



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“ASOCIACIONES BACTERIANAS DE PATÓGENOS
PUTATIVOS PRESENTES EN BOLSAS PERIODONTALES DE
MUJERES EMBARAZADAS Y NO EMBARAZADAS Y SU
POSIBLE RELACIÓN CON LA SEVERIDAD DE LA LESIÓN”**

TESISTA:

OD. MARÍA MATILDE USÍN

DIRECTOR:

PROF. DR. RICARDO PARODI

CÓRDOBA, 2009



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**Título: “Asociaciones bacterianas de patógenos putativos presentes en
bolsas periodontales de mujeres embarazadas y no embarazadas y su
posible relación con la severidad de la lesión”**

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Odontología

Od María Matilde Usín

Director: Prof. Dr. Ricardo Parodi

Director

Profesor Dr Ricardo J. Parodi

Comisión de Tesis

Profesora Dra. María Ester Esper

Profesor Dr. Luis A. Olmedo

Profesor Dr. Rubén Daniel Ruiz

ÍNDICE

I. Introducción	1
I.a- Microbiología periodontal: organización de las comunidades bacterianas	6
I.b- Embarazo y enfermedad periodontal	10
I.c- Diagnostico clínico y microbiológico de la enfermedad periodontal	11
II- OBJETIVOS	14
II.a- Objetivos generales	15
II.b- Objetivos específicos	15
III- MATERIALES Y MÉTODOS	15
III. a- Primera etapa: clínica	17
III.b- Segunda etapa: bacteriología	20
III.c- Tercera etapa: análisis estadístico	23
IV - RESULTADOS	25
V- DISCUSIÓN	42
VI- CONSLUSIONES	51
VII- RESUMENES	54
VIII- SUMARY	56
IX- BIBLIOGRAFÍA	59

I-Introducción

I- INTRODUCCIÓN

Las diferentes patologías que afectan tanto al periodonto marginal (encía marginal), como al periodonto de inserción (ligamento periodontal, cemento dental y hueso alveolar), tienen síntomas y signos clínicos comunes. La bolsa periodontal y la pérdida ósea alveolar son hallazgos clínicos y radiológicos que con diferencias de calidad y cantidad, están presentes en la gran mayoría de ellas.

En aquellos pacientes clínicamente libres de compromiso sistémico, el factor etiológico local de la lesión, está representado por un biofilm sub-gingival (Socransky y Haffajee, 1992). El desarrollo de la enfermedad dependerá de factores atribuibles a condiciones del huésped, de los microorganismos y del ambiente (Lisgarten, 1976). Algunos microorganismos poseen potencialidad patogénica, pero el hecho de que se produzca o no depende del equilibrio vs desequilibrio entre los mecanismos de virulencia del microorganismo y la resistencia del hospedador. La colonización de un microorganismo no implica enfermedad, sino que la instalación de la enfermedad infecciosa depende de la interacción, entre la capacidad de defensa del huésped, la virulencia del microorganismo y el ambiente (Moore y Moore, 1994).

Está ampliamente aceptado que la iniciación y progresión de las enfermedades periodontales dependen de la presencia de microorganismos capaces de causar enfermedad (Schenkein, 1999), no obstante, es de interés recordar que la bolsa periodontal infectada puede alojar a más de 500 especies microbianas, cada una con distinto potencial inductor de enfermedad (Haffajee y Socransky, 2000). Si bien, el nivel de conocimientos de la etiología y progresión de la enfermedad ha alcanzado un desarrollo ponderable, hasta el presente su diagnóstico clínico se determina por la profundidad de sondaje de las bolsas periodontales, la evaluación del nivel clínico de inserción perdida, y del punto de vista radiográfico, la estimación de la altura de hueso remanente. En la actualidad existen razones para pensar que las enfermedades periodontales son desencadenadas por un grupo definido de patógenos,

que actúan solos o asociados, con capacidad de aportar nutrientes y generar condiciones físico-ambientales necesarias para su supervivencia.

Entre las especies más estudiadas que participan en estos grupos, podemos mencionar:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromona gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Tannerella forsythensis* (*T. forsythensis*) y *Treponema denticola* (*T. denticola*) (Socransky y col, 1998). Se ha comprobado que estos microorganismos poseen significativos mecanismos de virulencia, que le permiten colonizar al huésped, multiplicarse en él y alterar sensible y negativamente su fisiología (Moore y Moore, 1994; Mayrand, 1985). Además, dichos gérmenes y sus subespecies tienen capacidad de diseminarse por el sistema circulatorio y afectar otros órganos (Socransky y Haffajee, 1992).

La destrucción ósea, responsable en definitiva de la pérdida del diente, es promovida por el proceso inflamatorio, inducido por el biofilm de placa dental, que estimula en mayor o menor medida la respuesta del huésped, produciendo citoquinas pro-inflamatorias como interleucina-1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) y los efectores adaptativos del sistema inmune (Socransky y Haffajee, 1992).

Gingivitis y periodontitis son consideradas infecciones oportunistas de la cavidad oral, producidas por placa bacteriana y controlada por la respuesta del huésped. A su vez, el hospedador puede presentar diversas condiciones sistémicas fisiológicas y patológicas que incrementarían el riesgo de generar enfermedad periodontal (Loe, 1965). Entre ellas, el embarazo, tiene un significativo impacto sobre muchos órganos del cuerpo incluyendo la cavidad bucal (Vittekk y col., 1982).

Durante el embarazo, algunas mujeres expresan encías inflamadas, edema, facilidad de sangrado y halitosis. Todo esto constituye un cuadro clínico que se denomina: gingivitis del embarazo

(Vittek y col, 1982). En la actualidad, se demostró que el embarazo *per se* no es capaz de iniciar cambios inflamatorios en la encía. La etiología de la gingivitis del embarazo se vincula con el biofilm, representado por la placa bacteriana, que se asienta en un huésped muy modificado por el componente hormonal. La presencia de placa, como irritante local, produce una exagerada respuesta inflamatoria gingival, la que podría explicarse, por la interacción entre la presencia de receptores de estrógenos y progesterona en la encía de las embarazadas y su afinidad por gérmenes probadamente capaces de iniciar y sostener un proceso inflamatorio en la encía. Diferentes autores demostraron que el embarazo puede actuar como un factor potenciador de la respuesta inflamatoria gingival, inducida por este biofilm (Loe y Silness, 1963; El-Ashiry y col., 1970; Offenbacher y col., 1998).

Varios estudios sugieren que el aumento de los niveles de hormonas sexuales en el tejido gingival representa un aporte nutricional para el desarrollo exacerbado de algunas especies bacterianas patógenas y en relación con ello, se ha observado un incremento en la población subgingival de bacterias Gram negativas anaeróbicas obligadas y facultativas responsables del aumento de la inflamación (Kornman y Loesche, 1980; Jensen y col, 1981).

Hugson, (1970) demostró que los niveles incrementados de progesterona favorecen el desarrollo de la **Prevotella intermedia**.

En la última década los investigadores han encontrado altos niveles séricos de IL-1 y TNF- α en pacientes con periodontitis severa y sugieren que la enfermedad periodontal induciría un incremento de estas citoquinas pro-inflamatorias (Socransky y col, 1998; Offenbacher y Zambon, 1996). De modo, que las bolsas periodontales infectadas podrían considerarse un reservorio tanto de microorganismos, como de sus productos tóxicos y sus mediadores inflamatorios (Haffajee y Socransky, 1994; Tanner y col, 1998; Torresyap y col, 2003).

Estudios más recientes han demostrado una asociación estrecha entre la enfermedad periodontal como factor de riesgo de algunas condiciones sistémicas, como por ejemplo embarazo, partos prematuros, niños de bajo peso al nacer, enfermedades cardiovasculares, etc. (Offenbacher y col, 1996)

Los estudios bacteriológicos más frecuentemente utilizados hasta el presente para analizar gérmenes asociados a la salud o enfermedad periodontal son la técnica de microscopia de campo oscuro y contraste de fases y el cultivo, aislamiento y tipificación bacteriana. Gracias a los avances en biología molecular, contamos con varias técnicas de diagnóstico, entre las cuales se impone la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Es un método rápido y confiable para reconocer bacterias y útil para estudiar asociaciones específicas de microorganismos, ya que muchos de ellos no pueden ser detectados por los métodos convencionales (Trans y Rudney, 1999; Van Winkelhoff y Winkel, 2005).

Si consideramos a la periodontitis como una infección que constituye un posible factor de riesgo para el desarrollo de severas patologías sistémicas que compromete la vida del paciente, el conocimiento y la revisión de la composición bacteriana de las bolsas periodontales conduciría a mejorar su diagnóstico, la aplicación de un tratamiento adecuado y su prevención, constituirían un aporte invaluable para la salud de la población.

Es por ello que nos propusimos estudiar la bacteriología de las bolsas periodontales de mujeres embarazadas y no embarazadas de un sector de nuestra comunidad y correlacionar los hallazgos bacteriológicos con el diagnóstico clínico, lo que nos permitirá recomendar estrategias terapéuticas y programas preventivos, para mejorar la calidad de vida de las personas.

La elevada prevalencia de las enfermedades gingivo-periodontales y su papel como factor de riesgo para condiciones sistémicas fisiológicas y patológicas de las personas, fueron los marcadores que motivaron el presente trabajo.

I.a- Microbiología periodontal: organización de las comunidades bacterianas

Existen evidencias que las enfermedades gingivo-periodontales han sido padecidas por la humanidad a través de los siglos. En investigaciones arqueológicas se observaron que una de las enfermedades prevalentes que padecieron los egipcios, 4000 años atrás, fue una forma de periodontitis supurativa crónica (Ruffer, 1921).

Gottlieb, (1928) realizó la primera descripción de periodontitis como entidad específica, en la que el factor sistémico jugaba un rol etiológico principal. Mayrand en 1985, describió a la Enfermedad Periodontal como una infección polimicrobiana y mixta y que algunas especies estimularían por sinergia, el potencial de virulencia de otros microorganismos capaces de producir la enfermedad.

Durante la última década se ha producido un gran avance en la determinación del papel que desempeñan las diversas especies bacterianas en la progresión de la enfermedad periodontal. Estas especies predominan en forma constante, en las biopelículas de las zonas con patología, incluso se hace referencia a ellas como agentes patógenos periodontales. Entre los microorganismos que se incluyen en este grupo están: **P. gingivalis**, **A. actinomycetemcomitans**, **T. forsythensis** y **T. denticola** (Trans y Rudney, 1999; Holt y Ebersole, 2005; Socransky y Haffajee, 2005).

Los estudios realizados por Socransky y col, han demostrado que, por lo general, muchas de estas especies se presentan conjuntamente en las biopelículas subgingivales (Socransky y col, 1998).

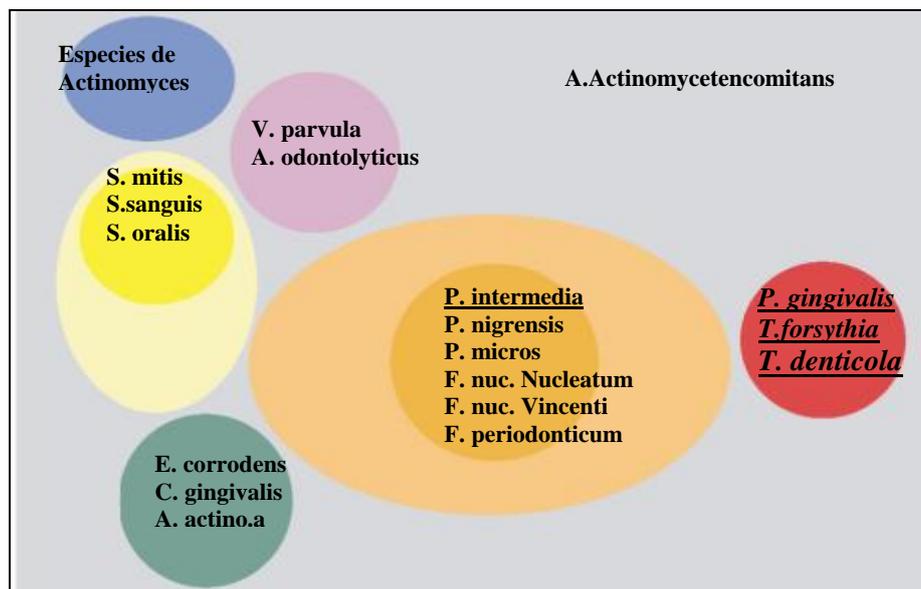


Figura 1: Representación en forma de diagrama de las relaciones entre las especies bacterianas dentro de los complejos microbianos y entre los complejos, descritos por Socransky (1998).

El grupo Rojo (***P. gingivalis***, ***T. forsythensis*** y ***T. denticola***) es considerado el complejo más significativo en la progresión de la enfermedad periodontal, dado que los miembros de este consorcio crecen en número e incidencia proporcional al aumentar los parámetros clínicos de enfermedad periodontal (Holt y Ebersole, 2005; Kolenbrander y col, 2002).

Hace más de dos décadas, Armitage (1982) fue de los primeros en establecer una relación entre el porcentaje de espiroquetas en las bolsas periodontales y las determinaciones clínicas de inflamación, como el aumento de la placa bacteriana y de exudado gingival, sangrado en el sondaje, profundidad de la bolsa periodontal y pérdida de inserción del tejido conectivo. Por lo tanto, es clave comprender las particularidades de las espiroquetas como patógenos oportunistas en su interacción con la compleja biopelícula periodontal.

En el año 1998 intentaron definir las asociaciones de especies que suceden, in vivo, en las biopelículas bacterianas subgingivales y observaron que en ellas deben producirse asociaciones de especies específicas, ya que éstas se producen regularmente en otros ecosistemas en la naturaleza (Socransky y col, 1998).

Se reconoció que cuando ciertas especies se detectaban en un sitio, era virtualmente seguro que otras especies también estuvieran allí. Esto se comprobó analizando los datos de más de 13.000 muestras de biopelícula subgingival procedentes de 185 individuos con diferentes estados de salud y enfermedad periodontal (Socransky y col, 1998). Las asociaciones entre todos los pares de especies fueron determinadas según diferentes coeficientes de semejanza y sometidas al análisis por grupos (clusters analysis). Estos resultados estadísticos reforzaron la hipótesis de que existían distintos complejos de microorganismos en las biopelículas subgingivales. Posteriormente, los datos fueron examinados con nuevos test más confiables. Los resultados de estos análisis confirmaron los complejos descritos por Socransky y sugieren una relación entre cada uno de los integrantes de la compleja comunidad de la biopelícula subgingival. Los complejos específicos están relacionados con su hábitat en términos de salud / enfermedad, las características clínicas locales y los antecedentes sistémicos del anfitrión (Socransky y col, 1998, 2005; Holt y Ebersole, 2005).

Las especies que constituyen los complejos también parecen estar distribuidas en diferentes regiones de la bolsa periodontal o el surco gingival.

La siguiente figura esta tomada de publicaciones de Kigure y col (1995) y Noiri y col (2000) y muestran las regiones del área subgingival que parecen estar enriquecidas por específicos complejos microbianos.

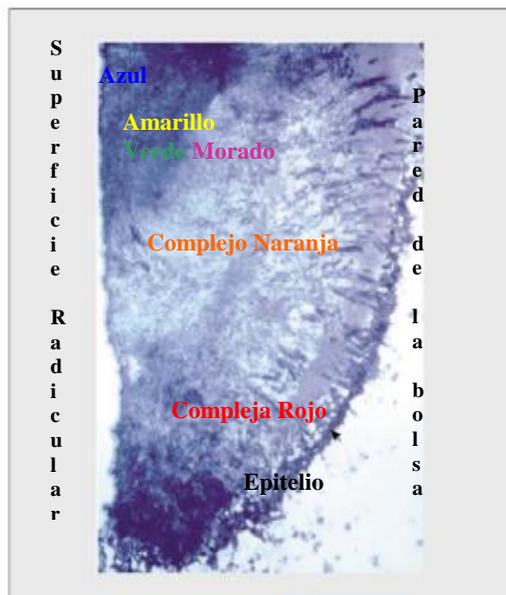


Figura 2: Sección histológica de placa bacteriana subgingival humana teñida con azul toluidina –azul de metileno.

La superficie del diente está a la izquierda, y el revestimiento epitelial de la bolsa periodontal, a la derecha. La placa bacteriana adherida a la superficie dentaria se aprecia hacia la parte superior derecha del corte, en tanto que puede observarse una segunda zona de microorganismos revistiendo la pared de la bolsa periodontal. (Kigure y col, 1995)

Durante más de 100 años, cada generación de microbiólogos a llegado a la misma conclusión: que la microbiota subgingival de los individuos con periodoncio sano difiere de la encontrada en los pacientes con periodontitis (Lisgarten y Heuden, 1978; Ramberg y col, 1995; Tarnner y col, 1998).

Hasta el momento, no cabe duda de que ciertas especies, como **P. gingivalis**, **T. forsythensis** y **T. denticola** pueden ser detectadas con mayor frecuencia en los individuos con periodontitis que en los sanos (Watarabe y Frommel, 1996; Yang y col, 2004).

Holt y col (2005), estudiaron 592 sujetos con periodontitis crónica, y observaron un cambio en la configuración de los perfiles microbianos, con el aumento de la gravedad de la enfermedad. Esta variación está particularmente determinada por las especies del complejo rojo, cuya cantidad se eleva a medida que aumenta la profundidad media de la bolsa periodontal. La profundidad de la bolsa de una zona guarda una estrecha relación con la composición de la microbiota subgingival. Entonces, dos factores parecen ser críticos: la **profundidad de la bolsa periodontal** y los **parámetros inflamatorios de la bolsa** (citoquinas proinflamatorias) (Socransky y Haffajee, 1991).

I. b- Embarazo y enfermedad Periodontal.

Durante el embarazo la cantidad de hormonas sexuales femeninas aumenta de forma notable, ya que la placenta comienza a producir estrógenos y progesterona. El nivel de progesterona se eleva a 100 ng/ml, 10 veces la cantidad que alcanza durante la fase lútea del ciclo menstrual y las concentraciones de estradiol en plasma se incrementan hasta 30 veces su valor normal al final del embarazo (Mariotti, 1999). Los estrógenos regulan la proliferación celular, la diferenciación y queratinización, estimulan sobre todo la proliferación de algunos órganos reproductores o relacionados con ellos, mientras que la progesterona influye sobre la permeabilidad capilar, produce dilatación y tortuosidad de la microvasculatura gingival, estasis circulatoria, favoreciendo la salida de fluido a los tejidos perivascuales, alterando la tasa y el patrón de producción de colágeno y el metabolismo de los folatos (Ganong, 1992).

En 1877 Pinard, registró el primer caso de gingivitis del embarazo. Numerosos estudios confirman, que entre el 30 y 100% de las embarazadas presentan gingivitis (Jensen y col, 1981; Cohen y col, 1971; Raber-Durlacher y col, 1994) que se caracteriza por eritema, edema, hiperplasia y aumento de la hemorragia gingival. El sector anterior de la cavidad bucal es el más afectado y los sitios interproximales tienden a estar alterados (Hugoson, 1970). Un mayor edema en los tejidos lleva a un aumento de la profundidad de sondaje y un incremento transitorio de la movilidad dentaria (Lindhe y Branemark, 1967; Moore y Moore, 2001). Estas manifestaciones clínicas de inflamación se acentúan a partir del 2do y 3er mes de embarazo por la superproducción de gonadotropinas coriónicas detectadas en sangre circulante y alcanzando su máximo en el 8vo mes, cuando los valores de estrógenos y progesterona son los más altos (Loe y Silness, 1963; Parodi y Dominguez, 1970).

Hugoson y col. (1970) explicaron que la dilatación de la microvasculatura gingival, es el resultado de los niveles incrementados de progesterona que favorece el filtrado de líquido intercelular

al tejido perivascular, modificando la calidad del flujo gingival. Otros autores (El-Ashiry y col, 1970), postulan que la respuesta inflamatoria es el resultado del aumento hormonal que produce alteración del metabolismo tisular, destrucción de los mastocitos gingivales y la liberación de histamina y de enzimas proteolíticas. Durante la gestación existe una depresión de la respuesta de los linfocitos T maternos que pueden ser considerados un factor de la respuesta hística alterada por la placa (O'Neil, 1979). Korman y Loesche (1980) observaron que la composición de la placa bacteriana subgingival, se modifica durante el embarazo. Postularon que microorganismos anaeróbicos, como *P. intermedia* pueden emplear hormonas ováricas como factor de crecimiento, reemplazando a la vitamina K y se cree que estos patógenos intervienen en el aumento de la tendencia a la hemorragia gingival.

I. c-Diagnóstico clínico y microbiológico de la enfermedad periodontal.

En medicina, la microbiología clínica se utiliza para el diagnóstico y la planificación del tratamiento. Existen diversas pruebas diagnósticas que pueden aplicarse en la evaluación de los pacientes con enfermedad periodontal. La técnica de campo oscuro nos brinda la posibilidad de estudiar la estructura y distribución de la flora microbiana, permite detectar la morfología y motilidad de los gérmenes hallados, pero no permite conocer si los mismos son aeróbicos o anaerobios (Lisgarten, 1976; Schenkein, 1999).

Las bacterias que pueblan la bolsa periodontal son variadas, pero solo unas pocas pueden ser cultivadas en vitro, aunque por procedimientos lentos y laboriosos. Desafortunadamente muchas bacterias y muy importantes por su capacidad patogénica, no se recuperan in vitro. En síntesis, estos métodos de laboratorios son tediosos, requieren mucho tiempo y los resultados no alcanzan a responder todas las preguntas que el problema plantea, tales como los microorganismos identificados

que expresan o no los mecanismos de virulencia que permitan asociarlos a la patología instalada.

En los últimos años, la biología molecular tuvo extraordinarios adelantos que constituyen los pilares del conocimiento de las ciencias biomédicas. Las nuevas técnicas de clonado y caracterización de genes han permitido la identificación de numerosos genes específicos de microorganismos infecciosos, abriendo una posibilidad interesante para el estudio de patógenos putativos periodontales.

En la actualidad existen varias técnicas biomoleculares, que permiten identificar microorganismos en forma rápida y eficiente. Una de ellas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La misma se basa en la amplificación de secuencias específicas de ADN, el cual puede ser detectado en ínfimas cantidades de material biológico (Ashimoto y col, 1996; Savit y col, 1990). La detección y tipificación de las bacterias periodontales estudiadas en bolsas de diferente profundidad, utilizando técnica de PCR fue descrita por Parodi (2001), Slots (1995) entre otros autores. Los datos revelan que los patógenos (*P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*) considerados responsables de la etiopatogénia de las enfermedades periodontales, se encuentran en mayor proporción en bolsas profundas, mientras que en las bolsas playas no son tan frecuentes.

Estas pruebas resultan especialmente útiles, en pacientes con periodontitis crónica o agresiva que no responden adecuadamente al tratamiento convencional mecánico. El análisis microbiológico brinda información que puede ayudar a los clínicos a elegir las estrategias de tratamiento más eficaces, pero no es necesario para diagnosticar la mera existencia de gingivitis o periodontitis.

Se ha demostrado que el tratamiento periodontal básico detiene la actividad de la enfermedad en la mayoría de los pacientes adultos con periodontitis crónica, en especial cuando se combina con adecuados cuidados de mantenimiento (Haffajee y Socransky, 2000). Pero en algunos casos, puede

producirse una escasa respuesta al tratamiento; en los que la enfermedad se denomina, periodontitis refractaria, o también en aquéllos con periodontitis agresiva.

Para algunos tipos de periodontitis, como la juvenil, la enfermedad puede reactivarse hasta en un 25 % de pacientes durante el año que sigue a la terapia activa (Mombelli y col, 1994). Se ha identificado *A. actinomycetemcomitans* como un factor de riesgo microbiano para la mala respuesta al tratamiento, y se asocia la persistencia del microorganismo con la recidiva de la enfermedad en la periodontitis juvenil localizada (Kiley y Host, 1980). La escasa respuesta al tratamiento en adultos con periodontitis se ha relacionado con algunas especies bacterianas, como la asociación de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythensis*, después del desbridamiento mecánico periodontal, no presentan mejoría en el sangrado al sondaje gingival, en la profundidad de las bolsas, y el nivel de inserción clínica (Shiloah y col, 1998; Slots y Ting, 1999).

También se ha hallado relación entre la pérdida activa de inserción periodontal en pacientes en mantenimiento y la persistencia de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*, entre otras (Albander y col, 1990; Tanner y col, 1984).

Los indicios disponibles muestran que ciertos complejos microbianos están asociados con una escasa respuesta al tratamiento y con la actividad de la enfermedad periodontal en curso o recurrente en pacientes susceptibles (Tanner y col, 1979). Los pacientes con periodontitis refractaria al tratamiento o con periodontitis agresivas, se pueden beneficiar del estudio microbiológico, al identificar la presencia y las concentraciones de las bacterias que pueden constituir el objetivo de un próximo tratamiento, en especial cuando se considera la terapia complementaria con antibióticos sistémicos (Socransky y col, 2002; Van Winkelhoff y Winkel, 2005).

II-Objetivos

II- OBJETIVOS

II. a- OBJETIVOS GENERALES

Identificar mediante la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (**A. actinomycetemcomitans**), *Porphyromona gingivalis* (**P. gingivalis**), *Prevotella intermedia* (**P. intermedis**), *Tannerella forsythensis* (**T. forsythensis**) y *Treponema denticola* (**T. denticola**), en bolsas periodontales de mujeres embarazadas y no embarazadas con cambios gingivales clínicos, que asisten al Hospital Materno Provincial de la Ciudad de Córdoba, a los efectos de correlacionar la presencia de dichos patógenos con la severidad de la enfermedad.

II. b- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar la presencia de los patógenos **P. gingivalis**, **A. actinomycetemcomitans**, **P. intermedia**, **T. forsythensis**, **T. denticola** en las bolsas periodontales de diferente profundidad con los diferentes trimestres del embarazo.
- Asociar la presencia de los patógenos identificados, en las bolsas de cada condición analizada, (gingivitis, periodontitis leve y grave) con el tipo de respuesta inflamatoria de la pared blanda.
- Relacionar la presencia de los patógenos putativos periodontales y sus asociaciones con los diferentes parámetros clínicos.
- Comparar los hallazgos en mujeres embarazadas, con los resultados encontrados en mujeres no embarazadas, portadoras de la misma condición periodontal.

III- Material

y Métodos

III- MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se dividió en tres etapas, una primera parte clínica, en la cuál se realizó el examen periodontal, diagnóstico clínico y recolección de las muestras bacteriológicas. La segunda etapa consistió en el procesamiento de la muestras en el laboratorio, detección y tipificación de los patógenos periodontales estudiados mediante técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Y por último con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico.

III. a-PRIMERA ETAPA: CLÍNICA

Se estudiaron 150 pacientes embarazadas de 18 a 40 años de edad, en diferentes estadios del embarazo, que concurrieron al Hospital Maternidad Provincial de la ciudad de Córdoba, para control ginecológico periódico. Además se tomaron muestras de 50 mujeres no embarazadas (grupo control) que no ingieran anticonceptivos orales. Todas las pacientes firmaron su aceptación de participar en el trabajo.

El criterio de selección incluyó pacientes que presentaban signos de inflamación gingival, no haber recibido tratamiento periodontal en los últimos dos años y ser sistémicamente sanas. El examen periodontal se realizó utilizando sonda periodontal (PerioWise) y consistió en evaluar, profundidad de sondaje de las bolsas periodontales (PS), nivel de inserción clínica (NIC), Índice de Placa de Silness y Løe e Índice Gingival de Løe y Silness (Tabla 1) y la característica clínica de la pared blanda de la bolsa. Según la consistencia de la pared blanda de la bolsa periodontal, se clasificaron como edematosa y no edematosas.

La profundidad de sondaje es la distancia presente desde el margen gingival hasta la profundidad de la bolsa periodontal, mientras que el nivel de inserción clínica se mide desde el límite amelocementario al fonde de la bolsa.

Tabla 1: Criterios aplicados para el estudio del Índice Gingival de Loe y Silnes e Índice de Placa de Silness y Loe.

INDICE GINGIVAL DE LOE Y SILNESS	INDICE DE PLACA DE SILNESS Y LOE
0 Encía normal, sin cambio de color, ni hemorragia	0 Ausencia de placa
1 Inflamación leve, ligero cambio de color, pequeña alteración de superficie. No hemorragia	1 Película fina de placa en el borde gingival, sólo reconocida frotando la sonda
2 Inflamación moderada, enrojecimiento, hinchazón, hemorragia al sondaje	2 Moderada cantidad de placa en el borde gingival y espacios interdentarios. Placa visible
3 Inflamación fuerte enrojecimiento intenso hinchazón hemorragia espontánea	3 Abundante placa en el borde gingival y espacios interdentarios Placa visible

Se seleccionaron bolsas periodontales de las caras proximales, mesiales y distales de elementos dentarios anteriores, superiores e inferiores y se las clasificaron según la profundidad de sondaje: 2–4 mm, 5–6 mm, y >7 mm, y de acuerdo a la pérdida del nivel de inserción clínica NIC 0, que se corresponde con diagnóstico de gingivitis; NIC 1 a 4 mm, periodontitis leve; y NIC mayor a 5 mm, equivalente a periodontitis grave.

La toma de las muestras de placa subgingival se realizó de acuerdo con la técnica propuesta por Slots en 1995, que se modificó con la confección de placas guías de acrílico termoformadas a partir de un modelo de yeso del paciente, cuya finalidad fue la de permitir la introducción de varias puntas de papel en el mismo sitio de la bolsa periodontal (Parodi y col, 2001).

En la primera consulta se seleccionó el sitio del elemento dentario donde luego se realizó la toma de la muestra, en primer lugar, se tomó impresión con alginato y se confecciona un modelo de yeso del paciente. Posteriormente, a partir del modelo, utilizando láminas flexibles de 0,6mm de espesor para Termoformadora Vacupres, se obtuvo una placa de acrílico que se recortó y perforó en los sitios elegidos para la toma de la muestra y se le realizó un canal que permitió la inserción de varios conos de papel con la misma angulación y en el mismo sitio de la bolsa periodontal.



Figura 3: Medición de la profundidad de la bolsa periodontal seleccionada para la toma de la muestra



Figura 4: Confección de placa guía de acrílico termoformada a partir del modelo de yeso del paciente

En la segunda sesión, previo a la toma de la muestra, con gasa estéril se eliminó la placa supragingival. A continuación se colocó la placa guía y se introdujo un cono de papel estéril N° 40 para eliminar las bacterias de los 2/3 superiores de la bolsa. Luego se introdujeron seis puntas de papel absorbente estéril N° 40 hasta la profundidad de la bolsa durante 15 segundos, con movimiento de cateterismo y se colocaron en un tubo Eppendorf (1,5ml) estéril para ser conservados a 4° C hasta su procesamiento.

Las muestras se clasificaron de acuerdo a la profundidad de la bolsa, al nivel de inserción clínica, según el trimestre del embarazo y de acuerdo a la consistencia de la encía.



Figura 5: colocación de la placa guía en la cavidad bucal

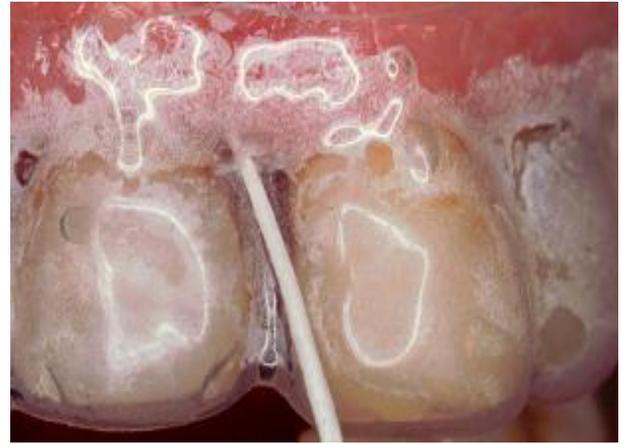


Figura 6: toma de la muestra con cono de papel estéril n° 40

III.b-SEGUNDA ETAPA: BACTERIOLÓGICA

1-Extracción del ADN: Se agregó 200µl de agua estéril a los tubos Eppendorf, que contenían los conos impregnados con material de la bolsa periodontal. Se incubó a 37° C durante 10 minutos y se centrifugó a 14.000 g durante 5 minutos. En el sobrenadante obtenido se verificó la presencia de ADN visualizado con luz ultravioleta, en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio.

2-Amplificación: Una vez confirmada la presencia de ADN en las muestras clínicas, en primer lugar se amplifica una secuencia específica y altamente conservado del gen 16S rRNA de 960 pb para identificar bacterias Gram negativas. El gen de 16S rRNA esta presente en todas las bacterias y es altamente conservado en las especies. La detección de esta secuencia por PCR es un método particularmente valioso para detectar microorganismos que no pueden ser cultivados o no fácilmente distinguibles en cultivo.

Se realizó PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar cada especie de periodontopatógenos de nuestro interés. A continuación se muestran las secuencias específicas de cada par de oligonucleótidos para cada especie y se indica el tamaño del fragmento producido por PCR.

Tabla 2: Tamaños de los productos amplificados en pares de bases (pb) para cada especie bacteriana

PATOGENO BACTERIANO	SECUENCIA ESPECIFICA DE PRIMERS PARA PCR (5'---3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO AMPLIFICADO en pb
Fragmento Universal	GATTAGCGAATGTGCTCATTACAT CCCGGGAACGTATTCACCG	960 pb
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC ATGCCAACTTGACGTTAAAT	557 pb
<i>T. forsythensis</i>	GCGTATGTAACCTGCCCGCA TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT	641 pb
<i>P. gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG ACTGTTAGCAACTACCGATGT	404 pb
<i>P. intermedia</i>	TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG TCAACATCTCTGTATCCTGCGT	575 pb
<i>T. denticola</i>	TAATACCGAATGTGCTCATTACAT TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA	316 pb

La reacción de amplificación se realizó con 10µl de DNA en 40µl de mezcla de reacción que contiene 5µl de buffer de PCR 10x , 25 mM (milimolar) de MgCl₂ (Promega), 1,25 U de Taq polimerasa (Promega), 0,2 mM de cada dNTPs (Pharmacia). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmers Cetus.

El perfil térmico de amplificación para *T. forsythensis*, *P.gingivalis* y *T.denticola* incluyó una desnaturalización inicial de 95 °C durante 2 min, seguidos por 36 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, etapa de complementaridad de primers a 60°C por 1 min y una extensión a 72 °C por 1 min con una extensión final de 72 °C por 2 min. El programa de temperaturas para *A.actinomycetemcomitans*, y *P.intermedia* incluyó una etapa inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 36 ciclos de 94 °C por 30s, 55 °C

de 1 min y 72 °C por 2 min y una etapa final de 72 °C por 10 min.

Cada muestra se realizó por duplicado y en cada reacción se agregó un tubo sin DNA como control negativo de la reacción y un tubo que contiene DNA de organismos aislados de cultivo donadas por el laboratorio de bacteriología del Hospital Reina Fabiola (Universidad Católica de Córdoba).

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,6 %. Se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz ultravioleta. Un marcador de tamaño molecular indica el tamaño del producto de amplificación en el gel (Perkin Elmers 100bp).

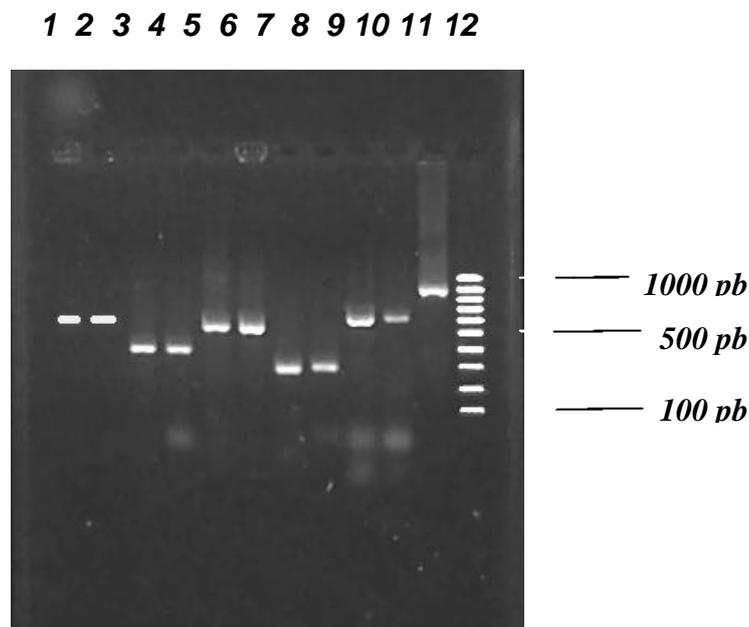


Figura 7: Gel de agarosa al 1,6% teñido con bromuro de etidio donde se observa los productos de amplificación obtenidos por PCR específicas de *P. intermedia* (Pi), *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *T. denticola* (Td), *P. gingivalis* (Pg) y *T. forsythensis* (Tf), en la línea 12 se ubica el marcador de peso molecular 100bp (PROMEGA). Línea 1 y 2 Pi; 3 y 4 Pg; 5 y 6 Aa; 7 y 8 Td; 9 y 10 Tf; línea 11: testigo positivo de bacterias Gram (-) (*Shigella flexneri*).

III. c-TERCERA ETAPA: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se analizaron con los siguientes métodos estadísticos.

1)-**Análisis de Agrupación:** Se analizaron de a pares de gérmenes (10 pares) y se registró el número de casos concordantes positivos (ambos gérmenes del par positivos), el número de casos concordantes negativos (ambos gérmenes del par ausentes) y el total de casos concordantes observados(positivos + negativos). El total de concordantes esperados por azar (en función de la prevalencia de los gérmenes en la muestra), el coeficiente kappa de concordancia no casual, el coeficiente Phi de la correlación nominal entre dos gérmenes (ausencia o presencia) y su significación estadística (p) que puede leerse como una medida de aproximación o distancia entre gérmenes.

2)-**Cluster Analysis para el análisis Jerárquico de Grupos:** a partir de los resultados anteriores, se realizó mediante el método binario de Sokal-Eneth transformado a una escala 0-100%, un **dendrograma** de similitud o aproximación de gérmenes. Esto permite una representación espacial del grado proximidad/distancia entre los gérmenes dentro de cada cluster y la distancia entre los distintos clusters.

3)-**Asociación univariada:** se estableció asociación univariada de cada uno de los gérmenes con un valor extremo de cada parámetro clínico de interés:

- ✓ Nivel de Inserción Clínica (NIC) se clasificó en mayor o igual a 5mm.
- ✓ Diagnóstico Clínico: Periodontitis Grave (se correlaciona con $NIC \geq 5mm$)
- ✓ Profundidad de sondaje (PS): mayor o igual a 6mm.
- ✓ Índice de Placa de Loe y Silness (IP): 2
- ✓ Índice Gingival de Silness y Loe (IG):2

Además se consideró la edad de la paciente y en el caso de las embarazadas el trimestre de gestación

4)-**Prueba de Pearson del Chi Cuadrado** para analizar la asociación de cada germen con el estado de interés de cada variable clínica. Se probó el incremento de la prevalencia de la enfermedad a través de la adición de factores de riesgo independientes (edad, trimestre de embarazo P gingivalis, T forsythensis, T denticola, A actinomycetemcomitans y P intermedia). Se estableció un valor Alfa de 5% (>0.05) para declarar significación estadística.

5)-**Odds Ratio crudo (OR) e Intervalo de confianza (IC: 95%)** respectivo, con aproximación al riesgo relativo de enfermedad en pacientes con versus sin el factor. Se entiende por enfermedad el contexto de cada parámetro clínico. El Odds Ratio puede interpretarse como la probabilidad de enfermedad cuando el factor de riesgo se halla presente en referencia a cuando está ausente.

6)-**Regresión Logística Múltiple:** se determina cuál es el peso o riesgo relativo de cada factor por sí solo e independiente del estado de los restantes. Para ello se ingresaron simultáneamente todos los factores a un modelo multivariado de riesgo, sin técnica de selección escalonada y de ese modo se estimó el **Odds Ratio ponderado o ajustado (ORp)** e intervalo de confianza (IC 95%). Se obtuvo una idea aproximada de cómo cambia el riesgo de enfermedad a medida que se suman o restan aritméticamente los factores de riesgo significativos (edad de la mujer, trimestre de gestación, P gingivalis, P intermedia, A actinomycetemcomitans, T forsythensis y T denticola).

IV-Resultados

IV- RESULTADOS

El análisis incluyó un total de 150 mujeres embarazadas y 50 no embarazadas que dieron su consentimiento firmado para participar en el proyecto de investigación. La edad promedio \pm desviación estándar en la muestra de mujeres embarazadas fue de 26 ± 5.7 (rango 16-38 años) y las no embarazadas fue de 27.6 ± 5.6 años (rango 17-36).

El 22% de las embarazadas tenían más de treinta años, y el 36% de las no embarazadas eran mayores de 30 años.

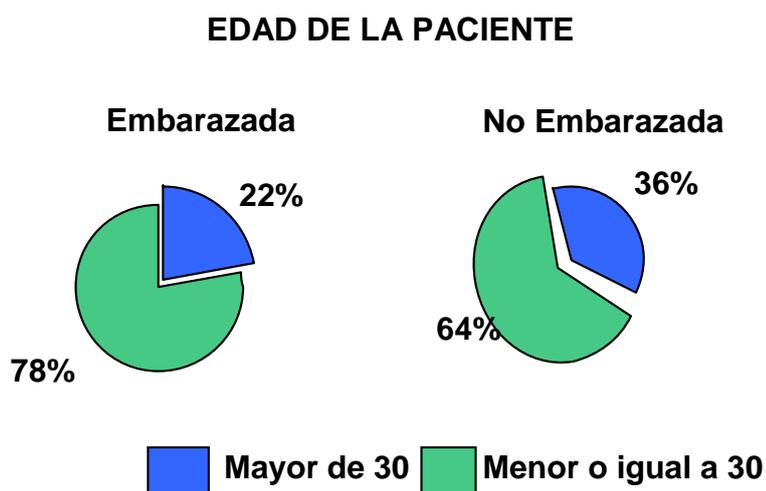


Figura 8: Distribución de mujeres embarazadas y no embarazadas según la edad

Según el trimestre del embarazo la distribución de las pacientes embarazadas corresponden: 35 pacientes (23.3%) al primer trimestre, 72 pacientes (48%) al segundo trimestre y 43 pacientes (28.7%) se encuentran en el tercer período de gestación.

- 1er: 35 pacientes (23,3%)
- 2do: 72 pacientes (48%)
- 3er: 43 pacientes (28,7%)

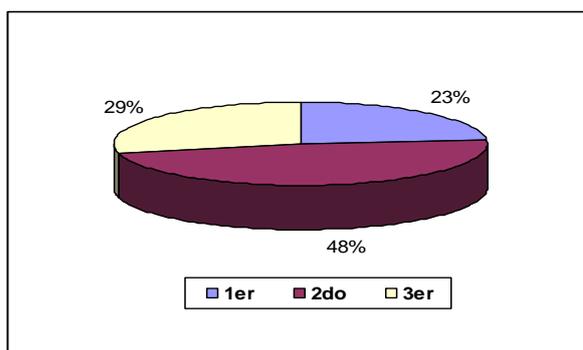


Figura 9: Distribución de embarazadas de acuerdo al trimestre de gestación.

En las mujeres embarazadas se observaron 126 muestras (84.5 %) cuya consistencia de la encía era a predominio edematosa y 24 (16 %) no edematosa. En el total de la muestra se observaron los 5 patógenos estudiados presentes en: **P. intermedia**: 3.3%, **P. gingivalis**: 39.3%, **T. denticola**: 34% **A. actinomycetemcomitens**: 3.3% y **T. forsythensis**: 21.3%.

Mientras que en las 50 pacientes no embarazadas el 82% (41 muestras) presentaban pared blanda edematosa y solo el 18% (9 muestras) no edematosa. También se observaron las 5 bacterias estudiadas: **P. intermedia**: 6%, **P. gingivalis**: 22%, **T. denticola**: 34%, **A. actinomycetemcomitens**: 6% y **T. forsythensis**: 42% (Tabla 1).

Tabla N° 3: Distribución de las bolsas periodontales de acuerdo a la consistencia de la pared blanda

	CONSISTENCIA DE LA ENCIA	
	EDEMATOSA	NO EDEMATOSA
EMBARAZADAS (n=150)	84 % (n=126)	16 % (n=24)
NO EMBARAZADAS (n= 50)	82 % (n=41)	18% (n=9)

Tabla 4: Porcentaje de patógenos periodontales, P. gingivalis (Pg), T. denticola (Td), A. actinomyetemcomitens (Aa), P.intermedia (Pi) y T. forsythensis (Tf), en mujeres embarazadas y no embarazadas.

DISTRIBUCION DE PATOGENOS					
	Pg	Td	Aa	Pi	Tf
EMBARAZADAS	39.3%	34%	3.3%	3.3	1.3%
NO EMBARAZADAS	22%	34%	6%	6%	42%

De acuerdo a la profundidad de sondaje en las bolsas menores a 4mm de profundidad se detectó la presencia de algunas de las bacterias estudiadas solo en una muestra, del total de 77 muestras, de bolsas de 2 a 4mm, correspondientes a embarazadas (67 muestras) y no embarazadas (10 muestras).

En bolsas de profundidad de sondaje mayor a 5mm se identificaron por PCR las 5 bacterias estudiadas, en todos los trimestres del embarazo, como así también en las no embarazadas.

Tabla 5: Distribución de muestras y porcentaje de bacterias detectadas en mujeres embarazadas y no embarazadas según la profundidad de sondaje.

PROFUNDIDAD DE LA BOLSA	NÚMERO DE MUESTRAS		% BACTERIAS	
	EMBARAZADAS	NO EMBARAZADAS	EMBARAZADAS	NO EMBARAZADAS
2 – 4mm	67	10	1,4%	0%
5 - 6mm	68	30	85,1%	81,5%
+ 7mm	15	10	92,3%	100%

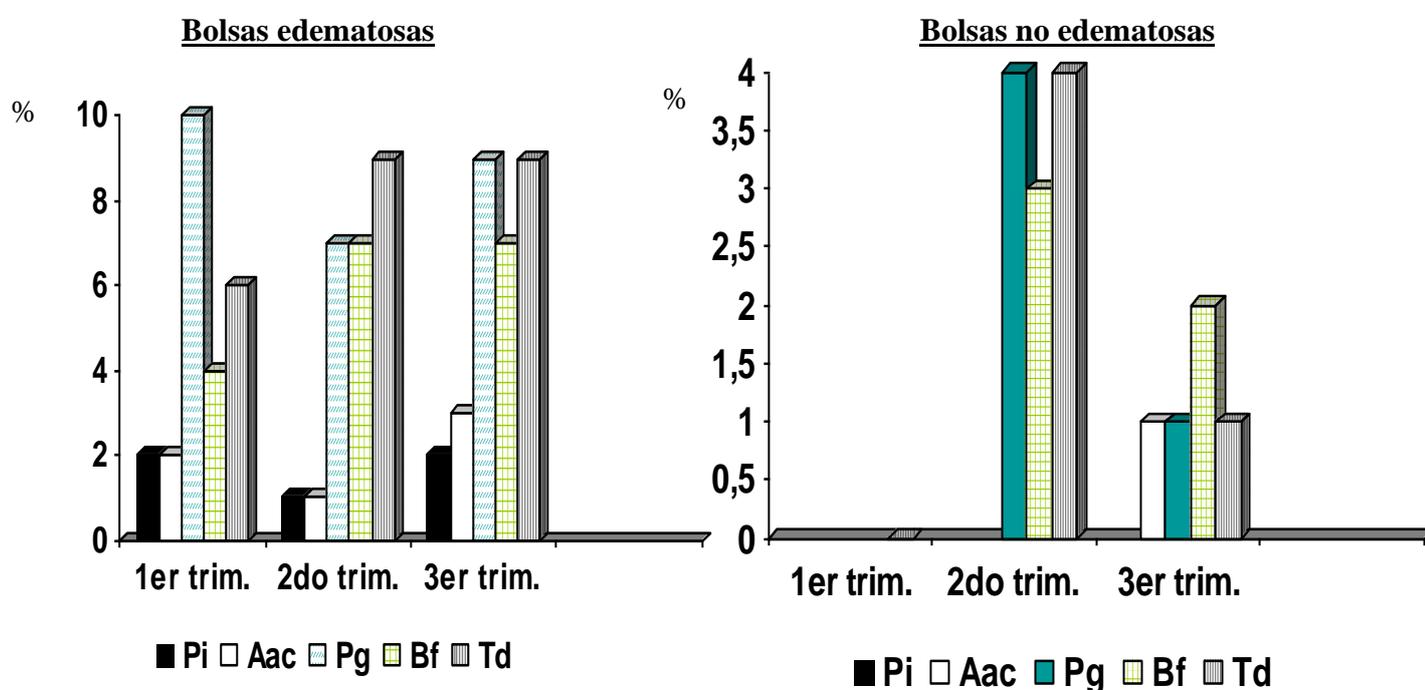
Las bolsas periodontales se clasificaron de acuerdo a la consistencia de la pared blanda en edematosas y no edematosas. En ambas **P. gingivalis**, **T. forsythensis** y **T. denticola** fueron las más frecuentes, mientras que **P. intermedia** y **A. actinomycetemcomitans** se encontraron en menor proporción.

La distribución de las especies bacterianas parece independiente del periodo de gestación

Tabla 6: Distribución bacteriana acorde al trimestre de gestación y la consistencia tisular de la bolsa periodontal.

	BOLSAS EDEMATOSAS N: 126					BOLSAS NO EDEMATOSAS N:24				
	Pi	Aa	Pg	Tf	Td	Pi	Aa	Pg	Tf	Td
1 ^{ER} TRIMESTRE	1	2	9	15	7					
2 ^{DO} TRIMESTRE		17	7	12	1		4	3	6	
3 ^{ER} TRIMESTRE		2	14	10	14			13	2	2

P. intermedia (Pi), *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg), *T. forsythensis* (Tf) y *T. denticola* (Td)



P. intermedia (Pi), *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg), *T. forsythensis* (Tf) y *T. denticola* (Td)

Figura 10: Composición microbiológica de las bolsas periodontales profundas edematosas y no edematosas en los diferentes períodos del embarazo

Los resultados del análisis de asociación de a pares de gérmenes se muestran en la tabla 7, donde se puede apreciar concordancia estadísticamente significativa ($p < 0.01$), con coeficiente de proximidad phi alto (de 0.18 a 0.56) y coeficiente Kappa > 0.40 entre: **T. denticola / P. gingivalis**, **T. denticola / T. forsythensis** y **P. gingivalis / T. forsythensis** en las muestras de las 150 mujeres embarazadas, evidenciándose que el porcentaje de concordancia observada supera a la esperada al azar, en función de la prevalencia de los gérmenes en la muestra. En las 50 mujeres no embarazadas se registró asociación significativa entre **T. forsythensis / T. denticola**.

Tabla 7: Análisis de asociación entre los gérmenes identificados por PCR en las bolsas periodontales de mujeres embarazadas y no embarazadas.

Pares de Gérmenes	Concordancia					Similitud o proximidad	
	(+)n	(-)n	Total Observada n%	Frecuencia esperada n%	K% Kappa	ϕ (phi)	p
EMBARAZADAS							
P intermedia / A actinomy	1	140	141 (94)	139 (92.6)	19	0.15	0.0633
P intermedia / P gingivalis	3	88	91 (60.6)	90 (60)	2	0.04	0.5851
P intermedia / T.forsythen	1	114	115 (76.6)	115 (76.6)	0	-0.02	0.8049
P intermedia / T denticola	2	96	98 (65.3)	98 (65.3)	0	0.0	>0.9999
A actinomyc / P gingivalis	3	89	92 (61.3)	90 (60)	3	0.08	0.3360
A actinom / T.forsythensis	2	116	118 (78.6)	116 (77.3)	6	0.09	0.2775
A actinomy / T denticola	4	99	103 (68.6)	99 (66)	8	0.18	0.0244
P gingivalis/T.forsythensis	23	83	106 (70.6)	84 (56)	33	0.36	<0.0001
P gingivalis / T denticola	39	80	119 (79.3)	81 (54)	55	0.56	<0.0001
T.forsythensis/ T denticola	23	92	115 (76.6)	89 (59.3)	43	0.44	<0.0001
NO EMBARAZADAS							
P intermedia / A actinomy	1	45	46 (92)	44 (88)	33	0.29	0.0398
P intermedia / P gingivalis	1	37	38 (76)	37 (74)	8	0.07	0.6250
P intermedia / T.forsythen	0	26	26 (52)	28 (56)	76	-0.21	0.1285
P intermedia / T denticola	0	29	29 (58)	31 (62)	-11	-0.19	0.1803
A actinomyc / P gingivalis	1	37	38 (76)	37 (74)	8	0.07	0.6250
A actinom / T.forsythensis	1	27	28 (56)	28 (56)	0	-0.04	0.7538
A actinomyc / T denticola	1	30	31 (62)	31 (62)	0	-0.01	0.9209
P gingivalis/T.forsythensis	3	21	24 (48)	27 (54)	-13	-0.16	0.2625
P gingivalis / T denticola	5	26	31 (62)	29 (58)	10	0.10	0.4595
T.forsythensis/ T denticola	24	13	37 (74)	26 (52)	46	0.46	0.0012

Concordancia: (+) se refiere a la cantidad de muestras que concordaron con ambos gérmenes positivos, (-) cantidad de muestras que concordaron con ambos gérmenes negativos; **total observada:** sumatoria de concordancias (+) y (-) observadas en la muestra, descrita en cantidad de pacientes y porcentaje respectivo entre paréntesis; **total esperada:** sumatoria de concordancias esperadas por simple azar; **Kappa:** coeficiente de concordancia estadística más allá de la

casualidad, expresada en porcentaje.

Similitud o proximidad phi: coeficiente de correlación nominal entre dos gérmenes (presencia / ausencia), de acuerdo a análisis jerárquico de grupos (Hierarchical Cluster Análisis) por método binario de Sokal-Sneath.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de asociación entre los 5 gérmenes identificados por PCR se realizó el Análisis Jerárquico de Grupos (Cluster Analysis). En el dendograma confeccionado de la muestra de mujeres embarazadas se observaron dos complejos. Uno formado por **P. gingivalis**, **T. forsythensis**, **T. denticola** y el otro por **P. intermedia**, **A. actinomycetemcomitans**. En el dendograma obtenido a partir de la muestra de las no embarazadas se observan dos grupos de gérmenes, con diferente asociación bacteriana a los ya definidos en las mujeres embarazadas. Uno de los grupos está formado por **T. forsythensis** y **T. denticola** mientras que el otro por **P. intermedia** y **A. actinomycetemcomitans**. **P. gingivalis** podría presentar un comportamiento dependiente del estado de gravidez de la mujer.

Análisis Jerárquico de Grupo

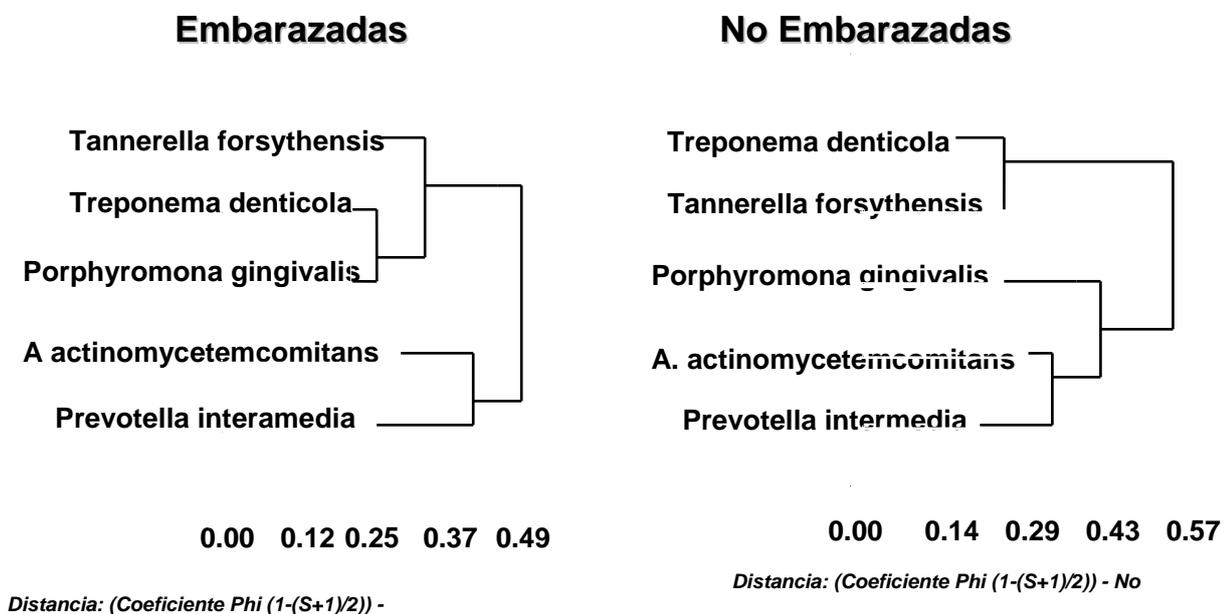


Figura 11: Dendograma del análisis de conglomerados para identificación de complejos de gérmenes en las bolsas periodontales realizado sobre mujeres embarazadas y no embarazadas

ASOCIACIONES DE LOS CINCO PATÓGENOS CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

En la tabla N° 8 se observan los resultados obtenidos del análisis univariado con respecto al diagnóstico clínico de periodontitis grave, que corresponde a Nivel de Inserción Clínica ≥ 5 mm. En las mujeres embarazadas se puede apreciar que la presencia de **P. gingivalis**, **T. denticola** y **T. forsythensis** se encuentra asociada ($p < 0.01$) a NIC ≥ 5 por lo que podrían resultar indicadores de riesgo de periodontitis grave. Siendo los porcentajes de mujeres embarazadas con NIC ≥ 5 con **P. gingivalis** 57.6% y 6.6 sin **P. gingivalis**, con **T. forsythensis** 54% versus 13% sin **T. forsythensis** y 64.5% con **T. denticola** mientras que sin **T. denticola** 16.8%.

En el análisis multivariado **P. gingivalis** y **T. denticola** resultarían ser indicadores de riesgo de periodontitis grave, viéndose incrementado el riesgo de esta patología, 14 veces en presencia de **P. gingivalis** (ORp=14.59) y aproximadamente 5 veces en presencia de **T. denticola** (OR p=4.98).

Relacionando la edad de la paciente y el trimestre de gestación a través del análisis univariado, no se observó diferencia estadísticamente significativa con periodontitis grave. Mientras que en el grupo de mujeres no embarazadas **T. forsythensis** y **T. denticola** resultarían indicadores de riesgo para periodontitis grave.

Los porcentajes de mujeres no embarazadas con NIC ≥ 5 , en los cuales se detectó **T. denticola** fue del 72.2% versus 25% sin **T. denticola** y **T. forsythensis** en el 71.4% de los casos versus el 20.7% sin **T. forsythensis**. En el análisis multivariado **T. forsythensis** resultó ser posible indicador de riesgo de periodontitis grave, viéndose el riesgo incrementado 39 veces en presencia de dicho patógeno (ORp=39.5).

Tabla 8: Identificación de indicadores de riesgo significativos para el diagnóstico de periodontitis Grave, en embarazadas y no embarazadas.

Indicadores de Riesgo	Frecuencia del indicador en la muestra n (%)	Periodontitis Grave NIC ≥ 5mm		p	Asociación univariada ORc (IC95%)	Asociación independiente multivariada	
		con el indicador n (%)	sin el indicador n (%)			ORp (IC95%)	P
EMBARAZADAS							
Edad (≥30)	33 (22)	9 (27,3)	31 (26,5)	0,9290	1.04 (0.4-2.4)	0.72 (0.2-2.6)	0,6225
2º o 3º trimestre embarazo	115 (76,7)	34 (26,6)	5 (16,1)	0,1456	2.03 (0.8-5.2)	0.44 (0.1-1.6)	0,2182
P. gingivalis	59(39,3)	34 (57,6)	6 (17,1)	< 0,0001	19.2 (7.5-49.7)	14.6(4.2-50.6)	< 0,0001*
T. denticola	31 (20,7)	20 (64,5)	20 (16.8)	< 0,0001	9.0 (3.8-21.4)	4.98 (1.6-1.5)	0,0044
T. forsythensis	50 (33,3)	27 (54)	13 (13)	< 0,0001	7.86 (3.5-17.4)	1.51 (0.5-4.6)	0,4701
A.actinoyicetemcomitans	5 (3,3)	3 (60)	37 (25,5)	0,0865	4.38 (0.8-23.1)	4.18 (0.4-41.2)	0,2208
P. intermedia	6 (4)	4 (66,7)	36 (25)	0,0237	6.0 (1.2-29.4)	11.83 (1.3-110)	0,0301
NO EMBARAZADAS							
Edad (≥30)	18 (36)	10 (55.6)	11 (34.4)	0.1452	2.39 (0.7-7.6)	0.59 (0.1-4.0)	0.5881
P. gingivalis	11 (22)	8 (72.7)	13 (33.3)	0.0194	5.33 (1.3-21.7)	27.58 (2.1-36.0)	0.0114
T. denticola	18 (36)	13 (72.2)	8 (25.0)	0.0012	7.80 (2.2-27.5)	5.24 (0.8-36.2)	0.0931
T. forsythensis	21 (42)	15 (71.4)	6 (20.7)	0.0003	9.58 (2.7-33.9)	39.5 (3.2-48.4)	0,0040
A.actinomycetemcomitans	3 (6)	2 (66.7)	19 (40.4)	0.3719	2.95 (0.4-24.2)	1.53 (0.0-184.4)	0.8608
P. intermedia	3 (6)	1 (33.3)	20 (42.5)	0.7538	0.68 (0.1-5.5)	3.34 (0.02-587.2)	0.6471

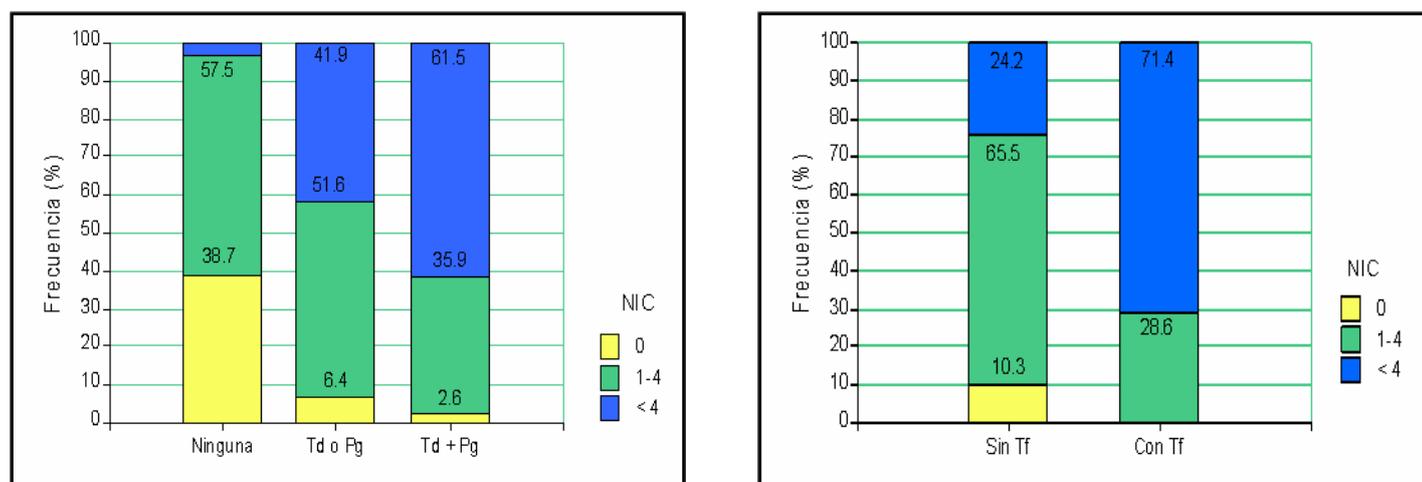
NIC: Nivel de inserción clínica (distancia desde el límite amelocementario al fondo de la bolsa)

*Indica indicadores independientes significativos de riesgo de periodontitis grave, es decir que son indicadores que independientemente de la presencia de otros factores representaría una probabilidad significativa de enfermedad

P: significación estadística, mediante prueba Chi- Cuadrado para el análisis univariado y por análisis de regresión logística múltiple para el análisis multivariado.

ORc (IC95%): cociente de probabilidad e intervalo de confianza del 95% respectivo que representa el riesgo de periodontitis grave en presencia del indicador respecto a la ausencia del mismo. Calculado a partir de productos cruzados a partir de tablas de contingencia 2x2.

ORp (IC95%): cociente de chance ponderado e intervalo de confianza del 95% respectivo que representa el riesgo de periodontitis grave en presencia del indicador respecto a la ausencia del mismo ajustado respecto al riesgo promedio de los restantes indicadores.



Presencia de uno o ambos/ausencia de los gérmenes del conglomerado **T.denticola (Td)**-**P. gingivalis (Pg)** en mujeres embarazadas

Presencia / ausencia de **T. forsythensis (Tf)** en no embarazadas

Figura 12: Distribución de frecuencias de T. forsythensis (Tf) según el Nivel de Inserción Clínica (NIC) en mujeres no embarazadas y T. denticola (Td) / P. gingivalis (Pg) en embarazadas

Como lo expresa la tabla N° 9 y la figura N° 13, en el análisis multivariado de mujeres embarazadas con bolsas de profundidad mayor a 6mm, se registró como posibles indicadores de riesgo significativos ($p < 0.01$) la edad de la paciente y la presencia de **P. gingivalis**. La profundidad de sondaje de la bolsa periodontal podría incrementarse 4 veces cuando la edad de la madre sea mayor a 30 años ($OR_p = 4.55$, $p = 0.0022$) y 3 veces en presencia de **P. gingivalis** ($OR_p = 3.19$, $p = 0.0136$).

El análisis de asociación en mujeres no embarazadas no registró diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los indicadores de riesgo evaluados y la profundidad de sondaje.

Tabla 9: Identificación de indicadores de riesgo significativos para Profundidad de Sondaje de bolsa Periodontal ≥ 6 mm en embarazadas y no embarazadas.

Indicador de Riesgo	Frecuencia de indicador en la muestra n (%)	Profundidad de Sondaje ≥ 6 mm		p	Asociación univariada ORc (IC95%)	Asociación independiente multivariada	
		con el indicador n (%)	sin el indicador n (%)			ORp (IC95%)	p
EMBARAZADAS							
Edad (≥ 30)	33 (22)- 115 (76,7)	21 (63.6)- 52 (45.2)	43 (36.7) 12 (34.3)	0.0058 0,2522	3.01 (1.4-6.6) 1.58 (0.7-3.4)	4.55 (1.7-12.0) 0.67 (0.2-1.8)	0,0022 0,4206
2º o 3º trimestre embarazo							
P. gingivalis	59(39,3)	40 (67.8)	24 (26.3)	< 0,0001	5.88 (2.9-11.9)	3.19(1.3-8.0)	0,0136
T. denticola	31 (20,7)	34 (68)	30 (30)	< 0,0001	4.96 (2.4-10.2)	2.43 (0.9-6.5)	0,0766
T. forsythensis	50 (33,3)	22 (70.9)	42(35.3)	0,0003	4.48 (1.9-10.4)	2.26 (0.8-6.5)	0,1304
A.actinomycetemcomitans	5 (3,3)	3 (60)	61 (42)	0,4254	2.07 (0.4-10.8)	0.36 (0.04-3.6)	0,3792
P. intermedia	6 (4)	5 (83,3)	59 (40.9)	0,0398	7.20 (1.1-45.1)	11.57 (1.1-125.0)	0,0438
NO EMBARAZADAS							
Edad (≥ 30)	18 (36)	11 (61.1)	10 (31.2)	0.0400	3.46 (1.1-11.2)	3.18 (0.7-13.9)	0.1256
P. gingivalis	11 (22)	6 (54.5)	15 (38.5)	0.3398	1.92 (0.5-7.1)	1.70 (0.3-8.5)	0.5171
T. denticola	18 (36)	11 (61.1)	10 (31.2)	0.0400	3.46 (1.1-11.2)	2.20 (0.4-7.4)	0.2955
T. forsythensis	21 (42)	11(52.4)	10 (34.5)	0.2057	2.09 (0.7-6.4)	1.75 (0.4-7.4)	0.4457
A.actinomycetemcomitans	3 (6)	2 (66.7)	19 (40.4)	0.3719	2.95 (0.4-24.2)	3.97 (0.1-97.9)	0.3991
P. intermedia	3 (6)	2 (66.7)	19 (40.4)	0.3719	2.95 (0.4-24.2)	4.79 (0.3-81.9)	0.2799

*Indica indicadores independientes significativos de riesgo de profundidad de sondaje mayor a 6mm, es decir que son indicadores que independientemente de la presencia de otros factores representaría una probabilidad significativa de enfermedad **P**: significación estadística, mediante prueba Chi- Cuadrado para el análisis univariado y por análisis regresión logística múltiple para el análisis multivariado.

ORc (IC95%): cociente de probabilidad e intervalo de confianza del 95% respectivo que representa el riesgo de profundidad de bolsa mayor a 6mm en presencia del indicador respecto a la ausencia del mismo. Calculado a partir de productos cruzados a partir de tablas de contingencia 2x2 **ORp (IC95%)**: cociente de probabilidad ponderado e intervalo de confianza del 95% respectivo que representa el riesgo de profundidad de bolsa mayor a 6mm en presencia del indicador respecto a la ausencia del mismo ajustado al riesgo promedio de los restantes indicadores.

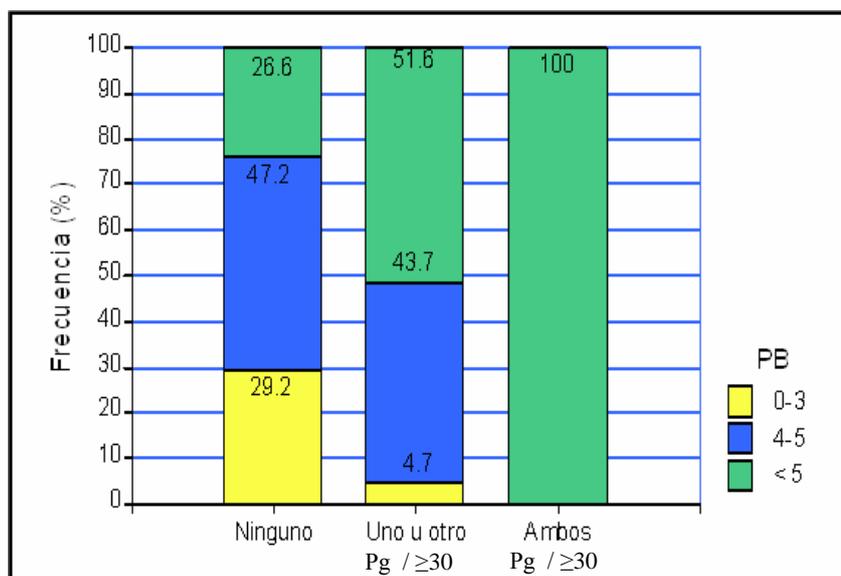


Figura 13: Distribución de *P. gingivalis* (Pg) según la Profundidad de sondaje (PB) de la bolsa periodontal en relación con la edad de las mujeres (≥ 30 años) embarazadas

La consistencia de la encía en ambos grupos estudiados, no se identificó como indicador de riesgo estadísticamente significativo, por lo tanto no se realizó el análisis multivariado.

Índice de placa de Silness y Loe (IP): en mujeres embarazadas, el análisis multivariado demostró persistencia de indicadores de riesgo de Índice de Placa >2 , la edad de la paciente y la presencia de ***P. gingivalis***. La edad de la madre mayor a 30 años podría aumentar 6 veces el riesgo de Índice de Placa >2 (ORp= 6.36, p=0.0037) y con ***P. gingivalis*** el riesgo aumenta 5 veces (ORp=4.92, p=0.0328). En mujeres no embarazadas se observó baja frecuencia de IP > 2 , solo 4 de ellas (8%) presentaron IP2, por lo tanto el análisis multivariado no se realizó.

Tabla 10: Índice de placa de Silness y Løe >2, en embarazadas y no embarazadas (Se detallan la frecuencia de los indicadores de riesgo en la muestra y las frecuencias de IP> 2 con y sin el indicador).

Indicador de Riesgo	Frecuencia de indicador en la muestra n (%)	Índice de Placa ≥ 2			Asociación univariada		Asociación independiente multivariada	
		con el indicador n (%)	sin el indicador n (%)	p	ORc (IC95%)	ORp (IC95%)	p	
EMBARAZADAS								
Edad (≥30)	33 (22)-	9 (27.3)-	10 (8.5)	0,0043	4.01 (1.5-10.7)	6.36 (1.8-22.2)	0,0037	
2º o 3º trimestre embarazo	115 (76,7)	14 (12.2)	5 (14.3)	0,7422	0.83 (0.3-2.4)	1.7 (0.4-6.9)	0,4533	
P. gingivalis	59(39,3)	15 (25.4)	4 (4.4)	0,0002	7.41 (2.4-22.5)	4.92(1.1-21.3)	0,0328	
T. denticola	31 (20,7)	7 (22.6)	12 (10.1)	0,0624	2.60 (0.9-7.1)	0.86 (0.2-.3.3)	0,8301	
T. forsythensis	50 (33,3)	12 (24.0)	7(7.0)	0,0032	4.20 (1.6-11.2)	2.93 (0.7-12.7)	0,1506	
A.actinomycetemcomitans	5 (3,3)	3 (60)	61 (42)	0,4254	2.07 (0.4-10.8)	0.08 (0.003-3)	0,1772	
P. intermedia	6 (4)	5 (83,3)	59 (40.9)	0,0398	7.20 (1.1-45.1)	6.46 (0.7-58.3)	0,0966	
NO EMBARAZADAS								
Edad (≥30)	18 (36)	3 (16.7)	1 (3.1)	0.0902	6.20 (0.8-46.1)			
P. gingivalis	11 (22)	2 (18.2)	2 (5.1)	0.1587	4.11 (0.6-27.3)			
T. denticola	18 (36)	2 (11.1)	2 (6.2)	0.5431	1.88 (0.3-119)			
T. forsythensis	21 (42)	2(9.5)	2 (6.9)	0.7354	1.42 (0.2-9.0)			
A.actinomycetemcomitans	3 (6)	1 (33.3)	3 (6.4)	0.0953	7.33 (0.7-73.0)			
P. intermedia	3 (6)	1 (33.3)	3 (6.4)	0.0953	7.33 (0.7-73.0)			

*Indica indicadores independientes significativos de riesgo de Índice de Placa 2, es decir que son indicadores que independiente de la presencia de otros factores representaría una probabilidad significativa de enfermedad **P**: significación estadística, mediante prueba Chi- Cuadrado para el análisis univariado y por análisis de regresión logística múltiple para el análisis multivariado. **ORc (IC95%)**: cociente de probabilidad de intervalo de confianza del 95% respectivo que representa el riesgo de Índice de Placa 2, en presencia del indicador respecto a la ausencia del mismo. Calculo a partir de productos cruzados a partir de tablas de contingencia 2x2

ORp (IC95%): cociente de probabilidad ajustada e intervalo de confianza del 95% respectivo que representa el riesgo de Índice de placa 2, en presencia del indicador respecto a la ausencia y al riesgo promedio de los restantes indicadores.

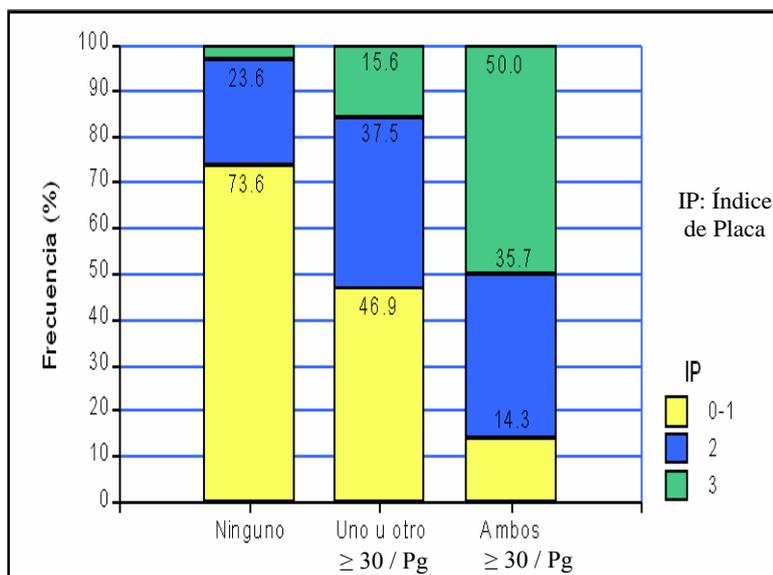


Figura14: Distribución de frecuencias de Índice de Placa de Silness y Løe en relación a la ausencia y presencia (edad ≥ 30 y/o *P. gingivalis*) en mujeres embarazadas

El Índice Gingival (IG) de Loe y Silness > 2 , en el análisis multivariado se registró como indicadores de riesgo independientes la presencia de *T. denticola*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* en mujeres embarazadas. La presencia de *P. gingivalis* podría aumentar 7 veces el riesgo de IG > 2 (ORp=7.34, p=0.0270), *T. denticola* incrementaría 6 veces (ORp=6.39, p=0.0232) y *P. intermedia* 51 veces el riesgo de presentar IG > 2 (ORp=51.6, p=0.0008).

En el grupo de pacientes no embarazadas no se identificaron indicadores de riesgo, estadísticamente significativo, por tanto no se realizó el análisis multivariado.

Tabla 11: Identificación de indicadores de riesgo significativos para Índice Gingival de Løe y Silness (IG): 2 en embarazadas y no embarazadas (Se detallan la frecuencia de cada indicador en la muestra y las frecuencias de IG: 2 con y sin el indicador).

Indicador de riesgo	Frecuencia de indicador en la muestra		Índice Gingival ≥ 2		Asociación univariada		Asociación independiente multivariada	
	n(%)	Con el indicador n (%)	Sin el indicador n(%)	P	ORc (IC95%)	ORp (IC95%)	P	
EMBARAZADAS								
Edad (≥ 30)	33 (22)-	5 (15.1)	15 (12.8)	0.7279	1.21 (0.4-3.5)	1.60 (0.4-6.6)	0,5161	
2º o 3º trimestre embarazo	115 (76,7)	16 (13.9)	4 (11.4)	0,7050	1.25 (0.4-3.8)	1.27 (0.3-6.1)	0,7639	
P. gingivalis	59(39,3)	17 (28.8)	3 (3.3)	$\leq 0,0001$	11.87 (3.6-39.6)	7.34(1.3-43.0)	0,0270	
T. denticola	31 (20,7)	8 (25.8)	12 (10.1)	0,0218	3.10 (1.2-8.3)	0.84 (0.2-.3.1)	0,7935	
T. forsythensis	50 (33,3)	15 (30.0)	5 (5.0)	$\leq 0,0001$	8.14 (2.8-23.2)	6.39 (1.3-31.7)	0,0232	
A.actinomycetemcomitans	5 (3,3)	1 (20.0)	19 (13.1)	0,6556	1.66 (0.2-11.2)	0.09 (0 -7.6)	0,2826	
P. intermedia	6 (4)	4 (66,7)	16 (11.1)	$\leq 0,0001$	16.0 (3.1-81.6)	51.61 (5.1-518.6)	0,0008	
NO EMBARAZADAS								
Edad (≥ 30)	18 (36)	3 (16.7)	1 (3.1)	0.0902	6.20 (0.8-46.1)			
P. gingivalis	11 (22)	2 (18.2)	2 (5.1)	0.1587	4.11 (0.6-27.3)			
T. denticola	18 (36)	2 (11.1)	2 (6.2)	0.5431	1.88 (0.3-119)			
T. forsythensis	21 (42)	2(9.5)	2 (6.9)	0.7354	1.42 (0.2-9.0)			
A.actinomycetemcomitans	3 (6)	1 (33.3)	3 (6.4)	0.0953	7.33 (0.7-73.0)			
P. intermedia	3 (6)	1 (33.3)	3 (6.4)	0.0953	7.33 (0.7-73.0)			

*Indica indicadores independientes significativos de riesgo de Índice Gingival 2, es decir que son indicadores que independientemente de la presencia de otros factores representaría una probabilidad significativa de enfermedad **P**: significación estadística, mediante prueba Chi- Cuadrado para el análisis univariado y por análisis de regresión logística múltiple para el análisis multivariado.

ORc (IC95%): cociente de probabilidad e intervalo de confianza del 95% respectivo que representa el riesgo de Índice Gingival 2, en presencia del indicador respecto a la ausencia del mismo. Calculo a partir de productos cruzados a partir de tablas de contingencia 2x2

ORp (IC95%): cociente de chance ponderado e intervalo de confianza del 95% respectivo que representa el riesgo de Índice Gingival 2, en presencia del indicador respecto a la ausencia del mismo ajustado respecto al riesgo promedio de los restantes indicadores

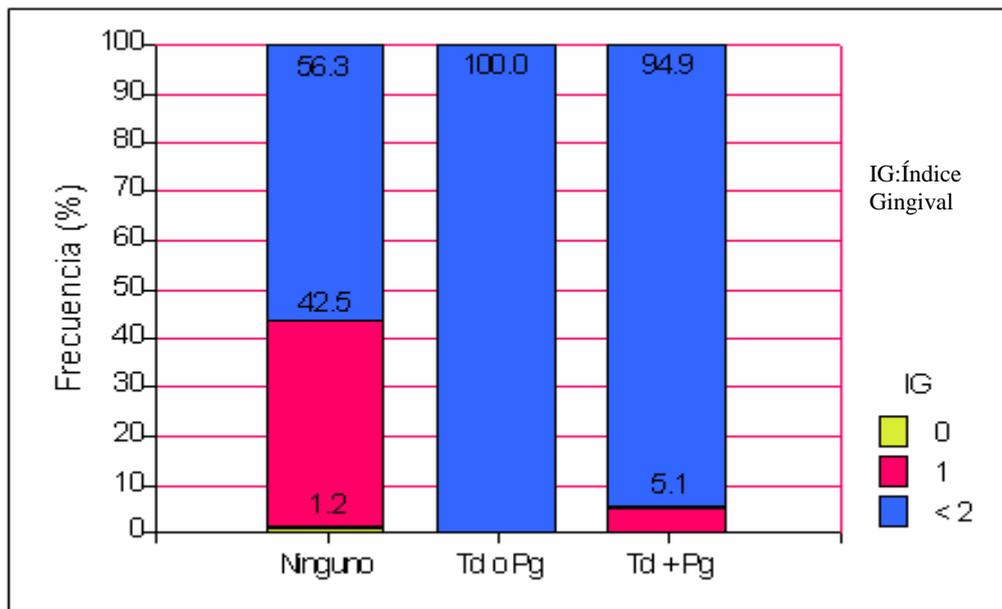


Figura 15: Distribución de frecuencias del Índice Gingival en relación a la ausencia / presencia de *T. denticola* (Td) y/o *P. gingivalis* (Pg) en embarazadas

De los resultados obtenidos en el presente estudio se observa al comparar ambos grupos, que existe una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el estado de la paciente (embarazo o no) y el nivel de inserción clínica, la presencia de *T. forsythensis* y de *P. gingivalis*. El porcentaje de niveles de inserción clínica mayores a 5 y la presencia de *T. forsythensis* es mayor en mujeres no embarazadas, mientras que hay mayor presencia de *P. gingivalis* en mujeres embarazadas.

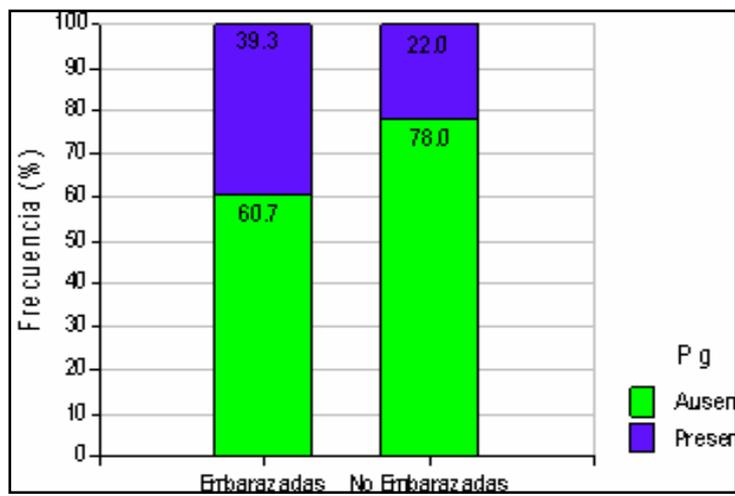


Figura 16: Presencia de P gingivalis (Pg) en embarazadas y no embarazadas

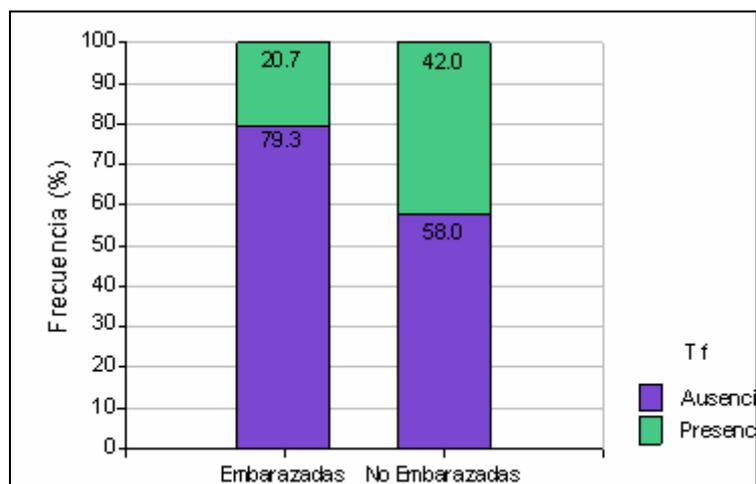


Figura 17: Distribución de T. forsythensis (Tf) en Bolsas Profundas de mujeres embarazadas y no embarazadas

V-Discusión

V- DISCUSIÓN

En 1891 Miller enunció que la enfermedad periodontal puede influir en las condiciones sistémicas del individuo. Los investigadores han encontrado altos niveles de componentes pro-inflamatorios, promovida su liberación por bacterias orales circulando en plasma, de pacientes con enfermedad periodontal severa (Socransky y Haffajee, 1992).

Se acepta que las enfermedades periodontales son infecciosas con respuesta modulada por el huésped e influenciada por factores de riesgos innatos o adquiridos del paciente, pero su iniciación y progresión dependen de la presencia de microorganismos capaces de causar la enfermedad. A pesar de que, alrededor de más de 500 especies de microorganismos, habitan la cavidad bucal, de las bolsas periodontales se han aislado un pequeño porcentaje de ellos, como verdaderos agentes etiológicos.

En 1996 un informe de consenso del World Workshop on Clinical Periodontics, concluyó que las siguientes especies bacterianas, **P. gingivalis**, **A. actinomycetemcomitans** y **T forsythensis** deberían considerarse como los principales agentes patógenos periodontales (Offenbacher y Zambon, 1996). Posteriormente Socransky y col. (1998) describieron diversos complejos bacterianos, entre ellos, el complejo rojo, constituido por **P. gingivalis**, **T. denticola** y **T forsythensis**, que se asocia a formas avanzadas de periodontitis crónica, e indicaron que existen asociaciones bacterianas específicas identificables en los distintos habitats.

Se realizaron intentos in vitro, de investigar las interacciones entre las especies bacterianas (Kolebrander y London, 1993; Onagawa y col, 1994; Roberts y col, 1999) y en el año 1998 se procuró definir las asociaciones de especies que suceden, in vivo, en las biopelículas bacterianas subgingivales, basándose en que éstas se producen regularmente en otros ecosistemas en la naturaleza (Socransky y col, 1998).

Por otra parte se observó que cuando ciertas especies se detectaban en un sitio, era seguro que otras especies también estuvieran allí, lo cual se comprobó analizando muestras de biopelícula subgingival procedentes de individuos con diferentes estados de salud y enfermedad periodontal (Socransky y col, 1998).

Durante la última década, se ha producido un gran avance en la determinación del rol que desempeñan las diversas especies bacterianas en la progresión de la enfermedad periodontal. Los estudios realizados por Socransky y col. (1998) han demostrado que, muchas de estas especies se presentan conjuntamente en las biopelículas subgingivales.

Al momento, éste es el primer trabajo que describe la presencia de asociaciones bacterianas en mujeres embarazadas y no embarazadas, y se observó la relación de ciertas especies bacterianas entre si. En el análisis de asociación de pares de gérmenes, se detectó asociación estadísticamente significativa ($p < 0.01$) y coeficiente de proximidad phi alto (0.18 a 0.56) entre **P. gingivalis / T. forsythensis**, **P. gingivalis / T. denticola** y **T. forsythensis / T. denticola** en las pacientes embarazadas de nuestra comunidad, diferente a los resultados observados en el grupo de mujeres no embarazadas, registrando asociación estadísticamente significativa entre **P. intermedia / A. actinomycetemcomitans** y **T. denticola / T. forsythensis**.

Otros investigadores han observado la relación entre las especies del complejo rojo. Gmur y col (1989) mostraron que existía una fuerte relación entre **T. forsythensis** y **P. gingivalis** en las muestras de placas subgingivales recogidas en diferentes profundidades de la bolsa periodontal, de pacientes de ambos sexos con periodontitis crónica. Analizando conjuntamente estos microorganismos se comprobó que existe una relación potencial entre ellos que permite su colonización mutua. Nosotros observamos asociaciones similares, entre **P. gingivalis / T. forsythensis**, en bolsas periodontales de mujeres embarazadas, con diagnóstico de Periodontitis Grave.

Simonson y cols., (1988) demostraron una fuerte relación entre **P. gingivalis** y **T. denticola**, detectadas en bolsas profundas y lesiones periodontales avanzadas. Los datos de estudios epidemiológicos realizados sugieren que **P. gingivalis** puede lograr desencadenar los procesos patológicos de un modo más eficaz en conjunción con un consorcio microbiano como **T. denticola** y **T. forsythensis** (Klein y Goncalves, 2003; Holt y Ebersole, 2005; Yang y col, 2004; Watarabe y Frommel, 1996).

Los resultados de nuestra investigación confirman la hipótesis, de que ninguna de las especies bacterianas por sí sola es suficiente para determinar la progresión de la enfermedad periodontal, sino que los patógenos de la cavidad bucal, existen a modo de complejos dentro de la matriz de la biopelícula, y son estos complejos agresivos, los que parecen ser necesarios para iniciar el proceso de enfermedad. Además observamos una fuerte asociación entre **P. gingivalis** y **T. denticola**, en mujeres embarazadas, y podrían considerarse indicadores de riesgo para el desarrollo de Periodontitis Grave, porque incrementan la pérdida del Nivel de Inserción Clínica (NIC) mayor a 5 mm. El NIC mide la destrucción de los tejidos periodontales y establece la cantidad de soporte periodontal perdido. Detectamos que en las muestras que ambos patógenos estaban ausentes, la pérdida de Inserción Clínica es menor al 4% , en cambio cuando la asociación **P. gingivalis** y **T. denticola** está presente, la pérdida del NIC se incrementaba en un 60% de las pacientes embarazadas.

En mujeres no embarazadas, la presencia de **T. forsythensis** podría considerarse posible indicador de riesgo para Periodontitis Grave, ya que su presencia aumenta el riesgo 39 veces (ORp= 39.5). En más del 70% de las pacientes no embarazadas que presentan NIC ≥ 5 mm se identificó por PCR la presencia de **T. forsythensis**.

En concordancia con nuestras observaciones, Kesavalu y col (1998) mostraron que una infección polimicrobiana de **T. denticola/ P. gingivalis** en ratones, es significativamente más virulenta

que la infección con cada uno de los microorganismos por separado. Más específicamente, la adición de **T denticola** a **P. gingivalis** aumentó las propiedades de destrucción tisular de **P. gingivalis** y disminuyó significativamente la dosis de **P. gingivalis** necesarias para producir enfermedad, con aumento significativo de pérdida de los tejidos periodontales.

Yoneda y col. (2003) han estudiado los efectos de las infecciones mixtas por **P. gingivalis** y **T. forsythensis** en un modelo murino de absceso. La combinación de estos dos microorganismos mostró un efecto sinérgico sobre la formación del absceso. Esta coinfección de **P. gingivalis** y **T. forsythensis** ocasionó la formación de abscesos más graves, que con la monoinfección de una de las dos especies. El grupo rojo fue considerado el complejo más virulento en la progresión de la enfermedad periodontal, dado que los miembros de este consorcio crecen en número e incidencia al aumentar los parámetros clínicos de enfermedad periodontal (Kolembrandt y col, 2002).

Nuestros resultados coinciden con la observación de otros autores, en que la profundidad de la bolsa periodontal, guarda estrecha relación con la composición de la microbiota subgingival. (Torresyap y col, 2003). Se demostró que todas las especies del complejo rojo aumentaron de forma significativa al aumentar la profundidad de la bolsa periodontal. En el grupo de embarazadas, se observó que la presencia de **P. gingivalis** favorecería el incremento en la profundidad de sondaje. **P. gingivalis** posee factores de virulencia (lipopolisacáridos, proteasas, proteínas de membrana externa, productos metabólicos derivadas, etc) que le permiten adherirse a diversos tejidos, invadir las células y multiplicarse, produciendo la destrucción del tejido conectivo y óseo.

Las bolsas periodontales más profundas tienen una mayor área de superficie epitelial a la que pueden adherirse bacterias como **P. gingivalis** (Amano, 2003).

De igual modo concordamos con los datos publicados, referentes a que la presencia de inflamación gingival, afecta la composición de la microbiota en ese sector. Los miembros de los

complejos rojo (**P. gingivalis**, **T. forsythensis** y **T. denticola**) y naranja (**P. intermedia**) se encuentran en cantidades elevadas en las áreas que sangran durante el sondaje periodontal, lo que se considera un indicador clínico de inflamación periodontal (Amano, 2003). Estas especies pueden beneficiarse porque están más cerca de la fuente nutricia, ya que el líquido crevicular gingival en esta circunstancia, puede estar enriquecido por los productos derivados de la degradación tisular, favoreciendo el crecimiento de muchas de las especies anaeróbicas como **P. gingivalis** y **T. denticola**.

Los hallazgos en el grupo de embarazadas, en las que se identificó la presencia de **P. gingivalis**, **T. denticola** y **P. intermedia**, podrían relacionarse con el riesgo de Índice Gingival de Loe y Silness en mayor o igual a 2, lo que se traduce clínicamente como un incremento del grado de inflamación de los tejidos gingivoperiodontales.

Renvert y col. (1996) intentaron relacionar los parámetros microbiológicos con el éxito del tratamiento periodontal. Durante 5 años se trataron 12 pacientes con el objetivo de identificar **A.actinomycescomitans**, **P.gingivalis**, **P.intermedia**, y correlacionar los cambios microbiológicos con los parámetros clínicos. Se observó una significativa relación entre la pérdida de inserción clínica y la presencia de asociaciones de especies bacterianas en la biopelícula subgingival, determinando que **P. gingivalis** y **T. forsythensis** aumentan el riesgo de desarrollar periodontitis grave y reduce las posibilidades de éxito del tratamiento. Similares resultados fueron observados en nuestra investigación; es decir demostramos que la presencia de **P. gingivalis** y **T. denticola** incrementarían el riesgo de pérdida de inserción clínica, lo que aumentaría el riesgo de desarrollar periodontitis grave en mujeres embarazadas; mientras que en las no embarazadas, **T. forsythensis**, podría considerarse factor predisponente para desarrollar Periodontitis Grave. Tanner y col. (1984; 1998) describieron que **T. forsythensis** se aislaba con frecuencia junto con **P. gingivalis** en casos de periodontitis grave.

Otro parámetro analizado fue la edad de la mujer; observamos que las mujeres embarazadas mayores de 30 años podrían tener mayor riesgo de desarrollar bolsas mayores a 6 mm de profundidad, riesgo que incrementa al asociarse con la presencia de **P. gingivalis**.

Datos bibliográficos evidencian que la prevalencia de **P. gingivalis** en la placa subgingival se relaciona con la edad del paciente. En los pacientes con periodontitis, este patógeno aumenta en número, acorde la edad (Kawada y col, 2004).

Los hallazgos de este estudio evidenciaron que la técnica biomolecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue adecuada para describir la presencia o ausencia de los cinco patógenos:

P. gingivalis, T. forsythensis, P. Intermedia, A.actinomycetemcomitans y T denticola.

Resultó de interés observar en el estudio que se presenta, que las mujeres gestantes evidenciaron en sus bolsas periodontales la prevalencia de **P. gingivalis**. En tanto en los controles no embarazadas fue mas prevalente **T. forsythensis**. Este hallazgo que se consideraría original no ha sido comunicado según la literatura consultada.

La mayoría de los autores que trabajaron este tema, entre ellos Hugson, 1970; Jensen y col, 1981; Kornman y Lóesche, 1970; Raber-Durlacher y col, 1994, opinan que el estradiol y la progesterona pueden ser sustitutos de menadiona (vitamina K), utilizado como factor de crecimiento esencial para **P. intermedia**, pero no para **P. gingivalis**. Esta diferencia, encontrada en la composición de la microbiota de embarazadas, es muy posible que sea imputable al hecho de que aunque esos autores estudiaron mujeres embarazadas con diagnóstico de gingivitis, sin pérdida de inserción de los tejidos periodontales de soporte, ninguno de ellos especificó datos relacionados con la profundidad de sondaje de las muestras analizadas.

En el estudio que se presenta se tuvo especial cuidado en especificar la profundidad de sondaje de todos los elementos dentarios analizados de todas las pacientes, cuyas bolsas periodontales

promediaron 6mm, lo que podría explicar la presencia de este patógeno de virulencia conocida.

Asimismo se ha reconocido un aumento de **P. gingivalis** entre la 21 y 27 semana de gestación, si bien no fue estadísticamente significativo (Offenbacher y col, 1998).

No observamos diferencias estadísticamente significativas entre la consistencia de la encía y la composición de la microbiota periodontopática, en ninguno de los grupos de pacientes evaluadas, presentando ambos predominio de pared blanda de la bolsa periodontal edematosa.

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestra población, podríamos concluir que el embarazo potencia la respuesta de los tejidos periodontales al biofilm de placa dental. Este cambio hormonal fisiológico asociado a enfermedades gingivoperiodontales, favorecería la severidad de la patología, acentuando los síntomas clínicos, como hemorragia, edema, halitosis, movilidad y podría incrementar la pérdida de soporte periodontal y la profundidad de la bolsa. Esto lleva a la pérdida de los elementos dentarios afectados y por consiguiente a la pérdida de la salud y función masticatoria, afectando la estética bucal del paciente con el consiguiente daño psicológico que podría ocurrir. Además, la alta prevalencia de las patologías que afectan a los tejidos gingivales y periodontales en nuestra población joven, hace imperiosa la necesidad de realizar estudios epidemiológicos con el fin de aplicar programas, que nos permitan actuar a nivel de salud pública.

La microbiología clínica periodontal puede desempeñar un papel en el diseño de terapias efectivas y en el control de la eficacia del tratamiento. .

El análisis microbiano en periodoncia apunta a, seleccionar individuos con más probabilidades de beneficiarse de la terapia sistémica antimicrobiana complementaria. El conocimiento de la microflora ayuda a los profesionales a elegir el tratamiento antibiótico más apropiado de acuerdo con la composición de la microflora subgingival. Esto podría contribuir a minimizar el empleo excesivo de agentes antibacterianos potentes y la aparición de resistencias bacterianas, a detectar la transmisión

horizontal y vertical de agentes patógenos periodontales entre los miembros de una familia y ayuda a determinar el punto final del tratamiento periodontal activo y a establecer los intervalos para los cuidados periodontales de mantenimiento (Mullally y col, 2000).

VI-Conclusiones

VI-CONCLUSIONES:

- Las enfermedades gingivoperiodontales son polimicrobianas y mixtas, por lo tanto ninguna de las especies bacterianas por sí sola es suficiente para determinar la progresión y/o severidad de la enfermedad periodontal, sino que dichas especies existen asociadas entre si, a modo de complejos dentro de la matriz de la biopelícula, y son los responsables del proceso de enfermedad.
- En mujeres embarazadas, se observó una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.01$) con un coeficiente de proximidad phi alto (0.18 a 0.56) entre *P. gingivalis*/*T. forsythensis*, *P. gingivalis*/*T. denticola* y *T. forsythensis*/*T. denticola*. En las mujeres no embarazadas, la asociación que observamos es entre *P. intermedia*/*A. actinomycetemcomitans* y *T. denticola*/*T. forsythensis*.
- La profundidad de la bolsa periodontal guarda estrecha relación con la composición de la microbiota subgingival. Se demostró que las especies del complejo rojo, principalmente *P. gingivalis* incrementan la profundidad de sondaje en mujeres gestantes. La asociación *P. gingivalis*–profundidad de bolsa no mostró diferencia significativa en mujeres no embarazadas.
- La composición de la microbiota subgingival se modifica en zonas que presentan signos de inflamación gingival, los miembros de los complejos rojo y naranja (*P. gingivalis*, *T. denticola* y *P. intermedia*) se encuentran en cantidades elevadas en las áreas que presentan hemorragia durante el sondaje periodontal.
- Existe estrecha relación entre la pérdida de inserción clínica y la presencia de los patógenos detectados en la placa subgingival. La asociación entre *P. gingivalis* y *T. denticola*, en embarazadas podría incrementar el riesgo de desarrollar periodontitis grave y reduce las posibilidades de éxito del tratamiento. En mujeres no embarazadas, la presencia de *T. forsythensis* podría predisponer a la pérdida de los tejidos de soporte periodontal.
- En la microbiota de las mujeres gestantes de la comunidad estudiada, prevalece principalmente el

desarrollo de *P. gingivalis* y en las no embarazadas *T. forsythensis*. *P. gingivalis* podría presentar un comportamiento dependiente del estado de gravidez de la mujer. La distribución de las especies bacterianas parece independiente del periodo de gestación.

- La edad de la embarazada podría ser considerada como factor de riesgo que afecta la severidad de la lesión. En embarazadas mayores de 30 años se detectó aumento de *P. gingivalis*.
- La enfermedad periodontal es considerada un factor de riesgo para el embarazo lo que conduce a la necesidad de realizar estudios epidemiológicos con el fin de implementar programas de diagnóstico, prevención, y tratamiento de la enfermedad en embarazadas, que nos permitan brindar soluciones a la problemática de nuestra comunidad.

VII-Resumen

VII-RESUMEN

El embarazo no causa gingivitis. Las patologías gingivoperiodontales reconocen una etiología bacteriana, representada por un biofilm que asienta sobre un huésped modificado, por el aumento de las hormonas sexuales femeninas, que facilita el crecimiento selectivo de patógenos periodontales.

Las hormonas actúan como factores de crecimiento que satisfacen los requerimientos de los anaerobios Gram negativos, favoreciendo el desarrollo del biofilm propio de la embarazada.

Nos propusimos conocer mediante PCR, la distribución y asociaciones bacterianas de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T.forsythensis*, *T. denticola*, en bolsas periodontales de embarazadas y no embarazadas, que asisten al Hospital Materno Provincial de Córdoba, a los efectos de correlacionar la bacteriología con la severidad de la enfermedad

Se examinaron 150 pacientes embarazadas en diferentes estadios del embarazo y 50 mujeres no embarazadas, de 18 a 40 años. Se seleccionaron bolsas periodontales y se las clasificaron según la profundidad de sondaje, pérdida de inserción clínica, diagnóstico clínico, y consistencia de la encía

La toma de las muestras de placa subgingival se realizó según la técnica propuesta por Slots (1995), modificada con la confección de placas guías de acrílico, cuya finalidad es permitir la introducción de varias puntas de papel en el mismo sitio de la bolsa. Se extrajo ADN y se amplificaron secuencias del gen 16S rRNA

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que las enfermedades gingivoperiodontales son polimicrobianas y mixtas; las especies bacterianas se asocian entre sí, a modo de complejos, potenciando su capacidad patogénica y se incrementan bacterias anaerobias Gram negativas responsables del aumento de la inflamación. Prevalciendo en mujeres gestantes estudiadas el desarrollo de *P. gingivalis* y en las no embarazadas *T. forsythensis*.

El embarazo podría potenciar las manifestaciones clínicas de las patologías periodontales, lo que conduce a la necesidad de implementar programas de diagnóstico, prevención y tratamiento.

VIII- Summary

VIII-SUMMARY

Pregnancy does not cause gingivitis. Gingivoperiodontal pathologies recognize a bacterial etiology, represented by a biofilm which it lays on a modified host, due to the increase of female sexual hormones, which facilitates the selective growth of periodontal pathogens.

Hormones behave as growth factors which meet the requirements of Gram negative anaerobes, favoring the development of the pregnant woman's own biofilm.

Our aim was to know, by means of PCR, the distribution and bacterial associations of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* and *T. denticola*, in the periodontal pockets of pregnant and non-pregnant women attending at Hospital Materno Provincial in Córdoba, in order to correlate the bacteriology with the severity of the disease.

150 pregnant patients in different stages of their pregnancy and 50 non-pregnant women, between 18 and 40 years old, were examined. Periodontal pockets were selected and classified according to probe depth, loss of clinical attachment, clinical diagnosis and gum consistency.

Subgingival plaque samples were taken according to the technique proposed by Slots (1995), modified with the making of acrylic guiding plaques, the aim of which being to enable the introduction of several paper points in the same site of the pocket. DNA was extracted and 16 S rRNA gene sequences were amplified.

The results obtained show that gingivoperiodontal diseases are polymicrobial, bacterial species associate between themselves, in compounds, boosting their pathogenic capacity and gram negative anaerobic bacteria, which cause inflammation, increase. In the pregnant women studied, the development of *P. gingivalis* prevailed whereas *T. forsythensis* predominated in non-pregnant women.

Pregnancy could boost the clinical manifestations of periodontal pathologies, which brings about the need for carrying out diagnosis, prevention and treatment programs.

IX- Bibliografía

IX-BIBLIOGRAFÍA

- **Albander JM, Olsen I, Gjermo P (1990).** Association between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontol Scand.* 48: 415-423.
- **Amano A (2003).** Molecular interaction of Porphiromonas gingivalis with host cell: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontol.* 74: 90-96.
- **American Academy of periodontology (1996).** Position paper. *Journal of Periodontology* 2000. 71: 664-678.
- **Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers DW (1982).** Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol.* 53: 550-556.
- **Ashimoto A, Chen C, Bakker J (1996).** Polimerase Chain Reaction Detection of putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advance periodontitis lesions. *Oral Microbiology and immunology.* 11:266-273.
- **Cohen DW, Shapiro J, Friedman L, Kyle G, Franklin S (1971).** A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy and fifteen months post-partum. Part II. *Journal of Periodontology.* 42: 653-657.
- **El-Ashiry GM, El-Kafrawy AH, Nasr MF and Younis N. (1970).** Comparative study of the influence of pregnancy and oral contraceptives on the gingivae. *Oral Medicine.* 30: 472-475.
- **Ganong WF.** Gonadas: desarrollo y funciones del aparato reproductor. En: *Fisiología Médica* 13 Edición. Editorial El Manual Moderno, Méjico DF, 1992, pp 378-415.
- **Gmur R, Strub JR, Guggenheim B (1989).** Prevalence of Bacteroide forsythus and Bacteroides gingivalis in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodontal*

Res. 24: 113-120.

- **Gottlieb B.(1928)** The formation of the pocket. Diffuse atrophy of the alveolar bone. J. Am, Dent.Assoc. 15: 462-465.
- **Haffajee AD; Socransky SS (1994).** Microbial etiological of destructive periodontal diseases.Microbiology and Immunology of Periodontal diseases. Periodontology 2000 5:78-111.
- **Haffajee AD, Socranky SS (2000).** Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adults periodontitis. J Clin. Periodontal. 2000; 27: 722-732.
- **Holt SC, Ebersole JL (2005).** Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola and Tannerella forsythia: The red complex prototype polibacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol 2000. 38: 72-122.
- **Hugson A (1970).** Gingival inflamation and female sex hormones. A clinical investigation of Pregnant woman and experimental studies in dogs. J. of periodontal Research supplements.vol: 5.
- **Jensen J, Liljermark W, Bloomquist C (1981).** The effects of female sex hormones on subgingival plaque. Journal of Periodontology. 52: 599-602.
- **Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Saito T (2004).** Prevalence of Porphyromona gingivalis in relation to periodontal assessed by real-time PCR. Oral Microbiol Immunol. 19: 289-292.
- **Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Okuda K (1995).** Distribution of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in human subgingival plaque at difeferent periodontal pocket depths, examined by immunohistochemical. Oral Microbiol Immunol. 9: 28-32
- **Kiley P, Host SC (1980).** Characterization of the lipopolysaccharide from Actinobacillus actynomicetemcomitans Y4 and N27. Infect Immun. 30: 862-873.
- **Klein MI, Goncalves RB (2003).** Detection of Tannerella forsythensis and Porphyromona gingivalis by Polimerase chain reaction in subjects with different periodontal status. J Periodontol.

74:798-802.

- **Kolebrander PE, London J (1993).** A here today, here tomorrow: oral bacteria adherence. *J Bacteriol.* 7: 406-413.
- **Kolebrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ (2002).** Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 66: 486-505.
- **Kornman KS, Loesche WJ (1980).** The Subgingival Microflora during Pregnancy. *Journal of Periodontal Research.* 5:111-122.
- **Lindhe J, Branemark P (1967).** Changes in Microcirculation after local application of sex hormones. *J Periodontol Res* 2: 185.
- **Lisgarten M (1976).** Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. *J Periodontol.* 47:1-18.
- **Lisgarten M A, Heudon L (1978).** Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J. Clin. Periodontol.* 5:115.
- **Loe H, Silness J (1963).** Periodontal Disease in Pregnancy, Prevalence and Severity. *Acta Odontológica Scandinava.* 21: 531-551.
- **Loe H (1965).** Periodontal changes in pregnancy. *Journal of Periodontology.* 36: 37-44.
- **Mariotti A (1999).** Dental plaque-induced gingival diseases. *Annals of Periodontology.* 4: 7-19.
- **Mayrand D (1985).** Virulence Promotion by Mixed bacterial infections. *The Pathogenesis of bacterial* Springer-Verlag pp 282-291.
- **Miller WD (1891).** The human mouth as a focus of infection. *Dental Cosmos.* 33: 689-713.
- **Mombelli A, Gmur R, Gobbi C, Lang N (1994).** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis I topographic distribution before and after treatment. *J Periodontol.* 65: 820-826.
- **Moore WCC, Moore LH (1994).** The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000.

5:66-77.

- **Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff LF, Coulter WA (2000).** Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *J Periodont Res.* 35: 232-241.
- **Noiri Y, Li L, Ebisu S (2001).** The localization of periodontal disease associated bacteria in human periodontal pockets. *J Dent Res.* 80: 1930-1934.
- **Offenbacher S, Zambon JJ (1996).** Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1: 926-932.
- **Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G (1996).** Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol.* 67: 1103-1113.
- **Offenbacher S, Jarod HL, O'Railly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP (1998).** Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol.* 3: 233-25021.
- **Offenbacher, S; Beck, J (1998)** Periodontitis: A Potential Risk Factor for Spontaneous Preterm Birth. *Periodontal Aspects of systemic health vol 1:* 32-39.
- **Onagawa M, Ishihara K, Okuda K (1994).** Coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Bull Tokyo Dent Coll.* 35: 171-181.
- **O'Neil TAC (1979).** Maternal-Lymphocyte response and gingivitis pregnancy. *Journal of Periodontology.* 50:178-198.
- **Parodi RJ, Dominguez FV (1970).** Mast-cells in the gingival of pregnancy women. *Journal of Dental Research (Abst) Suppl, N° 5:* 59, 998.
- **Parodi R, Sembaj A, Bazano G, Tabares S, Usín MM (2001).** PCR for detection and tipification of periodontal pathogens. *Journal Dental Research.* 80 (4): 960.

- **Raber-Durlacher JE, Van Steenberghe tjm, Van Der Velden U, de Graff J (1994).** Experimentel gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodol.* 21: 549-558.
- **Ramberg P, Axelsson P, Lindhe J (1995).** Plaque formation at healthy and inflamed gingival sites in young individuals. *J Clin Periodontol.* 22: 85-88.
- **Renvert S, Dahlen G, Wikstrom M (1996).** Treatment of periodontal disease based on microbiological and clinical parameters during 5 years. *J Periodontol.* 67: 562-571.
- **Roberts SK, Bass C, Broding M, Stoodley P (1999).** Biofilm information and structure: What's new?. *Dental plaque Revisited Cardiff Bioline.* 15-35.
- **Ruffer MA (1921).** *Studies in the Paleopathology of Egypt.* Chicago University.
- **Savit ED, Keville MW, Peros WJ (1990).** DNA Probes in the Diagnosis of Periodontal Microorganisms *Arch Oral Biol.* 35: 153-159.
- **Schenkein H (1999).** The pathogenesis of periodontal disease. *Journal Periodontol.* ;70:457- 470.
- **Shiloah J, Patters MR, Dean III JW, Bland P, Toledo G (1998).** The prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in humans 1 year after 4 randomized treatment modalities. *J Periodontol.* 69:1364-1372.
- **Silness J, Loe H (1963).** Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont. Scand.* 22: 122.
- **Simonson LG, Mc Mahon KT, Childers DW, Morton HE (1992).** Bacterial synergy of *Treponema denticola* and *Porphyromona gingivalis* in a multinational population. *Oral Microbiol Immunol.* 7: 111-112.
- **Simonson LG, Goodman CH, Bial JJ, Morton HE (1988).** Quantitative relationship of

Treponema denticola to severity of periodontal disease. Infect Immun. 56: 726-728.

- **Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ; Guoliang, LI and Chen C (1995).** In subgingival specimens by 16S Ribosomal DNA Amplification with the Polymerase Chain Reaction. Clin Infectious Diseases. 20:304-307.
- **Slots J, Ting M (1999).** Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000. 20: 82-121.
- **Socransky SS, Haffajee AD (1991).** Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. J Periodont Res. 26: 195-209.
- **Socransky SS, Haffajee AD (1992).** The Bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. Journal of Periodontology. 63:322-331.
- **Socransky SS, Haffajee AD, Cugini NA, Smith C, Kert RL Jr (1998).** Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol. 25: 134-144.
- **Socransky SS, Smith C, Haffajee AD (2002).** Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. J Clin Periodontol. 29: 260-268.
- **Socransky SS, Haffajee AD (2005).** Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000.38:135-187.
- **Tanner ACR, Haffer C, Bratthall Visconti RA, Socransky SS (1979).** A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol. 6: 278-307.
- **Tanner ACR, Socransky SS, Goodson JM (1984).** Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. J Periodontal Res. 19: 279-291.
- **Tanner ACR, Maiden MFJ, Macuch PJ, Murray LL, Kent Jr RL (1998).** Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. J Clin Periodontol. 25:85-98.
- **Torresyap G, Haffajee AD, Uzel NG, Socransky SS (2003).** Relationship between

periodontal pocket sulfide levels and subgingival species. *J Clin Periodontol.* 30: 1003-1010.

- **Trans SD, Rudney JD (1999).** Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 37: 3504-3508.
- **Van Winkelhoff AJ, Winkel EG (2005).** Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000.* 39: 40–52.
- **Vitteck J, Hernandez MR, Werz EJ, Rappaport SC, Southren AL (1982).** Specific estrogen receptors in human gingiva. *J. Of Clin Endocrinology and Metabolism.* 54: 608-612.
- **Watanabe K, Frommel TO (1996).** *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol.* 23: 212-219.
- **Yang HW, Huang YF, Chou MY (2004).** Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol.* 75: 1077-1083.
- **Yoneda M, Hirofuji T, Motooka N, Nozoe K, Shigenaga K (2003).** Humoral immune responses to S-layer-like proteins of *Bacteroides forsythus*. *Clin Diagn Lab. Immunol.* 10: 383-387.