



TESIS DOCTORAL

Departamento de Estomatología

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**ESTUDIO LONGITUDINAL DE LA RELACIÓN ENTRE
PRESENCIA DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS Y
ESTADO DE SALUD PERIODONTAL**

Tesis doctoral presentada por:

MIRIAM PUIG SILLA

Dirigida por:

Dr. José Manuel Almerich Silla

Dr. José María Montiel Company

Valencia, 2015



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Prof. Dr. D. José Manuel Almerich Silla, profesor titular de universidad del Departament d'Estomatologia de la Universitat de València y Dr. José Maria Montiel Company, profesor ayudante doctor del Departament d'Estomatologia de la Universitat de València

CERTIFICAN

Que Dña. Miriam Puig Silla, odontóloga, ha efectuado bajo nuestra dirección la presente Tesis Doctoral, titulada

ESTUDIO LONGITUDINAL DE LA RELACIÓN ENTRE PRESENCIA DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS Y ESTADO DE SALUD PERIODONTAL

para optar al grado de Doctor

Para que así conste, firmamos la presente en Valencia, a catorce de abril de dos mil quince.

Dr. J. M. Almerich

Dr. J.M. Montiel

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero darle las gracias a mis directores de tesis. A José Manuel, del que he aprendido mucho, no sólo en el campo de la investigación, sino también a nivel docente y clínico, por la confianza que ha depositado en mí y por su apoyo. A José María, por su ayuda en el planteamiento del estudio y en el análisis estadístico y por su buen carácter.

También quiero agradecer a Paco Dasí el haberme acogido en su despacho y su paciencia para enseñarme cómo hacer PCRs. A José Enrique, por su ayuda y por ser un gran compañero de trabajo.

A todos los profesores de la Unidad de Odontología Preventiva y Comunitaria, que son muy buenos profesionales pero mejores personas, con los que se trabaja muy a gusto.

A todos los trabajadores de la Clínica Odontológica, en especial a aquellos que me facilitaron la organización de las exploraciones a los pacientes, por su buena predisposición. Siempre hacen todo lo posible por allanarme el camino.

Por último dar las gracias a mi familia. A mis padres que me han dado muchas cosas, entre ellas una educación, por enseñarme la importancia del esfuerzo y la constancia. A Jose M^a, mi marido, por animarme a terminar esta tesis, por compartir su vida conmigo y por formar junto con nuestros hijos una familia maravillosa.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	7
1. La enfermedad periodontal.....	9
1.1 Anatomía del periodonto sano.....	9
1.2 Etiopatogenia de la enfermedad periodontal.....	11
1.3 Clasificación de las enfermedades periodontales.....	13
1.4 Índices epidemiológicos periodontales.....	18
1.5 Prevalencia de la enfermedad periodontal.....	21
1.6 Tabaco y enfermedad periodontal.....	25
1.7 Repercusiones de la periodontitis en la salud general del paciente..	26
2. Bacterias periodontopatógenas.....	28
3. Gen <i>fimA</i> de <i>Porphyromonas gingivalis</i>.....	34
4. Técnicas de laboratorio empleadas en el diagnóstico de la enfermedad periodontal.....	45
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	47
5.1 Estructura del ADN.....	47
5.2 Métodos de amplificación. Reacción en cadena de la polimerasa.....	48
OBJETIVOS.....	53
MATERIAL Y MÉTODO.....	57
A. Primera fase del estudio.....	59
1. Selección de la muestra.....	59
2. Exploración clínica.....	60
3. Determinación de bacterias mediante PCR.....	61
B. Segunda fase del estudio.....	64
C. Análisis de los datos.....	66
C1. Variables del estudio.....	66
C2. Análisis estadístico.....	67
RESULTADOS.....	69
Primera fase del estudio.....	71
Segunda fase del estudio.....	79

DISCUSIÓN.....	87
1. Prevalencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> y sus genotipos <i>fimA</i>	89
2. Prevalencia de bacterias periodontopatógenas y del Complejo Rojo de Socransky.....	93
3. Relación entre el consumo de tabaco y la composición de placa subgingival.....	96
4. Estudios longitudinales y pérdida de muestra.....	97
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXOS.....	115
Anexo 1. Consentimiento informado.....	117
Anexo 2. Certificado del Comité de ética.....	119
Anexo 3. Ficha de exploración inicial.....	120
Anexo 4. Ficha de exploración final.....	121

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad caracterizada por la inflamación y destrucción de los tejidos que soportan el diente y que, en los estadios más avanzados, lleva a la pérdida de los dientes. Se trata de una enfermedad de gran prevalencia que afecta a individuos de todas las edades. En la última Encuesta de Salud Oral realizada en España en el año 2010 se observó que en el grupo de adultos jóvenes, de 35 a 44 años, el 53% presentaban cálculo, que implica una inflamación crónica de las encías. Además, el 11% presentaban ya bolsas periodontales y el 5% se encontraban en una fase avanzada de la enfermedad. En la cohorte de 65-74 años el cálculo estaba presente en el 56'5% de la población, la prevalencia de bolsas periodontales ascendía al 18'8%, y un 10'4% presentaba periodontitis avanzada (Llodra Calvo 2012).

Además, en los últimos años muchos estudios que relacionan la enfermedad periodontal con enfermedades sistémicas como patología cardiovascular, parto prematuro y neonatos de bajo peso al nacer y diabetes. Existe una falta de consenso por parte de los expertos y la mayoría de estos estudios no determinan la relación causa-efecto entre ambas pero sí se ha observado que el tratamiento de la enfermedad periodontal mejora parámetros inflamatorios a nivel sistémico y reduce la bacteriemia (Otomo-Corgel et al. 2012).

El diagnóstico de la enfermedad periodontal no se limita a la identificación de los signos clínicos, sino que se están desarrollando otras formas de diagnóstico que permitan una identificación lo más temprana posible del inicio y progresión de la enfermedad. El conocimiento detallado de la microbiología periodontal además de permitir el desarrollo de programas de prevención para pacientes de riesgo periodontal, nos permite conocer el pronóstico y monitorizar los resultados una vez realizado el tratamiento. Una de las técnicas más empleadas en el estudio de la microbiología periodontal es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la cavidad oral existe un gran

INTRODUCCIÓN

número de bacterias en condiciones normales, entre las cuales hay especies que residen en armonía sin causar daño al huésped o incluso son beneficiosas para él. Sin embargo, existen otras especies asociadas a la enfermedad periodontal y denominadas bacterias periodontopatógenas. Entre estas bacterias destacan *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Eikenella corrodens*. Se caracterizan por la habilidad para colonizar subgingivalmente, su capacidad invasiva, la síntesis de proteasas y endotoxinas y su capacidad para inducir una respuesta inmune en el huésped.

Porphyromonas gingivalis es una bacteria anaerobia gram-negativa que puede colonizar las superficies orales e invadir los tejidos periodontales activando la respuesta inmune del huésped. *P. gingivalis* está considerado como uno de los patógenos más importantes de la enfermedad periodontal. *P. gingivalis* se detecta con gran frecuencia en pacientes con periodontitis, sin embargo, también es detectado, aunque en menor medida en pacientes periodontalmente sanos.

Entre los factores de virulencia encontramos las fimbrias, las endotoxinas, la cápsula, las vesículas de membrana, etc, destacando la caracterización del tipo de fimbrias que presenta el microorganismo por el papel que juega en la invasión del huésped. El gen *fimA* codifica para la fimbriolina, una subunidad proteica de la fimbria. Recientemente se ha estudiado la distribución del genotipo del gen *fimA* de *P. gingivalis* en pacientes periodontales obteniendo seis variantes de este gen en función de su secuencia nucleotídica (I-V y Ib). Se ha indicado la existencia de una clara correlación entre la destrucción periodontal y la distribución de estos genotipos de *fimA*. Concretamente la presencia de fimbriolina tipo II es significativamente predominante en pacientes con periodontitis severa.

El objetivo del presente estudio es estudiar la prevalencia de la enfermedad periodontal crónica en una muestra de 114 adultos de la Comunidad Valenciana, determinando además la prevalencia de los distintos genotipos de *fimA* de *P. gingivalis* de la muestra estudiada, así como la

presencia o ausencia de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* y *T. denticola*. También se ha pretendido comparar la expresión del gen *fimA* de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica y en adultos periodontalmente sanos, y estudiar la asociación entre los distintos genotipos y los parámetros clínicos de la enfermedad como son el sangrado gingival, la profundidad de bolsas periodontales y la pérdida de inserción.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES**1. LA ENFERMEDAD PERIODONTAL****1.1. ANATOMÍA DEL PERIODONTO SANO**

El periodonto está formado por los tejidos de soporte y revestimiento del diente (encía, ligamento periodontal, cemento, hueso alveolar).

La encía

La mucosa bucal consta de tres zonas: la mucosa masticatoria (formada por la encía y el revestimiento duro del paladar), el dorso de la lengua (cubierto por mucosa especializada) y la mucosa bucal que recubre el resto de la boca. La encía es la parte de la mucosa bucal que recubre los procesos alveolares de los maxilares y rodea los cuellos de los dientes.

Los límites de la encía son los siguientes: en sentido coronario la encía, de color rosado, termina en el margen gingival libre, de contorno festoneado. En sentido apical, se continúa con la mucosa alveolar, de un rojo más oscuro y laxo. Ambas se separan por la línea o unión mucogingival (LMG).

En la encía podemos distinguir dos partes: la encía libre o marginal y la encía insertada o adherida. La encía marginal corresponde al margen o borde de la encía que rodea los dientes y forma la pared de tejido blando del surco gingival. El surco gingival es el espacio poco profundo alrededor del diente, limitado por la superficie dental y el revestimiento epitelial del margen libre de la encía. En el ser humano, la profundidad de sondaje de un surco gingival clínicamente normal es de 2 a 3 mm.

La encía insertada está fijada firmemente al periostio subyacente del hueso alveolar. La anchura de ésta corresponde a la distancia entre la unión mucogingival y la proyección sobre la superficie externa del fondo del surco gingival o bolsa periodontal. Generalmente ésta es mayor en la zona de incisivos y menor en la zona de molares.

ANTECEDENTES

Ligamento periodontal

Es el tejido conectivo que rodea a la raíz y la une al hueso. Las fibras principales son los elementos más importantes del ligamento periodontal, son de colágena y están dispuestas en fascículos. Están distribuidas en seis grupos:

- Grupo transeptal: Se extienden en sentido interproximal sobre la cresta alveolar y se enclavan en el cemento de los dientes vecinos.
- Grupo de la cresta alveolar: Se extienden en sentido oblicuo desde el cemento, por debajo del epitelio de unión, hasta la cresta alveolar. Evitan la extrusión del diente y se oponen a los movimientos laterales.
- Grupo horizontal: Se extienden en ángulos rectos respecto del eje longitudinal del diente, desde el cemento hasta el hueso alveolar.
- Grupo de fibras oblicuas: Es el grupo más vasto y se extienden desde el cemento en dirección coronal oblicuamente hacia el hueso. Son las que soportan las tensiones masticatorias verticales.
- Grupo apical: Divergen a partir del cemento hacia el hueso en el fondo del alveolo.
- Grupo interradicular: Divergen desde el cemento hacia el diente en las zonas de las furcas de los dientes multirradiculares.

El tejido conectivo intersticial presenta fibras colágenas dispuestas con menor regularidad entre los grupos de fibras principales. Este tejido contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios.

Cemento

Es el tejido mesenquimatoso calcificado que constituye la cubierta exterior de la raíz anatómica. Existen principalmente dos tipos de cemento radicular: el acelular (primario) y el celular (secundario). Ambos están formados por una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas colágenas.

Proceso alveolar

Es la porción del maxilar y la mandíbula que forma y apoya a los alvéolos dentarios. Se forma cuando el diente erupciona, con la finalidad de proveer la inserción ósea para constituir el ligamento periodontal, y desaparece de manera gradual tras la pérdida del diente. El proceso alveolar consta de:

- Una lámina externa de hueso cortical, formado por hueso compacto.
- La pared alveolar interna de hueso compacto delgado llamado hueso alveolar propiamente dicho, lámina cribiforme o lámina dura.
- Trabéculas esponjosas, entre esas dos capas compactas, que operan como hueso alveolar de soporte (Carranza, Newman 1998).

1.2. ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

En la etiopatogenia de la periodontitis intervienen tanto microorganismos como la respuesta inmune del huésped. Las bacterias colonizan los tejidos que rodean al diente, encía marginal y surco gingival, formando biofilms o biopelículas. Estas comunidades bacterianas situadas en la cavidad oral también se conocen como placa dental. La placa supragingival está relacionada con la gingivitis mientras que es la placa subgingival la que está ligada a la periodontitis (Liebana, Castillo & Alvarez 2004).

En condiciones habituales existe un predominio de estreptococos orales (hasta un 82%), en equilibrio con los tejidos gingivales, y cuando éste se rompe surgen las enfermedades gingivales. Todas ellas tienen en común la presencia de una placa inespecífica a nivel gingival que, junto al cálculo, desencadenan el proceso inflamatorio (Liebana, Castillo & Alvarez 2004).

Bajo el término de “Periodontitis” se incluye aquellas enfermedades inflamatorias que conducen a la destrucción del aparato de sostén dental. La enfermedad periodontal evoluciona por brotes episódicos, seguir un curso en etapas (desde una forma inicial a otra avanzada), tener un carácter crónico o agresivo y ser localizadas o generalizadas.

ANTECEDENTES

La placa subgingival es aquella que está localizada a nivel del surco gingival. A medida que la enfermedad evoluciona se convierte en una bolsa periodontal y lleva a la destrucción del hueso alveolar. De una forma esquemática puede decirse que en la periodontitis crónica están implicados una amplia gama de microorganismos como *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *Prevotella nigrescens* y otros. En el caso de la periodontitis agresiva el microorganismo más prevalente es *A. actinomycetemcomitans* junto con otros microorganismos como *Campylobacter rectus*, *T. forsythia* y *P. gingivalis*.

Factores de periodontopatogenicidad

Los factores que influyen en la periodontopatogenicidad de las bacterias se dividen en dos grupos: directos e indirectos (Liebana, Castillo & Alvarez 2004).

- Patogenicidad directa. Se produce por la acción de productos que elaboran las bacterias y que actúan directamente sobre los tejidos que forman el periodonto, como exotoxinas y exoenzimas. Estos productos producen lesiones tisulares, muerte celular, citotoxicidad, apoptosis, etc, destacando la penetración en los tejidos epiteliales, especialmente ligada a *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *F. nucleatum*.
- Patogenicidad indirecta. Son aquellos que disminuyen o aumentan la respuesta del huésped. Uno de los principales factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* es la síntesis de una leucotoxina que además parece que induce la apoptosis en las células polimorfonucleares (PMN). Otros microorganismos interfieren la respuesta específica mediante proteasas que destruyen inmunoglobulinas y factores del complemento, que inhiben la proliferación de linfocitos B, etc. En ocasiones la patogenicidad indirecta se traduce en un incremento de la respuesta del huésped, activando macrófagos que excretan enzimas que contribuyen a la inflamación y a la reabsorción ósea.

Factores del huésped

El huésped puede presentar una respuesta normal o patológica. En ocasiones se produce una hiperrespuesta que se relaciona con periodontitis agresivas, ya que parece que en las crónicas ésta no se produce. Al activarse macrófagos (monocitos) y linfocitos T se liberan una serie de mediadores que contribuyen al proceso inflamatorio, al daño tisular y a la destrucción ósea. En otros casos la respuesta del huésped puede estar disminuida por enfermedades como el SIDA, tratamientos inmunosupresores, etc, que aceleran la evolución de la enfermedad (Liebana, Castillo & Alvarez 2004).

Por tanto, la destrucción de los tejidos periodontales viene determinada tanto por la patogenicidad de las bacterias como por la respuesta del huésped que en ocasiones está alterada, bien por exceso o por defecto.

1.3. CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

La importancia de clasificar las enfermedades periodontales reside en la unificación de los criterios a la hora de diagnosticar esta patología. La enfermedad periodontal no es una sola entidad, ya que existen diferentes tipos de manifestaciones clínicas en función de su etiología, signos que presenta, evolución... Por este motivo los sistemas de clasificación son necesarios con la finalidad de proporcionar al clínico unos criterios ordenados de diagnóstico y tratamiento de sus pacientes.

La Academia Americana de Periodoncia, AAP, en 1999 desarrolló la Clasificación de Enfermedad Periodontal (Armitage 1999). Esta clasificación supone la unificación de las diferentes entidades que se presentan en la enfermedad periodontal. Hasta esa fecha la clasificación más empleada fue la publicada en 1989 por la misma academia. Sin embargo, esta clasificación de 1989 presentaba una serie de inconvenientes:

- Considerable extensión en las categorías de enfermedades.
- Ausencia del componente de enfermedad gingival.

ANTECEDENTES

- Inapropiado énfasis en la edad y en las tasas de progresión.
- Criterios inadecuados para su clasificación.

Posteriormente en 1993 durante el primer Workshop Europeo de Periodoncia se sugiere una clasificación de la enfermedad periodontal simple, basándose en parte en la edad del paciente dividida en cuatro categorías:

- Gingivitis.
- Periodontitis del adulto.
- Periodontitis de aparición temprana.
- Periodontitis necrotizante.

La clasificación propuesta por la AAP en 1999 incluye algunos aspectos nuevos y presenta una serie de correcciones con respecto a las anteriores, como son:

- Se añade una extensa clasificación de la enfermedad gingival que incluye tanto lesiones inducidas por placa como las no asociadas a la presencia de placa.
- Se consideran los aspectos sistémicos del paciente periodontal, adquiriendo importancia las manifestaciones o lesiones periodontales de enfermedades sistémicas a nivel endocrino, malnutrición o toma de medicamentos.
- Se sustituye el término de “periodontitis del adulto” por “periodontitis crónica”, con la finalidad de poder incluir a aquellos adolescentes que presenten esta patología.
- Se reemplaza la denominación de “Periodontitis de aparición temprana” por “Periodontitis Agresiva” lo que implica que la enfermedad puede aparecer en cualquier edad.
- Se excluye la forma de “Periodontitis Refractaria”, ya que no se trata de una entidad propia sino más bien cualquier tipo de periodontitis resistente al tratamiento aplicado.
- Reemplazo de “Periodontitis ulceronecrotizante” por “Enfermedad Periodontal Necrotizante”, la cual incluye tanto a la gingivitis como a la periodontitis ulceronecrotizante.
- El absceso periodontal que no aparecía en la clasificación de 1989 se incluye en esta, basándose en la localización del absceso.

- Los aspectos que tienen relación con lesiones periodontales endodónticas son incluidas.
- Se añade una categoría que abarca las alteraciones, condiciones o deformidades tanto del desarrollo como adquiridas de los tejidos periodontales.

La clasificación de la ADA de 1999 es la siguiente:

I. Enfermedad Gingival

A. Enfermedad Gingival Inducida por Placa Dental.

1. Gingivitis asociada con Placa Dental únicamente.
 - a. Sin otros factores locales asociados.
 - b. Con otros factores locales asociados (Ver VIII-A).
2. Enfermedad Gingival modificada por factores sistémicos.
 - a. Asociada con el Sistema Endocrino.
 - 1) Gingivitis asociada con la Pubertad.
 - 2) Gingivitis asociada con el Ciclo Menstrual.
 - 3) Gingivitis asociada con el Embarazo.
 - a) Gingivitis.
 - b) Granuloma Piógeno.
 - 4) Gingivitis asociada a Diabetes Mellitus.
 - b. Asociada con Discrasias Sanguíneas.
 - 1) Gingivitis Asociada con Leucemia.
 - 2) Otros.
3. Enfermedad Gingival modificada por medicamentos.
 - a. Enfermedad gingival influenciada por drogas.
 - 1) Agrandamientos Gingivales Influenciados por drogas.
 - 2) Gingivitis Influenciada por drogas.
 - a) Gingivitis asociada a anticonceptivos orales.
 - b) Otras.
4. Enfermedad gingival modificada por malnutrición.
 - a. Gingivitis asociada a deficiencia de Ácido Ascórbico.
 - b. Otras.

B. Lesiones Gingivales No Inducidas por Placa.

1. Enfermedad Gingival de Origen Bacteriano Específico.
 - a. Lesiones asociadas con *Neisseria gonorrhoea*.
 - b. Lesiones asociadas con *Treponema pallidum*.
 - c. Lesiones asociadas a Especies *Streptocólicas*.
 - d. Otros.
2. Enfermedad Gingival de Origen Viral.

ANTECEDENTES

- a. Infecciones por el Herpes Virus.
 - 1) Gingivoestomatitis herpética primaria.
 - 2) Herpes oral recurrente.
 - 3) Infecciones por Varicela Zoster.
- b. Otras.
- 3. Enfermedad Gingival de Origen Fúngico.
 - a. Infecciones por Especies de Cándida.
 - b. Eritema Gingival Lineal.
 - c. Histoplasmosis.
 - d. Otras.
- 4. Lesiones Gingivales de Origen Genético.
 - a. Fibromatosis Gingival Hereditaria.
 - b. Otros.
- 5. Manifestaciones Gingivales de Condiciones Sistémicas.
 - a. Desórdenes Mucocutáneos.
 - 1) Liquen Plano.
 - 2) Penfigoide.
 - 3) Pénfigo Vulgar.
 - 4) Eritema Multiforma.
 - 5) Lupus Eritematoso.
 - 6) Inducidas por Drogas.
 - 7) Otras.
 - b. Reacciones Alérgicas.
 - 1) Reacciones a los materiales restaurativos dentales.
 - a) Mercurio.
 - b) Níquel.
 - c) Acrílico.
 - d) Otros.
 - 2) Reacciones atribuidas a
 - a) Cremas dentales.
 - b) Enjuagues dentales.
 - c) Aditivos de gomas de mascar.
 - d) Aditivos de los alimentos.
 - 3) Otras.
- 6. Lesiones Traumáticas.
 - a. Lesiones químicas
 - b. Lesiones físicas.
 - c. Lesiones térmicas.
- 7. Reacciones a Cuerpo Extraño.
- 8. Otras no Específicas.

- II. Periodontitis Crónica.**
 - A. Localizada.**
 - B. Generalizada.**
- III. Periodontitis Agresiva**
 - A. Localizada.**
 - B. Generalizada.**
- IV. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas.**
 - A. Asociada con Desórdenes Hematológicos.**
 - 1. Neutropenia adquirida.**
 - 2. Leucemia.**
 - 3. Otros.**
 - B. Asociada con Desórdenes Genéticos.**
 - 1. Neutropenia cíclica familiar.**
 - 2. Síndrome de Down.**
 - 3. Síndromes de deficiencia de adhesión leucocitaria.**
 - 4. Síndrome Papillon-Lefèvre.**
 - 5. Síndrome de Chediak-Higashi.**
 - 6. Histiocitosis.**
 - 7. Enfermedad de almacenamiento de glicógeno.**
 - 8. Agranulocitosis Genética Infantil.**
 - 9. Síndrome de Cohen.**
 - 10. Síndrome de Ehlers-Danlos.**
 - 11. Hipofosfatasa.**
 - 12. Otros.**
 - C. Otros no específicos.**
- V. Enfermedad Periodontal Necrotizante.**
 - A. Gingivitis Ulceronecrotizante.**
 - B. Periodontitis Ulceronecrotizante.**
- VI. Absceso Periodontal.**
 - A. Absceso gingival.**
 - B. Absceso periodontal.**
 - C. Absceso pericoronar.**
- VII. Periodontitis Asociada con Lesiones Endodónticas.**
 - A. Lesiones combinadas endo-periodontales.**
- VIII. Condiciones o deformidades del desarrollo o adquiridas**
 - A. Factores Localizados Relacionados a los Dientes que Modifican o Predisponen a la Enfermedad Gingival Inducida por Placa o Periodontitis.**
 - 1. Factores anatómicos dentales.**
 - 2. Aparatos y restauraciones dentales.**
 - 3. Fracturas radiculares.**

ANTECEDENTES

4. Reabsorción radicular cervical y lágrimas de cemento.

B. Condiciones y Deformidades Mucogingivales Adyacentes a los Dientes.

1. Resección de los Tejidos Gingivales Blandos.

a. Superficies Lingual o Vestibular.

b. Interproximal (Papilar).

2. Ausencia de Encía Queratinizada.

3. Profundidad Vestibular Disminuida.

4. Posición Aberrante de Músculos/Frenillo.

5. Exceso Gingival.

a. Pseudobolsas.

b. Margen gingival inconsistente.

c. Gran exceso gingival.

d. Agrandamiento gingival.

6. Color anormal.

C. Condiciones y Deformidades Mucogingivales en Rebordes Edéntulos.

1. Deficiencia de reborde horizontal y/o vertical.

2. Ausencia de tejido queratinizado/Encía.

3. Agrandamiento de tejido blando/Gingival.

4. Posición aberrante de músculos/Frenillo.

5. Profundidad Vestibular Disminuida.

6. Color anormal.

D. Trauma Oclusal.

1. Trauma Oclusal Primario.

2. Trauma Oclusal Secundario.

1.4. ÍNDICES EPIDEMIOLÓGICOS PERIODONTALES

Los índices periodontales más utilizados son los siguientes:

A. Índice de Placa de Silness y Löe, 1964 (IP)

B. Índice Gingival de Löe y Silness, 1953 (IG)

C. Índice de Higiene de O'Leary, 1972 (IH)

D. Índice Periodontal Comunitario de Necesidad de Tratamiento (CPITN)

A. Índice de Placa de Silness y Löe:

Se trata de un índice que evalúa la presencia de placa bacteriana en las superficies vestibulares de los dientes. Para ello es necesario secar con aire

previamente y no requiere el uso de reveladores de placa. Los grados de este índice son:

- Grado 0: Ausencia de placa
- Grado 1: Película fina de placa en el borde gingival únicamente detectable al pasar la sonda.
- Grado 2: Moderada cantidad de placa a lo largo del borde gingival. Espacios interdientales libres. Reconocible a simple vista.
- Grado 3: Gran cantidad de placa a lo largo del borde gingival. Espacios interdientales ocupados por placa.

$$\text{IP de Silness y L\ddot{o}e} = \frac{\text{Suma de las puntuaciones}}{\text{Número de dientes}}$$

B. Índice Gingival de L\ddot{o}e y Silness:

Mide inflamación gingival y sus grados son los siguientes:

- Grado 0: Encía normal, sin inflamación, sangrado ni cambios de color.
- Grado 1: Inflamación leve, sin sangrado. Leve aumento de volumen y cambio de color.
- Grado 2: Inflamación moderada, edema, eritema, sangrado al sondaje y presión.
- Grado 3: Inflamación severa, importante eritema y edema. Sangrado espontáneo, ulceración.

$$\text{I.G de L\ddot{o}e y Silness} = \frac{\text{Suma de los índices gingivales de cada pieza}}{\text{Número de piezas examinadas}}$$

En función del valor medio obtenido podemos distinguir entre:

- Inflamación gingival leve: 0'1-1
- Inflamación gingival moderada: 1'1-2
- Inflamación gingival severa: 2'1-3

ANTECEDENTES

C. Índice de Higiene de O`Leary:

Este índice sólo detecta la presencia de placa de manera cuantitativa, ya que determina la presencia o ausencia de ésta. Para ello se utiliza un revelador de placa, y se observa cada superficie del diente (vestibular, palatina, mesial y distal) y se anota un signo + o – (la presencia o ausencia de placa respectivamente). El resultado se expresa en forma de porcentaje:

$$\% \text{ higiene oral} = \frac{\text{Número de sitios exentos de tinción}}{\text{Número de dientes examinados}} \times 100$$

D. Índice Periodontal Comunitario de Necesidad de Tratamiento (CPITN):

Éste es el índice más usado para estudios epidemiológicos y, además de la gravedad de la gingivitis y periodontitis, indica la necesidad de tratamiento. Para realizar la exploración se recomienda el uso de la sonda periodontal de la OMS, que posee una punta esférica de 0'5 mm y marcas para los 3'5, 5'5, 8'5 y 11'5mm.

Cada diente es explorado en seis puntos (3 vestibulares y 3 palatinos: mesial, medio y distal). Los sextantes son las unidades básicas de registro, y para ello cada sextante debe contener, al menos, dos dientes funcionales. Si existe un diente o ninguno, el sextante es nulo y los valores se incluyen en el sextante contiguo. El valor asignado a cada sextante será el más alto obtenido tras explorar los dientes de ese sextante. En menores de 20 años sólo se exploran 6 dientes: un incisivo superior, otro inferior, y los primeros molares(o en su defecto los segundos molares). Los códigos de este índice son los siguientes:

- Código 0: Salud periodontal.
- Código 1: Hemorragia al sondaje.
- Código 2: Presencia de cálculo y/o restauraciones desbordantes.
- Código 3: Bolsas de 4-5mm de profundidad.
- Código 4: Bolsas de 6mm de profundidad o mayores.

El número de código registrado en cada sextante indicará las necesidades de tratamiento.

- Código 1: Tratamiento 1 (Instrucción en higiene oral)
- Código 2: Tratamiento 1 + Tratamiento 2 (Eliminación de cálculo y de obturaciones desbordantes)
- Código 3 y 4: Tratamiento 1+ Tratamiento 2+ Tratamiento 3 (tratamiento periodontal complejo)

Posteriormente se desarrolló el Índice Periodontal Comunitario, CPI, que es una variante de anterior, ya que también registra el sangrado, la presencia de cálculo y de bolsas periodontales. Se trata de un índice más completo porque además de estos parámetros, mide la pérdida de inserción.

1.5. PREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

MUNDIAL

Locker et al. realizaron una revisión crítica de la literatura existente sobre epidemiología de la enfermedad periodontal desde 1980 hasta 1996 (Locker, Slade & Murray 1998). Tras el rechazar varios estudios que, por sus deficiencias en las mediciones, no fueron incluidos en esta revisión, los autores llegaron a las siguientes conclusiones:

- Existe un porcentaje elevado de sujetos de edad media y avanzada que presenta niveles moderados de pérdida de inserción, mientras que la pérdida severa afecta a un porcentaje mucho menor. Aproximadamente una quinta parte de los individuos mayores han experimentado una pérdida severa generalizada.
- Los estudios de incidencia muestran que el 50-75% de los adultos mayores experimentan una pérdida de inserción de 2-3 mm o mayor, como mínimo en una localización en un periodo de tiempo relativamente corto.

En 2008, se publicó una revisión sobre enfermedad periodontal y adultos mayores incluyendo, entre otros aspectos, la epidemiología de la enfermedad (Boehm, Scannapieco 2007). En el estudio se muestra la siguiente tabla de prevalencias.

ANTECEDENTES

Estudio	Sujetos (País, edad)	Tasas de prevalencia
Krustrup y Erik Petersen.	Dinamarca. 65-74 años	2'4% sanos 93'1% sangrado al sondaje 62'1% bolsas 4-5 mm 20% bolsas > 5 mm
Levy et al.	Iowa. Edad media:85	91%: 4 mm Pérdida Inserción 45%: 6 mm Pérdida Inserción 15%: 8 mm Pérdida Inserción
Mack et al.	Alemania. 60-80 años	60-69 años: 79% 4 mm bolsa 37% 6 mm bolsa 70-79 años: 68% 4 mm bolsa 30% 6 mm bolsa
Hirotoomi et al.	Japón. 70-80 años	97% 4 mm Pérdida Inserción 48% 7 mm Pérdida Inserción
Chalmers et al.	Sur de Australia. Edad media: 83'2	66% Edéntulos 63% Zonas con cálculo
Kiyak et al.	Washington. 78-98 años	43% Enfermedad periodontal

Tabla1. Tabla de prevalencias de la revisión realizada por Boehm et al.

Jenkins y Papapanou realizaron una revisión bibliográfica de la epidemiología de la gingivitis por placa y la periodontitis en niños y adolescentes (Jenkins, Papapanou 2001). Las conclusiones de estos autores son las siguientes:

- La gingivitis es común. Su prevalencia y severidad se incrementa con la edad. Las superficies linguales de los molares y las superficies interproximales en general son las más afectadas.
- Los datos sobre periodontitis en dentición temporal son muy limitados. La prevalencia en niños europeos es aproximadamente del 5%. Las tasas de prevalencia más altas en niños no europeos están relacionadas con una predisposición racial o con una higiene oral deficiente.
- Es muy poco frecuente la periodontitis severa generalizada en dentición temporal que implique la pérdida prematura de estos dientes. Estos casos habitualmente están relacionados con enfermedades sistémicas.

- La pérdida de soporte periodontal relacionada con la periodontitis en dentición permanente es común en adolescentes, pero habitualmente sólo se observan pequeñas pérdidas de inserción y mínimas reabsorciones de hueso.
- Son pocas las poblaciones de adolescentes en las que se observa una mayor destrucción periodontal, y ésta se atribuye a la raza, etnia y a las diferencias de cuidados preventivos.
- Las formas más precoces de periodontitis afectan aproximadamente al 0'1% de la población blanca y al 2'6 de la población negra. Las formas localizadas son cuatro veces más frecuentes que las generalizadas. Los estudios sugieren que estos tipos de periodontitis afectan a mujeres blancas más que a hombres blancos y a hombres negros más que a mujeres negras.
- En general, la placa, el cálculo y los niveles de gingivitis y periodontitis son ligeramente mayores en los chicos que en las chicas.
- En los últimos 40 años, se ha observado en algunos países desarrollados una mejora de la higiene oral en la niñez y la adolescencia, con reducción de los niveles de gingivitis. En otros países la higiene se ha ido deteriorando y los niveles de gingivitis han aumentado. Sin embargo, no hay evidencias de un cambio en la prevalencia y severidad de la periodontitis.
- En los países desarrollados la enfermedad periodontal necrotizante tiene un pico de incidencia en los adultos jóvenes y en muchos de estos países es poco frecuente, aunque su prevalencia es mayor en portadores del VIH. En los países en vía de desarrollo los niños con malnutrición y enfermedades infecciosas tienen riesgo de padecer una enfermedad periodontal necrotizante.

EUROPA

En el grupo de edad de 15 a 19 años únicamente el 22% están sanos a nivel periodontal, ya que la mayoría presentan gingivitis y/o cálculo. Existen diferencias entre los distintos países europeos. En Europa oriental se observa un estado periodontal peor (6% de jóvenes sanos) que en Europa occidental (27% de jóvenes sanos).

En los adultos jóvenes (de 35-44 años) el 15-54% presentan bolsas moderadas (3,5-5,5 mm) con una media del 36% para Europa Occidental y del

ANTECEDENTES

45% para los países del Este. La proporción de europeos con bolsas profundas superiores a 5,5 mm es del 14% (9% en Occidente y 23% en el Este). En el grupo de edad de 65-74 años alrededor del 30% de los europeos presentan bolsas moderadas y el 20% bolsas profundas (Llodra Calvo 2005).

ESPAÑA

Los datos sobre patología periodontal en estudios epidemiológicos a nivel nacional se han recogido a partir de la encuesta realizada en 1983. En el grupo de 12 años el porcentaje de jóvenes sanos se duplicó de 1983 a 1993, pasando del 17% al 33%. En el año 2000 este porcentaje de jóvenes sanos aumentó hasta el 55% y en 2005, el 34,5% de los adolescentes de 15 años estaban periodontalmente sanos.

La prevalencia de bolsas periodontales en el grupo de 35-44 años fue muy similar en las encuestas 1983-1993, en torno al 49%, mientras que hubo una notable disminución en la encuesta de 2000, presentando bolsas periodontales el 26% de adultos jóvenes (de 35-44 años)% y se estabilizó en el 25,4% en el estudio del 2005.

El porcentaje de sujetos con bolsas severas es otro indicador que ha ido disminuyendo del 18% (1983) al 11%(1993), y al 4% (2000 y 2005).

En el 2010 se realizó la última encuesta a nivel nacional. Los resultados obtenidos a nivel de patología periodontal son los siguientes:

- Al analizar la presencia de bolsas periodontales en el grupo de adultos jóvenes encontramos unas cifras mejores que las obtenidas en el periodo 2000-2005, pasando de un 25% al 16%.
- En el grupo de 65-74 años la prevalencia de bolsas moderadas o severas también ha descendido a un 29% respecto a los resultados obtenidos en 2005 (38%) (Llodra Calvo 2012).

COMUNIDAD VALENCIANA

El estudio de salud oral en adultos en la Comunidad Valenciana más reciente fue realizado en el año 2006 (Eustaquio Raga 2008) obteniendo los siguientes resultados:

- El porcentaje de sujetos sin ningún signo de enfermedad periodontal es del 13% para adultos y del 5,5% para los mayores.
- La prevalencia de cálculo es casi del 60% para los adultos.
- Cerca del 22% y del 26% de los adultos jóvenes y los adultos mayores respectivamente presentan bolsas periodontales aunque sólo una minoría (4.6% y 4.3%) se corresponde con fase avanzada de la enfermedad.
- En los adultos jóvenes casi el 75% no presenta pérdida de inserción, mientras que en los adultos mayores es de un 25%. Sólo el 5% de los adultos jóvenes presenta pérdida de inserción grave, en los mayores es de casi el 16%.

1.6. TABACO Y ENFERMEDAD PERIODONTAL

La Organización Mundial de la Salud estima que actualmente existen en el mundo 1.300 millones de fumadores. El consumo de tabaco sigue siendo la principal causa de muerte evitable en el mundo y de un gran abanico de problemas de salud ampliamente contrastados, como son cáncer de pulmón, vesícula, esófago, laringe, boca y garganta; bronconeumopatía crónica, enfisema y bronquitis; apoplejía, ataques cardíacos y otras enfermedades cardiovasculares.

Sin embargo, la lista de afecciones que causa el consumo de tabaco ha aumentado. Actualmente se sabe que el tabaco contribuye a enfermedades como cataratas, neumonía, leucemia mieloide aguda, aneurisma de la aorta abdominal, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de útero, cáncer de riñón, periodontitis y otras enfermedades (Office of the Surgeon General (US), Office on Smoking and Health (US) 2004).

El tabaco es el principal factor de riesgo asociado a la enfermedad periodontal crónica. La literatura desarrollada en los últimos veinte años evidencia que los pacientes fumadores muestran mayor presencia de bolsas, y una pérdida de hueso y de inserción mayores que los no fumadores. Además padecen una pérdida de dientes mayor. Dependiendo de los criterios

ANTECEDENTES

empleados para definir la enfermedad periodontal, el riesgo es de 5 a 20 veces mayor en un fumador que en un no fumador (Bergstrom 2004).

A pesar de que la asociación entre tabaco y periodontitis está demostrada en numerosos estudios epidemiológicos, todavía no se ha descubierto por completo el mecanismo por el que el tabaco contribuye a la patogénesis de la enfermedad periodontal. Hay estudios microbiológicos que muestran una mayor prevalencia en los pacientes fumadores de bacterias periodontales como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia* y, *Fusobacterium nucleatum*. Sin embargo otros autores no han hallado diferencias en la detección de estas bacterias en pacientes fumadores y no fumadores (Cesar Neto et al. 2012).

Existe un estudio reciente que afirma que el tabaco altera la respuesta humoral del paciente frente a *P. gingivalis* y esto puede incrementar su capacidad de producir infección, reforzando la evidencia de que la evolución de la enfermedad periodontal en fumadores es diferente a la de los pacientes no fumadores, partiendo de una misma situación (Zeller et al. 2013).

Por otra parte también se ha observado que el consumo de tabaco influye en el éxito del tratamiento periodontal, ya que se ha observado que más del 90% de periodontitis refractarias se dan en pacientes fumadores. Además también se ha demostrado que al abandono del tabaco revierte sus efectos negativos (Cesar Neto et al. 2012).

1.7. REPERCUSIONES DE LA PERIODONTITIS EN LA SALUD GENERAL DEL PACIENTE

La enfermedad periodontal muestra una asociación con múltiples condiciones sistémicas aunque existe una falta de consenso por parte de los expertos en la naturaleza de esta asociación. A continuación se expone la

relación entre la enfermedad periodontal y las patologías sistémicas más relevantes con las que se le relaciona.

Diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica que presenta niveles elevados de glucemia debido a alteraciones en la producción o la actividad de la insulina, que conlleva complicaciones micro- y macrovasculares. Existe una clara evidencia de que la enfermedad periodontal es una de las complicaciones del paciente diabético (Otomo-Corgel et al. 2012). Khader et al realizaron un metaanálisis para examinar la extensión y severidad de la enfermedad periodontal en pacientes con y sin diabetes y sus resultados evidenciaron la relación entre ambas enfermedades (Khader et al. 2006).

En los últimos 20 años se ha estudiado esta relación bidireccional llegando a la conclusión de que la periodontitis severa afecta negativamente sobre el control de la glucemia y se asocia a la aparición de complicaciones de la diabetes (Chapple, Genco & working group 2 of the joint EFP/AAP workshop 2013). De hecho, el tratamiento de la enfermedad periodontal ha demostrado tener efectos beneficiosos en el control de la glucemia de pacientes con diabetes tipo II (Lalla, Papapanou 2011).

Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad y tienen en común con la enfermedad periodontal que ambas son crónicas, de etiología multifactorial, de alta prevalencia y compartes múltiples factores de riesgo.

Existen marcadores inflamatorios a nivel sistémico aparecen en ambas enfermedades. Además, el depósito de bacterias periodontopatógenas en las placas de ateroma, induce una respuesta que favorece la coagulación o la invasión de células vasculares. Por otra parte se ha hallado una correlación entre el espesor de la íntima media de la carótida y la enfermedad periodontal severa (Otomo-Corgel et al. 2012).

ANTECEDENTES

Diversos metaanálisis de estudios publicados concluyen que los pacientes con enfermedad periodontal tienen un riesgo mayor de desarrollar enfermedades cardiovasculares, ya que dicha enfermedad periodontal incrementa tanto la incidencia como la prevalencia de enfermedad cardíaca coronaria. Sin embargo, la disminución de este riesgo tras el tratamiento de la periodontitis está por demostrar y son necesarios más estudios en este sentido (Blaizot et al. 2009, Bahekar et al. 2007, Lockhart et al. 2012).

Neonatos de bajo peso

Desde 1996, existen diversos estudios que buscan hallar la relación entre enfermedad periodontal y partos prematuros o neonatos de bajo peso (Agueda, Echeverria & Manau 2008). En un metaanálisis realizado sobre esta cuestión concluyeron que dichos estudios son muy heterogéneos y que son necesarias nuevas investigaciones con una metodología bien planeada para verificar la hipótesis. En cualquier caso, es fundamental el cuidado de la salud bucodental en la mujer embarazada (Konopka, Paradowska-Stolarz 2012).

2. BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

La interacción entre las bacterias y las células eucariotas es compleja y existen diversos mecanismos que nos permiten convivir con normalidad con las bacterias que se encuentran habitualmente en nuestro organismo. La enfermedad periodontal se produce por un biofilm complejo de bacterias y sus productos, activando así la respuesta inflamatoria del huésped. En la cavidad oral se han identificado aproximadamente 500 especies de bacterias, de las cuales 415 están presentes en la placa subgingival (Feng, Weinberg 2006).

Las bacterias comensales son aquellas que residen en armonía en la cavidad oral sin causar daño al huésped. Además ciertas bacterias poseen un papel beneficioso en la cavidad oral. Algunos ejemplos de bacterias asociadas a un periodonto sano son *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces naeslundii* y *Actinomyces viscosus*.

Por otra parte existen bacterias asociadas a la enfermedad periodontal denominadas periodontopatógenas. *A. Actinomycescomitans* ha sido asociada a periodontitis agresiva, mientras que *Porphyromonas gingivalis*, *A. actinomycescomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Eikenella corrodens* se han asociado con periodontitis crónica. La placa dental contribuye al inicio y progresión de la enfermedad periodontal. Sin embargo, es la composición de dicha placa la que influirá en el grado de afectación del periodonto. *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*, junto con *A. actinomycescomitans* (en casos de periodontitis juvenil), son las que presentan una capacidad destructiva mayor, y de su patogenicidad destaca (Feng, Weinberg 2006):

- su habilidad para colonizar subgingivalmente
- su capacidad invasiva
- sus proteasas y endotoxinas
- su capacidad para inducir una respuesta

***Porphyromonas gingivalis* (Pg)**

Porphyromonas gingivalis es una bacteria Gram negativa, cocobacilo anaerobio obligado, tiene forma de caña pequeña, no móvil, forma colonias de color café, con zonas de hemólisis en las placas de agar sangre.

Pg produce un gran número de enzimas, proteínas y productos terminales de su metabolismo que son activas contra un amplio espectro de las proteínas del huésped, proveyendo un mecanismo de evasión para las defensas del huésped (Bostanci, Belibasakis 2012). Como factores de virulencia presenta:

1. Cápsula de polisacárido.

Se trata de una barrera fisico-química que ofrece protección al microorganismo contra la desecación y resistencia a la fagocitosis por los neutrófilos. Posee cápsula densa y amorfa de aproximadamente 15 nm de espesor, alrededor de la membrana exterior. Hay una relación estrecha entre la

ANTECEDENTES

encapsulación de Pg y la habilidad para funcionar como un patógeno oral. Esta encapsulación incrementa su resistencia a la fagocitosis, resistencia al suero e inducción decrecida a los leucocitos polimorfonucleares.

2. Hemaglutina.

Intervienen en el proceso de hemaglutinación de los glóbulos rojos sanguíneos. Ésta es mediada por adhesinas asociadas a la superficie de la bacteria. Se ha identificado en Pg por electroforesis una proteína de adhesión hemaglutinante llamada HA-Ag2, como un antígeno común a todas las especies, con la capacidad de unión a los eritrocitos. Esta proteína también participa en la adherencia a las células epiteliales (Chandad, Mouton 1995).

3. Enzimas.

Se trata de uno de los principales factores de virulencia, ya que juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad periodontal, incluyendo la diseminación de Pg y otras especies bacterianas a los tejidos más profundos del huésped, dando como resultado la invasión de los tejidos y destrucción de las células del huésped (Travis et al. 1997). Entre éstas destacan la colagenasa, que degrada fibrillas de colágeno como resultado de la acción mutua con otras proteasas, la proteasa parecida a la tripsina y la proteasa cisteína, que posee la capacidad de aglutinar a los eritrocitos, causando su lisis.

4. Lipopolisacáridos (LPS)

Existen estudios que muestran que los lipopolisacáridos producidos por Pg son capaces de estimular la producción de Prostaglandinas E2 de los macrófagos de las ratas. Tamura et al. (Tamura et al. 1992) han demostrado la estimulación de IL-1 β e IL-8 por los LPS de Pg en los fibroblastos gingivales humanos. Los LPS de Pg inducen a la producción de IL-6 por los fibroblastos gingivales humanos, se piensa que esta inducción es el resultado indirecto de la estimulación de la IL-1 β causada por los LPS.

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(Aa)**

Esta fue la primera especie en ser identificada como un posible patógeno periodontal por su incremento en la frecuencia de detección y presencia en grandes cantidades en las lesiones de la Periodontitis juvenil localizada (Mandell, Socransky 1981, Newman et al. 1976).

Klinger, en 1912, fue el primero en describir sus características morfológicas y de cultivo. En primer lugar le asignó el nombre de *Bacterium actinomycetemcomitans*, siendo Topley y Wilson los que en 1929 le cambiaron el nombre a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Olsen, Shah & Gharbia 1999). Posteriormente, en 2006, según estudios de ADN se observó gran similitud en cuatro bacterias: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus saphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* y *Haemophilus segnis*, conformando estas un nuevo género llamado *Aggregatibacter*, perteneciente a la familia *Pasteurellacea*, por lo que hubo una reclasificación y esta bacteria adquirió el nombre que se emplea actualmente: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Norskov-Lauritsen, Kilian 2006).

Se trata de un cocobacilo Gram negativo, redondeado de un tamaño aproximado de 0'4-0'5 x 1-1'5µm, capnofílico, ya que requiere de la presencia de CO₂ para su desarrollo en un porcentaje del 5-10%, no produce esporas, no es hemolítico y forma colonias. Son múltiples sus factores de virulencia entre los que podemos destacar:

1. Leucotoxina.

Ésta posee especificidad citolítica para destruir los leucocitos PMN, macrófagos y a una subclase de linfocitos humanos, mientras que otros tipos de células como las endoteliales, epiteliales, fibroblastos, eritrocitos y plaquetas son resistentes a su lisis. La toxina penetra y forma poros trans-membranosos en la célula objetivo, induciendo una rápida formación de canales de iones altamente conductivos, que llevan a la despolarización de la membrana, pérdida del potasio intracelular, dilatación osmótica con la consecuente muerte celular (Fives-Taylor et al. 1999).

ANTECEDENTES

2. Bacteriocinas.

Son proteínas letales para otras variedades y especies de bacterias, disminuyendo así la competencia con otros organismos ya sea por el espacio o los nutrientes. Su mecanismo de acción consiste en alterar la permeabilidad celular produciendo la pérdida de RNA, DNA y otras macromoléculas intracelulares y co-factores requeridos para su crecimiento. Además inhiben el crecimiento de algunas especies de *Streptococos* (*S sanguis*, *S uberis*) y *Actinomyces* (*A viscosus*) así como de otras variedades de *Aa*. Sin embargo tiene poco efecto sobre el crecimiento de otras bacterias Gram negativas asociadas con la enfermedad periodontal.

3. Factor inhibidor de la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares.

En la periodontitis existe una acumulación de neutrófilos en los tejidos conectivos gingivales, en el epitelio de unión y en la bolsa periodontal. La interferencia o la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos es ventajoso para el organismo infectante. *Aa* ha demostrado ser capaz de inhibir la quimiotaxis.

4. Factores inmunosupresores.

El *Aa* es capaz de elaborar diversos factores capaces de suprimir los mecanismos de defensa del huésped, produce una proteína capaz de inhibir la producción de DNA, RNA y síntesis de proteínas por las células T humanas activadas por antígenos. La proteína purificada es capaz de inhibir la producción de IgG e IgM por las células B humanas afectando la producción de Ig, mediante la interferencia temprana del estado de activación de la célula.

Treponema denticola (Td)

Treponema es un género de espiroquetas y mientras que en los pacientes sanos, sólo supone un pequeño porcentaje de las bacterias del fluido crevicular, en los pacientes periodontales la proporción hallada de esta bacteria es mayor. Además se ha observado la existencia de asociación con otras

bacterias periodontopatógenas como *Porphyromonas gingivalis*. Entre los mecanismos que posee para destruir tejidos periodontales destacan unas potentes proteasas y los cambios a nivel físico-químico que produce en el entorno (Frederick et al. 2011).

T. denticola ha mostrado adherencia a los fibroblastos y a las células epiteliales, actividad hemolítica y hemaglutinante, adhesinas que se unen a las proteínas de la matriz y a las células... Y los efectos de *T. denticola* y sus productos generan una respuesta por parte de la mucosa y del sistema inmunitario del huésped (Sela 2001).

***Tannerella forsythia* (Tf)**

T. forsythia es un bacilo anaerobio gram-negativo que inicialmente fue descrito como *Bacteroides forsythus* pero posteriormente fue reclasificado por Sakamoto *et al.* Adquiriendo su nombre actual. A pesar de la evidente implicación en la patogénesis de la enfermedad periodontal, es uno de los microorganismos que ha sido menos estudiado. Investigaciones en animales demuestran su virulencia al causar abscesos y pérdida de hueso alveolar en roedores. Además estos estudios *in vivo* demostraron que su patogenicidad se ve potenciada en presencia de otras bacterias como *P. gingivalis* y *T. denticola*. Únicamente han sido identificados unos pocos factores de virulencia en *T. forsythia* como son proteasas, actividad inductora de apoptosis, glucosidasas y glucosaminidasas, una hemaglutinina... (Sharma 2010).

Complejo rojo de Socransky

En 1998 Socransky *et al.*, conocedores de que las bacterias de la placa subgingival formaban agrupaciones entre ellas, realizaron un estudio cuya finalidad fue definir cómo son estas comunidades utilizando para ello muestras de placa subgingival de pacientes con y sin enfermedad periodontal. En su estudio observaron 5 complejos. Un complejo formado por *Bacteroides forsythus* (actualmente *T. forsythia*), *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*. Un segundo complejo formado por *Fusobacterium nucleatum*,

ANTECEDENTES

Prevotella intermedia, *Prevotella nigrescens* y *Peptostreptococcus micros* junto con otras especies asociadas a este grupo. El tercer complejo compuesto por *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* y *S. intermedius*. El cuarto complejo incluía tres especies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo *a*. Por último, el quinto complejo estaba formado por *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*. También se observó la presencia de algunas bacterias que no mostraron una clara relación con ninguno de los cinco complejos descritos anteriormente (Socransky et al. 1998).

Ya en este estudio se observó que era el primer complejo, el denominado “complejo rojo”, el que mostraba una relación más clara con parámetros clínicos de la enfermedad periodontal, en concreto con la profundidad de bolsa y con la presencia de sangrado tras el sondaje (Socransky et al. 1998). Posteriormente se han llevado a cabo múltiples estudios para determinar la presencia de estas tres bacterias en diferentes poblaciones, la asociación entre ellas y los mecanismos sinérgicos que aumentan su patogenicidad (Suzuki, Yoneda & Hirofuji 2013), (Darveau 2010), (Wara-aswapati et al. 2009).

3. GEN *fimA* de *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis posee varios factores de virulencia como son fimbrias, cápsulas y proteasas. Esta bacteria ha sido detectada con poca frecuencia en individuos periodontalmente sanos y sin gingivitis. Aunque los factores de huésped influyen en el desarrollo de la enfermedad periodontal, hay también diferencias en la virulencia de los microorganismos de los pacientes periodontalmente sanos y en aquellos que padecen periodontitis. De hecho, existen clones especialmente virulentos de *P. gingivalis* en pacientes que han desarrollado periodontitis crónica o agresiva (Amano et al. 2004).

Las fimbrias mayores de *P. gingivalis* son un factor de virulencia crítico que influye en el inicio y progresión de la enfermedad. Se trata de componentes filamentosos en la superficie celular. Su subunidad proteica, la fimbrilina, está implicada en las interacciones con los tejidos del huésped mediante la adhesión y la colonización de éstos. Además, las fimbrias son capaces de activar células del huésped como células epiteliales, endoteliales, monocitos, dando lugar a la liberación de citoquinas, incluyendo las interleuquinas IL-1, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como moléculas de adhesión celular (Amano et al. 2004).

Las variaciones clonales de las fimbrias mayores (FimA) y en la secuencia nucleotídica del gen *fimA* han sido estudiadas con la finalidad de hallar su relación con las diferencias de virulencia que presenta la bacteria. Se han hallado seis variantes del gen *fimA* (tipos I-II-III-IV-V y Ib) en función de las variaciones observadas en la secuencia nucleotídica.

No todas las variantes detectadas aparecen en la cavidad oral con la misma frecuencia. Los estudios realizados muestran que la mayor parte de los pacientes periodontales son portadores del tipo II, seguido del grupo IV, y que la presencia del tipo II se incrementa significativamente en las formas más severas de periodontitis. Sin embargo, el genotipo de *fimA* más prevalente en los individuos periodontalmente sanos es el tipo I.

En 2003 Beikler *et al.* realizaron un estudio para determinar la prevalencia de los distintos genotipos de *fimA* de *P. gingivalis* en pacientes de la Universidad de Muenster, Alemania, con enfermedad periodontal. Para ello, recogieron muestras de placa subgingival de las seis zonas más afectadas de 102 pacientes y la analizaron, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genotipos más prevalentes en esta población fueron el tipo II, I y IV. Sin embargo, no encontraron una asociación entre los tipos y la severidad de la periodontitis ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y profundidad de bolsa, sangrado al sondaje o número de dientes en boca (Beikler et al. 2003).

ANTECEDENTES

Posteriormente Missailidis *et al.* llevaron a cabo un estudio similar en una población brasileña. En este caso los pacientes fueron clasificados en función de su estado periodontal como periodontalmente sanos (sin pérdida de inserción), pacientes con gingivitis (aquellos que presentaron más de un 30% de sangrado al sondaje) y pacientes con periodontitis agresiva o crónica. De cada paciente se obtuvieron tres muestras de placa subgingival que se estudiaron mediante PCR. Los resultados mostraron que el tipo II como el más prevalente en pacientes periodontales, sólo encontrándose esta variante en un paciente sano. El tipo Ib es el segundo genotipo más prevalente en los pacientes periodontales. El genotipo V no se detectó en la población estudiada, mientras que el tipo IV fue el más frecuentemente observado en los pacientes con gingivitis tanto sólo como en combinación con otros genotipos. Por lo tanto, estos autores concluyen que los genotipos II y Ib son los más prevalentes en los pacientes con periodontitis de la población brasileña estudiada, sugiriendo un mayor potencial patogénico de estos tipos (Missailidis *et al.* 2004).

Miura *et al.* estudiaron la prevalencia y las diferencias patogénicas que presentan los distintos tipos de *fimA* de *P. gingivalis*, en un grupo de 18 pacientes japoneses con periodontitis agresiva, que compararon con otro grupo de 22 adultos periodontalmente sanos. Además de determinar los genotipos de este microorganismo estudiaron la presencia de otras bacterias relacionadas con la enfermedad periodontal, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia*, mediante PCR. Los resultados mostraron que en la periodontitis agresiva el genotipo más prevalente es el tipo II, hallándose en un 46.7% de los casos, seguido del tipo Ib y el tipo I. La cantidad de bacterias *P. gingivalis* fue mayor en las zonas donde se identificó el genotipo I, mientras que en aquellas en las que se halló el genotipo II se observó una coexistencia de *P. gingivalis* con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* (Miura *et al.* 2005).

En 2007 Zhao *et al.* realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar la prevalencia de los distintos genotipos de *fimA* de *Porphyromonas gingivalis* y relacionarlo con el estado de salud periodontal en adultos chinos. Al igual que los anteriores, estos autores también estudiaron la coexistencia de éstos con

Aggregatibacter actinomycetemcomitans y *Tannerella forsythia* mediante la técnica de PCR. *P. gingivalis* fue detectada en el 22'1% de los adultos sanos, frente a un 81'7% de los pacientes con periodontitis crónica. El genotipo de *fimA* más prevalente en los adultos periodontalmente sanos fue el tipo I, mientras que en el grupo de pacientes con enfermedad periodontal eran el tipo II seguido del tipo IV. Además se encuentra con frecuencia una coexistencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* mayor en las zonas positivas para el genotipo II de *fimA* (Zhao et al. 2007).

También ha sido estudiada la prevalencia de estos genotipos en niños japoneses de 2 a 15 años, clasificándolos en sanos, gingivitis y periodontitis, y analizando su placa bacteriana mediante PCR. *P. gingivalis* se detectó en 29'6% de los niños con periodontitis, y en éstos la asociación de los genotipos Ib y II fue la más prevalente (37'5%) seguida de los genotipos IV y II. En el grupo de niños con gingivitis se detectaron con mayor frecuencia el genotipo IV y el II, por este motivo los autores concluyeron que estos dos genotipos junto con la asociación del Ib-II son los más comunes en la enfermedad periodontal (Hayashi et al. 2012).

En un estudio publicado en 2012 sobre una población española, se muestra la prevalencia de los seis genotipos *fimA* de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* en tres grupos de pacientes: sanos, pacientes con gingivitis y con periodontitis crónica. Los genotipos II y Ib fueron los más prevalentes en los pacientes periodontales. En el grupo de pacientes con gingivitis el genotipo IV fue el que mostró una mayor prevalencia junto con las bacterias *Treponema denticolay Tannerella forsythia* (Puig-Silla et al. 2012).

En 2013 se publicó un estudio sobre la variabilidad genética del gen *fimA* de *P. gingivalis* en una población española, a partir de muestras subgingivales de un total de 65 pacientes entre sanos y enfermos periodontales. El genotipo II resultó ser el más prevalente (50'9%), mientras ningún otro genotipo tuvo una prevalencia mayor del 15%. Los genotipos II y IV fueron significativamente más prevalentes en los pacientes con periodontitis (Fabrizi et al. 2013).

ANTECEDENTES

En un estudio realizado en 412 adultos en Corea, la bacteria *P. gingivalis* fue detectada en el 97'5% de los pacientes periodontales y en el 57'8% de los individuos sanos. El genotipo *fimA* II fue el más prevalente entre ambos grupos de estudio y los genotipos II, Ib y IV fueron los más prevalentes en los enfermos periodontales. Sin embargo, tras realizar el análisis estadístico se observó que el genotipo Ib fue el que mostró una correlación más significativa con la presencia de periodontitis (Moon et al. 2013).

En las investigaciones más recientes encontramos la realizada por Feng *et al.* en el que estudiaron la prevalencia de ocho bacterias periodontopatógenas y de los genotipos *fimA* de *P. gingivalis* en pacientes chinos con periodontitis agresiva, mediante PCR. Entre los microorganismos estudiados se incluyen los tres que forman parte del complejo rojo de Socransky (*P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*), *A. Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, y *Fusobacterium nucleatum*. La prevalencia de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *C. rectus*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, y *A. actinomycetemcomitans* fue significativamente superior en los pacientes con periodontitis agresiva comparado con los sanos. La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en los pacientes con periodontitis agresiva fue relativamente baja (30'4%) comparado con otras bacterias, aunque observaron que los pacientes jóvenes albergaban con mayor frecuencia esta bacteria. En cuanto a los genotipos *fimA* de *P. gingivalis*, fue el tipo II el más prevalente en los pacientes con periodontitis agresiva (Feng et al. 2014).

En la tabla 2 se muestran las diferencias de estos estudios en cuanto al tamaño y distribución de la muestra y los criterios de inclusión y exclusión. En la tabla 3 se pueden observar los resultados obtenidos en dichos estudios y sus conclusiones.

ANTECEDENTES

ESTUDIO	TAMAÑO DE LA MUESTRA	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Beikler et al. (2003)	102 pacientes (29 hombres y 73 mujeres) de 48.9 ± 11.7 años.	Sanos a nivel sistémico con EP crónica de moderada a severa o EP agresiva.	Detartraje, antibióticos o tratamiento periodontal en 6 meses previos. Alteraciones de la inmunidad.
Missaildis et al. (2004)	102: 41 hombres y 61 mujeres de 14-75 años. Sanos: 45 pacientes (Gingivitis: 20). Periodontitis: 57 (42 EP crónica y 15 EP agresiva).	Sanos: sin pérdida de inserción (Gingivitis: más de 30% de sangrado) Periodontitis: pérdida de inserción y destrucción ósea.	Antibióticos o tratamiento periodontal en 6 meses previos. Enfermedades asociadas a EP como la diabetes o SIDA.
Miura et al. (2005)	18 EP agresiva: 7 hombres y 11 mujeres de 19–34 años (27.6). 22 sanos: 6 hombres y 16 mujeres de 19–31 años (23.4).	EP agresiva: Destrucción periodontal severa con múltiples bolsas mayores de 5 mm. Sanos: encía sana, sin evidencia radiográfica de pérdida de hueso y profundidades de bolsa menores de 3 mm.	Enfermedades sistémicas o problemas que puedan afectar la evolución de la terapia periodontal. Tratamiento periodontal durante al año previo al estudio o antibióticos los 3 meses anteriores.
Zhao et al. (2007)	136 Sanos: 44 hombres de 25–75 años (44.3 ± 10.6) y 92 mujeres de 25–74 años (42.4 ± 11.3). 115 EP crónica: 67 hombres de 25–74 años (47.9 ± 11.8) y 48 mujeres de 26–75 años (44.5 ± 12.4).	Sanos: 20 o más dientes en boca y salud gingival sin evidencias radiográficas de pérdida de hueso, profundidad de sondaje <3 mm y pérdida de inserción <1 mm. EP crónica: 16 o más dientes en boca y bolsas mayores de 4 mm.	Enfermedades sistémicas o problemas que puedan afectar la evolución de la terapia periodontal. Tratamiento periodontal o antibióticos los 3 meses anteriores al estudio.

ANTECEDENTES

ESTUDIO	TAMAÑO DE LA MUESTRA	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Hayashi et al. (2012)	Muestra total: 400 pacientes de 2-15 años distribuidos: <ul style="list-style-type: none"> - 134 sanos - 239 gingivitis - 27 periodontitis 	Sanos: ausencia de inflamación y sangrado, ni pérdida ósea en radiografía Gingivitis: Signos de inflamación moderada sin pérdida ósea en radiografía Periodontitis: Pérdida de inserción > 3 mm en 4 dientes	No se excluyeron niños con enfermedades sistémicas. Sí se excluyeron aquellos que habían tomado antibióticos los 3 meses previos al estudio.
Puig-Silla et al. (2012)	86 pacientes (25-50 años): <ul style="list-style-type: none"> - 37 sanos - 16 gingivitis - 33 periodontitis crónica 	Sanos: ninguna profundidad de bolsa mayor de 3 mm ni una pérdida de inserción superior a 1 mm. Gingivitis: índice de sangrado superior al 30% Periodontitis crónica: al menos 4 zonas con profundidad de sondaje \geq 5 mm y una pérdida de inserción \geq 2 mm	Mujeres embarazadas, hiperplasia gingival por fármacos, antibióticos en los seis meses previos, anti-inflamatorios como tratamiento crónico y otras enfermedades autoinmunes.
Fabrizi et al. (2013)	65 pacientes de los cuales: <ul style="list-style-type: none"> - 15 sanos - 50 enfermedad periodontal 	Sin enfermedades sistémicas, con un mínimo de 16 dientes (al menos 3 por cuadrante). La clasificación de sanos o enfermos periodontales se realizó según criterios diagnósticos internacionales tras la exploración clínica y radiográfica.	Haber recibido tratamiento periodontal o alguna medicación relevante (haber tomado antibióticos al menos el mes previo al estudio)

ANTECEDENTES

<p>Moon et al. (2013)</p>	<p>412 adultos (27-75 años):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 128 sanos: 64 hombres + 64 mujeres (42'3±13'5 años) - 284 periodontitis: 172 hombres + 112 mujeres (48'3±9'5 años) 	<p>Sanos: Al menos 20 dientes sin sangrado ni pérdida ósea en radiografías y con un sondaje <4 mm en todas las localizaciones</p> <p>Periodontitis crónica: Bolsa periodontal ≥ 4 mm</p>	<p>Embarazo, uso de antimicrobianos a nivel local o sistémico durante los 3 meses previos a la toma de muestras y cualquier condición sistémica que influye a nivel periodontal.</p>
<p>Feng et al. (2014)</p>	<p>115 adultos (20-49 años):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 34 sanos - 81 periodontitis agresiva 	<p>Periodontitis agresiva: ≥ 35 años, con al menos 8 dientes con pérdida de inserción rápida, profundidad de bolsa > 5mm y pérdida ósea confirmada radiográficamente</p> <p>Sanos: ninguna profundidad de bolsa > 3 mm</p>	<p>Enfermedades crónicas, embarazo o lactancia, tratamiento periodontal en los últimos 6 meses o antibiótico en los 3 meses previos y fumadores actuales</p>

Tabla 2. Diseño de los estudios de prevalencia de los genotipos de *fimA* de *P gingivalis*. EP: Enfermedad periodontal

ANTECEDENTES

ESTUDIO	BACTERIAS	PREVALENCIA GENOTIPOS <i>fimA</i>	CONCLUSIONES																																	
Beikler et al. (2003)	<i>P. gingivalis</i> : 50.25% de la muestra inicial	I: 25.5% II/IV y III/IV: 2.0% II: 38.2% Desconocido: 6.9% III: 4.9% IV: 18.6% V: 3.9%	Los genotipos más prevalentes en caucásicos son los tipos I, II y IV. No se ha hallado relación con la severidad de la EP.																																	
Missaildis et al. (2004)	<i>P. gingivalis</i> : 57.8% de la muestra general (Pacientes periodontales: ♀ 90.3%; ♂ 88.4% y pacientes sanos: ♂ 20.0%; ♀ 16.6%)	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Sanos</th> <th>EP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>I</td> <td>25.0%</td> <td>11.7%</td> </tr> <tr> <td>Ib</td> <td>0%</td> <td>27.4%</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td>25.0%</td> <td>47.0%</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td>0%</td> <td>11.7%</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td>50.0%</td> <td>5.8%</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td>0%</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>		Sanos	EP	I	25.0%	11.7%	Ib	0%	27.4%	II	25.0%	47.0%	III	0%	11.7%	IV	50.0%	5.8%	V	0%	0%	Los genotipos II y Ib son los más prevalentes en pacientes periodontales de Brasil, lo que sugiere un mayor potencial patogénico de estos tipos												
	Sanos	EP																																		
I	25.0%	11.7%																																		
Ib	0%	27.4%																																		
II	25.0%	47.0%																																		
III	0%	11.7%																																		
IV	50.0%	5.8%																																		
V	0%	0%																																		
Miura et al. (2005)	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Sanos</th> <th>EP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A.a</td> <td>6.3%</td> <td>34.1%</td> </tr> <tr> <td>P.g</td> <td>16.8%</td> <td>79.8%</td> </tr> <tr> <td>T.f</td> <td>16.8%</td> <td>91.9%</td> </tr> </tbody> </table>		Sanos	EP	A.a	6.3%	34.1%	P.g	16.8%	79.8%	T.f	16.8%	91.9%	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Sanos</th> <th>EP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>I</td> <td>100%</td> <td>23%</td> </tr> <tr> <td>Ib</td> <td>0%</td> <td>23.8%</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td>0%</td> <td>40.5%</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td>0%</td> <td>7.9%</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td>0%</td> <td>2.4%</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td>0%</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>		Sanos	EP	I	100%	23%	Ib	0%	23.8%	II	0%	40.5%	III	0%	7.9%	IV	0%	2.4%	V	0%	0%	La cantidad de bacterias <i>P. gingivalis</i> fue mayor en zonas con genotipo I, y la coexistencia con otras bacterias mayor en zonas con genotipo II.
	Sanos	EP																																		
A.a	6.3%	34.1%																																		
P.g	16.8%	79.8%																																		
T.f	16.8%	91.9%																																		
	Sanos	EP																																		
I	100%	23%																																		
Ib	0%	23.8%																																		
II	0%	40.5%																																		
III	0%	7.9%																																		
IV	0%	2.4%																																		
V	0%	0%																																		

ESTUDIO	BACTERIAS	PREVALENCIA GENOTIPOS <i>fimA</i>	CONCLUSIONES				
Zhao et al. (2007)	Sanos	Sanos	Los genotipos II y IV son factores de riesgo en la patogénesis de la EP crónica en adultos chinos.				
	EP	EP					
	A.a 3.3%	36.2%		I 66.7%	17.1%		
	P.g 22.1%	81.7%		Ib 6.6%	20.2%		
T.f 20.0%	63.8%	II 6.7%	43.6%				
		III 10%	15.0%				
		IV 6.7%	30.9%				
		V 16.7%	4.3%				
Hayashi et al. (2012)	<p><i>P. gingivalis</i> fue detectada en:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1'5% en sanos - 10% en gingivitis - 29'6% en periodontitis 	Sanos	Gingivitis	EP	La presencia de <i>P. gingivalis</i> se asocia a enfermedad periodontal y los genotipos <i>fimA</i> más comunes son II, IV y la combinación Ib/II.		
		I 0%	0%	0%			
		Ib 0%	0%	0%			
		II 50%	29'2%	25%			
		III 0%	8'3%	0%			
		IV 0%	33'3%	37'5%			
		V 0%	0%	0%			
		Ib+II 50%	16'7%	37'5%			
Ib+II+V 0%	4'2%	0%					
Puig-Silla et al. (2012)	Sanos	Gingivitis	EP	Sanos	Gingivitis	EP	Los genotipos II y Ib fueron los más prevalentes en los pacientes periodontales. En el grupo de pacientes con gingivitis el genotipo IV fue el que mostró una mayor prevalencia junto con las bacterias <i>Treponema denticolay Tannerella forsythia</i> .
	A.a 8.1%	12.5%	33..3%	I 5.4%	0%	12.1%	
	P.g 27%	37.5%	66.7%	Ib 2.7%	0%	12.1%	
	T.f 27%	56.3%	69.7%	II 18.3%	6.3%	39.4%	
	T.d 16.2%	18.5%	48.5%	III 0%	0%	9.3%	
			IV 13.5%	31'3%	15.2%		
			V 0%	0%	0%		

ANTECEDENTES

ESTUDIO	BACTERIAS	PREVALENCIA GENOTIPOS <i>fimA</i>	CONCLUSIONES		
Fabrizi et al. (2013)	En el artículo no se describe la prevalencia de <i>P. gingivalis</i> sino la distribución de los genotipos en las muestras en las que la bacteria está presente.	Sanos	EP	Existe una asociación significativa entre el genotipo <i>fimA</i> II de <i>P. gingivalis</i> y la periodontitis.	
		I	27'3%		8'2%
		Ib	18'2%		13'3%
		II	34'8%		57'6%
		III	4'5%		3'8%
		IV	15'2%		13'9%
V	0%	3'2%			
Moon et al. (2013)	Presencia de <i>P. gingivalis</i> : - Sanos: 57'8% - Periodontitis: 97'5%	Sanos	EP	Los genotipos II, Ib y IV son los más prevalentes en periodontitis. El genotipo <i>fimA</i> Ib muestra una correlación más significativa con la presencia de periodontitis.	
		I	14'1%		12'7%
		Ib	3'1%		17'3%
		II	44'5%		67'3%
		III	3'1%		6'7%
		IV	7'8%		15'1%
V	0%	4'9%			
Feng et al. (2014)	Sanos P agresiva	Sanos	EP	El genotipo II es el más prevalente en los pacientes con periodontitis agresiva y la prevalencia de A.a en éstos fue relativamente baja (30'4%) comparado con otras bacterias.	
		A.a	2'9%		30'4%
		P.g	44'1%		98'2%
		T.f	44'1%		96'4%
		T.d	35'3%		96'4%
		I	38'4%		16'4%
Ib	23'1%	21'8%			
II	7'7%	29'1%			
III	15'4%	3'6%			
IV	7'7%	5'5%			
V	0%	0%			

Tabla 3. Resultados de los estudios de prevalencia de los genotipos de *fimA* de *P. gingivalis*.

EP: Enfermedad periodontal

A.a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, P.g: *Porphyromonas gingivalis*, T.f: *Tannerella forsythia*, T.d: *Treponema denticola*

4. TÉCNICAS DE LABORATORIO EMPLEADAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

El diagnóstico adecuado es fundamental para un tratamiento correcto de la enfermedad periodontal. Además de la anamnesis, la exploración clínica y el uso de pruebas radiográficas existen otras pruebas complementarias que pueden aportar información relevante para el diagnóstico. Estos métodos los podemos dividir en dos grandes grupos: el diagnóstico microbiológico, enfocado a la detección de las bacterias periodontopatógenas, y el diagnóstico inmunológico, que evalúa la respuesta del huésped y sus consecuencias.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Cultivo

El cultivo bacteriano es el “gold standard” a partir del cual se validan otras técnicas de análisis microbiológico. Para ello, se obtiene una muestra de placa subgingival con puntas de papel o curetas, se traslada en un medio de transporte específico y se cultiva bajo unas condiciones determinadas. A pesar de que es el método de referencia para evaluar la sensibilidad a los antibióticos, su aplicación rutinaria es poco eficaz, ya que presenta una serie de inconvenientes. Se requiere rigurosidad en el transporte ya que sólo proliferan bacterias vivas, son necesarios diversos medios selectivos para estudiar determinadas bacterias, varias atmósferas para la incubación. Además los resultados pueden tardar más de una semana debido al lento crecimiento de algunos anaerobios y algunos periodontopatógenos como *T. Forsythia* o los treponemas orales, difíciles de cultivar (Liebana, Castillo & Alvarez 2004).

Métodos inmunológicos

Son técnicas que buscan detectar la presencia de antígenos bacterianos usando anticuerpos conocidos. Se han empleado diversas técnicas como inmunofluorescencia directa o indirecta, citometría de flujo, ELISA, aglutinación con látex, etc. Los principales problemas de estas técnicas son las reacciones cruzadas entre bacterias y la dificultad para obtener anticuerpos monoclonales específicos.

ANTECEDENTES

Métodos moleculares

Entre estos métodos encontramos las sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes. No sólo permiten detectar periodontopatógenos sino cuantificarlos. Las sondas de ADN permiten identificar secuencias de nucleótidos específicos para especies bacterianas concretas. En el caso de la PCR cabe destacar su alta sensibilidad, especificidad y rapidez; no requiere microorganismos vivos y permite detectar especies difícilmente cultivables.

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

Respuesta inmune

Consiste en la detección de anticuerpos séricos y a nivel del surco gingival. Parece ser que en las formas de periodontitis agresivas hay relación entre disminución y severidad de las manifestaciones pero no en la periodontitis crónica.

Mediadores inflamatorios

Son péptidos sintetizados por los linfocitos y macrófagos y se ha estudiado su presencia en el fluido crevicular. Existen varios tipos y con funciones e implicaciones distintas: IL-1, IL-6, TNF- α , PGE-2, IL-4, IL-10, IL-2 y otros.

Enzimas líticas en el surco gingival

Las más estudiadas han sido las metaloproteasas y entre ellas la colagenasa. Se trata de enzimas sintetizadas por macrófagos, fibroblastos y neutrófilos que degradan el colágeno. Igualmente se han evaluado la elastasa, aspartatoaminotransferasa, catepsinas, glucuronidasa, dipeptidilpeptidasa, etc. En la mayoría de los casos su aumento se asocia con pérdidas de inserción severa (Liebana, Castillo & Alvarez 2004).

5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

5.1. ESTRUCTURA DEL ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) codifica la secuencia de los aminoácidos de las proteínas y controla su síntesis. El conjunto de ADN de una célula es su genoma, y éste puede estar fragmentado formando cromosomas, como ocurre en las células eucariotas, o ser una estructura única, como sucede en la mayoría de las bacterias.

En el año 1953 Watson y Crick describieron la estructura del ADN. Cada molécula está constituida por dos largas cadenas de nucleótidos con polaridad opuesta, unidas entre sí formando una doble hélice. Cada nucleótido está formado por una desoxirribosa a la que se une en el carbono 1' una base nitrogenada, que puede ser pirimídica (Citosina, Timina) o púrica (Adenina, Guanina), y en el carbono 5', un grupo fosfato.

Los nucleótidos se enlazan entre sí a través del grupo fosfato formando cadenas muy largas, quedando las bases nitrogenadas en la parte central unidas cada una al carbono 1' del azúcar formando un ángulo recto con su eje. Las cadenas de polinucleótidos que constituyen una molécula de ADN se mantienen unidas entre sí gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas complementarias (Guanina-Citosina; Timina-Adenina) de ambas cadenas que quedan enfrentadas.

En la figura 1 se muestran diversas representaciones gráficas de la molécula de ADN.

ANTECEDENTES

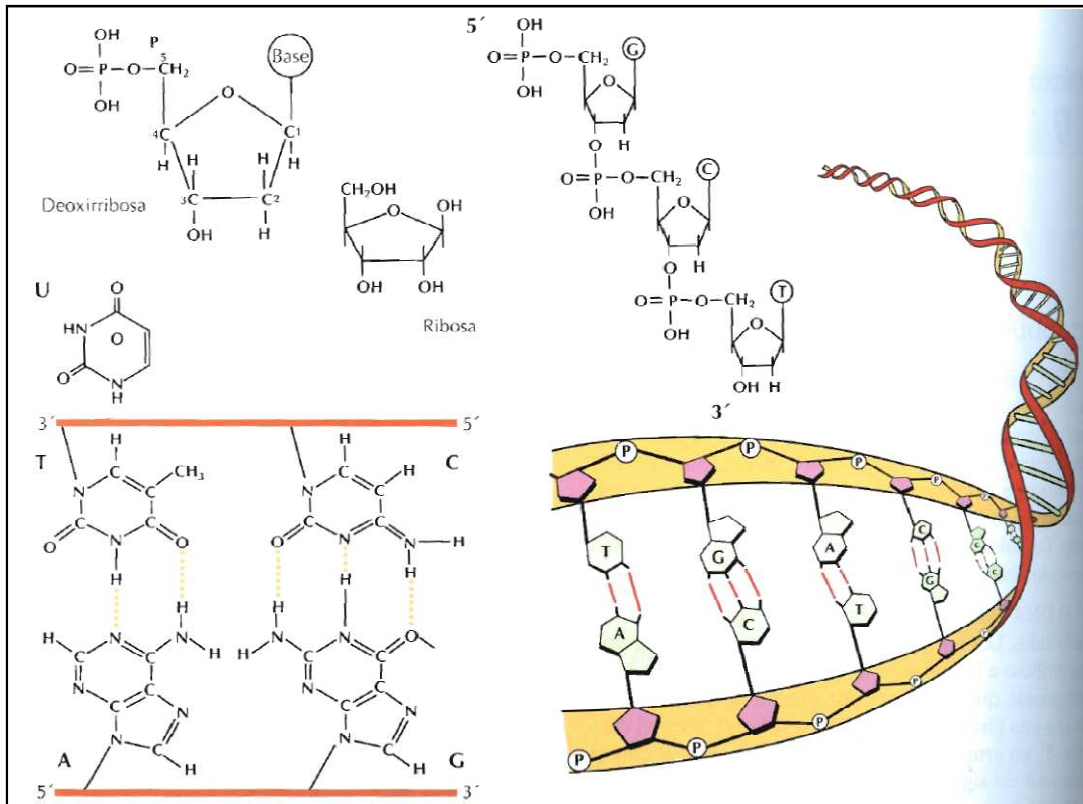


Figura 1. Representación de la estructura del ADN.

5.2 MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Las técnicas de amplificación tienen como objetivo multiplicar *in vitro* el número de copias de un fragmento de ADN del genoma de un microorganismo. Una vez amplificado un fragmento de ADN, es detectado fácilmente por una sonda, dada su abundancia y, por tanto, estas técnicas son de elección para la detección e identificación de microorganismos directamente en muestras clínicas. La técnica de amplificación más empleada es la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction; PCR).

En Abril de 1983, Kary Mullis dio a conocer la técnica de reacción en cadena de la polimerasa que permite la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN basándose en la replicación del ADN realizada en condiciones naturales por la DNA-polimerasa en los organismos. Una

polimerasa es un enzima natural que cataliza la formación y reparación del ADN y el ARN. Para ello, es necesario desnaturalizar (separar) la doble hélice, y que dicha enzima pueda iniciar su actividad, copiando sobre cada una de las cadenas una nueva cadena complementaria en el sentido 5'-3', enfrentando las bases correspondientes (G-C; T-A). Sin embargo, la DNA-polimerasa no puede iniciar su actuación sobre un fragmento monocatenario, sino en una región de doble cadena. Para crear esta región se usan los denominados cebadores o iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.

Esta técnica ha tenido un gran impacto desde que en 1988 fue posible utilizar una DNA-polimerasa que no se activaba por temperatura. Se trata de la *Taq*-polimerasa (aislada de una bacteria termófila adaptada a la vida en las fuentes de agua caliente, *Thermus aquaticus*) (Étienne 2001). Partiendo de este principio, la reacción en cadena de la polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª. Desnaturalización del ADN doble cadena

En esta etapa las dos cadenas de la molécula de ADN se separan. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (92-96°C) durante 15 segundos a un minuto. El tiempo para la desnaturalización del ADN depende de su complejidad, de la geometría del tubo, del termociclador y del volumen de la reacción.

2ª. Hibridación de los iniciadores

Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (30-65° C) durante unos 30 segundos. Los cebadores (primers) se unen a las zonas 3' complementarias que delimitan el fragmento que queremos amplificar.

3ª. Polimerización o extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa

Se lleva a cabo a 72°C durante 30 segundos a cinco minutos, que es la temperatura óptima para que la *Taq*-polimerasa desarrolle su actividad. Esta enzima se une a cada uno de los fragmentos bicatenarios DNA-cebador y

ANTECEDENTES

produce un fragmento de doble cadena por la complementariedad en la dirección 5'-3'. Para ello incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

La figura 2 muestra los pasos de la PCR por la cual a partir de una molécula de ADN se han obtenido dos iguales.

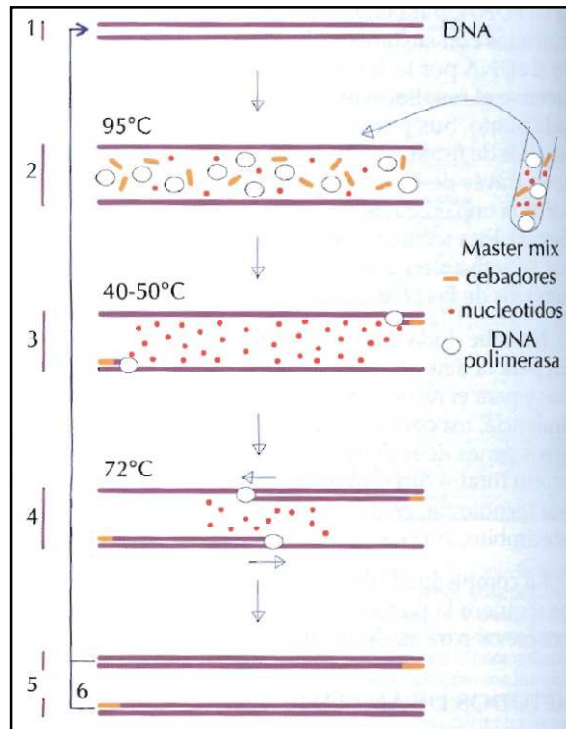


Figura 2. Pasos de la PCR

De este modo, a partir de dos cadenas iniciales se han obtenido cuatro. Posteriormente se inicia un nuevo ciclo calentando a 95°C para separar las cadenas recién formadas y repetir el ciclo. Este proceso se lleva a cabo en un instrumento automático denominado termociclador, que realiza los ciclos (de 20 a 30 durante dos o tres horas) en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta hasta llegar a conseguir millones de copias. Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, obtenemos una cantidad de ADN de $2n$, por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.

Para que las reacciones de PCR se den en condiciones óptimas hay que tener en cuenta diversos factores como son el diseño de los cebadores, la temperatura de renaturalización óptima, para que haya especificidad de hibridación del cebador con su diana, la concentración de los elementos químicos de la solución, como el Cl_2Mg , y un pH adecuado.

Existen formatos comercializados de modo que los fragmentos de ADN formados (amplicones) se transfieren a pocillos de placas en los que hay fijadas sondas específicas, disponiéndose de sistemas de revelado de estos híbridos. La detección de los amplicones puede hacerse mediante electroforesis o con kits comercializados. La detección mediante electroforesis en gel de agarosa es un método muy empleado aunque sólo permite determinar el tamaño de los amplicones en función de la localización de las bandas en el gel, reveladas con bromuro de etidio que se comparan con un control de fragmento de ADN de diferentes pesos moleculares conocidos.

Para identificar los amplicones de manera inequívoca es necesario transferir el material amplificado a un filtro de nitrocelulosa e hibridarlos con sondas específicas marcadas.

Limitaciones de la PCR

Uno de los problemas que plantea esta técnica es la presencia de inhibidores en las muestras. Existen productos orgánicos que se encuentran en las muestras clínicas, como sangre, polisacáridos, etc... que pueden inhibir la reacción. Además hay que tener en cuenta que el tipo de polimerasa, junto con otros parámetros, condiciona la longitud del fragmento que puede sintetizarse eficazmente, ya que más allá de una determinada longitud de ADN la polimerasa deja de actuar.

Otro de los problemas relevantes son las contaminaciones. Hay dos tipos: la contaminación puntual de una muestra negativa por otra positiva durante el proceso inicial de extracción de ADN, y la contaminación general del laboratorio con los amplicones de una PCR previa.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

1. Determinar la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* y del Complejo rojo de Socransky en la placa subgingival de los pacientes explorados.
2. Determinar la prevalencia de los distintos genotipos de *fimA* de *P. gingivalis* en la muestra estudiada.
3. Comparar la expresión del gen *fimA* de *P. gingivalis* y la prevalencia de las cuatro bacterias periodontopatógenas en pacientes con periodontitis crónica, pacientes con gingivitis y en adultos periodontalmente sanos.
4. Estudiar la asociación de los genotipos *fimA* de *P. gingivalis* y las bacterias entre sí.
5. Conocer la distribución de las bacterias y los genotipos *fimA* de *P. gingivalis* en función de la exposición al tabaco, independientemente del estado periodontal del paciente.
6. Estudiar la asociación entre los genotipos, las bacterias y los parámetros clínicos de la enfermedad como son el índice de placa, índice de sangrado gingival y la profundidad de sondaje.
7. Determinar los cambios en la composición de la placa subgingival en una misma localización del surco gingival en pacientes sanos, y de una misma bolsa en enfermos periodontales, con cuatro años de evolución.
8. Conocer la evolución del estado periodontal de los pacientes en cuatro años y su relación con la composición de la placa subgingival, el tratamiento periodontal recibido y la exposición al tabaco.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO

Éste es un estudio longitudinal en el que el trabajo de campo se llevó a cabo en dos fases: una primera fase se realizó en el año 2009 y la segunda parte del estudio se desarrolló en el año 2013.

A. PRIMERA FASE DEL ESTUDIO

1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

En la primera fase del estudio fueron incluidos 114 pacientes de la Clínica Odontológica de la Universitat de València. Los pacientes recibieron la información necesaria y participaron de manera voluntaria obteniendo previamente su consentimiento informado (Anexo 1). Tanto el diseño del estudio como el protocolo de actuación fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València (Anexo 2).

1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron en el estudio pacientes de entre 25 y 50 años con al menos 20 dientes presentes en boca excluyendo los terceros molares. Los pacientes fueron explorados y clasificados en tres grupos en función de su estado periodontal: Grupo I: pacientes periodontalmente sanos, Grupo II: pacientes con gingivitis y Grupo III: pacientes con periodontitis crónica.

Se incluyeron en el Grupo I aquellos pacientes que no presentaban en ninguna localización una profundidad de bolsa mayor de 3 mm ni una pérdida de inserción superior a 1 mm (Zhao et al. 2007). En el grupo II se incluyó a los pacientes que, cumpliendo las condiciones del Grupo I, presentaron un índice de sangrado superior al 30% (Missailidis et al. 2004). La periodontitis crónica se define siguiendo la clasificación de Enfermedades Periodontales consensuada por la Academia Americana de Periodoncia en 1999 (Armitage 1999). Se catalogaron como pacientes con enfermedad periodontal crónica (Grupo III) aquellos que presentaron al menos 4 zonas con una profundidad de sondaje

MATERIAL Y MÉTODO

igual o mayor a 5 mm y una pérdida de inserción igual o mayor de 2 mm (Herrera et al. 2008). Aquellos pacientes que presentaban una periodontitis inicial fueron excluidos del estudio.

1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio mujeres embarazadas, personas con hiperplasia gingival inducida por fármacos, que hubieran tomado antibióticos en los seis meses previos a la exploración o que tomaban medicamentos anti-inflamatorios como tratamiento crónico. También se excluyeron aquellos pacientes que presentaban alguna de las siguientes enfermedades (Schulz et al. 2008):

- infección por VIH
- diabetes mellitus tipo I y II
- enfermedad cardíaca coronaria
- enfermedades reumatoides
- lupus eritematoso
- síndrome de Behcet
- enfermedad de Crohn
- gingivoestomatitis herpética
- pénfigo y penfigoide oral

2. EXPLORACIÓN CLÍNICA

Se realizó una exploración completa de toda la boca empleando la sonda periodontal de la OMS (PCP11.5B, Hu Friedy, Chicago, IL, USA) y se registraron los siguientes parámetros en 6 localizaciones por cada diente (mesio-vestibular, medio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, medio-lingual y disto-lingual) (Herrera et al. 2008):

- placa (presente o ausente, expresado en porcentaje)
- sangrado (presente o ausente, expresado en porcentaje)
- profundidad de bolsa (en mm)
- pérdida de inserción (en mm)

Además los pacientes fueron catalogados como “no fumadores”, “antiguos fumadores” o “fumadores actuales”. Se consideraron “antiguos fumadores” aquellos que hubieran dejado el hábito al menos 6 meses antes de la exploración. En caso de que el tiempo transcurrido fuera menor a 6 meses se consideraron “fumadores actuales”. Además a los pacientes fumadores se les preguntó por el número aproximado de cigarrillos diarios que consumían.

Tanto los datos recogidos en la anamnesis como los parámetros clínicos fueron registrados en una ficha de exploración inicial (Anexo 3) y se llevaron a cabo en el periodo comprendido entre los meses de febrero y julio de 2009.

3. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE PCR

3.1. TOMA DE LA MUESTRA BIOLÓGICA

Las muestras de placa subgingival fueron obtenidas de la bolsa de mayor profundidad de los dientes índice de Ramfjord (1.6, 2.1, 2.4, 3.6, 4.1 y 4.4) en los pacientes periodontales, y en la zona mesio-vestibular de uno de los dientes de Ramfjord de los sujetos sanos o con gingivitis (Zhao et al. 2007). Para ello se retiró previamente la placa supragingival empleando una cureta estéril de forma cuidadosa para evitar el sangrado. Tres puntas de papel estériles eran insertadas en el surco gingival lo más profundo posible, mantenidas durante 15 segundos y posteriormente extraídas (Imagen 1).



Imagen 1. Puntas de papel estériles para la toma de muestras

MATERIAL Y MÉTODO

3.2. AISLAMIENTO DEL ADN BACTERIANO

Las puntas de papel fueron introducidas rápidamente en tubos eppendorf estériles, y se procedió inmediatamente al aislamiento del ADN bacteriano. Para el aislamiento del ADN bacteriano se empleó el Wizard SV DNA Purification System (Promega Cat. # A2360) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Tras la extracción, los ADNs se almacenaron a -20°C hasta el momento de la determinación.

3.3. DETERMINACIÓN MEDIANTE PCR de la presencia de *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* y los genotipos *fimA* de *P. gingivalis*.

La detección de las bacterias se realizó mediante la técnica de PCR. En concreto, para el genotipado del gen *fimA* de *P. gingivalis* se siguió el método descrito por Zhao et al (Zhao et al. 2007) y se emplearon los primers específicos para cada subtipo descritos por Amano et al (Amano et al. 2000) y Nakagawa et al (Nakagawa et al. 2002).

La reacción de PCR se realizó con 100 ng del ADN bacteriano extraído en el paso anterior, 200 μM de cada uno de los dNTPs, 3 mM MgCl_2 , 50 pmol de cada primer y 0.5 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso inicial de activación de la Taq polimerasa de 95°C durante 10 minutos; seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a 58°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos; y por último un único paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR obtenidos en cada reacción se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y tinción con bromuro de etidio (Imágenes 2 y 3).

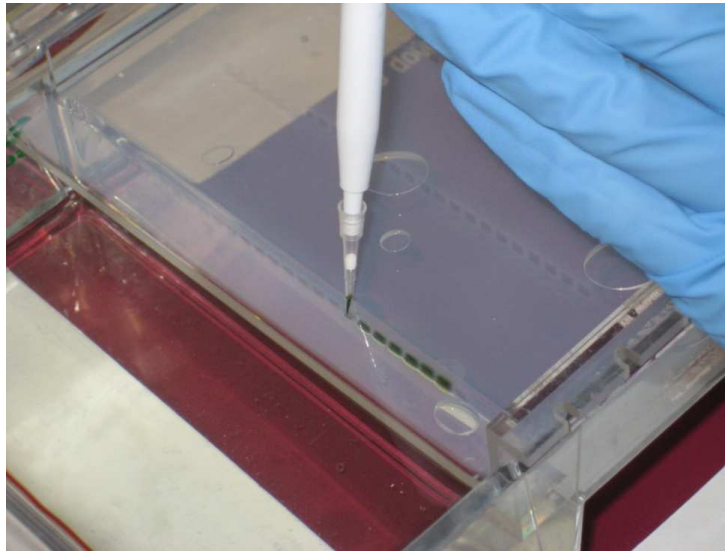


Imagen 2. Colocación de los productos de PCR en el gel de agarosa

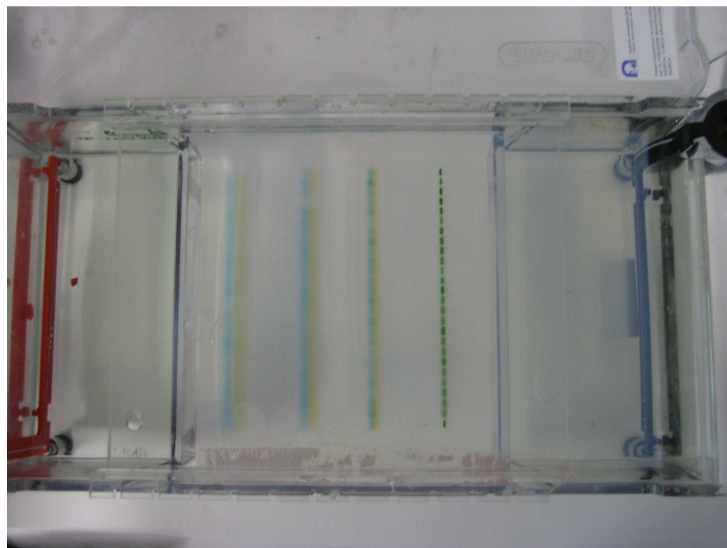


Imagen 3. Migración de las moléculas de ADN debida a la diferencia de potencial eléctrico a la que se somete el del de electroforesis

En aquellas muestras en las que se detectó simultáneamente los genotipos I y II se realizó otra amplificación utilizando primers específicos para el tipo Ib. Tras la amplificación los amplicones obtenidos se digirieron con RsaI y se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % y tinción con bromuro de etidio. Aquellas muestras en las que apareció 2 fragmentos se consideraron como tipo Ib (Nakagawa et al. 2002). Como controles positivos se utilizaron el ADN extraído de *P. gingivalis* ATCC33277, *P. gingivalis* W83 y *A. actinomycetemcomitans* ATCC29533.

B. SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO

Para la realización de la segunda fase del estudio se telefoneó a los 114 pacientes explorados con la intención de citarlos nuevamente en la Clínica Odontológica de la Universitat de València para realizarles una nueva exploración periodontal y toma de muestras de placa subgingival. De los 114 pacientes que comenzaron el estudio fue posible contactar con 102, ya que 12 habían cambiado de número de teléfono o dicho número no existía.

De los 102 pacientes localizados, 90 asistieron a la exploración. Los motivos por los cuales algunos pacientes no accedieron a continuar el estudio fueron la falta de interés, el cambio de residencia (fuera de la provincia de Valencia) y la imposibilidad de asistir por motivos laborales o de horario. En el gráfico 1 se representa la pérdida de la muestra y sus motivos.

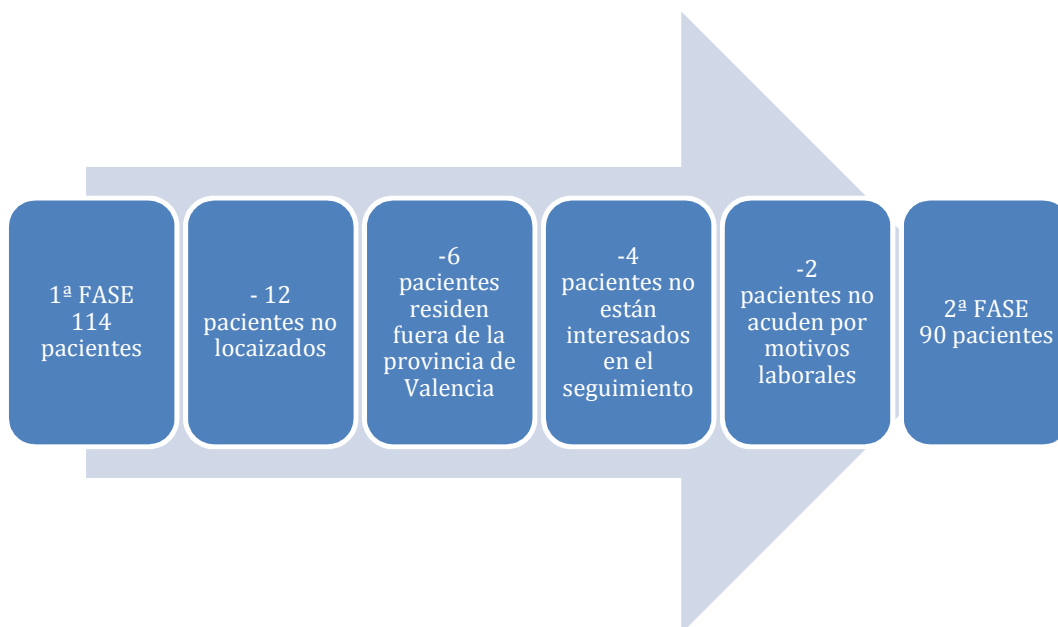


Gráfico 1. Pérdida de muestra y motivos de abandono del estudio.

En esta segunda visita se obtuvo el consentimiento informado de nuevo y se cumplimentó una nueva ficha de exploración muy similar a la primera en la que se añadió un nuevo dato a registrar: si en el periodo transcurrido desde la exploración inicial se habían realizado algún detartraje o habían recibido tratamiento periodontal de manera esporádica o constante (Anexo 4).

La segunda exploración y nueva toma de muestras de los 90 pacientes se realizó en el periodo comprendido entre los meses de febrero y octubre de 2013. En función de los parámetros clínicos obtenidos fueron clasificados de nuevo en 3 grupos (sanos, gingivitis y periodontitis crónica).

Las muestras de placa subgingival fueron tomadas en el mismo punto del surco gingival en los pacientes sanos o con gingivitis, y en la misma bolsa periodontal en los pacientes con periodontitis. Tanto los criterios de clasificación como la toma de muestras y el procesado de las mismas siguieron el mismo protocolo descrito en la primera fase del estudio.

C. ANÁLISIS DE LOS DATOS

C.1. VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables que se han empleado en este estudio son las siguientes:

- Enfermedad periodontal (Sano/Gingivitis/Periodontitis): siguiendo los criterios anteriormente citados.
- Genotipo de *fimA* de *P. gingivalis* (Ausencia/Presencia de las 6 variantes de *fimA*: I, II, III, IV, V y Ib)
- *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* y el Complejo rojo de Socransky (Ausencia/Presencia)
- Profundidad de sondaje (mm).
- Sangrado gingival: como el porcentaje de superficies con sangrado tras el sondaje.
- Gingivitis (Sí/No): como aquellos pacientes sanos con un porcentaje de sangrado superior al 30%.
- Placa dental: como el porcentaje de superficies de exploración que presentan placa dental supragingival.
- Tabaco: se distinguen tres categorías (fumador actual/ex fumador/no fumador).
- Edad: medida en años.
- Sexo (Hombre/Mujer).
- Bacteria₀/Genotipo₀/Complejo rojo₀: Presencia de la bacteria, del genotipo *fimA* de *P. gingivalis* o del Complejo rojo de Socransky en la toma de muestras realizada en la primera exploración (1ª fase del estudio).
- Bacteria₁ /Genotipo₁ /Complejo rojo₁: Presencia de la bacteria (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* o *Tannerella forsythia*), del genotipo *fimA* de *P. gingivalis* (I-V o Ib) o del Complejo rojo de Socransky en la toma de muestras realizada en la segunda exploración (2ª fase del estudio)
- Tratamiento periodontal en el periodo de seguimiento (ninguno/ detartraje esporádico/ mantenimiento periodontal constante)

- Evolución periodontal estable o favorable: Pacientes cuya condición periodontal en la segunda exploración era la misma o mejor que en la primera exploración.
- Evolución periodontal desfavorable: Pacientes que de la primera a la segunda exploración habían pasado del grupo de Sanos a Gingivitis o Periodontitis y aquellos pacientes que inicialmente ya eran enfermos periodontales y cuya profundidad de bolsa había aumentado en el periodo de seguimiento.

C.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La recogida de los datos se realizó en las fichas diseñadas para este fin en formato papel (Anexos 3 y 4). Posteriormente se almacenaron en una base de datos protegida diseñada en el programa Access de Microsoft®. El análisis de los datos se ha realizado mediante el programa estadístico SPSS 19.0.

Estadística descriptiva(Análisis univariante)

Se obtuvo las medias para las variables cuantitativas y las prevalencias para las variables dicotómicas u ordinales. Además se determinó los intervalos de confianza del 95%.

Análisis bivalente

En la estadística bivalente se estudió la relación entre las variables mediante el test Chi cuadrado y el test de tendencia lineal. El nivel de significación se estableció en un valor $p < 0,05$. Para la comparación de medias se utilizó el test t de Student y el test Anova.

Análisis multivariante

Se realizó un modelo de regresión logística con el método Adelante condicional.

RESULTADOS

RESULTADOS

1ª FASE DEL ESTUDIO

En la primera fase del estudio fueron explorados un total de 114 pacientes, de los cuales 60 se incluyeron en el grupo de pacientes “sanos”, 17 en el grupo de pacientes con “gingivitis” y 37 pacientes en el grupo de “periodontitis”. En la tabla 1 se muestra la distribución de los mismos según la edad, el consumo de tabaco en la exploración inicial y el sexo en los tres grupos. Los test estadísticos muestran que no hay diferencias significativas entre los grupos.

		Sanos n=60	Gingivitis n=17	Periodontitis n=37	Total n=114	
Edad (años)		39,34	35,15	41,39	39,38	Test Anova p=0,083
Tabaco	No fumador	23 38,3%	6 35,3%	7 18,9%	36 31,6%	Test Chi ² p=0,239
	Ex fumador	20 33,3%	5 29,4%	12 32,4%	37 32,5%	
	Fumador	17 28,3%	6 35,3%	18 48,6%	41 36%	
Sexo	Hombre	25 41,7%	5 29,4%	21 56,8%	51 44,7%	Test Chi ² p=0,135
	Mujer	35 58,3%	12 70,6%	16 43,2%	63 55,3%	

Tabla 1. Características sociodemográficas de la muestra inicial

En la tabla 2 podemos observar los parámetros clínicos: índice de placa, índice de sangrado y profundidad de sondaje, registrados por grupos. Para el análisis estadístico se realizó un test Anova y para determinar las diferencias entre los tres grupos se hizo una prueba Post Hoc con la corrección de Bonferroni. En el índice de placa encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de sanos y los grupos de gingivitis y periodontitis.

RESULTADOS

En el índice de sangrado las diferencias son significativas en los tres grupos entre sí, mientras que en la profundidad de sondaje en milímetros se han observado diferencias entre el grupo de pacientes con periodontitis y los otros dos grupos.

	Grupo 1 Sanos n=60	Grupo 2 Gingivitis n=17	Grupo 3 Periodontitis n=37	Test Anova	Prueba Post Hoc Corrección Bonferroni p<0,05
Índice de placa (%)	12,35 (9,42-15,28)	30,65 (18,83-42,46)	26,59 (20,64-32,55)	p=0,000	Grupo 1 vs 2 Grupo 1 vs 3
Índice de sangrado (%)	12,15 (10,02-14,28)	47,76 (39,87-55,66)	33,86 (26,54-41,19)	p=0,000	Grupo 1 vs 2 Grupo 1 vs 3 Grupo 2 vs 3
Profundidad de sondaje (mm)	1,83 (1,72-1,95)	1,94 (1,60-2,28)	5,68 (5,21-6,14)	p=0,000	Grupo 1 vs 3 Grupo 2 vs 3

Tabla 2. Características clínicas de la muestra inicial

La prevalencia de las cuatro bacterias estudiadas y de los 6 genotipos *fimA* de *P gingivalis* se muestra en la tabla 3. Tras la realización de un test χ^2 se observan diferencias significativas entre los tres grupos para las cuatro bacterias y el Complejo rojo de Socransky. También se hallaron dichas diferencias en los genotipos *fimA* II, III y Ib de *P gingivalis*. Cabe destacar que el genotipo *fimA* V no fue detectado en ningún paciente.

En esta tabla también se muestra las bacterias y genotipos *fimA* que presentan una tendencia lineal significativa, de manera que su prevalencia aumenta según empeora la condición periodontal. Esta tendencia lineal está también representada en el Gráfico 2.

RESULTADOS

	Sanos n=60	Gingivitis n=17	Periodontitis n=37
<i>P gingivalis</i> ^{1,2}	14 23,3% (14,4 - 35,4)	6 35,3% (17,3 - 58,7)	23 62,2% (46,1 - 75,9)
Genotipo <i>fimA</i> I	1 1,7% (0,3 - 8,9)	0 0% (0 - 18,4)	4 10,8% (4,3 - 24,7)
Genotipo <i>fimA</i> II ¹	11 18,3% (10,6 - 29,9)	1 5,9% (1 - 26,9)	13 35,1% (21,8 - 51,2)
Genotipo <i>fimA</i> III ^{1,2}	0 0% (0 - 6)	0 0% (0 - 18,4)	4 10,8% (4,3 - 24,7)
Genotipo <i>fimA</i> IV	6 10% (4,7 - 20,1)	5 29,4% (13,3 - 53,1)	6 16,2% (7,7 - 31,1)
Genotipo <i>fimA</i> V	0 0% (0 - 6)	0 0% (0 - 18,4)	0 0% (0 - 9,4)
Genotipo <i>fimAlb</i> ^{1,2}	0 0% (0 - 6)	0 0% (0 - 18,4)	3 8,1% (2,8 - 21,3)
<i>A actinomycetemcomitans</i> ^{1,2}	5 8,3% (3,6 - 18)	2 11,8% (3,3 - 34,3)	10 27% (15,4 - 43)
<i>T forsythia</i> ^{1,2}	13 21,7% (13,2 - 33,6)	10 58,8% (36 - 78,4)	29 78,4% (62,8 - 88,6)
<i>T denticola</i> ^{1,2}	8 13,3% (6,9 - 24,2)	3 17,6% (6,2 - 41)	21 56,8% (40,9 - 71,3)
Complejo rojo ^{1,2}	3 5% (1,7 - 13,7)	1 5,9% (1 - 26,9)	13 35,1% (21,8 - 51,2)
¹ Test Chi ² (p<0,05)			
² Test de tendencia lineal (p<0,05)			
Complejo rojo: asociación de <i>P gingivalis</i> , <i>T forsythia</i> y <i>T denticola</i>			

Tabla 3. Prevalencia de bacterias periodontopatógenas y de los genotipos *fimA* de *P gingivalis* en función del estado periodontal.

RESULTADOS

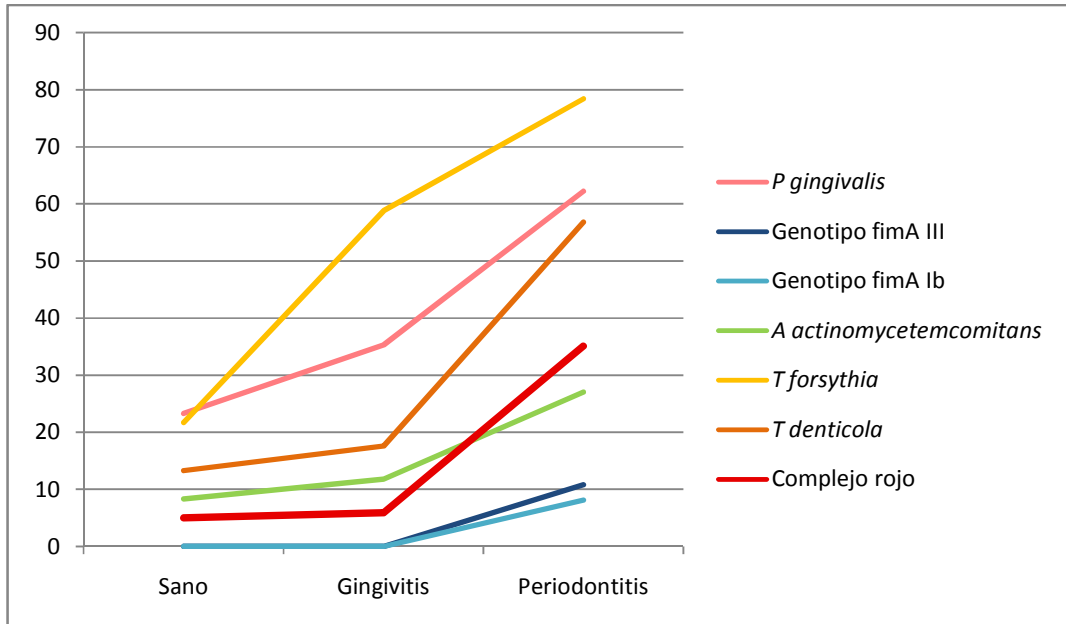


Gráfico 2. Tendencia lineal entre prevalencia de bacterias, genotipos *fimA* de *P gingivalis* y estado periodontal en la primera exploración.

En la tabla 4 se muestra la correlación de los genotipos *fimA* de *P gingivalis* y de las bacterias estudiadas entre sí. La correlación más fuerte es la encontrada entre los genotipos *fimA* I y Ib de *P gingivalis*. Otras asociaciones observadas son entre los genotipos *fimA* I y II, y los genotipos *fimA* II y Ib.

También se ha hallado una correlación positiva entre el genotipo *fimA* III de *P gingivalis* y la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. En cuanto a la asociación entre bacterias destaca la de *Treponema denticola* con *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* con *Tannerella forsythia*.

	<i>A actinomyce-temcomitans</i>	<i>T denticola</i>	<i>T forsythia</i>	<i>P gingivalis</i>	Genotipo <i>fimAlb</i>	Genotipo <i>fimA V</i>	Genotipo <i>fimA IV</i>	Genotipo <i>fimA III</i>	Genotipo <i>fimA II</i>	Genotipo <i>fimA I</i>
Genotipo <i>fimA I</i>	0,031	-0,038	0,148	0,275	0,768 **	-	-0,090	-0,041	0,301 *	
Genotipo <i>fimA II</i>	0,016	0,094	0,111	0,681	0,310 *	-	0,016	-0,101		
Genotipo <i>fimA III</i>	0,322 *	0,199	0,208	0,245	-0,031	-	-0,080			
Genotipo <i>fimA IV</i>	-0,106	0,232	0,012	0,538	-0,069	-				
Genotipo <i>fimA V</i>	-	-	-	-	-					
Genotipo <i>fimAlb</i>	-0,069	-0,103	0,180	0,211						
<i>P gingivalis</i>	0,081	0,319 *	0,196							
<i>T forsythia</i>	0,160	0,408 *								
<i>T denticola</i>	0,177									
<i>A actinomyce-temcomitans</i>										
* >0'3										
** >0'7										

Tabla 4. Correlaciones de Pearson de bacterias y genotipos *fimA* de *P gingivalis* entre sí

RESULTADOS

La influencia del tabaco en la composición de la placa subgingival de los pacientes se presenta en la tabla 5, que muestra la distribución de las cuatro bacterias estudiadas y del Complejo rojo en función de la condición de no fumador, ex fumador o fumador actual, independientemente del estado periodontal. La única bacteria que muestra diferencias estadísticamente significativas entre fumadores y no fumadores o exfumadores es *Treponema denticola*.

	No fumador n=36	Ex fumador n=37	Fumador n=41	Test Chi ²	Test de tendencia lineal
<i>P gingivalis</i>	11 30,6% (18 – 46,9)	13 35,1% (21,8 – 51,2)	19 46,3% (32,1 – 61,3)	p=0,335	p=0,152
<i>A actinomyce- temcomitans</i>	8 22,2% (11,7 – 38,1)	5 13,5% (5,9 – 28)	4 9,8% (3,9 – 22,5)	p=0,296	p=0,130
<i>T forsythia</i>	18 50% (34,5 - 65,5)	14 37,8% (24,1 – 53,9)	20 48,8% (34,3 – 63,5)	p=0,510	p=0,949
<i>T denticola</i> ¹	9 25% (13,8 – 41,1)	6 16,2% (7,7 – 31,1)	17 41,5% (27,8 – 56,6)	p=0,041	p=0,095
Complejo rojo	5 13,9% (6,1 – 28,7)	5 13,5% (5,9 – 28)	7 17,1% (8,5 – 31,3)	p=0,888	p=0,689
¹ Diferencias significativas en el test Chi ² (p<0,05)					

Tabla 5. Distribución de las bacterias en función de la exposición al tabaco

La tabla 6 muestra la distribución de los genotipos *fimA* de *P gingivalis* en función de la exposición al tabaco, independientemente de la condición periodontal de los pacientes. Tras la realización del test Chi² no se han hallado diferencias significativas para ninguno de los genotipos.

	No fumador n=36	Ex fumador n=37	Fumador n=41	Test Chi ²	Test de tendencia lineal
Genotipo <i>fimA</i> I	0 0% (0 – 9,6)	2 5,4% (1,5 – 17,7)	3 7,3% (2,5 – 19,4)	p=0,275	p=0,123
Genotipo <i>fimA</i> II	7 19,4% (9,8 – 35)	9 24,3% (13,4 – 40,1)	9 22% (12 – 36,7)	p=0,881	p=0,804
Genotipo <i>fimA</i> III	1 2,8% (0,5 – 14,2)	1 2,7% (0,5 – 13,8)	2 4,9% (1,3 – 16,1)	p=0,837	p=0,611
Genotipo <i>fimA</i> IV	4 11,1% (4,4 – 25,3)	4 10,8% (4,3 – 24,7)	9 22% (12 – 36,7)	p=0,286	p=0,175
Genotipo <i>fimA</i> V	0 0% (0 – 9,6)	0 0% (0 – 9,4)	0 0% (0 – 8,6)	-	-
Genotipo <i>fimA</i> Ib	0 0% (0 – 9,6)	1 2,7% (0,5 – 13,8)	2 4,9% (1,3 – 16,1)	p=0,410	p=0,185

Tabla 6. Distribución de los genotipos *fimA* de *P. gingivalis* en función de la exposición al tabaco

En la tabla 7 se muestran los porcentajes de superficies con placa supragingival, de superficies con sangrado y la profundidad de sondaje media en función de la presencia/ausencia de cada una de las bacterias, del Complejo rojo y de los genotipos *fimA* de *P. gingivalis*. Existen diferencias significativas para los tres parámetros clínicos tanto en el Complejo rojo de Socransky como para las tres bacterias que lo forman por separado. La única bacteria cuya presencia no muestra relación con ninguno de los indicadores clínicos estudiados es *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Si nos centramos en los genotipos *fimA* de *P. gingivalis* destaca la relación entre el genotipo III y la profundidad de sondaje y el genotipo IV con la presencia de placa y de sangrado.

RESULTADOS

		% superficies con placa	% superficies con sangrado	Profundidad de sondaje (mm)
Genotipo <i>fimA</i> I	Presente	21,40 (13,42- 29,38)	21,00 (1,66-40,34)	4,40 (1,98-6,82)
	Ausente	19,62 (16,24- 23,01)	24,67 (20,76- 28,58)	3,04 (2,66-3,42)
Genotipo <i>fimA</i> II	Presente	21,36 (14,02-28,70)	24,20 (16,85-31,55)	3,76 (2,91-4,61)
	Ausente	19,24 (15,55-22,92)	24,60 (20,15-29,04)	2,91 (2,50-3,32)
Genotipo <i>fimA</i> III	Presente	30,25 (-1,42-61,92)	28,50 (-16,14-73,14)	6,00** (2,33-9,67)
	Ausente	19,32 (16,03-22,60)	24,36 (20,55-28,18)	2,99 ** (2,63-3,35)
Genotipo <i>fimA</i> IV	Presente	31,29 * (19,58-43,01)	43,00 ** (28,80-57,20)	3,00 (1,94-4,06)
	Ausente	17,67 * (14,51-20,83)	21,27 ** (17,84-24,69)	3,11 (2,71-3,52)
Genotipo <i>fimA</i> V	Presente	-	-	-
	Ausente	19,70 (16,46-22,95)	24,51 (20,73-28,28)	3,10 (2,72-3,47)
Genotipo <i>fimAlb</i>	Presente	25,33 (13,59-37,07)	31,33 (10,21-52,46)	5,33 (3,90-6,77)
	Ausente	19,55 (16,22-22,88)	24,32 (20,46-28,19)	3,04 (2,66-3,41)
<i>P gingivalis</i>	Presente	25,51 ** (19,41-31,61)	30,40 * (23,13-37,66)	3,77* (3,11-4,43)
	Ausente	16,18 ** (12,63-19,74)	20,94 * (16,85-25,04)	2,69 * (2,26-3,12)
<i>A actinomyces-comitans</i>	Presente	19,12 (9,78-28,45)	25,12 (12,98-37,26)	4,18 (3,05-5,30)
	Ausente	19,80 (16,28-23,33)	24,40 (20,40-28,40)	2,91 (2,52-3,29)
<i>T forsythia</i>	Presente	27,52 ** (21,85-33,18)	33,62 ** (27,13-40,10)	4,15 ** (3,52-4,79)
	Ausente	13,15 ** (10,31-15,99)	16,87 ** (13,43-20,31)	2,21 ** (1,91-2,50)
<i>T denticola</i>	Presente	26,28 * (19,06-33,51)	34,06 ** (25,56-42,56)	4,59 ** (3,80-5,39)
	Ausente	17,13 * (13,66-20,60)	20,78 ** (16,88-24,68)	2,51 ** (2,16-2,86)
Complejo rojo	Presente	35,24 ** (23,34-47,13)	40,41 * (25,67-55,16)	4,94 ** (3,84-6,04)
	Ausente	16,98 ** (13,98-19,97)	21,72 * (18,25-25,20)	2,77 ** (2,41-3,14)
* p < 0,05; ** p < 0,01				

Tabla 7. Relación de bacterias y genotipos *fimA* de *P gingivalis* con la presencia de placa, sangrado y profundidad de sondaje bolsa

2ª FASE DEL ESTUDIO

El tiempo medio transcurrido entre la primera y la segunda exploración fue de 4,08 años. De los 114 individuos que fueron explorados inicialmente, se mantuvieron 90, lo que supone una pérdida del 21,1% de la muestra. La evolución de los grupos en este periodo de seguimiento se muestra en la tabla 8.

La mayoría de los pacientes permanecen en el mismo grupo que al comienzo del estudio. Únicamente 10 pacientes que inicialmente pertenecían al grupo de sanos evolucionaron a un estado clínico peor (8 de ellos al grupo de gingivitis y 2 a periodontitis). De los pacientes que inicialmente estaban en el grupo de gingivitis, 2 pacientes pasó al grupo de los sanos y otros 2 al de periodontitis. Todos los pacientes que en la primera exploración formaban parte del grupo de Periodontitis permanecieron en este grupo. La concordancia entre los estados inicial y final ha sido considerada alta según la escala de Landis y Koch (estadístico kappa = 0,722).

		Estado inicial (primera exploración)		
		Sanos n=58	Gingivitis n=12	Periodontitis n=20
Estado final (segunda exploración)	Sanos n=50	48 82,2% (71,1 – 90,4)	2 16,7% (1,5 – 35,4)	0 0% (0 – 17,8)
	Gingivitis n=16	8 13,8% (7,2 – 24,9)	8 66,7% (39,1 – 86,2)	0 0% (0 – 17,8)
	Periodontitis n=24	2 3,4% (1 – 11,7)	2 16,7% (1,5 – 35,4)	10 100% (82,2 – 100)

Tabla 8. Evolución de los grupos de estudio en el periodo de seguimiento.

RESULTADOS

La descripción de las características sociodemográficas de los tres grupos formados a partir de la segunda exploración clínica se presenta en la tabla 9. Los test estadísticos muestran nuevamente que no hay diferencias significativas en cuanto a la edad, sexo o consumo de tabaco en ninguno de los grupos.

		Sanos n=50	Gingivitis n=16	Periodontitis n=24	
Edad (años)		44,07	41,82	45,42	Test Anova p=0,529
Tabaco	No fumador	22 44%	6 37,5%	6 25%	Test Chi ² p=0,306
	Ex fumador	20 40%	8 50%	10 41,7%	
	Fumador	8 16%	2 12,5%	8 33,3%	
Sexo	Hombre	22 44%	6 37,5%	8 33,3%	Test Chi ² p=0,664
	Mujer	28 56%	10 62,5%	16 66,7%	

Tabla 9. Características sociodemográficas de la muestra final (n=90)

En estos pacientes se estudió cómo había variado la composición de la placa subgingival. La tabla 10 muestra la correlación de cada una de las bacterias, Complejo rojo y genotipos *fimA* de *P. gingivalis* al inicio y al final del estudio. Los que mostraron una mayor correlación fueron los genotipos I, II y IV, las bacterias *P. gingivalis*, *T. denticola* y el Complejo rojo.

	Correlación de Pearson	Valor p
Genotipo <i>fimA</i> I ₀ – genotipo <i>fimA</i> I ₁	P = 0,384 *	p < 0,01 **
Genotipo <i>fimA</i> II ₀ – genotipo <i>fimA</i> II ₁	P = 0,362 *	p < 0,01 **
Genotipo <i>fimA</i> III ₀ – genotipo <i>fimA</i> III ₁	P = -0,047	p = 0´659
Genotipo <i>fimA</i> IV ₀ – genotipo <i>fimA</i> IV ₁	P = 0,442 *	p < 0,01 **
<i>P gingivalis</i> ₀ – <i>P gingivalis</i> ₁	P = 0,312 *	p < 0,01 **
<i>T denticola</i> ₀ – <i>T denticola</i> ₁	P = 0,287	p < 0,01 **
<i>T forsythia</i> ₀ – <i>T forsythia</i> ₁	P = 0,134	p = 0,206
<i>A actinomycetemcomitans</i> ₀ – <i>A actinomycetemcomitans</i> ₁	P = -0,076	p = 0,475
Complejo rojo ₀ – Complejo rojo ₁	P = 0,469 *	p < 0,01 **
<p>0= Bacterias y genotipos en las muestras de placa tomadas en la primera exploración</p> <p>1 = Bacterias y genotipos en las muestras de placa tomadas en la segunda exploración</p> <p>*Pearson >0,3</p> <p>** p<0,01</p>		

Tabla 10. Correlación de bacterias y genotipos *fimA* de *P gingivalis* al inicio y al final del estudio.

En la tabla 11 se describe la prevalencia de las cuatro bacterias estudiadas y de los 6 genotipos *fimA* de *P gingivalis* de las muestras obtenidas en la segunda exploración. El test Chi² únicamente mostró diferencias significativas entre los tres grupos para la bacteria *P gingivalis*.

Sin embargo, el test de tendencia lineal sí que mostró un aumento progresivo de la presencia de *P gingivalis*, *T denticola* y el Complejo rojo de Socransky, así como del genotipo *fimA* Ib de *P gingivalis*, según empeora el estado periodontal. Estos resultados están descritos en la misma tabla y están representados en el gráfico 3.

RESULTADOS

	Sanos n=50	Gingivitis n=16	Periodontitis n=24
<i>P gingivalis</i> ^{1,2}	12 24% (14,3-37,4)	10 62,5% (38,6 – 81,5)	16 66,7% (46,7 – 82)
Genotipo <i>fimA</i> I	4 8% (3,2 - 18,8)	4 25% (10,2 - 49,5)	4 16,7% (6,7 – 35,9)
Genotipo <i>fimA</i> II	6 12% (5,6 - 23,8)	4 25% (10,2 - 49,5)	8 33,3% (18 – 53,3)
Genotipo <i>fimA</i> III	4 8% (3,2 - 18,8)	2 12,5% (3,5 – 36)	2 8,3% (3,2 – 25,8)
Genotipo <i>fimA</i> IV	4 8% (3,2 - 18,8)	6 37,5% (18,5 – 61,4)	4 16,7% (6,7 – 35,9)
Genotipo <i>fimA</i> V	0 0% (0 – 7,1)	0 0% (0 – 19,4)	0 0% (0 – 13,8)
Genotipo <i>fimAlb</i> ²	0 0% (0 – 7,1)	0 0% (0 – 19,4)	4 16,7% (6,7 – 35,9)
<i>A actinomycetemcomitans</i>	4 8% (3,2 - 18,8)	0 0% (0 – 19,4)	0 0% (0 – 13,8)
<i>T forsythia</i>	30 60% (46,2 – 72,4)	10 62,5% (38,6 – 81,5)	16 66,7% (46,7 – 82)
<i>T denticola</i> ²	12 24% (14,3-37,4)	6 37,5% (18,5 – 61,4)	14 58,3% (38,8 – 75,5)
Complejo rojo ²	4 8% (3,2 - 18,8)	4 25% (10,2 - 49,5)	10 41,7% (42,5 - 61,2)
¹ Test Chi ² (p<0,05) ² Test de tendencia lineal (p<0,05) Complejo rojo: asociación de <i>P gingivalis</i> , <i>T forsythia</i> y <i>T denticola</i>			

Tabla 11. Prevalencia de bacterias periodontopatógenas y de los genotipos *fimA* de *P gingivalis* en función del estado periodontal final.

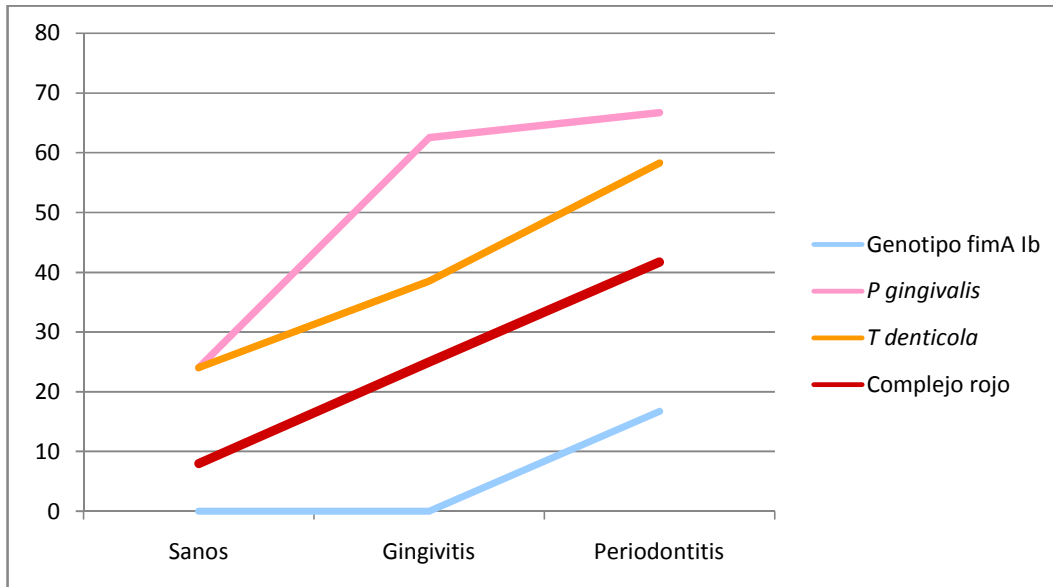


Gráfico 3. Tendencia lineal entre la prevalencia de bacterias, genotipos *fimA* de *P. gingivalis* y el estado periodontal final.

Para estudiar la posible relación entre la composición de la placa subgingival de los pacientes y la evolución clínica en los cuatro años de seguimiento, se clasificó a los 90 pacientes en dos grupos: un grupo denominado “Evolución periodontal estable o favorable” que incluía a los pacientes cuya condición periodontal era la misma o mejor que en la primera exploración y otro grupo denominado “Evolución periodontal desfavorable” formado por los pacientes que habían pasado de sanos a gingivitis o a periodontitis y pacientes que inicialmente ya eran enfermos periodontales y cuya profundidad de bolsa había aumentado en el periodo de seguimiento.

La tabla 12 muestra la prevalencia de las bacterias y genotipos *fimA* de *P. gingivalis* de la toma de muestras inicial (al comienzo del estudio) en los dos grupos anteriormente citados. Las bacterias que muestran diferencias estadísticamente significativas son *Porphyromonas gingivalis* y su genotipo *fimA* II, *T. forsyhia* y el Complejo Rojo. En esta tabla también se muestra el

RESULTADOS

Riesgo Relativo de las bacterias significativas, siendo las más altas la de *A actinomycetemcomitans* y el Complejo Rojo.

	Evolución periodontal estable o favorable n=68	Evolución periodontal desfavorable n=22	p-value	Riesgo Relativo
<i>P gingivalis</i> ¹	18 26,5% (17,4 – 38,0)	18 81,8% (61,4 – 92,7)	p=0,000	3,09 (1,61-5,94)
Genotipo <i>fimA</i> I	0 0% (0 – 5,3)	2 9,1% (2,5– 27,8)	p=0,058	-
Genotipo <i>fimA</i> II ¹	12 17,6% (10,3 – 28,4)	10 45,5% (26,9– 65,3)	p=0,008	2,57 (1,11-5,96)
Genotipo <i>fimA</i> III	0 0% (0 – 5,3)	2 9,1% (2,5 – 27,8)	p=0,058	-
Genotipo <i>fimA</i> IV	12 17,6% (10,3 – 28,4)	4 18,2% (7,3– 38,5)	p=0,955	1,03 (0,33-3,19)
<i>A actinomycetemcomitans</i>	4 5,9% (2,3– 14,2)	6 27,3% (13,1– 48,2)	p=0,012	4,63 (1,30-16,4)
<i>T forsythia</i> ¹	20 29,4% (19,9– 41,1)	14 63,6% (42,9 – 80,3)	p=0,004	2,16 (1,09-4,28)
<i>T denticola</i>	14 20,6% (12,6 – 31,6)	10 45,5% (26,9 – 65,3)	p=0,022	2,21 (0,98-4,97)
Complejo rojo ¹	6 8,8% (4,1 – 17,9)	8 36,4% (19,7 – 57,0)	p=0,005	4,12 (1,43-11,8)
¹ Diferencias significativas en el test Chi ² o test de Fisher (p<0,01) Complejo rojo: asociación de <i>P gingivalis</i> , <i>T forsythia</i> y <i>T denticola</i>				

Tabla 12. Prevalencia de bacterias periodontopatógenas y de los genotipos *fimA* de *P gingivalis* de la toma de muestras de placa subgingival en la primera exploración en los 90 pacientes que permanecieron en el estudio en función de la evolución periodontal durante el periodo de seguimiento.

Se realizó un análisis multivariante de regresión logística binaria con variable dependiente “Evolución periodontal desfavorable” y como variables independientes todas las variables que medían la presencia de bacterias o genotipo *fimA* de *P gingivalis* en la primera exploración, así como la edad, el sexo, el número de cigarrillos en los pacientes fumadores y el tratamiento periodontal recibido durante los cuatro años de seguimiento. El modelo final

resultó con variables significativas independientes: el genotipo *fimA* II de *P gingivalis* ($p=0,017$; $\text{Exp}\beta =3,84$), y *T forsythia* ($p=0,008$; $\text{Exp}\beta =4,16$). La prueba ómnibus del modelo fue significativa, con una $p=0,001$, y una R^2 de Nagelkerke de 0,212. La prueba de ajuste del modelo (Prueba de Hosmer y Lemeshow) obtuvo una $p=0.901$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN1. PREVALENCIA DE *Porphyromonas gingivalis* Y SUS GENOTIPOS *fimA*

Algunos autores definen la bacteria *Porphyromonas gingivalis* como uno de los principales agentes causales del inicio y la progresión de la enfermedad periodontal, capaz de establecerse subgingivalmente, interactuar con otras bacterias y colonizar los tejidos periodontales debido a la gran variedad de factores de virulencia que posee, entre los que se encuentran sus fimbrias (Lamont, Jenkinson 2000, Yoshimura et al. 2009).

Existen múltiples estudios que muestran una alta frecuencia de aparición de *Porphyromonas gingivalis* en la placa subgingival de pacientes con enfermedad periodontal, en un intervalo de 29,6 a 97,5%. En el presente estudio se ha detectado la presencia de *P. gingivalis* en el 62,2% de los pacientes con periodontitis crónica. (Beikler et al. 2003, Missailidis et al. 2004, Miura et al. 2005, Zhao et al. 2007, Hayashi et al. 2012, Moon et al. 2013, Amano et al. 1999).

A pesar de que *P. gingivalis* es considerada una de las bacterias más vinculadas con la enfermedad periodontal, no aparece exclusivamente en pacientes con dicha enfermedad, sino que también está presente en la placa subgingival de pacientes periodontalmente sanos, aunque en un porcentaje menor que va del 1,5 al 57,8% según los estudios publicados (Missailidis et al. 2004, Miura et al. 2005, Zhao et al. 2007, Hayashi et al. 2012, Moon et al. 2013, Amano et al. 2000, Yang, Huang & Chou 2004). En el gráfico 4 se representan los porcentajes de presencia de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica y en pacientes sanos incluyendo el obtenido en el presente estudio: 23,3 %.

DISCUSIÓN

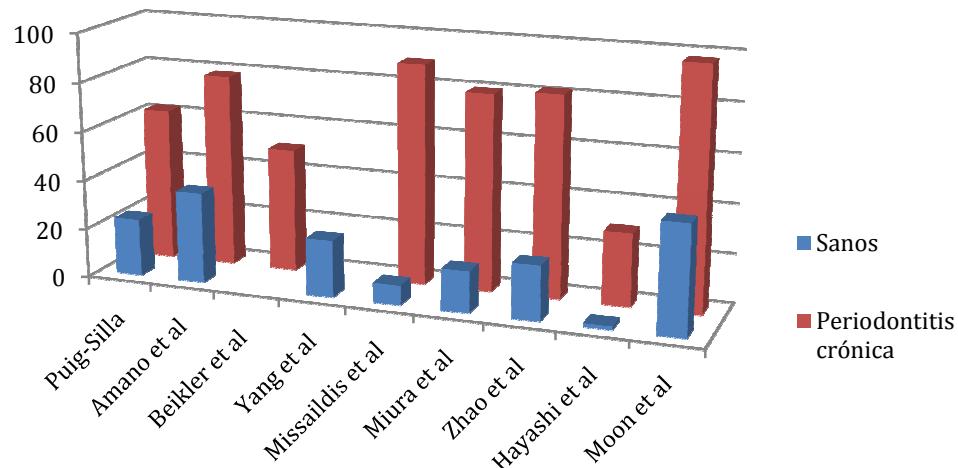


Gráfico 4. Presencia de *P. gingivalis* en pacientes sanos y pacientes con periodontitis crónica (en %).

En cuanto a la distribución de los genotipos *fimA* de *P. gingivalis* encontramos muchas variaciones en función de la población estudiada aunque sí existe un dato que se repite en todos ellos: la mayor prevalencia del genotipo *fimA* II en los pacientes con periodontitis crónica. Ya en los primeros estudios en los que se conocían los 6 genotipos, se atribuía al tipo II la relación más fuerte con la periodontitis (odds ratio 77,8) y el tipo Ib, que fue el último en identificarse también mostró una asociación con la progresión de la enfermedad aunque en menor grado (Nakagawa et al. 2002).

En el estudio realizado en Alemania se observó que el genotipo más prevalente en los pacientes periodontales es el II seguido del I y el IV (Beikler et al. 2003). Por su parte Missailidis et al. también hallaron el genotipo II como el más prevalente en los pacientes periodontales brasileños pero seguido del genotipo Ib (Missailidis et al. 2004). Moon et al. obtuvieron los mismos resultados: los genotipos II, Ib y IV fueron los más prevalentes en los pacientes con periodontitis, aunque fue el genotipo *fimA* Ib el que mostró una correlación más significativa con la enfermedad periodontal (Moon et al. 2013).

En estudios realizados en pacientes asiáticos ocurre algo similar. Tanto en japoneses como en chinos el genotipo II es el más frecuente en pacientes con periodontitis crónica pero existen diferencias en la prevalencia del resto de genotipos. En el presente estudio también hemos determinado que el genotipo II es el más prevalente en el grupo de pacientes periodontales, seguido el genotipo IV. Este resultado es similar al obtenido por Zhao et al (Zhao et al. 2007) y diferente al obtenido en otras poblaciones. Si comparamos la frecuencia de aparición de los genotipos de los pacientes con periodontitis con los de los pacientes sanos y los pacientes con gingivitis, las diferencias estadísticamente significativas se encuentran en los genotipos II, III y Ib.

Cabe destacar que no se ha observado la presencia del genotipo V en ninguno de los pacientes explorados. Hay diversos estudios que tampoco hallaron este genotipo ni en pacientes sanos ni con enfermedad periodontal (Missailidis et al. 2004, Miura et al. 2005, Hayashi et al. 2012). Otros autores sí han detectado su presencia aunque con una frecuencia muy baja (del 3,2 al 16,7%) (Beikler et al. 2003, Zhao et al. 2007, Fabrizi et al. 2013).

Si nos centramos en el genotipo II en pacientes con periodontitis crónica en nuestro estudio se ha hallado una frecuencia de aparición del 35,1%, que es muy superior al observado en pacientes sanos. Este dato es muy similar al obtenido en otras poblaciones como la alemana (38.2%) (Beikler et al. 2003), la brasileña (39.3%) (Missailidis et al. 2004), la china (43.6%) (Zhao et al. 2007) y la japonesa (46.7%) (Miura et al. 2005). Otros estudios muestran valores más alejados ya sea por encima (67,3%) (Moon et al. 2013) o por debajo (29.1%) (Feng, Weinberg 2006). En éste último estudio, a pesar de hallarse el genotipo *fimA* II en un porcentaje muy inferior a los anteriores, cabe destacar que sigue siendo el genotipo más prevalente en enfermos periodontales. Estos datos se representan en el gráfico 5.

DISCUSIÓN

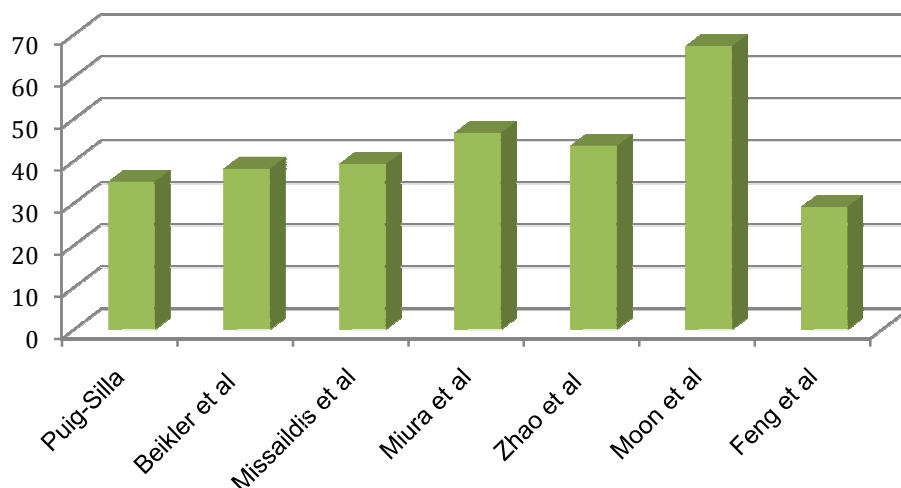


Gráfico 5. Presencia del genotipo *fimA* II de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis (en %)

La mayor virulencia del genotipo II ha sido estudiada por diversos autores que han encontrado que debido a su capacidad de adhesión e invasión es un determinante clave de la virulencia de *P. gingivalis* (Amano et al. 2004, Kato et al. 2007).

En el grupo de pacientes con gingivitis sólo se hallaron los genotipos *fimA* II y IV, que son los dos genotipos detectados con mayor frecuencia por Zhao et al. en todos los pacientes que presentaron sangrado gingival tras el sondaje (Zhao et al. 2007). Estos resultados difieren a los obtenidos por Fujise et al. que observaron que la presencia del genotipo I condicionaba una mayor presencia de sangrado tras el tratamiento de la periodontitis (Fujise et al. 2005).

Actualmente las variaciones en la distribución de los genotipos se atribuyen a las diferencias étnicas y geográficas (Missailidis et al. 2004, Zhao et al. 2007). De hecho existen estudios que muestran marcadas variaciones en la composición de la placa subgingival en pacientes con periodontitis crónica de distintos países en las mismas condiciones de edad, profundidad de bolsa, sexo y exposición al tabaco (Herrera et al. 2008, Haffajee et al. 2004, Lopez et al. 2004).

2. PREVALENCIA DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS Y DEL COMPLEJO ROJO DE SOCRANSKY

A pesar la diversidad de bacterias que podemos aislar en una misma bolsa periodontal (más de 40 especies), sólo unas pocas se asocian a enfermedad y han demostrado tener un claro papel etiológico. En el Workshop mundial de 1996 se llegó a la conclusión de que *P gingivalis*, *T forsythia*, *T denticola* y *A actinomycetemcomitans* son claves en la etiología de la enfermedad periodontal (Sanz et al. 2004).

P gingivalis, *T forsythia* y *T denticola* son las bacterias que forman el clásico “complejo rojo” descrito por Socransky et al (Socransky et al. 1998). Además existen estudios *in vitro* que han hallado relaciones sinérgicas entre algunas de ellas (Kuramitsu, Chen & Ikegami 2005).

De la misma forma que ocurría con *P gingivalis*, las bacterias *T forsythia*, *T denticola* y *A actinomycetemcomitans* están presentes tanto en pacientes sanos como en pacientes con enfermedad periodontal, pero en porcentajes muy diferentes.

A actinomycetemcomitans

En el presente estudio la prevalencia de esta bacteria en individuos sanos fue del 8,3%, en pacientes con gingivitis del 11,8% y de un 27% en pacientes periodontitis crónica, mostrando diferencias significativas entre los grupos y una tendencia lineal. La comparación de estos resultados con los obtenidos en otros estudios similares se muestra en el gráfico 6 (Miura et al. 2005, Zhao et al. 2007, Feng et al. 2014).

Cabe destacar que de las cuatro bacterias estudiadas ésta es la que aparece con menor frecuencia, tanto en las personas sanas como en los pacientes periodontales (en torno al 30%), incluso en estudios realizados en personas con periodontitis agresiva (Feng et al. 2014). En el estudio realizado por Wara-aswapati et al obtuvieron una alta frecuencia de aparición de las tres

DISCUSIÓN

bacterias del Complejo rojo en el grupo de pacientes con periodontitis moderada a severa, mientras que *A actinomycetemcomitans* sólo se halló en el 35% de los pacientes (Wara-aswapati et al. 2009).

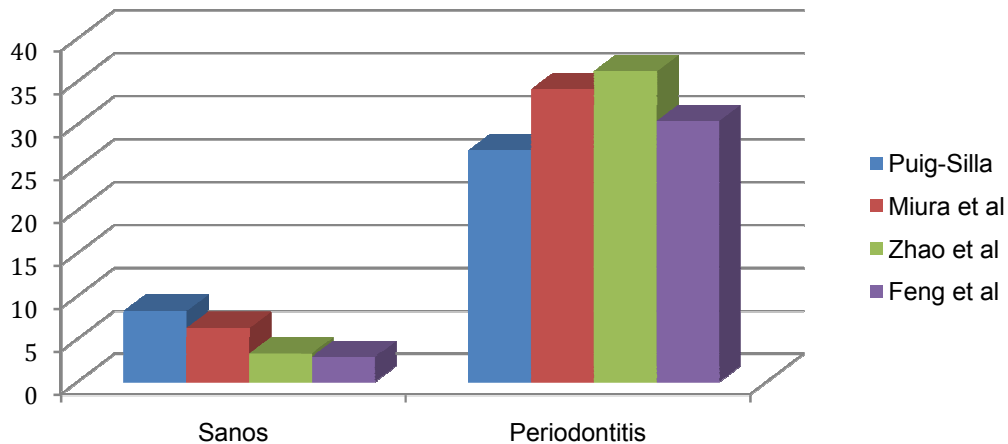


Gráfico 6. Presencia de *A actinomycetemcomitans* en pacientes sanos y pacientes con enfermedad periodontal (en %).

Además *A actinomycetemcomitans* es la única de las cuatro bacterias cuya presencia no ha mostrado influir en los parámetros clínicos (índice de placa, índice de sangrado y profundidad de bolsa).

T forsythia

Esta bacteria es, de las cuatro estudiadas, la que más se ha detectado en los pacientes con periodontitis crónica con una prevalencia del 78´4%. El gráfico 7 muestra los porcentajes de *T forsythia* obtenidos en diversos estudios tanto en personas sanas como en pacientes con periodontitis (Miura et al. 2005, Zhao et al. 2007, Feng et al. 2014).

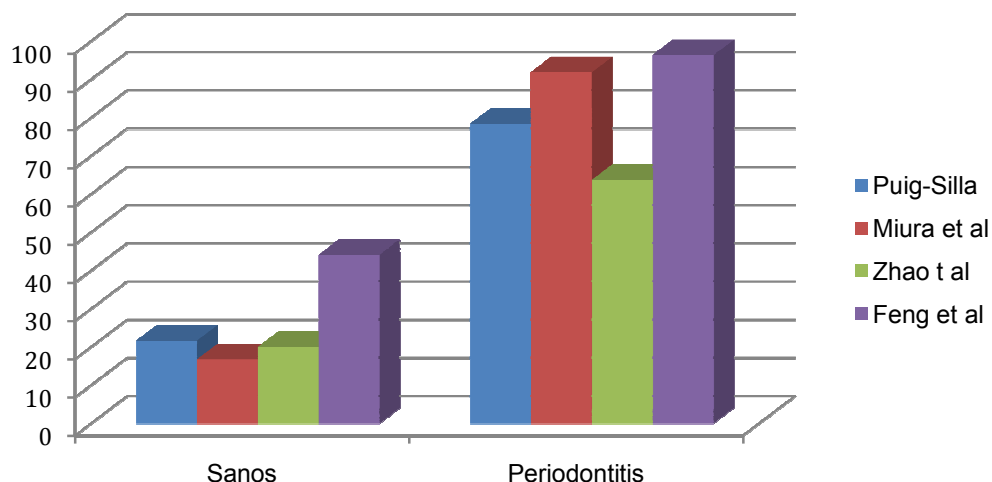


Gráfico 7. Presencia de *T forsythia* en pacientes sanos y pacientes con enfermedad periodontal (en %).

T denticola

De las tres bacterias que forman el Complejo rojo de Socransky, *T denticola* es la bacteria menos estudiada. Como ocurría con las anteriores, hemos encontrado diferencias significativas de su prevalencia en los tres grupos (sanos 13,3%, gingivitis 17,6% y periodontitis 56,8%), de manera que esta prevalencia aumenta según empeora el estado periodontal.

Al comparar estos datos por los obtenidos en un estudio muy reciente (Feng et al. 2014) observamos que los valores difieren considerablemente. Feng et al obtuvieron prevalencias muy superiores tanto en los individuos sanos (35,5%) como en los pacientes con enfermedad periodontal (96,4%). Esta diferencia puede atribuirse a ese estudio se realizó con pacientes con periodontitis agresiva, y el nuestro fue sobre pacientes con periodontitis crónica.

Complejo rojo de Socransky

Ya hemos visto que la presencia de *P gingivalis*, *T forsythia* y *T denticola* por separado es significativamente mayor en los pacientes con periodontitis crónica, respecto a los pacientes sanos o con gingivitis. Además hemos

DISCUSIÓN

estudiado la asociación de estas tres bacterias y en más de un tercio de los enfermos periodontales se hallan las tres simultáneamente en la misma bolsa (prevalencia del 35,1%). Únicamente en el 5% de los individuos sanos y en el 5,9% de los pacientes con gingivitis se detectó la presencia del Complejo rojo.

Otro dato a tener en cuenta es que la asociación de estas tres bacterias asciende de forma lineal según va empeorando la condición periodontal. También en la población tailandesa se encontró una asociación significativa del Complejo rojo con la severidad de la enfermedad (Wara-aswapati et al. 2009).

3. RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE TABACO Y LA COMPOSICIÓN DE PLACA SUBGINGIVAL

Es complicado cuantificar el efecto del tabaco en la enfermedad periodontal ya que existe diversas formas de medir su progresión (profundidad de bolsa, pérdida de inserción, pérdida de hueso...), pero existen diversos estudios que llegan a la misma conclusión: el tabaco afecta negativamente el estado periodontal. Se ha demostrado que la enfermedad periodontal se inicia antes en los pacientes fumadores y que tanto la cantidad de tabaco que se consume diariamente como el número de años que se ha mantenido el hábito, se relaciona con la pérdida de dientes (Casals 2013).

Existen en la bibliografía investigaciones sobre la relación entre el consumo del tabaco y la respuesta del sistema inmunitario del paciente con enfermedad periodontal. Diversos estudios concluyen que el tabaco modifica la respuesta inflamatoria e inmunitaria del huésped, afectando de diferentes formas a sus células de defensa (Apatzidou, Riggio & Kinane 2005, Palmer 2005).

En nuestro caso buscamos conocer la influencia del tabaco en la composición de la placa bacteriana subgingival. No hemos hallado diferencias en la distribución de los genotipos *fimA* de *P gingivalis* al comparar los pacientes fumadores con los exfumadores y los no fumadores. Existen estudios

previos que no hallaron diferencias entre la cantidad de *P. gingivalis* obtenida en muestras de placa subgingival de fumadores y no-fumadores (Gomes et al. 2006, Teixeira et al. 2009).

En cuanto a la relación del consumo de tabaco y las bacterias estudiadas, sí se observó diferencias significativas en la prevalencia de *T denticola* de pacientes fumadores, respecto a los ex fumadores y no fumadores. Haffajee & Socransky detectaron una prevalencia mayor de determinadas bacterias como *P gingivalis* y *T denticola* en pacientes fumadores que en los ex fumadores o en no fumadores (Haffajee, Socransky 2001).

En cualquier caso no existe mucha bibliografía al respecto que permita afirmar que el consumo de tabaco influya en la composición de la placa subgingival de los pacientes.

4. ESTUDIOS LONGITUDINALES Y PÉRDIDA DE MUESTRA

Un estudio longitudinal es aquel que recoge datos sobre un grupo de sujetos, siempre los mismos (la muestra), en distintos momentos a lo largo del tiempo. Al realizar este estudio se buscó observar en una muestra inicial de pacientes con y sin enfermedad periodontal la influencia de determinadas bacterias periodontopatógenas sobre unos parámetros clínicos relacionados con el estado del periodonto.

La duración de un estudio longitudinal depende la naturaleza evolutiva de la enfermedad que se está estudiando. En este caso, al tratarse de periodontitis crónica, que es una enfermedad crónica pero de evolución lenta, se pensó un periodo de seguimiento de los pacientes de cuatro años. En un estudio de estas características el paso del tiempo provoca problemas ya que las personas cambian de domicilio, de teléfono de contacto, de circunstancias personales y se produce una pérdida de muestra que limita los resultados obtenidos en la segunda fase del estudio.

DISCUSIÓN

En este estudio los pacientes recibieron, tras la primera exploración, instrucciones de higiene oral y el tratamiento adecuado según su estado periodontal. Sin embargo, la mayor parte de los pacientes con enfermedad periodontal no acudieron a las sesiones de mantenimiento periodontal, únicamente dos sujetos con periodontitis asistieron a las revisiones y siguieron el tratamiento adecuado. Esta falta de tratamiento es llamativa, y se atribuye a que el raspado y alisado radicular no se encuentra entre las prestaciones del Sistema Nacional de Salud y es el paciente el que tiene que asumir los costes. Según la última Encuesta nacional de salud realizada por el Instituto nacional de estadística, más del 50% de los adultos de 25 a 54 años hace más de un año de su última visita al dentista y únicamente el 1% recibió tratamiento de las enfermedades de las encías en su última visita, siendo las revisiones, detartrajes, obturaciones y endodoncias los tratamientos más frecuentes (Instituto nacional de estadística 2013).

La mayor parte de los estudios longitudinales realizados sobre enfermedad periodontal tienen como objetivo ver la evolución de la misma aplicando un determinado tratamiento respecto a un grupo control o comparar dos tratamientos diferentes (Janatova et al. 2009, Jervoe-Storm et al. 2007, Soder, Nedlich & Jin 1999). Este estudio se limita a observar la progresión natural de la enfermedad y determinar el papel de las bacterias en dicha progresión.

En 2012 Nomura et al publicaron un estudio longitudinal cuyo objetivo fue determinar qué biomarcadores salivales y qué bacterias podían ser utilizados para predecir la progresión de la enfermedad periodontal. Las bacterias estudiadas fueron *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Tannerella forsythia*, y el periodo de seguimiento fue de 18 meses. Las bacterias que mostraron ser un predictor significativo de la progresión de la enfermedad periodontal fueron *P. gingivalis* y *P. intermedia*, aunque el nivel de predicción se mejora al combinar los niveles de *P. gingivalis* con el marcador alanina-aminotransferasa (Nomura et al. 2012). También en nuestro estudio la

presencia de *P. gingivalis* fue, junto con *T forsythia*, la que mostró incrementar el riesgo de progresión de la periodontitis.

En 2007 se publicó un estudio longitudinal sobre el papel de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el inicio de la periodontitis agresiva cuyos resultados sugieren que la presencia de dicha bacteria en niños con un periodonto sano sí puede servir como marcador de riesgo (Fine et al. 2007). Sin embargo es difícil comparar estos resultados con nuestro estudio ya que fue realizado en escolares de 11 a 17 años en los que se buscó la aparición de una periodontitis agresiva localizada y las bacterias que se relacionan con el inicio de la periodontitis crónica en adultos no son las mismas.

En cuanto a estudios longitudinales de la presencia de *genotipos fimA* de *P. gingivalis* encontramos el realizado por Fujise et al cuyo objetivo fue evaluar la influencia de los distintos genotipos en pacientes con periodontitis crónica que recibieron un tratamiento de raspado y alisado radicular. Los resultados mostraron el genotipo I como un predictor de sangrado tras el tratamiento (Fujise et al. 2005).

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola* son las bacterias más prevalentes en la placa subgingival de los pacientes con periodontitis crónica. *A. actinomycetemcomitans* únicamente ha sido detectada en el 27% de dichos pacientes.
2. El genotipo *fimA*III de *P. gingivalis* es el más prevalente en los pacientes con periodontitis.
3. La prevalencia de las bacterias *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, del Complejo rojo de Socransky y de los genotipos *fimA* II, III y Ib de *P. gingivalis* han mostrado diferencias significativas en pacientes con periodontitis crónica, pacientes con gingivitis y en adultos periodontalmente sanos.
4. La presencia de las bacterias *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, el Complejo rojo de Socransky y de los genotipos *fimA* III y Ib de *P. gingivalis* aumenta de forma lineal según empeora la condición periodontal.
5. Se ha observado una correlación positiva entre los genotipos *fimA* de *P. gingivalis* I-Ib, I-II y II-Ib, entre el genotipo *fimA* III de *P. gingivalis* y la bacteria *A. actinomycetemcomitans* y entre *T. denticola*-*P. gingivalis* y *T. denticola*-*T. forsythia*.
6. La única bacteria cuya presencia muestra diferencias significativas entre fumadores y no fumadores o exfumadores es *Treponema denticola*.
7. La presencia tanto del Complejo rojo de Socransky como de las tres bacterias que lo forman se relacionan con peores resultados en los índices de placa, de sangrado y profundidad de sondaje. El genotipo

CONCLUSIONES

fimA III se asocia a una mayor la profundidad de sondaje y el genotipo *fimA* IV con la presencia de placa y de sangrado.

8. La presencia de los genotipos I, II y IV, la bacteria *P. gingivalis* y el Complejo Rojo son los que han mostrado una mayor correlación entre la primera y la segunda toma de muestras de placa subgingival de los pacientes.
9. De todas las variables estudiadas, las que han mostrado significación en el análisis multivariante de regresión logística son el genotipo *fimA* II de *P. gingivalis* y *T. forsythia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agueda, A., Echeverria, A. & Manau, C. 2008, "Association between periodontitis in pregnancy and preterm or low birth weight: Review of the literature", *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, vol. 13, no. 9, pp. E609-15.
- Amano, A., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Akiyama, S., Morisaki, I. & Hamada, S. 2000, "Prevalence of specific genotypes of Porphyromonas gingivalis fimA and periodontal health status", *Journal of dental research*, vol. 79, no. 9, pp. 1664-1668.
- Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I. & Hamada, S. 1999, "Distribution of Porphyromonas gingivalis strains with fimA genotypes in periodontitis patients", *Journal of clinical microbiology*, vol. 37, no. 5, pp. 1426-1430.
- Amano, A., Nakagawa, I., Okahashi, N. & Hamada, N. 2004, "Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis", *Journal of periodontal research*, vol. 39, no. 2, pp. 136-142.
- Apatzidou, D.A., Riggio, M.P. & Kinane, D.F. 2005, "Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis", *Journal of clinical periodontology*, vol. 32, no. 9, pp. 973-983.
- Armitage, G.C. 1999, "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions", *Annals of Periodontology / The American Academy of Periodontology*, vol. 4, no. 1, pp. 1-6.
- Bahekar, A.A., Singh, S., Saha, S., Molnar, J. & Arora, R. 2007, "The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis", *American Heart Journal*, vol. 154, no. 5, pp. 830-837.
- Beikler, T., Peters, U., Prajaneh, S., Prior, K., Ehmke, B. & Flemmig, T.F. 2003, "Prevalence of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in Caucasians", *European journal of oral sciences*, vol. 111, no. 5, pp. 390-394.
- Bergstrom, J. 2004, "Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease", *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*, vol. 92, no. 1, pp. 1-8.
- Blaizot, A., Vergnes, J.N., Nuwwareh, S., Amar, J. & Sixou, M. 2009, "Periodontal diseases and cardiovascular events: meta-analysis of observational studies", *International dental journal*, vol. 59, no. 4, pp. 197-209.
- Boehm, T.K. & Scannapieco, F.A. 2007, "The epidemiology, consequences and management of periodontal disease in older adults", *Journal of the American Dental Association (1939)*, vol. 138 Suppl, pp. 26S-33S.
- Bostanci, N. & Belibasakis, G.N. 2012, "Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen", *FEMS microbiology letters*, vol. 333, no. 1, pp. 1-9.
- Carranza, F. & Newman, M. 1998, *Periodontología clínica*, 8ª ed. edn, McGraw-Hill Interamericana, México.

BIBLIOGRAFÍA

- Casals, E. 2013, "Tabaco y salud oral. Deshabitación del hábito tabáquico." in *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones.*, eds. E. Cuenca Sala & P. Baca García, 4ª edn, Elsevier Masson, Barcelona, pp. 219-230.
- Cesar Neto, J.B., Rosa, E.F., Pannuti, C.M. & Romito, G.A. 2012, "Smoking and periodontal tissues: a review", *Brazilian oral research*, vol. 26 Suppl 1, pp. 25-31.
- Chandad, F. & Mouton, C. 1995, "Antigenic, structural, and functional relationships between fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 of *Porphyromonas gingivalis*", *Infection and immunity*, vol. 63, no. 12, pp. 4755-4763.
- Chapple, I.L., Genco, R. & working group 2 of the joint EFP/AAP workshop 2013, "Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases", *Journal of periodontology*, vol. 84, no. 4 Suppl, pp. S106-12.
- Darveau, R.P. 2010, "Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis", *Nature reviews.Microbiology*, vol. 8, no. 7, pp. 481-490.
- Étienne, J. 2001, "Algunas técnicas generales de biología molecular." in *Bioquímica genética. Biología molecular.*, 1ª ed edn, Masson, SA, , pp. 353-370.
- Eustaquio Raga, M. 2008, *Estudio epidemiológico de salud oral de adultos. Comunidad Valenciana, 2006.*, 1ª ed. edn, Universitat de València, Serveis de publicacins.
- Fabrizi, S., Leon, R., Blanc, V., Herrera, D. & Sanz, M. 2013, "Variability of the fimA gene in *Porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis and non-periodontitis patients", *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, vol. 18, no. 1, pp. e100-5.
- Feng, X., Zhang, L., Xu, L., Meng, H., Lu, R., Chen, Z., Shi, D. & Wang, X. 2014, "Detection of eight periodontal microorganisms and distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in chinese patients with aggressive periodontitis", *Journal of periodontology*, vol. 85, no. 1, pp. 150-159.
- Feng, Z. & Weinberg, A. 2006, "Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues", *Periodontology 2000*, vol. 40, pp. 50-76.
- Fine, D.H., Markowitz, K., Furgang, D., Fairlie, K., Ferrandiz, J., Nasri, C., McKiernan, M. & Gunsolley, J. 2007, "Aggregatibacter actinomycetemcomitans and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents", *Journal of clinical microbiology*, vol. 45, no. 12, pp. 3859-3869.
- Fives-Taylor, P.M., Meyer, D.H., Mintz, K.P. & Brissette, C. 1999, "Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*", *Periodontology 2000*, vol. 20, pp. 136-167.

- Frederick, J.R., Sarkar, J., McDowell, J.V. & Marconi, R.T. 2011, "Molecular signaling mechanisms of the periopathogen, *Treponema denticola*", *Journal of dental research*, vol. 90, no. 10, pp. 1155-1163.
- Fujise, O., Miura, M., Hamachi, T. & Maeda, K. 2005, "Involvement of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotype in treatment outcome following non-surgical periodontal therapy", *Journal of periodontology*, vol. 76, no. 10, pp. 1661-1666.
- Gomes, S.C., Piccinin, F.B., Oppermann, R.V., Susin, C., Nonnenmacher, C.I., Mutters, R. & Marcantonio, R.A. 2006, "Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens", *Journal of periodontology*, vol. 77, no. 9, pp. 1483-1490.
- Haffajee, A.D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N.J. & Socransky, S.S. 2004, "Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations", *Journal of clinical periodontology*, vol. 31, no. 11, pp. 996-1002.
- Haffajee, A.D. & Socransky, S.S. 2001, "Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota", *Journal of clinical periodontology*, vol. 28, no. 5, pp. 377-388.
- Hayashi, F., Okada, M., Oda, Y., Kojima, T. & Kozai, K. 2012, "Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Japanese children", *Journal of oral science*, vol. 54, no. 1, pp. 77-83.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J.E. & Leon, R. 2008, "Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain", *Journal of clinical periodontology*, vol. 35, no. 2, pp. 106-113.
- Instituto nacional de estadística 2013, Encuesta nacional de salud 2011-2012. [Consulta: 1 abril 2015] Disponible: <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p419&file=inebase> [2013, 14 de marzo].
- Janatova, T., Najmanova, L., Neubauerova, L., Kyselkova, M., Novotna, G., Spizek, J., Janata, J. & Duskova, J. 2009, "Changes in the incidence of periodontal pathogens during long-term monitoring and after application of antibacterial drugs", *Folia microbiologica*, vol. 54, no. 5, pp. 429-435.
- Jenkins, W.M. & Papapanou, P.N. 2001, "Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents", *Periodontology 2000*, vol. 26, pp. 16-32.
- Jervoe-Storm, P.M., AlAhdab, H., Semaan, E., Fimmers, R. & Jepsen, S. 2007, "Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planing as monitored by real-time PCR", *Journal of clinical periodontology*, vol. 34, no. 2, pp. 156-163.
- Kato, T., Kawai, S., Nakano, K., Inaba, H., Kuboniwa, M., Nakagawa, I., Tsuda, K., Omori, H., Ooshima, T., Yoshimori, T. & Amano, A. 2007, "Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype", *Cellular microbiology*, vol. 9, no. 3, pp. 753-765.

BIBLIOGRAFÍA

- Khader, Y.S., Dauod, A.S., El-Qaderi, S.S., Alkafajei, A. & Batayha, W.Q. 2006, "Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis", *Journal of diabetes and its complications*, vol. 20, no. 1, pp. 59-68.
- Konopka, T. & Paradowska-Stolarz, A. 2012, "Periodontitis and risk of preterm birth and low birthweight--a meta-analysis", *Ginekologia polska*, vol. 83, no. 6, pp. 446-453.
- Kuramitsu, H.K., Chen, W. & Ikegami, A. 2005, "Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*", *Journal of periodontology*, vol. 76, no. 11 Suppl, pp. 2047-2051.
- Lalla, E. & Papapanou, P.N. 2011, "Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases", *Nature reviews.Endocrinology*, vol. 7, no. 12, pp. 738-748.
- Lamont, R.J. & Jenkinson, H.F. 2000, "Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*", *Oral microbiology and immunology*, vol. 15, no. 6, pp. 341-349.
- Liebana, J., Castillo, A.M. & Alvarez, M. 2004, "Periodontal diseases: microbiological considerations", *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, vol. 9 Suppl, pp. 82-91; 75-82.
- Llodra Calvo, J. 2012, "Encuesta de salud oral en España 2010", *RCOE*, vol. 17, no. 1, pp. 13-41.
- Llodra Calvo, J. 2005, "Distribución de las enfermedades orales. Tendencias epidemiológicas" in *Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones*, eds. E. Cuenca Sala & P. Baca García, 3ª edn, Elsevier Masson, Barcelona, pp. 371-382.
- Locker, D., Slade, G.D. & Murray, H. 1998, "Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review", *Periodontology 2000*, vol. 16, pp. 16-33.
- Lockhart, P.B., Bolger, A.F., Papapanou, P.N., Osinbowale, O., Trevisan, M., Levison, M.E., Taubert, K.A., Newburger, J.W., Gornik, H.L., Gewitz, M.H., Wilson, W.R., Smith, S.C., Jr, Baddour, L.M. & American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Peripheral Vascular Disease, and Council on Clinical Cardiology 2012, "Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association", *Circulation*, vol. 125, no. 20, pp. 2520-2544.
- Lopez, N.J., Socransky, S.S., Da Silva, I., Japlit, M.R. & Haffajee, A.D. 2004, "Subgingival microbiota of chilean patients with chronic periodontitis", *Journal of periodontology*, vol. 75, no. 5, pp. 717-725.
- Mandell, R.L. & Socransky, S.S. 1981, "A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis", *Journal of periodontology*, vol. 52, no. 10, pp. 593-598.

- Missailidis, C.G., Umeda, J.E., Ota-Tsuzuki, C., Anzai, D. & Mayer, M.P. 2004, "Distribution of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis in subjects with various periodontal conditions", *Oral microbiology and immunology*, vol. 19, no. 4, pp. 224-229.
- Miura, M., Hamachi, T., Fujise, O. & Maeda, K. 2005, "The prevalence and pathogenic differences of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in patients with aggressive periodontitis", *Journal of periodontal research*, vol. 40, no. 2, pp. 147-152.
- Moon, J.H., Herr, Y., Lee, H.W., Shin, S.I., Kim, C., Amano, A. & Lee, J.Y. 2013, "Genotype analysis of Porphyromonas gingivalis fimA in Korean adults using new primers", *Journal of medical microbiology*, vol. 62, no. Pt 9, pp. 1290-1294.
- Nakagawa, I., Amano, A., Ohara-Nemoto, Y., Endoh, N., Morisaki, I., Kimura, S., Kawabata, S. & Hamada, S. 2002, "Identification of a new variant of fimA gene of Porphyromonas gingivalis and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis", *Journal of periodontal research*, vol. 37, no. 6, pp. 425-432.
- Newman, M.G., Socransky, S.S., Savitt, E.D., Propas, D.A. & Crawford, A. 1976, "Studies of the microbiology of periodontosis", *Journal of periodontology*, vol. 47, no. 7, pp. 373-379.
- Nomura, Y., Shimada, Y., Hanada, N., Numabe, Y., Kamoi, K., Sato, T., Gomi, K., Arai, T., Inagaki, K., Fukuda, M., Noguchi, T. & Yoshie, H. 2012, "Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis", *Archives of Oral Biology*, vol. 57, no. 4, pp. 413-420.
- Norskov-Lauritsen, N. & Kilian, M. 2006, "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", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, no. Pt 9, pp. 2135-2146.
- Office of the Surgeon General (US) & Office on Smoking and Health (US) 2004,
- Olsen, I., Shah, H.N. & Gharbia, S.E. 1999, "Taxonomy and biochemical characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis", *Periodontology 2000*, vol. 20, pp. 14-52.
- Otomo-Corgel, J., Pucher, J.J., Rethman, M.P. & Reynolds, M.A. 2012, "State of the science: chronic periodontitis and systemic health", *The journal of evidence-based dental practice*, vol. 12, no. 3 Suppl, pp. 20-28.
- Palmer, R.M. 2005, "Should quit smoking interventions be the first part of initial periodontal therapy?", *Journal of clinical periodontology*, vol. 32, no. 8, pp. 867-868.
- Puig-Silla, M., Dasi-Fernandez, F., Montiel-Company, J.M. & Almerich-Silla, J.M. 2012, "Prevalence of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis and

BIBLIOGRAFÍA

- other periodontal bacteria in a Spanish population with chronic periodontitis", *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, vol. 17, no. 6, pp. e1047-53.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J.M. & Silva, A. 2004, "Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review", *Journal of clinical periodontology*, vol. 31, no. 12, pp. 1034-1047.
- Schulz, S., Machulla, H.K., Altermann, W., Klapproth, J., Zimmermann, U., Glaser, C., Kluttig, A., Stein, J., Schaller, H.G. & Reichert, S. 2008, "Genetic markers of tumour necrosis factor alpha in aggressive and chronic periodontitis", *Journal of clinical periodontology*, vol. 35, no. 6, pp. 493-500.
- Sela, M.N. 2001, "Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases", *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, vol. 12, no. 5, pp. 399-413.
- Sharma, A. 2010, "Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*", *Periodontology 2000*, vol. 54, no. 1, pp. 106-116.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. & Kent, R.L., Jr 1998, "Microbial complexes in subgingival plaque", *Journal of clinical periodontology*, vol. 25, no. 2, pp. 134-144.
- Soder, B., Nedlich, U. & Jin, L.J. 1999, "Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study", *Journal of periodontology*, vol. 70, no. 7, pp. 761-771.
- Suzuki, N., Yoneda, M. & Hirofuji, T. 2013, "Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis", *International journal of dentistry*, vol. 2013, pp. 587279.
- Tamura, M., Tokuda, M., Nagaoka, S. & Takada, H. 1992, "Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures", *Infection and immunity*, vol. 60, no. 11, pp. 4932-4937.
- Teixeira, S.R., Mattarazo, F., Feres, M., Figueiredo, L.C., de Faveri, M., Simionato, M.R. & Mayer, M.P. 2009, "Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis", *Journal of clinical periodontology*, vol. 36, no. 6, pp. 482-487.
- Travis, J., Pike, R., Imamura, T. & Potempa, J. 1997, "*Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis", *Journal of periodontal research*, vol. 32, no. 1 Pt 2, pp. 120-125.
- Wara-aswapati, N., Pitiphat, W., Chanchaimongkon, L., Taweechaisupapong, S., Boch, J.A. & Ishikawa, I. 2009, "Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population", *Oral diseases*, vol. 15, no. 5, pp. 354-359.

- Yang, H.W., Huang, Y.F. & Chou, M.Y. 2004, "Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects", *Journal of periodontology*, vol. 75, no. 8, pp. 1077-1083.
- Yoshimura, F., Murakami, Y., Nishikawa, K., Hasegawa, Y. & Kawaminami, S. 2009, "Surface components of Porphyromonas gingivalis", *Journal of periodontal research*, vol. 44, no. 1, pp. 1-12.
- Zeller, I., Hutcherson, J.A., Lamont, R.J., Demuth, D.R., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N. & Scott, D.A. 2013, "Altered Antigenic Profiling and Infectivity of Porphyromonas Gingivalis in Smokers and Non-Smokers With Periodontitis", *Journal of periodontology*, .
- Zhao, L., Wu, Y.F., Meng, S., Yang, H., OuYang, Y.L. & Zhou, X.D. 2007, "Prevalence of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status in Chinese adults", *Journal of periodontal research*, vol. 42, no. 6, pp. 511-517.

ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO



UNIVERSITAT ID VALÈNCIA

1. Naturaleza general y propósito de la investigación

Las enfermedades de las encías (gingivitis y periodontitis) afectan a un gran número de personas de todas las edades, y además están relacionadas con enfermedades generales como la diabetes, los partos prematuros y un mayor riesgo de accidentes cardiovasculares. En la boca hay un gran número de bacterias pero únicamente determinados tipos se relacionan con una evolución más agresiva de esta enfermedad.

El presente estudio tiene como finalidad conocer la frecuencia con la que se encuentran unos tipos determinados de bacterias en los tejidos que rodean al diente y relacionar su presencia con el estado de salud o enfermedad de las encías. Esta información nos ayudará a obtener un diagnóstico de la gravedad en estadios iniciales de la enfermedad y aplicar el tratamiento adecuado para detener su avance.

2. Procedimientos a los que acepta participar, riesgos, tiempo y esfuerzo requerido

Para ello, cada participante deberá informar acerca de su edad, las enfermedades que padece, la medicación que toma y si es o no fumador. Posteriormente se realizará una exploración completa de las encías, que incluye el grado de higiene, el sangrado de encías y la pérdida de hueso que rodea y sostiene los dientes. Por último se tomará una muestra de bacterias de la zona de encía que esté en peores condiciones para ser analizada y determinar los tipos de bacterias que presenta.

Tanto la exploración como la toma de muestras se harán bajo condiciones de estricta limpieza. En los procedimientos puede producirse un poco de dolor que desaparecerá sin tratamiento a los pocos segundos.

Los procedimientos citados se llevarán a cabo una única sesión, de una duración aproximada de 20 minutos.

3. Privacidad

Se garantiza la confidencialidad de la información obtenida. Cada participante será identificado con un código, y únicamente los investigadores principales tendrán acceso a los datos personales. Las muestras, una vez analizadas, serán destruidas en su totalidad. Si los resultados de este estudio son publicados, el participante no será identificado por el nombre.

4. Compensación

La exploración realizada es completamente gratuita y el estudio cubre los gastos derivados del análisis de las muestras. Usted no recibirá ningún

ANEXOS

beneficio económico por participar en este estudio y de igual manera no tendrá que incurrir en ningún gasto.

5. Participación voluntaria.

El participante es libre de retirarse cuando desee y es libre para rechazar su participación en cualquiera de los procedimientos sin que suponga ninguna penalización para él. Además tiene derecho de oposición, de rectificación y de cancelación de sus datos de acuerdo a la legislación vigente, así como su derecho a solicitar la retirada o destrucción de la muestra.

6. Firma del consentimiento

Usted recibirá una copia de este consentimiento que está firmando, donde encontrará la información que le permita contactar con el investigador para cualquier inquietud. Si desea recibir más información a cerca de la investigación puede contactar con la Dra. Miriam Puig Silla, en la Clínica Odontológica de la Universitat de València, al teléfono 963864142.

Yo, _____ una vez informado sobre el procedimiento que se llevará a cabo otorgo en forma libre mi consentimiento

SI NO

a la Dra. Miriam Puig Silla para la obtención de la muestra solicitada.

Hago constar que este documento ha sido leído y entendido por mí en su integridad, de manera libre y espontánea.

Valencia, a ___ de _____ de _____

Firma

ANEXO 2. CERTIFICADO DEL COMITÉ DE ÉTICA

VNIVERSITAT
D VALÈNCIA
Vicerectorat d'Investigació i Política Científica

D. Fernando A. Verdú Pascual, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, según consta en el acta de la reunión celebrada en el día de hoy, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

“Estudio de prevalencia de genotipos de fima de *Porphyromonas gingivalis* asociados a periodontitis crónica”, cuyo investigador principal es D. José Manuel Almerich Silla, informa favorablemente el mismo siempre que se respeten los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos, así como cumplir los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a veinticuatro de junio de 2008.



