Burt BA, Eklund SA. The distribution of oral diseases and conditions. En: Dentistry, dental practice, and the community. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1999: 237-58.
27. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. J Clin Periodontol 2000, 27: 897–903.
28. Christersson LA, Slots J, Zambon JJ, Genco RJ. Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. J Periodontol. 1985, 56: 127-31.
29. Christensen LB, Petersen PE, Krustup U, Kjoller M. Self-reported oral hygiene practices among adults in Denmark. Community Dent Health 2003, 20: 229-35.
30. Contreras A, Mardirossian A, Slots J. Herpesviruses in HIV-periodontitis. J Clin Periodontol. 2001, 28: 96-102.
31. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. J Periodontal Res. 2000, 35: 3-16.

32. Contreras A, Slots J. Mammalian viruses in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1996, 11: 381-6.
33. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, Seymour GJ. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol*. 2001, 28: 1137-44.
34. Dahlen G, Rosling B. Identification of bacterial markers by culture technique in evaluation of periodontal therapy. *Int Dent J*. 1998, 48: 104-10.
35. Danser MM, van Winkelhoff AJ, de Graaff J, van der Velden U. Putative periodontal pathogens colonizing oral mucous membranes in denture-wearing subjects with a past history of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1995, 22: 854-9.
36. Dasanayake AP, Boyd D, Madianos PN, Offenbacher S, Hills E. The association between *Porphyromonas gingivalis*-specific maternal serum IgG and low birth weight. *J Periodontol*. 2001, 72: 1491-7.
37. DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ*. 1993, 306: 688-91.
38. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology* 2002; 148: 467-72.
39. Dibart S, Skobe Z, Snapp KR, Socransky SS, Smith CM, Kent R. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol*. 1998, 13: 30-5.
40. DiRienzo JM, McKay TL. Identification and characterization of genetic cluster groups of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the human oral cavity. *J Clin Microbiol*. 1994, 32: 75-81.
41. DiRienzo JM, Slots J. Genetic approach to the study of epidemiology and pathogenesis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol*. 1990, 35: 79-84.
42. Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994, 5: 112-41.

43. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial nucleic acid based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2002, 29: 638–44.
44. Eley BM, Cox SW. Correlation between gingivain/gingipain and bacterial dipeptidyl peptidase activity in gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss in chronic periodontitis patients. A 2-year longitudinal study. *J Periodontol* 1996; 67: 703-16.
45. Elliot DR, Wilson M, Buckley CM, Spratt DA. Aggregative behaviour of bacteria isolated from canine dental plaque. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 5211-17.
46. Enersen M, Olsen I, van Winkelhoff AJ, Caugant DA. Multilocus sequence typing of strains from different geographic origins. *J Clin Microbiol.* 2006, 44:35-41.
47. Enersen M, Olsen I, Caugant DA. Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* isolates from single ‘refractory’ periodontitis sites. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74: 5817-21.
48. Enersen M. *Porphyromonas gingivalis*: a clonal pathogen?: Diversities in housekeeping genes and the major fimbriae gene. 1. *J Oral Microbiol.* 2011, 3.
49. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000. 1999, 20: 136-67.
50. Flemming T.F. Periodontitis. *Annal of Periodontology* 1999, 4: 32-8.
51. Frandsen EV, Poulsen K, Curtis MA, Killian M. Evidence of recombination in *Porphyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. *Infect Immun* 2001, 69: 4479-85.
52. Fujiwara T, Morishima S, Takahashi I, Hamada S. Molecular cloning and sequencing of the fimbrillin gene of *Porphyromonas gingivalis* strains and characterization of recombinant proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 197: 241-7.
53. Gelskey SC. Cigarette smoking and periodontitis: methodology to assess the strength of evidence in support of a causal association. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999, 27: 16-24.

54. Genco RJ, Zambon JJ, Christersson LA. Use and interpretation of microbiological assays in periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 1986, 1: 73-81.
55. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996, 67:1041-9.
56. Genco R, Kornman K. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996, 1: 926-32.
57. Glass RT, Lare MM. Toothbrush contamination: a potential health risk? *Quintessence Int.* 1986, 17: 39-42.
58. González 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 Odontoestomatología preventiva y comunitaria* 1989, 1: 25-31.
59. Greenstein G. Contemporary interpretation of probing depth assessments: diagnostic and therapeutic implications. A literature review. *J Periodontol.* 1997, 68: 1194-205.
60. Greenstein G, Lamster I. Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. *J Periodontol.* 1997, 68: 421-31.
61. Griffen AL, Lyons SR, Becker MR, Moeschberger ML, Leys EJ. *Porphyromonas gingivalis* strain variability and periodontitis. *J Clin Microbiol.* 1999, 37: 4028-33.
62. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol.* 1998, 36: 3239-42.
63. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995, 66: 23-9.
64. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol.* 1998, 3: 51-61.
65. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994, 65: 260-7.

66. Gunsolley JC, Ranney RR, Zambon JJ, Burmeister JA, Schenkein HA. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families afflicted with periodontitis. J Periodontol. 1990, 61: 643-8.
67. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. J Periodontol. 1993, 64: 16-23.
68. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. J Clin Periodontol 2004, 31: 996–1002.
69. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994, 5: 78-111.
70. Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, Narayanan D, Davies R, Seymour G. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. J Dent Res. 2004, 83: 232-5.
71. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. J Periodontol. 2000, 71: 1554-60.
72. Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, Zambon JJ. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. J Periodontol. 2000, 71: 912-22.
73. Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological role in periodontal disease. Infect Immun 2004; 72: 1318-25.
74. Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol. 2002, 29: 657-60.
75. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Dent Res. 2001, 80: 1580-3.

76. Haubek D, Ennibi OK, Vaeth M, Poulsen S, Poulsen K. Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Dent Res 2009; 88: 856-60.
77. Haubek D, Poulsen K, Westergaard J, Dahlen G, Kilian M. Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. J Clin Microbiol. 1996, 34: 1576-8.
78. Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Med Microbiol. 2002, 51: 1013-20.
79. Hobdell MH. Economic globalization and oral health. Oral Dis. 2001, 7: 137-43.
80. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. J Clin Periodontol. 2001, 28: 430-6.
81. Hofer D, Hammerle CH, Grassi M, Lang NP. Long-term results of supportive periodontal therapy (SPT) in HIV-seropositive and HIV-seronegative patients. J Clin Periodontol. 2002, 29: 630-7.
82. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000. 1999, 20: 168-238.
83. Horning GM, Hatch CL, Lutskus J. The prevalence of periodontitis in a military treatment population. J Am Dent Assoc 1990, 121: 616-22.
84. Houalet-Jeanne S, Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, Apiou J, Bonnaure-Mallet M. Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy. Infect Immun 2001; 69: 7146-51.
85. Jenkins WMM, Papapanou PN. Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents. Periodontol 2000. 2001, 26: 16-32.
86. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. J Periodontol. 1993, 64: 243-53.
87. Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. J Clin Periodontol. 2001, 28: 879-85.
88. Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N, Fine DH. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. J Bacteriol 2003; 185: 4693-8.

89. Karjalainen J, Kanervo A, Vaisanen ML, Forsblom B, Sarkiala E, Jousimies-Somer H. *Porphyromonas*-like gram-negative rods in naturally occurring periodontitis in dogs. FEMS Immunol Med Microbiol. 1993, 6: 207-12.
90. Kato T, Kawai S, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Nakagawa I, et al. Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. Cell Microbiol 2007; 9:753-65.
91. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. J Periodontal Res. 1995, 30: 332-41.
92. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med 2000, 11: 356-65.
93. Kinane DF, Lindhe J. Periodontitis crónica. En: Lindhe J, Karring T, Lang NP: Periodontología clínica e implantología odontológica. 4ª Ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 2005: 220-7.
94. Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Interacciones entre el huésped y el parásito en la enfermedad periodontal. En: Lindhe J, Karring T, Lang NP: Periodontología clínica e implantología odontológica. 4ª Ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 2005: 157-87.
95. Koehler A, Karch H, Beikler T, Flemming TF, Suerbaum S, Schmidt H. Multilocus sequence analysis of *Porphyromonas gingivalis* indicates frequent recombination. Microbiology 2003; 149: 2407-15.
96. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2002, 66: 486-505.
97. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. Periodontol 2000. 1997, 14: 33-53.
98. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol. 1997, 24: 72-7.



99. Lalla E, Park DB, Papapanou PN, Lamster IB. Oral disease burden in Northern Manhattan patients with diabetes mellitus. *Am J Public Health.* 2004, 94: 755-8.
100. Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* 1999; 7: 356-61.
101. Lamster IB, Grbic JT, Bucklan RS, Mitchell-Lewis D, Reynolds HS, Zambon JJ. Epidemiology and diagnosis of HIV-associated periodontal diseases. *Oral Dis.* 1997, 3: 141-8.
102. Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *J Clin periodontol.* 1986, 13: 590-6.
103. Lang NP, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page R, Papapanou P, Tonnetti M, Van Dyke T. International Classification Workshop. Consensus report: Aggressive periodontitis. *Annals of periodontology* 1999, 4, 53.
104. Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol.* 1990, 17: 714-21.
105. Leys EJ, Smith JH, Lyons SR, Griffen AL. Identification of *Porphyromonas gingivalis* strains by heteroduplex analysis and detection of multiple strains. *J Clin Microbiol.* 1999, 37: 3906-11.
106. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000, 13: 547-58.
107. Liébana Ureña J. Medios de cultivo bacterianos. En: *Microbiología oral.* 2ª Ed. Madrid, McGraw-Hill, 2002: 83-9.
108. Ling LJ, Ho CC, Wu CY, Chen YT, Hung SL. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol.* 2004, 75: 1479-85.
109. Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol.* 1976, 47: 1-18.
110. Listgarten MA, Lai CH, Evian CI. Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic

- periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol.* 1981, 8: 155-64.
111. Listgarten MA, Mayo HE, Tremblay R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol.* 1975, 46: 10-26.
112. Listgarten MA, Wong MY, Lai CH. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population. *J Periodontol.* 1995, 66: 158-64.
113. Loe H, Brown LJ. Early onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol* 1991, 62: 608-16.
114. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965, 36: 177-87.
115. Loe H, Theilade E, Jensen SB, Schiott CR. Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontal Res.* 1967, 2: 282-9.
116. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res.* 1979, 58: 2404-12.
117. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev* 2001, 14: 727-52.
118. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol.* 1992, 30: 427-33.
119. Lopez NJ, Smith PC, Gutierrez J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *J Dent Res.* 2002, 81: 58-63.
120. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol.* 2000, 38: 2362-5.

121. Macdonald JB, Sutton RM, Knoll ML, Madlener EM, Grainger RM. The pathogenic components of an experimental fusospirochetal infection. *J Infect Dis* 1956, 98:15-20.
122. Machtei EE, Christersson LA, Grossi SG, Dunford R, Zambon JJ, Genco RJ. Clinical criteria for the definition of "established periodontitis". *J Periodontol* 1992, 63: 206-14.
123. Machuca G, Rosales M, Lacalle JR, Machuca C, Bullón P. Effect of cigarette smoking on periodontal health status of healthy young adults. *J Periodontol* 2000, 71: 73-8.
124. Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun.* 1997, 65: 3983-90.
125. Marin C, Segura-Egea JJ, Martínez-Sahuquillo A, Bullón P. Correlation between infant birth weight and mother's periodontal status. *J Clin Periodontol* 2005, 32: 299-304.
126. Marshall KC. Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *American Society of Microbiology news.* 1992, 58: 202-7.
127. McCaul LK, Jenkins WM, Kay EJ. The reasons for the extraction of various tooth types in Scotland: a 15-year follow up. *J Dent* 2001, 29: 401-7.
128. McKaig RG, Thomas JC, Patton LL, Strauss RP, Slade GD, Beck JD. Prevalence of HIV-associated periodontitis and chronic periodontitis in a southeastern US study group. *J Public Health Dent.* 1998, 58: 294-300.
129. Melvin WL, Sandifer JB, Gray JL. The prevalence and sex ratio of juvenile periodontitis in a young racially mixed population. *J Periodontol* 1991, 62: 330-34.
130. Menard C, Mouton C. Clonal diversity of the taxon *Porphyromonas gingivalis* assessed by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Infect Immun.* 1995, 63: 2522-31.
131. Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 2000, 71: 981-8.

132. Miyazaki H, Pilot T, Leclercq MH, Barmes DE. Profiles of periodontal conditions in adolescents measured by CPITN. *Int Dent J* 1991, 41: 67-73.
133. Miyazaki H, Pilot T, Leclercq MH, Barmes DE. Profiles of periodontal conditions in adults measured by CPITN. *Int Dent J* 1991, 41: 74-80.
134. Möller ÁJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 1966, 74: 1-380.
135. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Martin C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. 2004, 31: 1054-60.
136. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2003, 38:518-24.
137. Muller HP, Lange DE, Muller RF. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* contamination of toothbrushes from patients harbouring the organism. *J Clin Periodontol*. 1989, 16: 388-90.
138. Muller-Glauser W, Schroeder HE. The pocket epithelium: a light- and electronmicroscopic study. *J Periodontol*. 1982, 53: 133-44.
139. Mumghamba EG, Markkanen HA, Honkala E. Risk factors for periodontal diseases in Ilala, Tanzania. *J Clin Periodontol*. 1995, 22: 347-54.
140. Murray R, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical microbiology*. 7<sup>a</sup> Ed. ASM Press, 1999: 1687-707.
141. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-

- dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006, 56: 2135-46.
142. O'Brien-Simpson NM, Black CL, Bhogal PS, Cleal SM, Slakeski N, Higgins TJ, Reynolds EC. Serum immunoglobulin G (IgG) and IgG subclass responses to the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complex of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *Infect Immun.* 2000, 68: 2704-12.
143. Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky SS, Beck JD. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol.* 1998, 3: 233-50.
144. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000.* 1997, 14: 9-11.
145. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel, Karger, 1982.
146. Papapanou PN, Lindhe J, Sterrett JD, Eneroth L. Considerations on the contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. *J Clin Periodontol.* 1991, 18: 611-5.
147. Papapanou PN, Lindhe J. Epidemiología de las enfermedades periodontales. En: Lindhe J, Karring T, Lang NP: *Periodontología clínica e implantología odontológica.* 4ª Ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 2005: 51-84.
148. Papapanou PN, Madianos PN, Dahlen G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci.* 1997, 105: 389-96.
149. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996, 1: 1-36.
150. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* 2006, 42: 80-7.
151. Petit MD, Van Steenberghe TJ, De Graaff J, Van der Velden U. Transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families of adult periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 1993a, 28: 335-45.

152. Petit MD, van Steenberg TJ, Scholte LM, van der Velden U, de Graaff J. Epidemiology and transmission of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycescomitans* among children and their family members. A report of 4 surveys. J Clin Periodontol. 1993b, 20: 641-50.
153. Petit MD, van Steenberg TJ, Timmerman MF, de Graaff J, van der Velden U. Prevalence of periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitis patients. J Clin Periodontol. 1994, 21: 76-85.
154. Pickett CL, Whitehouse CA. The cytolethal distending toxin family. Trends Microbiol 1999; 7: 292-97.
155. Planet PJ, Kachlany SC, Fine DH, DeSalle R, Figurski DH. The Widespread Colonization Island of *Actinobacillus actinomycescomitans*. Nat Genet 2003; 34: 193-8.
156. Preus HR, Olsen I. Possible transmittance of *A. actinomycescomitans* from a dog to a child with rapidly destructive periodontitis. J Periodontal Res. 1988, 23:68-71.
157. Preus HR, Zambon JJ, Dunford RG, Genco RJ. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycescomitans* in families with established adult periodontitis. J Periodontol. 1994, 65: 2-7.
158. Quirynen M, de Soete M, Pauwels M, Goossens K, Teughels W, van Eldere J, van Steenberghe D. Bacterial survival rate on tooth- and interdental brushes in relation to the use of toothpaste. J Clin Periodontol. 2001, 28: 1106-14.
159. Rams TE, Andriolo M Jr, Feik D, Abel SN, McGivern TM, Slots J. Microbiological study of HIV-related periodontitis. J Periodontol. 1991, 62: 74-81.
160. Reich E, Hiller KA. Reasons for tooth extraction in the western states of Germany. Community Dent Oral Epidemiol 1993, 21: 379-83.
161. Renvert S, Dahlen G, Wikstrom M. Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. Relation between microbiological and clinical parameters during 5 years. J Periodontol. 1996, 67: 562-71.

162. Renvert S, Pettersson T, Ohlsson O, Persson GR. Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome. *J Periodontol.* 2006, 77: 1110-9.
163. Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Periodontal Res.* 1996, 31: 496-501.
164. Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA, Adams DF. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J Periodontol.* 1996, 67:109-15.
165. Robinson PG, Sheiham A, Challacombe SJ, Zakrzewska JM. The periodontal health of homosexual men with HIV infection: a controlled study. *Oral Dis.* 1996, 2: 45-52.
166. Rodrigues DC, Taba MJ, Novaes AB, Souza SL, Grisi MF. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2003, 74:1361-7.
167. Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AE, Davies G, Henry PJ, Price P. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? *J Periodontal Res.* 2002, 37: 37-41.
168. Romero BC, Chiquito CS, Elejalde LE, Bernardoni CB. Relationship between periodontal disease in pregnant women and the nutritional condition of their newborns. *J Periodontol.* 2002, 73: 1177-83.
169. Rosenberg ES, Torosian JP, Hammond BF, Cutler SA. Routine anaerobic bacterial culture and systemic antibiotic usage in the treatment of adult periodontitis: a 6-year longitudinal study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993, 13: 213-43.
170. Rumpf RW, Griffen AL, Leys EJ. Phylogeny of *Porphyromonas gingivalis* by ribosomal intergenic spacer region analysis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1807-10.
171. Saarela M, von Troil-Linden B, Torkko H, Stucki AM, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol Immunol.* 1993, 8: 349-54.

172. Sabet M, Lee SW, Naumann RK, Sims T, Um HS. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiol* 2003; 149: 3617-27.
173. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002, 52: 841-9.
174. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997, 14: 173-201.
175. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papananou PN. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*, 2000, 79: 1808-14.
176. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004, 31: 1034–47.
177. Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, DelleMijn-Kippuw N, Simon R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci*. 2000, 108: 383-92.
178. Saxén L, Prevalence of juvenile periodontitis in Finland. *J Clin Periodontol* 1980, 7: 177-186.
179. Schenkein HA. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontol* 2000 2002, 30: 79-90.
180. Scherp HW. Current concepts in periodontal disease research: Epidemiological contributions. *Journal of American Dental Association* 1964, 68: 667-675.
181. Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA. Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*. 2000, 39: 97-107.



182. Shenker BJ, McArthur WP, Tsai CC. Immune supresión induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. I. Effects on human peripheral blood lymphocyte responses to mitogens and antigens. J Immunol 1982; 128: 148-54.
183. Shlossman M, Pettitt D, Arevalo A, Genco RJ. Periodontal disease in children and young adults on the Gila River Indian Reservation. J Dent Res 1986, 65, special issue, abstract no. 1127.
184. Slots 1979. Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol. 1979, 6: 351-82.
185. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. Infect Immun. 1980, 29: 1013-20.
186. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000. 1999, 20: 82-121.
187. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Clin Microbiol 1982, 15: 606-9.
188. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. Scand J Dent Res 1976, 84:1-10.
189. Snyder B, Ryerson CC, Corona H, Grogan EA, Reynolds HS, Contestable PB, Boyer BP, Mayer J, Mangan T, Norkus N, Zambon JJ, Genco RJ. Analytical performance of an immunologic-based periodontal bacterial test for simultaneous detection and differentiation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia*. J Periodontol. 1996, 67: 497-505.
190. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998, 25: 134-44.
191. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. J Clin Periodontol. 1984, 11: 21-32.
192. Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol 2000*. 1999, 20: 341-62.
193. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002, 28:12-55.
194. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005, 38: 135-87.
195. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiología de la enfermedad periodontal. En: Lindhe J, Karring T, Lang NP: *Periodontología clínica e implantología odontológica*. 4ª Ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 2005: 110-56.
196. Socransky SS, Haffajee AD, Smith GL, Dzink JL. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1987, 14: 588-93.
197. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994, 17: 788-92.
198. Stephens RG, Kogon SL, Jarvis AM. A study of the reasons for tooth extraction in a Canadian population sample. *J Can Dent Assoc* 1991, 57: 501-4.
199. Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 2001, 28: 306-10.
200. Sweeney EA, Alcoforado GA, Nyman S, Slots J. Prevalence and microbiology of localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1987, 2: 65-70.
201. Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979, 6: 278-307.
202. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol*. 1998, 3: 30-9.
203. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol*. 2000, 71: 1492-8.

204. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986, 13: 905-11.
205. Theilade E, Theilade J. Formation and ecology of plaque at different locations in the mouth. *Scand J Dent Res.* 1985, 93: 90-5.
206. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res.* 1966, 1: 1-13.
207. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999, 4: 39-53.
208. Tran SD, Rudney JD, Sparks BS, Hodges JS. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J Periodontol.* 2001, 72: 1-10.
209. Tuite-McDonnell M, Griffen AL, Moeschberger ML, Dalton RE, Fuerst PA, Leys EJ. Concordance of *Porphyromonas gingivalis*. Colonization in families. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 455–61.
210. Valcarcel J, Allardet-Servent A, Bourg G, O'Callaghan D, Michalesco P, Ramuz M. Investigation of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genome by pulsed field gel electrophoresis. *Oral Microbiol Immunol.* 1997, 12: 33-9.
211. Van der Velden U, Abbas F, Armand S, de Graaff J, Timmerman MF, van der Weijden GA, van Winkelhoff AJ, Winkel EG. The effect of sibling relationship on the periodontal condition. *J Clin Periodontol.* 1993, 20: 683-90.
212. Van Steenberghe TJ, Petit MD, Scholte LH, van der Velden U, de Graaff J. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. *J Clin Periodontol.* 1993, 20: 340-5.
213. Van Winkelhoff AJ, Goene RJ, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2000, 11: 511-20.
214. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 2002, 29: 1023-8.

215. Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000*. 1996, 10: 45-78
216. Van Winkelhoff AJ, Schouten-van Meeteren AY, Baart JA, Vandenbroucke-Grauls CM. Microbiology of destructive periodontal disease in adolescent patients with congenital neutropenia. A report of 3 cases. *J Clin Periodontol*. 2000, 27: 793-8.
217. Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, Clement M, De Graaff J. Intra-oral distribution of black-pigmented *Bacteroides species* in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 1988, 3: 83-5.
218. Van Winkelhoff AJ, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000* 2005, 39: 40–52.
219. Van Winkelhoff AJ, Boutaga K. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J Clin Periodontol 2005b*, 32: 16–27.
220. Van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Slots J. Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *J Parodontol Implantol* 1994, 13: 439-50.
221. Von Troil-Linden B, Saarela M, Matto J, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Source of suspected periodontal pathogens re-emerging after periodontal treatment. *J Clin Periodontol*. 1996, 23: 601-7.
222. Von Troil-Linden B, Torkko H, Alaluusua S, Wolf J, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Periodontal findings in spouses. A clinical, radiographic and microbiological study. *J Clin Periodontol*. 1995, 22: 93-9.
223. Westergaard J, Frandsen A, Slots J. Ultrastructure of the subgingival microflora in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res*. 1978, 86: 421-9.
224. Wolf HF, Edith M, Rateitschak KH. Clasificación de las enfermedades periodontales. En: Atlas en color de odontología. Periodoncia. 3ª Ed. Barcelona, Masson, 2005a: 519-24.
225. Wolf HF, Edith M, Rateitschak KH. Diagnóstico microbiológico. Métodos de prueba. En: Atlas en color de odontología. Periodoncia. 3ª Ed. Barcelona, Masson, 2005c: 179-87.

226. Wolf HF, Edith M, Rateitschak KH. Periodontitis. En: Atlas en color de odontología. Periodoncia. 3ª Ed. Barcelona, Masson, 2005b: 95-118.
227. Wolff LF, Aeppli DM, Pihlstrom B, Anderson L, Stoltenberg J, Osborn J, Hardie N, Shelburne C, Fischer G. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. J Clin Periodontol. 1993, 20: 699-706.
228. Wyss C. Dependence of proliferation of *Bacteroides forsythus* on exogenous N-acetylmuramic acid. Infect Immun. 1989, 57: 1757-9.
229. Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. J Periodontol 2004, 75: 1077-83.
230. Yilmaz O, Valverde P, Lamont RJ, Ojcius DM. Intracellular spreading of Porphyromonas gingivalis infection in primary gingival epithelial cells. Infect Immun 2006; 74: 703-10.
231. Zambon JJ, Reynolds HS, Chen P, Genco RJ. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque. Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Bacteroides gingivalis*. J Periodontol. 1985, 56: 32-40.
232. Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. Infect Immun. 1983, 41: 19-27.
233. Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J Periodontol. 1983, 54: 707-11.