

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



TESIS DOCTORAL

Estudio de prevalencia y susceptibilidades antimicrobianas de diferentes periodontopatógenos en pacientes con periodontitis crónica en Brasil

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Stella Maria Prudente Corrêa

Directores

David Herrera González
Mariano Sanz Alonso
Sergio Salvador

Madrid, 2012

ESTUDIO DE PREVALENCIA Y SUSCEPTIBILIDADES
ANTIMICROBIANAS DE DIFERENTES PERIODONTOPATÓGENOS
EN PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA EN BRASIL

Autor:

Stella Maria Prudente Corrêa

Directores:

Prof. Dr. David Herrera González

Prof. Dr. Mariano Sanz Alonso

Colaborador:

Prof. Dr. Sergio Salvador (USP Ribeirão Preto)

Sección de Periodoncia - Universidad Complutense de Madrid

Dirección de correspondencia:

Rua Barão de Atibaia, 778 Guanabara

Campinas – S.P. Brasil

CEP 13023-011

email: stellampc@hotmail.com

Dedicado a minha mãe que me respaldou por todos estes anos com seu carinho, a meu pai que apoiou minha curiosidade juvenil e por isso tornei-me uma incansável questionadora e a meu marido e companheiro de todas as horas que sempre contesta com carinho meus atos, fazendo com que eu cresça como pessoa.

Abreviaturas

PJL	Periodontitis juvenil localizada/periodontitis de inicio precoz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
CPITN	Community Periodontal Index for Treatment Needs – Índice Periodontal Comunitario de Necesidades de Tratamiento
EE.UU.	Estados Unidos de América
PCR	Polimerase chain reaction - reacción de polimerasa en cadena
ELISA	Enzymed linked inmunosorbent assay – Ensayo de unión enzimática inmunoabsorbente
BANA	N-Benzoil-DL-Arginina-Z-Naftilamida
MIC	Minimal concentration inhibitory - concentración inhibitoria mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CONEP	Comissão nacional de ética em pesquisa (Brasil)
ISG	Índice de sangrado gingival
IP	Índice de Placa
PS	Profundidad de sondaje
NIC	Nivel de inserción clínica
IS	Índice de supuración
RTF	Reduced transport fluid – fluido reducido de transporte
mm	Milímetros

mg/L	Miligramos por litro
µg	Microgramos
N ₂	Nitrógeno
H ₂	Hidrógeno
NH ₃	Amonio
H ₂ S	Gas sulfhídrico
CO ₂	Gas carbónico
°C	Grados centígrados
E-test	Epsilometer test
UFC	Unidades formadoras de colonias
PBS	Phosphate Buffer Saline - Tampón salino con fosfato
PG	Penicilina
CM	Clindamicina
TC	Tetraciclina
CI	Ciprofloxacino
MZ	Metronidazol
AC	Amoxicilina
Az	Azitromicina
XI	Amoxicilina con clavulanato
>	Mayor que
<	Menor que
Log	Logaritmo

Resumen

El objetivo de este estudio transversal fue investigar la prevalencia de periodonto-patógenos putativos en pacientes brasileños adultos diagnosticados con periodontitis crónica sin tratamiento previo, seleccionados de acuerdo con criterios clínicos predefinidos, y como un segundo objetivo, verificar la eficacia antimicrobiana de diferentes antibióticos *in vitro* para cada cepa testada.

Después de una anamnesis clínica, treinta pacientes fueron seleccionados, y se tomaron muestras microbiológicas de los cuatro dientes con localizaciones más profundas y con sangrado al sondaje.

Las muestras fueron inoculadas en placas de agar sangre para la determinación del recuento total de anaerobios e identificación de especies bacterianas patógenas. Después del tiempo de incubación, se aislaron diferentes cepas de patógenos periodontales y se evaluaron en cuanto a su susceptibilidad a ocho antimicrobianos usando la técnica Epsilometer (E-Test AB Biodisk, Solna, Suecia): Penicilina, Clindamicina, Tetraciclina, Ciprofloxacino, Metronidazol, Amoxicilina más Clavulanato, Amoxicilina y Azitromicina.

Las cepas más prevalentes en pacientes brasileños fueron *Parvimonas micra*, seguido de *Prevotella intermedia*. Microorganismos oportunistas como bacilos entericos, *Candida* spp. y *Pseudomonas* spp. tuvieron una prevalencia relevante en esta investigación, con implicaciones en los resultados de los tests antimicrobianos *in vitro*.

Palabras clave: Periodontitis crónica, epidemiología, microbiología, periodonto-patógeno, prevalencia microbiológica, Brasil, susceptibilidad antimicrobiana, E-test.

Abstract

The purpose of this cross sectional study was to investigate the prevalence of putative periodontal pathogens in Brazilian adult patients with diagnosis of untreated chronic periodontitis, selected according to pre-defined clinical criteria. Furthermore the *in vitro* antimicrobial efficacy of different agents against isolated strains was tested.

After a clinical anamnesis, thirty patients were selected, and microbiological samples were taken from the four teeth with the deepest sites with bleeding on probing.

The samples were inoculated on blood agar plates for determination of total anaerobic counts and identification of bacterial pathogens. After incubation time, different periodontal pathogen strains were isolated and tested against eight antimicrobials for susceptibility by the Epsilometer test (E-Test AB Biodisk, Solna, Sweden): Penicillin, Clindamycin, Tetracycline, Ciprofloxacin, Metronidazole, Amoxicillin plus Clavulanic acid, Amoxicillin and Azithromycin.

The most prevalent strains in Brazilian patients were *Parvimonas micra*, follow by *Prevotella intermedia*. Opportunistic microorganisms, such enteric bacilli, *Candida* spp. and *Pseudomonas* spp. demonstrated a relevant prevalence in the present research, with implications in the *in vitro* antimicrobial test.

Key words: chronic periodontitis, epidemiology, microbiology, periodontal pathogens, microbiological prevalence, Brazil, antimicrobial susceptibility, E-test.

Sumario

1. Introducción.....	17
2. Enfermedades periodontales.....	20
3. Epidemiología de las enfermedades periodontales.....	22
3.1. Datos mundiales.....	25
3.2. Datos en Brasil.....	32
4. Etiología de las enfermedades periodontales.....	35
4.1. Modelo etiológico multifactorial.....	36
4.1.1. Anatomía.....	36
4.1.2. Hábitat Oral.....	37
4.1.3. Biofilm.....	40
4.1.4. Genética.....	45
4.1.5. Respuesta inmune.....	46
4.1.6. Factores de riesgo.....	48
4.1.7. Factores sociales y comportamentales.....	51
4.2. Infecciones periodontales y enfermedades sistémicas.....	52
4.2.1. Enfermedades cardiovasculares.....	52
4.2.2. Nacimiento prematuro y bajo peso neonatal.....	54
4.2.3. Diabetes Mellitus.....	55
5. Microbiología de las enfermedades periodontales.....	56

6. Patógenos periodontales.....	62
6.1. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	62
6.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	63
6.3. <i>Tannerella forsythia</i>	65
6.4. <i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	67
6.5. <i>Fusobacterium nucleatum</i>	67
6.6. <i>Campylobacter rectus</i>	68
6.7. <i>Parvimonas micra</i>	68
6.8. <i>Capnocytophaga</i> spp.....	69
6.9. Otras especies.....	70
7. Métodos de estudio en microbiología periodontal.....	75
7.1. Estudios con microscopio.....	75
7.2. Cultivo bacteriano.....	77
7.3. Técnicas inmunológicas.....	77
7.4. Técnicas enzimáticas.....	82
7.5. Técnicas de biología molecular.....	83
7.6. Técnicas avanzadas.....	87
8. Tratamiento de las enfermedades periodontales.....	91
8.1. Tratamientos mecánicos.....	92
8.1.1. Higiene Oral personal.....	92
8.1.2. Tratamiento periodontal básico.....	93
8.1.3. Tratamiento quirúrgico.....	97

8.2. Terapéutica antimicrobiana.....	98
8.3. Otras Terapias.....	106
9. Justificación del estudio.....	112
10. Hipótesis.....	114
11. Objetivos del estudio.....	115
12. Material y métodos.....	117
12.1. Diseño del estudio.....	117
12.2. Pacientes.....	117
12.3. Variables respuesta: clínicas.....	121
12.4. Variables respuestas: microbiológicas.....	123
12.5. Susceptibilidad antimicrobiana para microorganismos periodontales : E-test.....	127
12.6. Análisis de los datos.....	133
13. Resultados.....	144
13.1. Datos demográficos de la muestra.....	144
13.2. Características clínicas de la muestra.....	145
13.3. Total de recuentos bacterianos.....	146
13.4. Frecuencia de detección de diferentes especies bacterianas.....	148
13.5. Proporción de muestras positivas de diferentes especies bacterianas.....	148
13.6. Tests de susceptibilidad antimicrobiana.....	149

14. Discusión.....	153
14.1. Datos demográficos.....	156
14.2. Datos clínicos.....	157
14.3. Datos microbiológicos.....	159
14.4. Susceptibilidad frente a antimicrobianos.....	164
15. Sumario.....	168
16. Conclusiones.....	171
17. Bibliografía.....	174
18. Anexos	
Anexo I. CONEP.....	211
Anexo II. Modelo de consentimiento del paciente.....	214
Anexo III. Fotografías del E-test.....	216
Anexo IV. Tablas.....	218
Anexo V. Modelo de la ficha de registro del pacientes.....	238

1. Introducción

La Odontología ha cambiado drásticamente en los últimos 80 años. La prerrogativa de “salvar el diente” del paciente, da cada vez más lugar a un énfasis en el diagnóstico, tratamiento, control de infección y establecimiento de un ambiente oral que contribuya para su salud general y bien estar. Mucho del progreso odontológico está basado en hallazgos de investigaciones de laboratorio, en la práctica de la clínica odontológica y estudios clínicos por todo el mundo.

Nuevas evidencias científicas disponibles demuestran que las periodontitis son enfermedades con implicaciones infecciosas e inmunológicas, y tienen como consecuencia local más grave la pérdida dental. Hoy ya es posible el diagnóstico precoz de la enfermedad y la posibilidad de prever un posible pronóstico tras una terapia específica.

Los conceptos etiopatológicos de las enfermedades periodontales se derivan principalmente de los resultados de estudios epidemiológicos. Estudios que indican, de forma consistente, que la ocurrencia y extensión de la enfermedad aumentan con la edad y la higiene dental inadecuada. La mayoría de las formas de la enfermedad periodontal están asociadas a la

placa bacteriana, que inicia una inflamación visible en las encías (Kinane et al. 2003).

Así, si la causa inicial directa de las enfermedades periodontales es el acúmulo de placa bacteriana en los márgenes cervicales de los dientes y su extensión a lo largo de la superficie de la raíz (Brecx et al. 1993, Page 1986 y Schroeder & Attström 1980), el elemento crucial para el tratamiento y mantenimiento de los pacientes pasa por el conocimiento de los microorganismos patogénicos de la placa, y sus mecanismos de acción y control.

Compuesta de innumerables especies bacterianas, se estima que la variedad de tipos bacterianos de la placa sea de aproximadamente 700 especies (Haffajee & Socransky 2006). Y, a pesar de que este conocimiento está accesible desde hace algún tiempo, muchas de las infecciones orales, así como las enfermedades periodontales, son tratadas empíricamente, sin la identificación microbiológica del agente etiológico, en la clínica diaria. El abordaje empírico no siempre tiene éxito, debido a las resistencias antibióticas y a la selección de antibióticos con base a identificaciones incorrectas del agente infeccioso (Loomer & Armitage 2006).

A pesar del uso de la microbiología durante más de un siglo en la medicina, para el diagnóstico clínico y plan de tratamiento de enfermedades

infecciosas, solo más recientemente, con el desarrollo de técnicas modernas, se ha podido utilizar como una herramienta de diagnóstico en Periodoncia, Cariología e Implantología (van Winkelhoff & Winkel 2005 b).

En Periodoncia, el análisis microbiológico subgingival es útil cuando la información tiene el potencial de orientar el clínico en estrategias de tratamiento más efectivas. El diagnóstico microbiano en la fase del diagnóstico de la enfermedad periodontal puede ser utilizado para evaluar el tipo y el grado de la intervención terapéutica a ser utilizada (Van Winkelhoff & Winkel 2005 b).

El presente trabajo fue preparado teniendo en cuenta la necesidad clínica de profundizar en el estudio de los microorganismos patogénicos de la placa bacteriana de pacientes con periodontitis crónica en Brasil, y en el estudio de la efectividad de los antibióticos más usados clínicamente para el tratamiento coadyuvante de las enfermedades periodontales.

2. Enfermedades Periodontales

Las enfermedades periodontales constituyen un problema de salud pública, estando en estudios de prevalencia a nivel mundial como la mayor causa de pérdida dental en adultos, después de las caries (Papapanou 1996). Las enfermedades periodontales están entre las infecciones más comúnmente observadas y representan una gran preocupación de la salud pública mundial (Löe & Silness 1963, van Dyke & Shileh 2005 y Teng 2006).

Para que una enfermedad sea considerada como importante se tiene en cuenta la prevalencia total, el total de demanda, y el impacto de la enfermedad en los sujetos y en la sociedad, en términos de dolor, incomodidad, estética, además del impacto económico.

Con signos muy difíciles de medir en investigación y con síntomas poco específico para los pacientes, las enfermedades periodontales destructivas (periodontitis) afectan a cada sujeto de una manera particular. Su secuela local más grave, la pérdida dental, no se registra con suficiente sensibilidad en estudios epidemiológicos, lo que puede resultar en una subestimación de su prevalencia y severidad (Papapanou 1996).

La selección de pacientes en estudios epidemiológicos es una dificultad, pues los sujetos normalmente más afectados por la enfermedad no participan de estudios, al contrario de los que tienen buen estado de salud bucal. Este concepto puede ser aplicable a los dientes, dado que los más severamente afectados por la enfermedad pueden haber sido extraídos o perdidos, previamente a la investigación, no siendo evaluados adecuadamente (Papapanou 1996).

La gran mayoría de los sujetos afectados por periodontitis tiene una edad entre los 40 y 60 años, y están en plena actividad productiva, pudiendo generar un impacto económico también sobre la sociedad.

3. Epidemiología de las enfermedades periodontales

La epidemiología se preocupa de la distribución de las enfermedades en la población, y de la aplicación de este conocimiento para controlar los problemas de salud. Es primordial entender el curso natural de la enfermedad y los factores que influyen su disposición en la población. Así, se buscan maneras efectivas de reducir su ocurrencia o sus secuelas. Es un campo multidisciplinar que se concentra en grupos poblacionales.

Las investigaciones epidemiológicas pueden ser observacionales o experimentales.

Los estudios observacionales, o epidemiología descriptiva, se caracterizan por los hechos y condiciones relativos a la ocurrencia de la enfermedad en un grupo de personas. Describe los aspectos físicos (edad, sexo, raza/etnia), aspectos geográficos (distribución geográfica) y temporales.

En investigaciones experimentales, o epidemiología constructiva, el investigador tiene el control sobre la exposición de interés y define a los sujetos como expuestos y no expuestos, o tratados y no tratados, controlando las características de exposición y los factores que influyen tal exposición.

La epidemiología en Periodoncia tiene varios problemas. El diagnóstico, el acto de identificar los signos y síntomas de la enfermedad y la clasificación, como método de distribución de las enfermedades en grupos, son debatidos desde los comienzos de la Periodoncia. Actualmente la controversia continúa. Si de 1870 a 1920, la clasificación de la enfermedad se basaba en características clínicas, la última clasificación de 1999 está basada en el paradigma infección / respuesta del huésped, que empezó a ser el paradigma dominante en los años de 1970. Pero todavía sabemos muy poco para diagnosticar y clasificar etiológicamente las enfermedades periodontales de un paciente (van der Velden 2005). Por culpa de esta limitación en el diagnóstico y clasificación, todavía no se logró crear un índice adecuado para el examen de la patología.

La destrucción periodontal es un proceso gradual, no uniforme, que presenta una variabilidad muy grande de una localización a otra. Los índices expresan numéricamente la condición gingival y/o periodontal basados en una descripción subjetiva de la inflamación y destrucción de los tejidos periodontales.

Los estudios epidemiológicos utilizan una cantidad enorme de síntomas, como sangrado, profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica, pérdida de hueso alveolar, de manera inconsistente. Hay variaciones considerables

con respecto a los umbrales en la definición de bolsas periodontales profundas o patológicas, o de nivel de inserción clínica, e incluso la pérdida de hueso alveolar, necesarios para aceptar que, de hecho, ocurrió una verdadera pérdida de tejido periodontal de soporte.

Hay todavía controversia en la cantidad de superficies dentarias afectadas necesarias para cualificar un diente como portador de enfermedad, lo que, inevitablemente, tienden a cambiar las estimaciones que describen la enfermedad (Papapanou 1996).

Las condiciones de examen de los pacientes también son muy controvertidos, como por ejemplo, si todos los dientes deben ser examinados, o solamente un grupo; si el sondaje debe de ser de toda la circunferencia del diente o parcial; y qué instrumentos periodontales deben ser utilizados.

Quizás debido a todas estas dificultades para realizar investigaciones epidemiológicas en Periodoncia, hay una ausencia de estudios de prevalencia en varios países, y muchos datos son regionales y no representan la población total (Papapanou 1996).

3.1. Datos mundiales

Los estudios médicos antiguos se refieren a varias enfermedades de los dientes y sus tejidos de sustentación, pero sin utilizar ninguna terminología especial. El primer nombre científico para la enfermedad de los dientes y su tejido de sustentación ha sido el término “escorbuto gingival” dado por Fauchard en 1723. En la década del 1920, Gotlieb clasificó la enfermedad periodontal en cuatro tipos: piorrea-*Schmutz* (del alemán piorrea-suciedad), atrofia alveolar, piorrea-paradental y trauma oclusal. Más o menos al mismo tiempo, McCall y Box introdujeron el término periodontitis para indicar una enfermedad inflamatoria que afectaba los tres componentes del periodonto: encías, hueso y ligamento periodontal (van der Velden 2005). Orban y Weinmann adoptaron el término periodontosis, considerando la enfermedad como una secuela degenerativa de la gingivitis, aunque este concepto fue luego abandonado (van der Velden 2005).

Más adelante, empezaron los estudios epidemiológicos en Periodoncia, y entre 1950 y 1970 gran parte de estos estudios usaron el índice periodontal de Russell, para caracterizar la condición periodontal de la población. La periodontitis estaba, según los conocimientos de la época, fuertemente relacionada con una higiene bucal inadecuada, cálculo, bajo nivel socio económico, ausencia de acceso a la educación y a los cuidados dentarios (Russell 1967, Waerhaug 1967, Bukley & Crowley 1984, Barros & Witkop

1963, Burt et al. 1985). Estos mismos estudios relataron que los adultos de los Estados Unidos de América (EE.UU.) tenían valores de la enfermedad muy bajos, en Latinoamérica los valores eran intermedios y la mayoría de las poblaciones de Asia y Oriente Medio tenían valores muy altos. Se suponía que grupos con acceso limitado a los cuidados dentarios de naciones en desarrollo tenían más enfermedad que los de países industrializados (Russell 1967, Waerhaug 1967, Bukley & Crowley 1984).

Pero el índice de placa de Russell acabó siendo desplazado por otros índices, pues mostraba discordancia en los niveles de placa que resultan en gingivitis, al contrario que las variables más adecuadas, que son las medidas de los niveles de inserción o de pérdida ósea (Ronderos & Michalowicz 2006)

El modelo de patogénesis de la enfermedad periodontal de los años 1970 era:

- Todos los sujetos era igualmente susceptibles a la periodontitis.
- La gingivitis, a largo plazo, invariablemente progresaría a periodontitis, con la consecuente pérdida dental. La gingivitis y la periodontitis serían estadios diferentes de la misma enfermedad.
- La susceptibilidad de la enfermedad periodontal aumentaría con la edad.

- El riesgo de la enfermedad periodontal estaba solamente determinado por factores ambientales. Se creía que la higiene oral inadecuada y la edad explicarían el 90% de las diferencias entre los sujetos (Russell 1967).

Löe et al. en 1986 desafiaron este concepto con su investigación longitudinal en los trabajadores de té de Sri Lanka, observando que los sujetos no son igualmente susceptibles al desarrollo de la enfermedad periodontal. Los pacientes del estudio no tenían acceso a cuidados odontológicos y la higiene oral era inadecuada, y fueron clasificados como: portadores de enfermedad periodontal de progresión “lenta” (11% de los individuos), 81% como portadores de periodontitis de progresión “moderada” y el 8% restantes con periodontitis de progresión “rápida”. La enfermedad no era autolimitante en los sujetos con progresión moderada y rápida, llevando, a largo plazo, a la pérdida de varios dientes o de toda la dentición. Tal investigación se convirtió en clásica, aclarando dos características importantes:

- 1) la enfermedad severa tiende a ocurrir en una pequeña parte de la población y
- 2) puede haber diferencias pronunciadas en la susceptibilidad de la enfermedad en la población, que no dependen de factores ambientales.

Los dos principios han sido documentados en diversos estudios (Diamante-Kipioti et al. 1993, Baelum et al. 1986, Baelum et al. 1988 a, Ronderos et al. 2001, Baelum et al. 1988 b, Hugoson et al. 1992 y Grossi et al. 1994).

A partir de esta investigación, Burt (1988), desarrolló el modelo epidemiológico para las enfermedades periodontales:

- No todas las gingivitis progresan a periodontitis.
- Un porcentaje bajo de la población presenta periodontitis severa.
- La periodontitis en los adultos mayores es la mayor causa de pérdida de dientes.

En 1981, la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló el sistema CPITN (Community Periodontal Index for treatment Needs), actualmente conocido solo como CPI (Community Periodontal Index). Muchos estudios, a partir de entonces, empezaron a utilizar este sistema que es, quizá, más fiable para comparaciones entre investigaciones.

En el CPITN, desarrollado por Ainamo et al. (1981), se emplea en grupos numerosos de la población, divididos por edad. La dentición de cada paciente es dividida en 6 sextantes, y la medida más severa del sextante es elegida para representar el sextante.

Las evaluaciones del CPI (Community Periodontal Index) son:

- Código 0: sin necesidad de tratamiento.
- Código 1: sin bolsas, pero puede haber sangrado al sondaje suave.
- Código 2: bolsas con un máximo de 3 mm, pero con cálculo y factores retentivos de placa subgingival.
- Código 3: sextantes con bolsas de 4 a 5 mm.
- Código 4: sextantes con bolsas de 6 mm o más.

Y las necesidades de tratamiento se basan en los códigos más severos en el sextante. Y determinados como TN (*treatment needs*, necesidades de tratamiento).

- TN 0: salud gingival.
- TN 1: necesidad de mejorar la higiene oral, caso el código 1 del CPI ha sido registrado.
- TN 2: necesidad de raspado, eliminación de restauraciones desbordantes y mejora de la higiene oral, caso en que los códigos 2 y 3 han sido registrados.
- TN 3: indica un tratamiento complejo y será asignado a los casos con el registro del código 4.

Los estudios del CPITN que emplearon el sondaje de la circunferencia de todos los dientes encuentran una prevalencia más alta de enfermedad

avanzada, por lo que el impacto de la metodología usada puede ser decisivo (Benigeri et al. 2000).

El sistema no fue planteado con propósitos epidemiológicos, pero es ampliamente empleado en este sentido. Basados en el CPITN, los investigadores encontraron una enorme variación en el porcentaje de sujetos con una o más bolsas con 6 mm o más, en la misma área o áreas diferentes. El rango varió de 1 - 74% en África, 8 - 22% en Norte y Sudamérica, 2 - 36% en Próximo Oriente, 2 - 40% en Europa, 2 - 64% en sudeste de Asia y entre 1 - 22% en el oeste del Pacífico. La media de número de sextantes por sujeto con bolsas de 6 mm o más varió también considerablemente con un rango de 0 - 2,1% en África, 0,1 - 0,4% en América, 0,1 - 0,6% en Próximo Oriente, 0,1 - 0,8% en Europa, 0,1 - 2,1% en el sudeste de Asia y entre 0 - 0,4% en el oeste del Pacífico. En los EE.UU. la prevalencia osciló de 0,1 - 0,4% de periodontitis de progresión rápida; 2,2 - 98% para la gingivitis y 46% de periodontitis en adultos de 55 a 64 años de edad (Papapanou 1996).

Miyazaki (1996) analizó 154 investigaciones independientes realizadas en 79 países, revelando poca diferencia entre los países en desarrollo y los industrializados en la prevalencia de bolsas periodontales con 6 mm o más entre personas de 35 a 44 años.

Este porcentaje aumenta considerablemente con la edad y parece alcanzar su pico en el rango de 50 a 60 años. La pérdida dental que ocurre después de esta edad parece contar con la subsiguiente reducción en la prevalencia de la enfermedad (Papapanou 1996).

La enfermedad periodontal muestra tanto similitudes como variaciones en su prevalencia y severidad en diferentes poblaciones (Löe et al. 1978, Baelum et al. 1988 a y 1988 b). Estas variaciones pueden ser debidas a los diferentes niveles de higiene oral, o pueden reflejar factores étnicos o raciales que modifican la composición de la microflora subgingival y/o los factores de la respuesta del huésped (Beck et al. 1990, Schei et al. 1993, Ellwood et al. 1997, Umeda et al. 1998).

Son interesantes también los análisis de materiales arqueológicos hechos por Mitsis & Taramidis 1995, Clarke et al. 1986, Kerr 1991 y Kerr 1994, que sugieren que la prevalencia o severidad de la enfermedad periodontal, no han cambiado significativamente a través de la historia.

En resumen: actualmente la enfermedad periodontal destructiva no debe de ser considerada una consecuencia invariable de la inflamación gingival de larga duración (Listgarten et al. 1985). Pero la periodontitis es consecuencia invariable de la gingivitis.

A pesar de la mejora en la higiene oral y de los accesos a los cuidados profesionales, el número absoluto y el porcentaje de adultos en los EE.UU. con periodontitis pueden estar en crecimiento debido al aumento de la expectativa de vida, disminución de la tasa de caries, y al aumento de sujetos mayores dentados (Douglass & Fox 1993).

3.2. Datos en Brasil

En Brasil se repiten los mismos problemas mundiales. Se trata de un país de dimensiones continentales, con variaciones socio-demográficas muy grandes entre región y región e, incluso, dentro del mismo sitio y ciudad. Los estudios son regionales y puede ser difícil usar los resultados para una generalización a todo el país.

En 2004, se publicó una investigación del Ministerio de Salud brasileño (SB 2000. 2004) con una muestra de 108.921 sujetos. La población diana fue de niños pre-escolares, niños de 12 años, adolescentes de 15 a 19 años, adultos de 35 a 44 años y personas mayores de 65 a 74 años, englobando todas las regiones del país, en ciudades desde 5.000 hasta más de 100.000 habitantes. Para la enfermedad periodontal, utilizaron el índice CPI, y la media total de prevalencia de bolsas periodontales con 4 mm o más en adultos (35 a 44 años) fue de 9,98 % con n=10.354 (66,3 % mujeres y 33,7%

hombres). Los sextantes excluidos por ausencia de elementos en este rango de edad fueron de 11,35%. Pero los índices de sextantes excluidos entre los 65 a 74 años representaron el 60,8%, con 6,30% de sextantes con, por lo menos, un diente con bolsa periodontal con 4 mm o más. La media de dientes perdidos en los dos rangos (adultos y mayores) fue de 13,2. Este estudio presentó una prevalencia más baja que la encontrada en la revisión epidemiológica de periodontitis de Gjermo et al. (2002), en pacientes de mediana edad en países de América Latina durante los años 1990. Llamó la atención el gran número de sextantes excluidos en los rangos de edad de los 35 a 44 años y principalmente entre los 65 a los 74 años, lo que puede acabar generando una baja prevalencia de enfermedad periodontal avanzada en mayores (SB 2000. 2004).

Peres et al. (2007) utilizaron los datos de la investigación del Ministerio de la Salud brasileño para asociar la enfermedad al color de la piel. Encontraron niveles más altos de enfermedad periodontal entre las personas de color de piel “negra oscura” y “negro claro” que en los blancos, y proponen dos hipótesis: que el color de la piel puede estar más asociado al estatus social más bajo, o quizás a una respuesta del estrés de esta población, que al factor racial propiamente dicho.

El estudio SB 2000. (2004), en adolescentes de 15 a 19 años, encontró bolsas periodontales de 4 a 5 mm en 1,19% de los individuos y 0,15% con bolsas de 6 mm o más. Otros estudios en adolescentes brasileños no encontraron una prevalencia muy diferente. Corteli et al. (2002), en una población de 600 adolescentes (15 a 25 años), encontraron un 25,5% de la población diana con, al menos, un elemento dental con pérdida de inserción, 1,66% con características clínicas de periodontitis agresiva localizada, 3,66% con periodontitis agresiva generalizada y 14,3% con periodontitis incipiente; el 55% restante mostró nivel de inserción clínico normal. Chambrone et al. (2008), en una revisión de la literatura, mostraron una presencia de enfermedad gingival con una media del 92,92% y la enfermedad periodontal con 89,88%, en el todo país.

4. Etiología de las enfermedades periodontales

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas, los mecanismos patogénicos exactos responsables por el inicio y progresión de la periodontitis no son conocidos.

Histopatológicamente, la enfermedad periodontal destructiva (periodontitis) presenta bolsa periodontal, localización del epitelio de unión apical a la unión cemento-esmalte, pérdida de fibras colágenas subyacentes al epitelio de la bolsa, pérdida de hueso alveolar, numerosos leucocitos polimorfonucleares en el epitelio de unión y en el epitelio de la bolsa, infiltrado inflamatorio intenso con células plasmáticas, linfocitos y macrófagos (Flemmig 1999). Muchas evidencias sugieren que la inflamación y destrucción de las estructuras periodontales son consecuencia de las reacciones de susceptibilidad del huésped a bacterias patogénicas (Schenkein 2006).

Los patógenos y los componentes bioquímicos generados por ellos son considerados factores de iniciación de la lesión periodontal. El huésped desempeña un papel esencial en la progresión y severidad de la enfermedad (Van Dyke & Sheileh 2005).

4.1. Modelo etiológico multifactorial

4.1.1. Anatomía:

Presentando ciertas características comunes a otras enfermedades infecciosas, las enfermedades periodontales tienen algunas características muy distintas. La principal razón es la particularidad anatómica de los dientes. Una parte de su estructura pasa a través del tegumento mientras que otra parte se queda íntimamente dentro del tejido. El diente aporta una superficie de colonización para una gama enorme de especies bacterianas, que pueden colonizar el diente propiamente dicho, las superficies epiteliales de la encía, la bolsa periodontal, el tejido conectivo subyacente si está expuesto, además de otras bacterias ya adheridas a esas superficies. La colonización de la corona dental es relativamente estable, pues no ocurre descamación de tejido (Socransky & Haffajee 2003) facilitando la formación de biofilms finos. El huésped promueve, en realidad, una oportunidad única para la formación del biofilm en la boca y un refugio seguro para la resistencia microbiana (Socransky & Haffajee 2002, Marsh 2005, Marsh & Devine 2011).

4.1.2. Hábitat oral

Quizás la mejor manera de comprender la microbiota oral es considerarlo como una ecología microbiana, cuyo foco está en la comprensión de las interacciones entre los microorganismos que habitan la boca y el huésped sobre el que colonizan. La composición de la microbiota oral varía significativamente con las condiciones ecológicas que prevalecen en las diferentes superficies orales, como la lengua, la mucosa bucal y dientes (Aas et al. 2005, Zaura et al. 2009, Dewhrist et al. 2010).

Dichas diferencias determinarán cuáles son los tipos de microorganismos que serán más hábiles para la colonización, crecimiento, y cuales estarán en menores o mayores cantidad en la comunidad bacteriana; además también determinará cuales serán sensibles y receptivos al medio ambiente de acogida (Marsh & Devine 2011).

Aunque la boca sea un ambiente hostil a la vida bacteriana y apenas algunos de los microorganismos que entran en la cavidad oral son capaces de colonizar y sobrevivir, ciertas bacterias son frecuentemente aisladas en este hábitat, por lo tanto, la boca contiene los requisitos necesarios para el crecimiento de microorganismos, tales como: temperatura, nutrición, atmosfera, pH y potencial redox. Los microorganismos responden a los

cambios en el medio y alteran su patrón de expresión genética a fin de adaptarse (Marsh & Devine 2011).

- Temperatura: Un pequeño aumento en la temperatura puede alterar la ecología subgingival cambiando la competitividad de los organismos. Temperaturas más altas tienden a elevar la proporción de *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (Haffajee et al. 1992 b). Pequeños cambios en la temperatura de áreas inflamadas subgingivales también pueden alterar la expresión genética bacteriana (Murakami et al. 2004).
- Eh - potencial redox: El rango de tolerancia de oxígeno y el potencial redox (Eh) de la cavidad oral del huésped parece favorecer el crecimiento de un biofilm maduro. La distribución de anaerobios en la boca está relacionado al potencial redox de cada localización, aunque algunos sobreviven en hábitats abiertamente aerobios con estrecha colaboración con especies que consumen oxígeno (Marsh & Devine 2011).
- pH: La mayoría de los microorganismos requieren un pH cercano al neutro para su crecimiento óptimo, y son sensibles a los extremos ácido y alcalino. El rango del pH de las superficies bucales está entre 6,75 y 7,25, y los cambios en el pH pueden causar grandes cambios en las proporciones de bacterias dentro de la placa dental. Después

del consumo de azúcar, por ejemplo, el pH de la placa cae rápidamente a menos de 5,0 por culpa de la producción de productos de la fermentación ácida (Marsh & Martin 2009). El aumento en el pH puede ser el resultado del aumento del metabolismo proteolítico bacteriano, como la producción de amoníaco, urea y la desaminación de aminoácidos. Un ejemplo del cambio en el pH, como determinante del crecimiento bacteriano, es la expresión de proteasas por el *P. gingivalis*, que aumenta el pH, aumentando así la competitividad de otros periodontopatógenos (Marsh et al. 1993), favoreciendo el crecimiento de *P. intermedia*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, que necesitan del pH alcalino para su crecimiento óptimo (Mc Kee et al. 1986, Sreenivasan et al. 1993). La dieta rica en carbohidratos parecen llevar a una caída del pH catastrófica para la ecología oral, que, si se repite con frecuencia, selecciona bacterias ácido-tolerantes y ácidogénicas, llevando a un alto riesgo de caries dental (Bradshaw et al. 1989)

- Los nutrientes para el biofilm oral, como los aminoácidos, proteínas y glicoproteínas, son obtenidos principalmente de la saliva y del fluido sulcular gingival: un flujo reducido del fluido sulcular en la salud gingival hace una menor aporte nutricional para el crecimiento de las microbiota subgingival (Marsh & Martin 2009).

Los cambios en el metabolismo están asociados con la selección de especies asociadas a la destrucción periodontal, como los anaerobios pigmentados de negro, estreptococos anaerobios, *Fusobacterium spp.*, y espiroquetas. Por ejemplo, *P. gingivalis* pasa a ser el microorganismo dominante del cultivo cuando el medio de mucina-base es suplementado con suero humano (como ocurre cuando hay aumento del fluido sulcular), con el aumento de la proporción de *P. gingivalis* también hay una elevación en la actividad de gingipaína y una elevación del pH de medio de 6,9 para 7,5 (Marsh & Devine 2011).

4.1.3. Biofilm:

El potencial patogénico de la placa bacteriana está demostrado en varios estudios desde los años 1960, confirmando su papel esencial en la caries, y las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis). La placa bacteriana que coloniza el diente y sus tejidos representa un biofilm verdadero.

El término biofilm describe una comunidad microbiana asociada a la superficie del diente o cualquier superficie que no descama (Wilderer & Charaklis 1989).

Los biofilms se forman virtualmente sobre todas las superficies sólidas inmersas en medio acuoso natural, particularmente más rápido en sistemas fluidos, donde se aporta una fuente regular de nutrientes a las bacterias. Ocurre una formación rápida de grupos de microorganismos debido a un amplio crecimiento bacteriano, acompañado por la excreción de una gran cantidad de polímeros extracelulares (Lang et al. 2003).

La mayor ventaja de este tipo de crecimiento bacteriano es la protección que el biofilm promueve para la colonización de especies frente a factores del medio, tales como los mecanismos de defensa del huésped y a sustancias potencialmente tóxicas en el medio, como por ejemplo químicos letales o antibióticos (Socransky & Haffajje 2002). Los biofilms también pueden facilitar el proceso de nutrición, alimentación cruzada (una especie produce nutrientes para otra), eliminación de productos metabólicos potencialmente perjudiciales (generalmente por la utilización por otra bacteria), así como el desarrollo de un medio físico-químico apropiado, como por ejemplo, la reducción del potencial de óxido-reducción (Socransky & Haffajje 2002). La frecuencia con que se detectan especies anaerobias en las regiones más profundas de los biofilms refuerza la evidencia de los gradientes de difusión, principalmente del oxígeno, en estos sitios (Ritz 1969).

Los biofilms están compuestos de micro colonias de células bacterianas que están distribuidas de forma no aleatoria en una matriz o glicocálix. El crecimiento de los biofilms es típicamente de propagación lateral y posteriormente en la dirección vertical (Socransky & Haffajee 2002). En el diente, los niveles inferiores del biofilm tienen densos grupos de microorganismos unidos a una matriz de polisacáridos con componentes orgánicos e inorgánicos. En la parte alta del biofilm, se encuentran grupos sueltos con aspecto irregular que se extienden para el medio circundante. El grupo de bacterias que circunda el biofilm posee un subgrupo estacionario y un grupo libre en movimiento. Los componentes nutricionales pueden penetrar en este medio fluido por difusión molecular (Lang et al. 2003).

Según Socransky & Haffajee (2002), las propiedades de los biofilms incluyen:

- 1. Estructura:** Con micro colonias de células bacterianas dentro de una matriz, circundadas por canales de agua que permiten el paso de nutrientes y otros agentes actuando como un sistema circulatorio primitivo. Frecuentemente las colonias están compuestas por diversos tipos de especies.
- 2. Exopolisacáridos:** Son los mayores componentes del biofilm, y su papel es mantener la integridad del biofilm.

3. Heterogeneidad fisiológica dentro de los biofilms: Las mismas especies microbiológicas pueden existir en estadios fisiológicos diferentes dentro del mismo biofilm separadas por pocos μm , haciendo que lo que afecta a una especie bacteriana en un grupo del biofilm, puede no afectar a la misma especie en un grupo más profundo. Además, las células dentro del biofilm pueden producir enzimas responsables de daños tisulares.

4. Factores que afectan el desarrollo y comportamiento de los biofilms: La hidrodinámica afecta tanto al transporte de nutrientes como a la estabilidad física de la superficie del biofilm. Biofilms que crecen en zonas con fuerzas físicas intensas son generalmente finos y densos comparados a los que crecen en zonas con bajas fuerzas de cizallamiento. Los biofilms también se ven afectados por cambios en la concentración de nutrientes.

5. Desprendimiento de células del biofilm: Este evento es esencial para la continua colonización del biofilm por nuevos habitantes bacterianos.

6. *Quorum sensing*: o transferencia de información. El *quorum sensing* implica la regulación de la expresión de genes por la acumulación de compuestos señalizadores que median la comunicación intracelular. Es un modo de transferir información dentro del biofilm.

7. Adhesión bacteriana. Es el paso esencial para el desarrollo de los biofilms. En la boca, las bacterias pueden adherirse a una variedad enorme de superficies, incluyendo los tejidos blandos orales, la película adherida de los dientes, y otras bacterias. Muchas bacterias poseen fimbrias y fibrillas

que las ayudan en la adherencia; la fimbriae de *P. gingivalis* es el mejor ejemplo dentro de las bacterias Gram-negativas.

8. Coagregación bacteriana: La asociación bacteriana dentro de los biofilms no es aleatoria. Hay asociaciones específicas entre las bacterias dentro del biofilm. Seis grupos íntimamente asociados han sido reconocidos: el primero incluye *Actinomyces*; un segundo grupo con miembros del género *Streptococcus*; un tercer grupo que incluye *Capnocytophaga* sp., *A. actinomycetemcomitans* serotipo a, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter concisus*; y un cuarto grupo con *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*. Estos grupos son los colonizadores primarios de la superficie dental y su crecimiento precede a la multiplicación de los dos últimos grupos, predominantemente gram-negativos. Muchas células de bacterias orales humanas se adhieren a otras bacterias orales, y esta adherencia célula a célula es conocida como coagregación.

Pero, aunque un biofilm con especies patogénicas colonice un huésped, este puede no manifestar clínicamente la enfermedad durante un cierto tiempo o quizás nunca. Por ello, parece claro que la enfermedad periodontal depende de la ocurrencia simultánea de varios factores (Socransky & Haffajee 1993): modificaciones en la respuesta del huésped, variaciones sociales o comportamentales, o por factores genéticos y epi genéticos (Schenkein 2006).

4.1.4. Genética:

Estudios de pacientes con enfermedad periodontal sugieren que la genética y el origen étnico pueden tener influencia en la susceptibilidad a la enfermedad, y pueden también afectar a la microbiota oral, pero muy pocos parámetros genéticos conocidos del huésped pueden influenciar la composición de la microbiota bucal residente (Rylev & Kilian 2008).

Socransky et al. (2000) encontraron que el polimorfismo asociado con la interleucina (IL)-1, u otras citocinas pueden aumentar la probabilidad de detectar ciertos patógenos periodontales clave y predisponer a los individuos a periodontitis.

Las investigaciones de diagnóstico basadas en condiciones genéticas del paciente, podrían ser interesantes, pero necesitan de una gran población, lo que no suele ser frecuente en estudios en periodoncia (Persson 2005). Así, los estudios en gemelos pueden ser una alternativa para demostrar una correlación genética en la susceptibilidad a la periodontitis crónica, dado que las diferencias genéticas están probablemente asociadas a genes susceptibles del huésped (Michalowicz et al. 2000). Moore et al. (1993) compararon la microbiota de gemelos y mostraron más similitudes que los pacientes no relacionados, sugiriendo alguna influencia genética. Graves et al. (2000), estudiando el síndrome de Papillon-Léfévère, un desorden genético grave, enfatizaron la importancia de factores hereditarios en la determinación

de la susceptibilidad a las enfermedades periodontales, y alertan de que no se pueden cambiar los factores genéticos individuales, pero, sí se pueden modificar otros factores, que pueden y deben ser controlados para, posiblemente, resultar en alteraciones en la susceptibilidad a la enfermedad periodontal.

El origen étnico parece influir en la selección de cepas. La gran cantidad de diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans* aisladas de diferentes localidades geográficas son un ejemplo. Parece haber también una predilección de microorganismos por una determinada etnia: *P. gingivalis* y *Peptostreptococcus anaerobius* son los microorganismos más asociados a los pacientes afroamericanos con periodontitis, *F. nucleatum* parece ser más frecuente en sujetos caucasianos. Pacientes hispanicos y asiatico-americanos parecen tener tendencia a una mayor probabilidad de detectar dos o más periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) comparados con otros pacientes con periodontitis (Marsh & Devine 2011).

4.1.5. Respuesta inmune:

El huésped acoge una microbiota residente compleja que parece ser beneficiosa para su desarrollo normal, sin iniciar una respuesta inflamatoria perjudicial, mientras también es capaz de construir una defensa eficiente

contra los patógenos. Bacterias patógenas y no patógenas pueden iniciar diferentes vías de señalización intra celular y respuestas inmunes innatas y adaptativas en las células epiteliales (Hooper 2009, Neish 2009). Dichas respuestas inmunes desempeñan dos papeles antagónicos: mientras protegen, también generan mecanismos destructivos que pueden promover la progresión de la enfermedad periodontal (Teng 2006). El desequilibrio inmunológico está atribuido a la incapacidad del organismo en eliminar los patógenos y, a la vez, causar destrucción del tejido. Sin embargo, aún no está establecido el mecanismo por el cual el proceso de inflamación se inicia en sitios previamente sanos (Schenkein 2006). Varios mediadores celulares y moleculares están siendo investigados en la enfermedad periodontal, incluyendo el papel de los linfocitos T y B, macrófagos, monocitos, células dendríticas y neutrofilos, así como el papel de las citocinas y quimiocinas.

Expresiones anormales de Receptores de Reconocimiento de Patrones de la célula del huésped (PRRs), que se unen a lipopolisacáridos bacterianos (TLR2 y CD14), se han relacionado con la predisposición a la enfermedad periodontal (Tervonen et al. 2007). Las bacterias residentes de la placa bacteriana determinan la expresión normal de mediadores inmunológicos. En localizaciones subgingivales, ayudan en el mantenimiento de la salud tisular, por medio de la regulación de niveles de expresión de la molécula de adhesión intra celular 1, E- selectina y IL-8, que por su acción regulan la

capa de neutrófilos entre el biofilm subgingival y el epitelio de unión (Dixon et al. 2004). Los periodontopatógenos pueden activar vías de respuesta distintas en las células epiteliales (Hasegawa et al. 2007).

Esta relación beneficiosa entre el huésped y la microbiota oral, puede cambiar con la cantidad y diversidad de especies en sitios con enfermedad periodontal, que se torna más marcada con la severidad de la enfermedad (Socransky & Haffajee 2005, Marsh & Martin 2009).

4.1.6. Factores de riesgo:

Wilson & Crouch (1987) propusieron establecer factores de riesgo para las enfermedades periodontales. Estos factores indican un aspecto del comportamiento personal o un estilo de vida, una exposición al medio o una característica congénita, la cual, basada en evidencias epidemiológicas, está asociada a favorecer el establecimiento o la progresión de la enfermedad. Los factores de riesgo pueden influenciar a un sujeto de manera general o pueden afectar los tejidos periodontales localizadamente (Mombelli 2005).

Los factores de riesgo deben satisfacer a dos criterios: 1) ser biológicamente plausibles como un agente causal de la enfermedad y, 2) deben mostrar preceder el desarrollo de la enfermedad, por tanto, se necesitan estudios clínicos prospectivos (Pihlstrom 2001). Son determinados usando Medidas

Asociativas como odds ratio (razón entre los productos de los índices cruzados), risk ratio (razones entre los riesgos) y riesgo relativo.

El riesgo relativo es la probabilidad del sujeto de desarrollar la enfermedad si está expuesto a un factor dado, comparado con el de desarrollar la enfermedad si no está expuesto. El riesgo relativo y el odds ratio son similares cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, pero los valores divergen cuando la prevalencia de la enfermedad aumenta. Mientras el risk ratio y el odds ratio son usados para cuantificar la enfermedad, el riesgo relativo es generalmente más significativo intuitivamente para los clínicos (Pihlstrom 2001).

Dentro de los factores de riesgo locales están: placa bacteriana, con la presencia de periodonto patógenos específicos, herpes virus, cálculo, contactos dentales proximales abiertos, afectación de furca, impactación alimentaria, además de oclusión traumática y presencia de hábitos para funcionales (Pihlstrom 2001). Los factores de riesgo locales son tratados localmente.

Entre los factores de riesgo comportacionales, destacan el tabaquismo, diabetes mal o no controlada, factores psicosociales, obesidad, osteoporosis/osteopenia, raza/etnia, sexo, estatus socio económico, bajo

nivel de educación, cuidados dentales infrecuentes y aumento de edad (Pihlstrom 2001, Tonetti & Claffey 2005).

4.1.6.1. Tabaquismo: Evidencias substanciales sostienen el efecto negativo del tabaquismo en la salud periodontal. Se estima, por el cálculo de la odds ratio, un aumento del riesgo de periodontitis avanzada para fumadores de 2,82, en comparación con no fumadores; con intervalo de confianza de 95% de 2,36 a 3,39 (Papapanou 1996). En esta investigación, los sujetos que dejaban de fumar en algún punto dentro del periodo de observación tuvieron un retraso significativo en la progresión de la pérdida de hueso, comparado con los que siguieron siendo fumadores. El tabaquismo también puede seleccionar patógenos potenciales como *T. forsythia*, *Parvimonas micra*, *F. nucleatum* y *C. rectus* (van Winkelhoff et al. 2001). Mientras que la suspensión del uso del tabaco lleva a la reducción de la prevalencia o proporción del número de periodontopatógenos como *P. micra* y *T. denticola* (Delima et al. 2010).

4.1.6.2. Diabetes mellitus: Los diabéticos parecen sufrir tres veces más pérdida de inserción y de hueso alveolar que los no diabéticos. Aumenta el riesgo de periodontitis en casos de diabetes de larga duración, de inicio precoz y de mal control metabólico, al contrario que los diabéticos con buen control metabólico, al haber un aumento de las enzimas catabólicas del

fluido sulcular de pacientes con diabetes mal controlada. Los pacientes diabéticos parecen tener altas frecuencias de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *Campylobacter spp.* (Ebersole et al. 2008).

4.1.6.3. Otros factores:

- Edad: La composición de la placa bacteriana parece cambiar con la edad. La prevalencia de algunos periodontopatógenos relacionados con la edad como *A. actinomycetemcomitans* son más comunes con sujetos jóvenes, mientras *P. gingivalis* son más prevalentes con el aumento de la edad (Favieri et al. 2009).
- Hormonas femeninas: Parece haber correlaciones entre las hormonas maternas y el nivel de *P. gingivalis* y *P. intermedia* (Carrillo-de-Albornoz et al. 2010)

4.1.7. Factores sociales y comportamentales:

A nivel individual, los factores socioeconómicos y educacionales a largo plazo pueden presentar un impacto significativo sobre la ocurrencia de la periodontitis. El estrés, por ejemplo, parece influir sobre los resultados de la terapia periodontal, y estudios en animales mostraron que el estrés psicológico crónico representa un marcado impacto sobre la respuesta localizada del huésped (Person 2005). El consumo de alcohol también parece estar asociado a la enfermedad, así como la higiene bucal limitada, el

bajo nivel educacional, las dificultades financieras, o la capacidad de acceso a cuidados de salud (Persson 2005).

4.2. Infecciones periodontales y enfermedades sistémicas:

La gran cantidad de publicaciones recientes, que tratan del papel de la enfermedad periodontal como un factor de riesgo para otras patologías, señalan el hecho de que la cavidad oral forma parte del cuerpo humano y la salud sistémica debe de englobar también la salud oral y periodontal. Aún que no se pueda concluir definitivamente sobre las investigaciones a este respecto, los hallazgos pueden tener una repercusión importante en el futuro.

4.2.1. Enfermedades cardiovasculares:

Muchas investigaciones relacionan que bajos niveles de inflamación crónica pueden ser un factor de riesgo importante en las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas (Ross 1999). Las enfermedades periodontales representan infecciones mixtas causadas por bacterias Gram-negativas anaerobias, cuya marcada proliferación dentro de la bolsa periodontal, provoca la ulceración del epitelio de la bolsa. Esta, por su vez,

se convierte en una puerta por donde pasan lipopolisacáridos (LPS) y otras estructuras antigénicas de origen bacteriano, que desencadenan una respuesta local y sistémica del huésped. Además, varias especies patogénicas también poseen capacidad de invadir tejidos. Actividades como el cepillado y la masticación pueden resultar en bacteremias transitorias, también causando un ataque bacteriano sistémico al huésped. Loos et al. (2000) investigando en pacientes con periodontitis, encontraron muestras con una elevada cantidad de leucocitos sanguíneos y altos niveles de proteína C reactiva (CRP), con consecuencias sistémicas. Otros investigadores (Ebersole et al. 1997, Loos et al. 2000, Slade et al. 2000) encontraron que las personas con enfermedad periodontal extensa presentaban, en media, un aumento de un tercio en los niveles de CRP y el doble de prevalencia de CRP elevadas, cuando eran comparados con sujetos periodontalmente sanos; los niveles de CRP también estaban aumentados en pacientes edéntulos. La conclusión de los estudios es que las infecciones crónicas pueden contribuir a un estado de pro-coagulación, favoreciendo el desarrollo de ateromas. La presencia de bacterias orales en placas ateromatosas ha sido estudiada, por ejemplo, por Chiu (1999), en muestras de carótidas humanas que sufrieron angioplastia, y se observó la presencia de inmunomarcadores para *P. gingivalis* y *Streptococcus sanguis* asociados a formación de trombos y úlceras, y adyacentes a la región con mayor presencia de cuerpos apoptóticos.

La enfermedad periodontal también ha sido asociada a enfermedades coronarias cardiacas. Beck et al. (1996) encontraron un aumento de la incidencia de enfermedad coronaria cardiaca fatal y derrame cerebral asociadas a pérdida de hueso alveolar radiográfica, relacionada con la severidad de la enfermedad periodontal.

4.2.2. Nacimiento prematuro y bajo peso neonatal

Los mediadores de la inflamación crónica parecen ser los responsables del parto prematuro, especialmente los mediadores producidos por las infecciones del trato genitourinario y las vaginosis bacterianas. Pero las mujeres con parto prematuro no siempre presentan cultivos positivos para microorganismos locales en el líquido amniótico (Papapanou & Lindhe 2003), así que se ha sugerido que el resultado del parto prematuro puede ser mediado indirectamente por inflamaciones distantes, resultado de la translocación de bacterias, lipopolisacáridos (LPS) y productos bacterianos en la circulación sistémica (Papapanou & Lindhe 2003). Hill (1998) señaló en su estudio que las mujeres con vaginosis raramente presentaban bacterias comunes del trato genitourinario en el líquido amniótico, y sin embargo, frecuentemente mostraban fusobacterias, que son microorganismos comunes de la microbiota periodontal, y propusieron que las bacterias orales podrían llegar al líquido amniótico por difusión sanguínea resultando en una irritación corioamniótica.

Mitchell-Lewis et al. (2001) encontraron *T. forsythia* y *C. rectus* en madres de niños prematuros y con bajo peso neonatal, además de identificar también una elevada cantidad de varias especies bacterianas examinadas. Dasanayake et al. (2001) también encontraron marcadores de anticuerpos IgG frente a *P. gingivalis* y *T. forsythia*, de manera estadísticamente significativa, en mujeres con parto prematuro al ser comparados con mujeres con partos a término.

4.2.3. Diabetes mellitus

Se comporta como un factor de riesgo para la periodontitis, pero también puede verse afectada por las infecciones crónicas. En este contexto, las infecciones periodontales pueden ser perjudiciales para el control metabólico de la diabetes (Papapanou & Lindhe 2003). Tanto los estudios de diabetes tipo 1 como los de diabetes tipo 2 indican que las infecciones periodontales pueden influenciar el control de la glucemia.

5. Microbiología de las enfermedades periodontales

Desde el “World Workshop on Clinical Periodontics” de 1996, se considera a un grupo de microorganismos periodontopatógenos específicos como agentes causantes de la enfermedad periodontal, y su presencia en las bolsas periodontales, como un factor de riesgo para la misma. Entre ellos, se considera que tienen una mayor fuerza de asociación: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*. Pero hay otras especies bacterianas que también son comúnmente encontradas en sitios enfermos y asociadas a periodontitis.

Se estima que más de 700 especies diferentes de microorganismos son capaces de colonizar la cavidad bucal y un único sujeto puede albergar hasta 150 especies diferentes. Los recuentos bacterianos del surco gingival varían desde 10^3 , en surcos gingivales sanos, hasta $>10^8$, en bolsas periodontales profundas, pudiendo llegar a 10^9 (Socransky & Haffajee 2003), o a mil millones de bacterias por gramo neto (Slots & Listgarten 1988). A pesar de la cantidad enorme de bacterias en la boca, normalmente prevalece el equilibrio en las relaciones ecológicas del huésped y la microbiota periodontal, y los microorganismos, aunque abundantes, pueden no provocar enfermedad durante toda la vida del huésped, y no hay pérdida

de las estructuras de soporte del diente. El desequilibrio de esta relación ecológica puede llevar a la destrucción del aparato de soporte periodontal. Si una determinada especie bacteriana se multiplica de manera excesiva, o, por ejemplo, un determinado microorganismo exhibe una nueva propiedad, puede haber desequilibrio en este delicado ecosistema y, consecuentemente, la ocurrencia de periodontitis.

Las periodontitis son enfermedades inflamatorias de naturaleza infecciosa, que se asemejan con otras enfermedades infecciosas, y, así, afectan un determinado órgano o sistema. Normalmente una infección está normalmente causada por uno o más microorganismos patogénicos relativamente bien definidos, también las periodontitis parecen ser causadas por un grupo relativamente definido de microorganismos, actuando solos o en conjunto (Socransky & Haffajee 2003).

La evolución histórica en la búsqueda de los agentes infecciosos etiológicos para las enfermedades periodontales dura ya más de un siglo. Los hallazgos pasan por amebas, espiroquetas, fusiformes, hasta estreptococos en la década de 1930; después y hasta los años 1960, la búsqueda de agentes patogénicos orales entra en total desinterés (Socransky & Haffajee 1994). Los estudios clásicos de Løe et al. (1965) Løe et al. (1967) y de Theilade et al. (1966), cambian el concepto de la etiología microbiana de la enfermedad

periodontal, y convencen de que el acúmulo de placa bacteriana precedía el inicio de la gingivitis. Muchos investigadores creían que la gingivitis llevaba a la eventual pérdida de soporte periodontal.

Tras estos hallazgos, las discrepancias entre los diversos investigadores y clínicos se acentuaron, pues si la cantidad de placa bacteriana estuviera asociada directamente con la etiología de la enfermedad, entonces no se podría explicar por qué la destrucción del aparato de sostén del diente es, a veces, localizada. Tampoco justificaría como pacientes que no presentan gran cantidad de placa desarrollan una destrucción acentuada del periodonto, y el por qué algunos individuos exhiben solamente gingivitis durante toda la vida independientemente de la cantidad de placa bacteriana presente.

Con el desarrollo de métodos de investigación más precisos, se comenzaron a identificar las diferencias en la composición de la placa bacteriana entre sujetos, incluso, de localizaciones dentro del mismo individuo. Así, se empezaron a relacionar microorganismos específicos con la etiología de las diferentes formas de enfermedad periodontal. Newman et al. (1976), Newman & Socransky (1977), Slots (1976), Tanner et al. (1979) y Slots (1977), demostraron que la microbiota de sujetos sanos era distinta de las de sujetos con distintas enfermedades periodontales y también diferente de

pacientes con periodontitis juvenil localizada (PJJ). Estos estudios representaron el punto inicial de investigaciones a gran escala para relacionar microorganismos específicos y diferentes enfermedades periodontales.

Los microorganismos, denominados ahora como patógenos periodontales sospechosos de causar enfermedad periodontal destructiva, fueron definidos inicialmente según los “postulados de Koch”. Tales criterios han sido ratificados y ampliados a lo largo del tiempo, siendo ahora conocidos como “criterios de Socransky”, e incluyen (1) criterio de asociación, (2) criterio de eliminación, (3) criterio de la respuesta del huésped, (4) criterio de los factores de virulencia, (5) criterio de los estudios en animales y (6) criterio de determinación del riesgo. La discriminación entre un patógeno y una especie no patógena se basa no solamente en un único criterio, sino, en una evaluación de “peso de las evidencias” (Socransky & Haffajee 2003):

(1) El criterio de asociación es el mismo que los dos primeros postulados de Koch: la especie debe ser encontrada más frecuentemente y en cantidad más elevada en casos de infección que en sujetos sin manifestación de la enfermedad o con otras formas de enfermedad.

(2) El criterio de eliminación se basa en que si es eliminada (o reducida su cantidad) una especie patógena, habrá una remisión simultánea de la enfermedad (un problema para la terapia periodontal, que raramente elimina solamente una especie de manera selectiva).

(3) El criterio de la respuesta del huésped evalúa la respuesta inmune del paciente: si el agente es patógeno, el huésped debe desarrollar una respuesta local y sistémica, que se puede evaluar mediante los anticuerpos específicos producidos.

(4) El criterio de los factores de virulencia se cumple si el patógeno sospechoso dispone de diferentes factores de virulencia. Estos determinantes bioquímicos proporcionan gran información sobre la virulencia del patógeno y evalúan su papel en la enfermedad.

(5) Criterio de los modelos animales, que proporcionan evidencias que apuntan el papel de una determinada especie microbiana en la enfermedad periodontal, si dicha especie es capaz de reproducir la enfermedad en modelos animales.

(6) Criterio de determinación del riesgo, evaluado mediante estudios prospectivos en los que se evalúa el riesgo de la progresión de la destrucción periodontal, en relación con la presencia del patógeno sospechoso en la evaluación basal. El desarrollo tecnológico de la hibridación del DNA-DNA y la tecnología de PCR han permitido identificar microorganismos específicos en grandes cantidades de muestras de placa subgingival, permitiendo el análisis de este criterio.

Más recientemente, en 1996, van Winkelhoff et al. propusieron que las infecciones podrían ser divididas en exógenas y endógenas, según el tipo de

patógeno causal: las infecciones exógenas, también llamadas verdaderas, serían causadas por microorganismos adquiridos del medio externo, y no serían parte de la flora normal; a diferencia de las infecciones endógenas, que serían causadas por microorganismos presentes en el medio, incluido el huésped sano, por lo tanto serían oportunistas, ya que ocurren en el hábitat usual del organismo.

La mayoría de los microorganismos asociados a las enfermedades periodontales a menudo también pueden ser detectados en bajos números en ausencia de enfermedad, caracterizándose como una infección endógena. En tal caso, la eliminación de los microorganismos no es un objetivo realista, pues puede haber recolonización de dichas bacterias en condiciones ecológicas favorables (Mombelli 2003). Algunos investigadores, por el contrario, consideran que *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* serían agentes infecciosos verdaderos de la periodontitis, o sea, como agentes de infección exógena (Mombelli 2003).

6. Patógenos periodontales

6.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Es uno de los microorganismos más fuertemente asociado a la periodontitis. Es un bacilo pequeño de terminación redondeada, inmóvil, sacarolítico, capnofílico, anaerobio, Gram-negativo. Forma colonias pequeñas convexas de centro estrellado en cultivo en placas de Agar-sangre. La eliminación o la disminución del patógeno, se ha asociado a una buena respuesta clínica en el tratamiento de pacientes con PJI. La especie produce leucotoxina (especialmente en las cepas de tipo JP2), toxina distensora citoletal e induce enfermedad en animales experimentales. Parece tener capacidad de invadir células epiteliales gingivales humanas *in vitro*, y células endoteliales y células epiteliales bucales *in vivo*. Además, puede inducir muerte celular por apoptosis. Inicialmente, aparecía muy asociado a PJI (actualmente, periodontitis agresiva) y también está relacionado con la periodontitis crónica, aunque con menos frecuencia y en menor proporción que en sujetos con PJI o periodontitis agresivas. Especialmente relevante es el estudio longitudinal de Haubek et al. (2008), respecto al cumplimiento del criterio del análisis de riesgo, en que la presencia de este patógeno representaba un riesgo 12.4 (odds ratio, OR) de futura pérdida de inserción a 2 años en adolescentes marroquíes. El riesgo subía a 18.0 si era la cepa JP2. El autor también sugiere

que puede ocurrir una competición por el nicho ecológico entre los dos clones de *A. actinomycetemcomitans* evaluados.

Se han detectado diferentes subtipos de *A. actinomycetemcomitans*: el serotipo a, que parece estar asociado a periodontitis crónica en sujetos adultos norteamericanos (Zambon et al. 1983 b); el serotipo b, en sujetos norteamericanos con PJI (Zambon et al. 1983 a) y el serotipo c, asociado a periodonto normal sano (Aisikainen et al. 1991). En Corea y Japón, Chung et al. (1989) y Saito et al. (1993) observaron el serotipo c asociado a localizaciones con periodontitis. Se han encontrado otros tres serotipos, menos frecuentes, d, e y f (Dogan et al. 1999, Mombelli et al. 2000 y Kaplan et al. 2001).

El criterio de eliminación se comprobó en un estudio de van Winkelhoff et al. (1992), en el que se observó una ganancia significativa en el nivel de inserción periodontal y una disminución de la profundidad de bolsa, en prácticamente todos los pacientes tratados con desbridamiento mecánico y uso sistémico de amoxicilina y metronidazol, que conseguía eliminar *A. actinomycetemcomitans*.

6.2. *Porphyromonas gingivalis*:

P. gingivalis es considerado el segundo periodonto-patógeno en importancia. Con morfología de cocos o bacilos pequeños, son anaerobios no motiles, asacarolíticos, Gram-negativos, del grupo de *Bacteroides melaninogenicus*,

muy investigados. Forman colonias de pigmentación castaño-negro en placas de Agar-sangre. Producen colagenasa, diferentes proteasas (incluso las que destruyen las inmunoglobulinas), hemolisinas, endotoxinas, ácidos grasos, NH₃, H₂S, indol, etc. Numerosos estudios enfatizan la asociación del *P. gingivalis* con la enfermedad periodontal, todavía más común en formas activas y destructivas y poco común en la salud periodontal (Haffajee & Socransky 1994). En localizaciones con destrucción periodontal progresiva aparecen cantidades elevadas o gran frecuencia de *P. gingivalis* (Lopez 2000, Kamma et al. 2001), de otro modo, aparece con menor frecuencia y/o cantidad en sitios tratados. Además, se detecta comúnmente en localizaciones con recurrencia de enfermedad, o donde persiste la profundidad de la bolsa periodontal post-terapia. Se asocia, entonces, a un riesgo aumentado de progresión de la enfermedad periodontal (Beck et al. 1997, Grossi et al. 1995).

Ogawa et al. (1989) encontraron, en suero, anticuerpos contra la fimbria del *P. gingivalis*. Hay un consenso de que los sujetos que sufren pérdida de inserción periodontal muestran niveles elevados de anticuerpos para antígenos de *P. gingivalis*, sugiriendo que la especie bacteriana tuvo acceso a los tejidos periodontales subyacentes, iniciando, o contribuyendo al proceso patológico.

Diversos estudios también han demostrado que el incremento de *P. gingivalis* está asociado a la progresión de la enfermedad periodontal e,

incluso, a la peri-implantitis en animales de laboratorio (Nociti et al. 2001, Rudney et al. 2001).

Todos los datos reiteran la importancia de *P. gingivalis* en las enfermedades periodontales y peri-implantarias.

6.3. *Tannerella forsythia*:

Tercer patógeno periodontal, en evidencia de fuerza de asociación, según el Consenso de Periodoncia de 1996. Descrito por primera vez como *Bacteroides fusiforme* en 1979 por Tanner et al. Es un bacilo altamente pleomórfico, de muy difícil cultivo, necesitando hasta 14 días para desarrollar pequeñas colonias. Es anaerobio, fusiforme, Gram-negativo. Frecuentemente está asociado a *F. nucleatum* en localizaciones subgingivales (Socransky et al. 1998). Se detecta con más frecuencia en localizaciones con enfermedad periodontal destructiva y en abscesos que sitios sanos o con gingivitis (Herrera et al. 2000 a, Herrera et al 2000 b y Papapanou et al. 2000). Los sujetos que presentan *T. forsythia* son más susceptibles a pérdida ósea, pérdida de inserción periodontal y pérdida dental, comparado con los que no presentan la especie (Machtei et al. 1999). Tiene una actividad proteolítica parecida a la tripsina, metilgloxial y es capaz de inducir apoptosis celular.

Gmur et al. (1989) en investigaciones de muestras de placa utilizando anticuerpos monoclonales, sugieren que *T. forsythia* es mucho más común

en sitios con profundidad de bolsa aumentada. Lai et al. (1987) demostraron que la especie está en mayor cantidad en la placa subgingival que la supragingival. Muchos investigadores (Haffajee et al. 1997, Levy et al. 2002, Winkel et al. 1998 y 2001, Feres et al. 2001) encontraron una disminución en la frecuencia en la detección de *T. forsythia* post-terapia periodontal adecuada con raspado, cirugías periodontales, y/o antibióticos sistémicos. Nociti et al. (2001), encontraron en periodontitis y peri-implantitis inducida en perros, un incremento significativo en la frecuencia de *T. forsythia*. Y la persistencia de la especie en pacientes con periodontitis crónica de baja severidad tuvo 5,3 veces mayor probabilidad (OR) de presentar, al menos, una localización con pérdida de inserción que sujetos sin la especie, o que ocasionalmente tenían *T. forsythia* (Tran et al. 2001).

Investigaciones utilizando hibridización DNA-DNA, detectaron *T. forsythia* sobre o en el interior de células epiteliales de bolsas periodontales, indicando la habilidad de la especie para invadir tejidos, aunque eso no ocurría en individuos sin enfermedad periodontal (Listgarten et al. 1993).

El papel de *T. forsythia* en la enfermedad periodontal está siendo investigado en estudios de varios laboratorios con métodos como sondas de DNA, PCR o métodos inmunológicos.

6.4. *Prevotella intermedia* / *nigrescens*:

Bacteroides pigmentado de negro, se presenta como un bacilo redondeado, anaerobio, Gram-negativo. Shah & Gharbia (1992) distinguen dos especies: *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens* lo que acabó por causar dificultad en interpretar los estudios iniciales de estas especies (Socransky & Haffajee 2003).

Aparece en niveles elevados en gingivitis necrosante, en ciertas formas de periodontitis y en sitios con periodontitis crónica progresiva (Loesche et al. 1982, Moore et al. 1985, Maeda et al. 1998, Herrera et al. 2000, Papapanou et al. 2000, Tanner et al. 1996 y Lopez 2000).

Yoshida-Minami et al. (1997) encontraron inducción de pérdida de hueso alveolar en ratones con aislados de estas especies. Mombelli et al. (2000) observaron que la persistencia del *P. intermedia* / *nigrescens*, tras terapia periodontal convencional, estaba asociada con alta frecuencia de sitios con sangrado al sondaje.

Capaz de producir infecciones al ser inoculada en animales de laboratorio (Hafstrom & Dahlén 1997), parece también ser capaz de invadir células epiteliales normales *in vitro*.

6.5. *Fusobacterium nucleatum*:

Bacilo fusiforme, anaerobio, Gram-negativo, comúnmente aislado en estudios de cultivo de muestras subgingivales, y todavía más prevalente en

sujetos con periodontitis (Papapanou et al. 2000, Socransky et al. 2000) y abscesos periodontales (Herrera et al. 2000 b). Para Socransky & Haffajee (2003) las diferencias en los niveles detectados de *F. nucleatum* entre lesiones periodontales activas y inactivas pueden ser minimizadas si se hiciera una subdivisión de la especie en, por lo menos, 4 subespecies, y posteriormente se hiciera la evaluación de la participación de cada subespecie asociada al estado y progresión de la enfermedad.

6.6. *Campylobacter rectus*:

Vibrio mótil, anaerobio y Gram-negativo. Asociado más comúnmente, y en mayores cantidades, a sitios enfermos comparados con sitios sanos, y todavía aún más en sitios que exhiben destrucción periodontal activa (Tanner & Bouldin 1989, Rams et al. 1994). Como *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* ha demostrado producir leucotoxina, y es una de las pocas especies que poseen esta característica en la microbiota oral (Gillespie et al. 1992). El papel de esta especie ha sido, hasta el momento, difícil de determinar, ya que muchos organismos de la placa son semejantes a esta especie, cuando se evalúan en cultivo.

6.7. *Parvimonas micra*:

Coco pequeño, asacarolítico, anaerobio, Gram-positivo. Se pueden distinguir dos genotipos, el rugoso y el liso, y este último parece estar más asociado a

la enfermedad periodontal (Kremer et al. 2000). *P. micra* se detecta con más frecuencia en sitios con destrucción periodontal que en sitios sanos o con gingivitis (Moore et al. 1985, Herrera et al. 2000 a, Papapanou et al. 2000, Riggio et al. 2001).

6.8. *Capnocytophaga* sp.

Pequeño aerobio, Gram-negativo, en forma de rueda, su hábitat es la boca y nasofaringe, de manera comensal, y ha sido implicado en septicemia, meningitis, endocarditis. *Capnocytophaga* sp. ha sido frecuentemente aislado en gran número de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis de inicio precoz (antigua PJI) y otras formas de enfermedad periodontal (Haffajee et al. 1992). También ha sido aislado en heridas de mordeduras de perros y gatos en humanos, siendo muy similar al *Bacteroides ochraceus*. Investigaciones de casos y controles, de Dyer et al. (1992), con 50 pacientes, sobre la respuesta de anticuerpos serológicos en periodontitis humana a componentes celulares de *Capnocytophaga*, sugieren que algunos sujetos son incapaces de presentar una respuesta inmune al microorganismo, y así puede haber un incremento de la susceptibilidad a la periodontitis con la presencia de una población muy pequeña de *Capnocytophaga* sp. en los sitios enfermos.

6.9. Otras especies:

Obviamente, no todos los patógenos periodontales han sido identificados todavía (Socransky & Haffajee 2003). Además, la prevalencia de algunos patógenos subgingivales parece variar entre sujetos de etnias diferentes (Umeda et al. 1998). Esas variaciones parecen explicar las diferencias de severidad de la enfermedad periodontal.

La prevalencia de bacilos entéricos es un buen ejemplo: en investigaciones de Slots et al. (1990, 1991), los bacilos entéricos tuvieron una prevalencia más alta en pacientes con enfermedad periodontal en República Dominicana que en los de EE.UU. El uso de ciprofloxacino sistémico mejoró la respuesta terapéutica de los pacientes con periodontitis infectados con bacilos entéricos (Slots et al. 1990). En el mismo estudio, los investigadores examinaron muestras de 3.000 pacientes con periodontitis crónica y observaron que 14% de estos pacientes tenían bacilos entéricos y pseudomonas. Barbosa et al. (2001) encontraron la presencia de bacilos entéricos y pseudomonas en 31,2% de los pacientes con periodontitis en Brasil, y especularon que los microorganismos sobre-infectantes pueden ser la causa del fracaso en el tratamiento periodontal.

6.9.1. Especies bacterianas oportunistas:

- Bacilos entéricos, son bacilos Gram-negativos con extremos redondeados, aerobios y anaerobios facultativos, constituyen la mayor parte de la flora

aerobia Gram-negativa que coloniza el tubo digestivo, pero el grupo de especies con capacidad patogénica en pacientes normales es reducido. La gran mayoría se comporta como patógenos potenciales solamente en condiciones ecológicas modificadas del huésped. Forman parte de este grupo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., etc (Slots et al. 1988, Slots et al.1990, Rams et al. 1992).

- *Pseudomonas* sp. tienen características microbiológicas y hábitat muy semejante a los bacilos entéricos, normalmente presentes en el suelo; son bacilos Gram-negativos, casi siempre móviles, con por lo menos un flagelo, aerobios estrictos, y es un microorganismo oportunista. Causa infecciones fundamentalmente hospitalares con una marcada gravedad y alta mortalidad, ya que posee una alta resistencia antibiótica. En la boca son aislados más frecuentemente en la placa supra y subgingival, saliva, mucosa y dorso de la lengua (Slots et al. 1988, Slots et al. 1990).

- *Candida* sp. es un género que contiene al menos 81 especies. *Candida albicans* es el hongo patogénico más conocido, pues produce candidiasis con más frecuencia. Forma parte de la flora bacteriana normal de la boca y tubo digestivo, y los demás microorganismos de la cavidad oral ejercen un control sobre estas especies. Son saprofitas comensales y originan manifestaciones clínicas en pacientes inmunodeprimidos por falta de

defensas, estados patológicos o sus tratamientos, y uso de antimicrobianos (Rams & Slots 1990).

- La familia de *Streptococcus* está frecuentemente implicada en las enfermedades periodontales, pero los datos a este respecto todavía son limitados, y se necesitan investigaciones sobre su papel en la enfermedad periodontal (Socransky & Haffajee 2003). Son cocos comensales, anaerobios facultativos o microaerófilos, su hábitat natural es la boca, el tracto gastrointestinal y respiratorio superior. Forma parte de la flora normal humana. El trabajo de Flynn & Slots (1993), con muestras de cultivo de 718 pacientes con periodontitis avanzada, encontraron *Streptococcus* β hemolíticos en 33,7% de los pacientes con una media de 10,5% de la flora total viable en cultivos, y la mayor prevalencia estaba en pacientes con 35 años o más. Son microorganismos sensibles a la penicilina, pero no sensibles a tetraciclina, metronidazol o ciprofloxacino. *Streptococcus* β hemolíticos puede influir en la enfermedad periodontal y en la cicatrización post-terapia.

- Contreras & Slots (2000) propusieron que algunos virus de la familia de los herpes virus pueden influenciar la respuesta del huésped a la microbiota subgingival local, o actuar como coadyuvantes en la etiología de la enfermedad. Los virus incluyen: citomegalovirus, Epstein-Barr, papiloma

(HPV) y herpes simples. En la investigación, los virus fueron encontrados con más frecuencia en sitios periodontales con actividad destructiva que en sitios estables.

Individualmente, los patógenos periodontales participan como factores de riesgo para la enfermedad, pero el sitio subgingival es colonizado por complejos microbianos cuyos efectos, puede variar de benéficos a nocivos. Parecen existir diferentes relaciones entre los patógenos, que pueden disminuir o acentuar la patogenicidad de una u otra especie (Socransky & Haffajee 2003).

Infecciones mixtas

La situación real que ocurre a nivel subgingival es la de combinaciones entre ciertas bacterias con mayor capacidad patogénica que las mismas especies por separado. Los modelos animales usados para tal hipótesis señalan algunas posibilidades de formaciones de asociaciones o “clusters” (grupos) de microorganismos (Socransky & Haffajee 2003, Tanner et al. 1979). El estudio más importante en este sentido es el de Socransky et al. (1998) que evaluaron 13.261 muestras de placa subgingival de 185 pacientes y describen 5 grupos coherentes basados en diferentes métodos de análisis estadísticos. Cada muestra fue analizada individualmente en cuanto a la

presencia de 40 especies subgingivales usando el método de hibridización DNA-DNA.

Fueron clasificados seis grupos de especies bacterianas íntimamente relacionadas: se incluían, en un primer complejo, *Actinomyces*; en el segundo complejo, amarillo, estaba constituido por miembros del género *Streptococcus*; el complejo verde tenía *Capnocytophaga*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo a, *E. corrodens*, *Campylobacter concisus*; el complejo púrpura con *V. parvula* y *Actinomyces odontolyticus*, que preceden el crecimiento de los complejos naranja y rojo con bacterias predominantemente Gram-negativas. El grupo naranja está compuesto por *Campylobacter gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. micra*, *P. intermedia/nigrescens* y *S. constellatum*, y el complejo rojo por *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola*. Los dos últimos complejos incluyen las especies consideradas como principales agentes etiológicos de las enfermedades periodontales.

7. Métodos de estudio en microbiología periodontal

El desafío de los investigadores ha sido el de identificar, de forma simple, por medio de tests de diagnóstico, los pacientes y/o sitios infectados por patógenos periodontales.

Las técnicas de diagnóstico en microbiología pueden ser de gran valía para dilucidar dichos patógenos y pueden ser clasificadas en:

7.1. Estudios con microscopio:

Son exámenes directos de especímenes con microscopio tras ser tomadas las muestras, que deben ser diluidas para la observación y pueden ser teñidas o no.

Descrita por Callens (1992), la microscopia de contraste de fase está basada en los principios de la geometría y amplitud de ondas para crear una imagen de las células iluminadas. El microscopio de campo oscuro posee condensadores y permite ver muestras frescas sin teñir, utilizando rayos de luz, que a través de una inclinación específica, se dirigen a un objeto formando una imagen brillante en un fondo oscuro. Este tipo de examen permite evaluar la cantidad de bacterias, y diferentes tipos de morfologías de bacterias como los cocos, bacilos no móviles (fusiformes, filamentosos u otros), bacilos móviles y espiroquetas. La desventaja es que no diferencia las

especies, ni ayuda en la elección de antimicrobianos, además de la necesidad de un equipo caro (microscopio). Como principal utilidad sería la observación, por el clínico, de cambios en el grupo bacteriano predominante en el sitio periodontal post-terapia (Listgarten & Schifter 1982).

Además, se puede teñir las muestras con tinción de Gram (hecha con cristal de violeta, iodina, alcohol y safranina), y se observan las muestras con microscopio de luz. Las especies Gram-positivas captan el cristal de violeta, son vistas en colores azules al microscopio, mientras que la Gram-negativa se ven rojas. El valor de este método es que la mayoría de los patógenos periodontales son Gram-negativos. No se puede valorar la motilidad, el tipo de especie o susceptibilidades a antibióticos.

También se puede teñir las muestras con cadenas largas de ácidos grasos, que retienen tinciones básicas. Se tiñen primero con fucsina-carbol y se lava con alcohol ácido. El colorante de fondo es el azul de metileno. Las bacterias positivas mantienen el color rojo inicial y las negativas se tiñen de azul. Este tipo de tinción identifica *Mycobacterium tuberculosis* y *marinum*.

7.2. Cultivo bacteriano:

A pesar, del avance de técnicas que utilizan el DNA bacteriano para la identificación de periodonto-patógenos, el cultivo es el procedimiento de referencia para determinación de microorganismos, el llamado "Gold Standard".

Considerado el único método existente capaz de identificar nuevas especies, necesita tiempo, dinero, personal cualificado y conocimiento técnico, pero sus ventajas sobrepasan todas las desventajas: tiene la capacidad de identificar la mayoría de microorganismos cultivables, pues con seguridad todos los microorganismos que crezcan en placas Petri son viables, o sea, fueron sacados vivos de la bolsa periodontal. Su mayor ventaja es la posibilidad de la evaluación de susceptibilidades a antimicrobianos de una cantidad muy grande de microorganismos, seleccionando el antibiótico adecuado para cada tipo enfermedad. En los casos de nuevas especies bacterianas, encontradas por medio de técnicas moleculares, el cultivo microbiológico puede tener un papel esencial para entender las propiedades de bacterias aun no cultivables en la salud y enfermedad (Sanz & van Winkelhoff 2011).

7.3. Técnicas inmunológicas:

La enfermedad periodontal es considerada una respuesta inmunológica a la acción de las bacterias del biofilm dental. Y uno de los mecanismos

propuestos, es el de la difusión de los productos bacterianos a través del epitelio del surco gingival, provocando una respuesta inflamatoria inmune (Kinane et al. 1991). Los métodos inmunológicos pueden ser utilizados para evaluar especies bacterianas mediante la reacción antígeno-anticuerpo. Estos métodos son más apropiados para la detección de microorganismos específicos en muestras clínicas, con la ventaja de que no requieren bacterias cultivables, proporcionando una estimación cuantitativa o semi-cuantitativa de los microorganismos diana.

7.3.1. Aglutinación del Látex:

Es uno de los tests inmunológicos que pueden ser utilizados para la detección de patógenos periodontales. Este método incluye el uso de “micro-esferas” de látex revestidas con anticuerpos especie-específicos que al entrar en contacto con los antígenos de la superficie celular, o extractos de antígenos de las especies bacterianas, desencadenan una unión cruzada, formando complejos antígeno-anticuerpo, generalmente de manera muy rápida, entre dos a cinco minutos. La mayor desventaja es justamente la reacción cruzada de los anticuerpos del test, y otra desventaja es la detección de pocos microorganismos con antígeno accesible, además de no ser capaz de evaluar la susceptibilidad a antimicrobianos.

7.3.2. Citometría de flujo o Citofluorografía:

Otro test inmunológico que es aplicado rutinariamente para investigar bacterias bucales como *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans* y *P. gingivalis*. El procedimiento incluye la reacción de bacterias de la placa con anticuerpos específicos marcados con fluoresceína. Se utiliza el citómetro de flujo que valora la incidencia de un eje de rayos láser en la suspensión obtenida por el biofilm dental y por los anticuerpos específicos para esas bacterias. Las células dispersan la luz en diferentes ángulos, que son medidos por detectores apropiados. Como cada tipo celular posee un patrón y volumen de reflexión característica, el procedimiento permite la identificación de los microorganismos. La gran desventaja de esta técnica es la necesidad de aparatología muy costosa.

7.3.3. ELISA (enzymed-linked immunosorbent assay):

Método muy sensible. Incluye la unión de reactivos serológicos (anticuerpos) a los pocillos de las placas de poliestireno, previamente sensibilizado por los antígenos bacterianos, o en las membranas colocadas en su base para absorción. Esta unión es detectada por una reacción de color, que puede ser evaluada visualmente o medida por un espectrofotómetro, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de bacterias en la muestra.

La ventaja de esta técnica es la rapidez y la identificación cuantitativa de patógenos periodontales; la sensibilidad y la especificidad son similares a los métodos de cultivo.

7.3.4. ELISA tipo sándwich:

Una variación de la misma técnica es ELISA tipo *sandwich*, donde después de la incubación, se incluye un segundo anticuerpo marcado unido a una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa vegetal). La reacción positiva se visualiza por la adición de un cromógeno y los resultados del test se leen también con un espectrofotómetro para la cuantificación óptima. Ha sido, sobre todo, usado como un método de comprobación. Esta técnica es cara y depende de un laboratorio con medios específicos para realizarla.

7.3.5. Microscopia de inmunofluorescencia:

Combina la sensibilidad y la especificidad de un ensayo inmunológico, con el uso del microscopio, permitiendo la identificación de una bacteria específica en frotis bacterianos, como las muestras de placa subgingival. Hay dos tipos de ensayos de inmunofluorescencia, la directa y la indirecta. La más utilizada es la técnica indirecta.

En este método, los anticuerpos son combinados con fluoresceinas que se unen al antígeno y posteriormente son examinados en microscopio de inmunofluorescencia. Es un test rápido para análisis cualitativo, pero requiere más tiempo para la evaluación cuantitativa. Las limitaciones del test incluyen el uso de anticuerpos monoclonales, que son extremadamente específicos, pudiendo resultar en “falsos negativos”. A pesar de detectar células bacterianas en pequeñas cantidades y no necesitar de células viables, estos tests exigen experiencia técnica, reactivos específicos y microscopio de fluorescencia.

7.3.6. Membrana de inmunoanálisis:

Es un método destinado a detectar niveles de colonización compatibles con la afectación periodontal del sitio infectado. Organizado en un formato de equipo, la detección y diferenciación del microorganismo tiene lugar en aproximadamente 5 minutos. Los resultados son interpretados visualmente. El costo es bajo y la viabilidad bacteriana no influencia los resultados. Sensible, pero no valora la sensibilidad antimicrobiana.

7.3.7. Análisis dot-blot:

Son tests con preparaciones monoclonales de anticuerpos que permiten evaluar varias muestras de placa al mismo tiempo. Método barato, simple y conveniente. La técnica no necesita de equipo especial, puede ser usada en la consulta y el resultado es obtenido en cerca de 2 horas. Pero tampoco valora la sensibilidad microbiana a los antibióticos.

7.4. Técnicas enzimáticas:

Las bacterias más frecuentemente asociadas a las periodontitis son los anaerobios Gram-negativos, que usan principalmente proteínas y péptidos como fuente de energía (Loesche et al. 1990). Así, una o más enzimas proteolíticas, exclusivas de tales bacterias, servirían de marcadores moleculares, y consecuentemente como marcadores de riesgo y/o de la infección causada por estos microorganismos (Loesche et al. 1990).

El test más conocido ha sido el BANA. Se trata del péptido sintético N-Benzoil-DL-Arginina-2-Naftilamida que sufre hidrólisis por la microbiota subgingival. Fue el primer substrato sugerido con posible valor diagnóstico (Loesche 1986). El test es realizado colocando una muestra de placa dental en una tira de papel impregnada con el péptido BANA. Si hay, por lo menos, uno de los tres patógenos *T. forsythia*, *T. denticola* y *P. gingivalis*, el BANA es hidrolizado promoviendo un cambio de color (del azul al negro), y la intensidad de color corresponde a la cantidad de microorganismos. El test

BANA empezó a ser utilizado clínicamente en 1982, desarrollado con el objetivo de posibilitar la lectura de los resultados en la consulta en un tiempo reducido (15 minutos), para resultar práctico y accesible, pero se mostró incapaz de distinguir las proporciones relativas de cada uno de las tres bacterias. Además, no puede identificar la presencia de otros periodontos patógenos importantes, o identificar los patógenos testados cuando presentes en número reducido.

7.5. Técnicas de biología molecular:

Las técnicas de análisis de DNA y RNA se basan en la capacidad de hibridación del DNA con secuencias complementarias de DNA o RNA.

Son tests importantes en la detección de patógenos de difícil cultivo, en una microbiota mixta, como en la placa bacteriana, o en número reducido.

Las técnicas de biología molecular están expandiendo el conocimiento en la ecología oral, destacando la gran riqueza de la microbiota subgingival y la posible importancia de bacterias asociadas a sitios enfermos, que todavía no pueden ser cultivadas, pero que merecen una investigación más profunda de su papel como periodontopatógenos (Sanz & van Winkelhoff 2011).

Parece ser la técnica más sensible para detectar patógenos periodontales, desde 10^3 microorganismos, (Liu et al. 2003). Algunas técnicas de hibridación son capaces de posibilitar la detección simultánea de más de 40

especies bacterianas. Algunas técnicas moleculares, como PCR, alcanzan niveles de sensibilidad de tan solo una célula.

Sus limitaciones están en la habilidad del marcaje, que puede ser sobre células no viables (lo cual puede ser visto como una ventaja), la autohibridación de la sonda, la unión no específica de la sonda y la reacción cruzada con el DNA de otras especies, que resulta en “falsos positivos”, además de no determinar la resistencia antibiótica. Los tests con sondas de DNA son realizados a partir de la fragmentación y purificación del DNA bacteriano en partículas menores. Los fragmentos son marcados y ligados, o hibridados, con DNA bacteriano aislado de la misma especie. Las muestras son enviadas a un laboratorio y colocadas en un filtro. Y el DNA marcado podrá ser evidenciado en un film fotográfico. Cuanto más puntos oscuros aparezcan en el film, mayores serán las cantidades de DNA marcados y consecuentemente de la especie diana presentes en la muestra.

7.5.1. Sondas de DNA:

Las sondas de DNA pueden ser de diferentes tipos: sonda genómica, clonada o de oligonucleótidos. Komiya et al. (2000) y Tanner et al. (1998) desarrollaran dos tests de sonda de DNA que pueden ser realizados en la consulta.

7.5.2. Checkboard DNA-DNA:

La técnica de hibridación Checkerboard DNA-DNA desarrollada por Socransky et al. (1994) está basada en la utilización de genomas enteros y sondas de DNA marcadas por digoxigenina. Esta técnica facilita el procesamiento de muestras de placa, respetando la múltiple hibridación de 40 especies en un único test. Los signos quimiofluorescentes resultantes de la hibridación son cuantificados y utilizados para evaluar la sensibilidad y especificidad de las sondas. Están ajustadas para detectar 10^4 o decenas de millares de células de cada especie. Son necesarios equipos y laboratorio especializados, restringiendo el uso de la técnica al grupo que desarrolló la técnica y a investigadores formados allí.

7.5.3. *Polimerase Chain Reaction* (PCR):

O reacción en cadena de la polimerasa, que es una prueba basada en la amplificación *in vitro* de secuencias de nucleótidos (*primers* o cebadores) por medio de ciclos repetidos de desnaturalización, anillamiento y extensión del DNA o RNA, utilizando la polimerasa del DNA. Permite detectar 10 microorganismos entre un muestra con alrededor de 10^6 bacterias (Gumerlock et al. 1991), con más alta sensibilidad que cualquier otro método. PCR amplifica un único segmento del DNA de la bacteria en millares de copias

idénticas. Su especificidad y su sensibilidad son muy buenas en comparación con el cultivo. La desventaja es que el equipo es caro, puede haber “falsos negativos” por variaciones en la secuencia de nucleótidos usados como *primers* y la tecnología patrón del PCR presenta aún limitaciones en cuanto a la cuantificación del microorganismo.

7.5.4. *Real-time* PCR:

El desarrollo de PCR en tiempo real con *primers* especie-específico ha resultado en un método altamente sensible y específico para la detección precisa de microorganismos diana y, al mismo tiempo, permite la cuantificación de especies bacterianas individualmente (Lau et al. 2004). La prueba muestra, incluso, capacidad de distinguir diferentes especies de espiroquetas (Yoshida et al. 2004). Más preciso y menos laborioso que los métodos de PCR anteriores, *real time* PCR no necesita de manejo manual posterior, previniendo una contaminación del producto en el transporte. La mayor desventaja es que no permite tests de susceptibilidad antibiótica.

7.6. Técnicas avanzadas:

En 2003 fue concluido el proyecto Genoma, resultado de un estudio de 13 años que involucró varios países, incluido Brasil. Este proyecto identificó que el genoma humano (DNA y todos sus genes) contiene aproximadamente 30.000 genes. Entre las aplicaciones de la identificación del genoma humano está la posibilidad del estudio de un gran número de genes.

Cuando los genomas de las secuencias de la mayoría de las bacterias orales estén disponibles a través de las técnicas de ecología molecular será factible la detección de genes que codifican factores de virulencia e otras funciones relevantes (Sanz & van Winkelhoff 2011).

Una de las tecnologías más significativas hasta hoy desarrolladas son los *arrays* (o matrices) de hibridación, que pueden ser clasificados en cuatro grupos: oligonucleótidos de alta densidad, microelectrónicos, macroarrays y microarrays.

7.6.1. Arrays de Oligonucleótidos:

Los arrays con oligonucleótidos de alta densidad utilizan fotolitografía para fabricación *in situ* de las sondas en la matriz.

Estos arrays contienen sondas que poseen una secuencia simple de DNA.

7.6.2. Arrays microelectrónicos:

Son las formas más novedosas de arrays de hibridación. La matriz está hecha de electrodos que generan un campo eléctrico que inmoviliza las sondas y controla a la hibridación de la diana. Así, los electrodos pueden mover ácidos nucleicos y también proteínas alrededor de la matriz. Actualmente se están desarrollando otros métodos de arrays de hibridación como la detección química y basadas en esferas.

7.6.3. Macroarrays:

Es una evolución de los primeros arrays, utilizan sondas fabricadas y depositadas por robots en las matrices. Esta técnica utiliza dianas marcadas radiactivamente y normalmente contienen de 200 a 5.000 genes.

7.6.4. Microarrays:

Desarrolladas por Schena et al. en 1995 en la universidad de Stanford (California, EE.UU.) pueden monitorizar la transcripción de millares de genes de una sola vez, pero se diferencia de la técnica de macroarray en tres aspectos: tipo de matriz, tipo de detección y densidad. El microarray utiliza vidrio, plástico o nylon como matriz y una camada de marcación fluorescente. Además, la técnica del

microarray presenta sondas de mayor densidad de las encontradas en los macroarrays (Kuo et al. 2002). De manera breve, esta técnica utiliza un microchip, constituido de una matriz que contiene las llamadas sondas, o secuencias de ácidos nucleicos de los genes investigados. Las sondas son depositadas en la matriz de manera análoga a una impresión, por medio de una impresora de tinta. Los ácidos nucleicos extraídos de las células o tejidos estudiados son entonces hibridizados a los arrays y las reacciones positivas con las sondas son consideradas expresiones genéticas positivas (Kuo et al. 2002). La gran ventaja de los microarrays es la posibilidad de hibridación en una pequeña cámara, reduciendo así el volumen de la muestra. Cuando la expresión genética es analizada en escala global, es posible estudiar simultáneamente la expresión de millares de genes. Una de las limitaciones de esta técnica es el gran volumen de datos complejos obtenidos con este experimento, y la falta de técnicas que faciliten la interpretación de estos datos. Se necesita un laboratorio y equipos altamente especializados para la preparación de los microarrays, pues se utilizan robots altamente precisos, que aplican las diferentes muestras de DNA en puntos diminutos (*spot*) en el centro de una lámina de microscopio con la superficie químicamente preparada. Cada punto representará un segmento génico en particular. Cuanto

más puntos en el microarray, más completa será el análisis del transcriptoma.

Para minimizar del número de genes estudiados, se puede limitar la investigación de genes relacionados a mecanismos de interés o mecanismos funcionales comunes. Los llamados arrays mecanismo-específicos o microarrays centrado, pueden ser utilizados para investigar por ejemplo citocinas, apoptosis, etc. Así, se genera un menor volumen de datos y consecuentemente facilita la interpretación de los resultados (Kuo et al. 2004).

En los últimos años, se empiezan a usar las microarrays para investigaciones de patologías odontológicas. En periodoncia, están disponibles en la literatura pocos estudios que empleen microarrays para análisis de la enfermedad periodontal.

Araki et al. (2004) fueron los primeros a emplear los microarrays centrados para analizar alteraciones en la expresión de genes relacionados a factores de virulencia de *P. gingivalis* asociados a severidad de la destrucción periodontal. Milward et al. (2007) investigaron los efectos moleculares de las células del epitelio oral en presencia de dos periodonto patógenos (*F. nucleatum* y *P. gingivalis*).

8. Tratamiento de las Enfermedades Periodontales

El tratamiento de las enfermedades periodontales evoluciona de manera continuada, alcanzando cada vez una mayor complejidad. El desarrollo de técnicas, las modificaciones de los patrones socio-demográficos y la creciente información sobre los cuidados de la salud van incrementando la demanda sobre la toma de decisiones con respecto al tratamiento de estas enfermedades.

Las informaciones presentadas hasta ahora indican que los biofilms, que colonizan la superficie dental y los tejidos orales, son complejos, y tienen que ser controlados y/o erradicados.

Las especies patogénicas están presentes en un gran número en las infecciones causadas por biofilms dentales, ampliamente distribuidas en la cavidad oral, dentro de estructuras comunitarias que promueven protección contra los mecanismos de defensas del huésped y agentes antimicrobianos. Además, se pueden multiplicar exponencialmente con capacidad de adherirse a otras superficies del huésped o a otros microorganismos ya adheridos en los tejidos del huésped (Socransky & Haffajee 2002).

Las terapias periodontales, actualmente, pueden ser agrupadas en tres grandes grupos:

1. Desbridamiento mecánico, que elimina físicamente los microorganismos.
2. Tratamientos antimicrobianos, que intentan matar o afectar el metabolismo de los microorganismos.
3. Otros tipos de terapias, como posibles vacunas contra patógenos orales, la introducción de especies en el biofilm a fin de controlar microorganismos potencialmente patogénicos, o la modificación o modulación de la respuesta del huésped.

8.1. Tratamientos mecánicos - desbridamiento mecánico o eliminación física de los microorganismos

El primer paso para el control del biofilm oral es la eliminación física de la placa bacteriana, que afortunadamente tiene fácil acceso.

La forma más común de terapia periodontal es la eliminación de la placa supra y sub-gingival por procedimientos como la higiene oral personal, raspado y alisado radicular (RAR), o terapia quirúrgica periodontal (Socransky & Haffajee 2002).

8.1.1. Higiene oral personal:

Una importante cuestión, con relación a las decisiones del tratamiento, es la prevención de las enfermedades periodontales, incluyendo gingivitis y periodontitis, enfatizando la educación sobre salud bucal y medidas de higiene bucal personal.

La higiene bucal, con el uso de cepillo de dientes, hilo dental y otros instrumentos que ayudan en la eliminación de la placa bacteriana y restos alimentarios de las superficies de los dientes, es considerada como esencial en el control de las enfermedades periodontales, tanto en prevención primaria como secundaria (para mantener al paciente en salud una vez tratado). Está claro que los procedimientos de higiene bucal pueden resolver la gingivitis experimental, y se asume que también ayuda a prevenir la periodontitis crónica (Lindhe 1989). Sin embargo, se debe tener cuidado con la noción de que la incidencia de periodontitis crónica puede ser modificada a través de medidas de higiene bucal personal (Lindhe 1989).

8.1.2. Tratamiento Periodontal Básico (o terapia causal)

También llamada terapia mecánica no quirúrgica de la bolsa periodontal. Se refiere al tratamiento de la inflamación periodontal y gingival por medio de la eliminación mecánica de los irritantes de la superficie del diente o raíz, hasta que los tejidos blandos adyacentes mantengan o retornen a un estadio saludable o no inflamados, también conocido como RAR (Rylander & Lindhe 2003).

Dependiendo de la localización de los depósitos de cálculo y placa bacteriana, el RAR debe ser ejecutado con instrumentos supra o subgingivales. El alisado radicular es una técnica de eliminación del cemento ablandado, consiguiendo una superficie radicular “dura” y “lisa”. Estas

técnicas pueden ser realizadas en forma de procedimientos cerrados o abiertos. En el método cerrado la instrumentación se hace sin el desplazamiento de las encías y en el método abierto se expone la superficie radicular afectada por medio de incisión de las encías para facilitar el acceso y visibilidad del campo operatorio (Rylander & Lindhe 2003).

Los instrumentos utilizados pueden ser manuales, ultrasónicos o sónicos, rotatorios, instrumentos de movimiento alternado e instrumentos de laser.

- Instrumentos manuales: el cálculo y los márgenes de restauraciones desbordantes son eliminados del esmalte o de la superficie radicular expuesta, mientras que el mismo procedimiento realizado en la superficie radicular también elimina pequeñas lascas de cemento durante la operación.

La instrumentación subgingival busca resolver la inflamación gingival y detener la destrucción progresiva del aparato de inserción por medio de la eliminación del biofilm de la bolsa gingival. Por lo tanto, conjuntamente con el control de placa supragingival, el desbridamiento subgingival es la medida más importante en el tratamiento de las enfermedades periodontales. En muchos pacientes que adoptan hábitos adecuados de control de placa, la instrumentación subgingival restablece la salud gingival (Rylander & Lindhe 2003).

- Instrumentación ultrasónica y sónica: la eliminación de placa y cálculo se hace por la vibración de la punta del instrumento y por el efecto de cavitación del líquido refrigerante. Las vibraciones tienen amplitud de 0,006 a 0,1 mm, producidos por un núcleo de metal que puede alterar sus dimensiones en un campo electromagnético con frecuencia operatoria entre 25.000 y 42.000 ciclo por segundo. En instrumentos sónicos, las vibraciones son producidas mecánicamente. Tales vibraciones provocan calor, razón por la cual las puntas son siempre irrigadas con líquido.

El raspado, hecho con instrumentos ultrasónicos de manera frecuente, resulta en el establecimiento de una superficie radicular irregular, y por eso Rylander & Lindhe (2003), sugieren que el raspado sea complementado con instrumentos manuales para producir una superficie radicular lisa.

- Instrumentos rotatorios: pueden ser utilizados en sitios difíciles de raspar como bolsas infraóseas profundas y estrechas y en furcas. Pueden usarse fresas diamantadas de granulación fina. Pero el cuidado debe ser especial para evitar la eliminación excesiva de estructuras dentarias (Rylander & Lindhe 2003).

- Instrumentos de movimiento alternado: son instrumentos usados en la pieza de mano que limpian y optimizan el alisado del cemento radicular rugoso, además de evitar la eliminación adicional de este cemento después de que la superficie esté limpia y lisa.
- Instrumentos de laser: instrumentos utilizados desde 1964, sirven para el desbridamiento radicular junto a la cirugía periodontal (Rylander & Lindhe 2003). Pueden ser una alternativa de tratamiento periodontal, aunque los resultados iniciales han sido motivo de controversia, pues parece favorecer el desbridamiento subgingival (causando daños mínimos a la superficie radicular), tiene efectos antimicrobianos potenciales (Tomasi et al. 2006) y favorece el proceso de reparo. Recientemente, Moritz et al. (1998), Assaf et al. (2007) y Qadri et al. (2005), mostraran que el laser de diodo puede contribuir a una reducción significativa de los recuentos bacterianos y en el control de la inflamación periodontal. Los lasers pueden ser divididos en dos categorías: (1) Laser de baja potencia, que posee un efecto analgésico, antiinflamatorio y bioestimulante, incluyendo Helio-neonio (He-Ne) y Arseneto de Galio-Aluminio (Ga As Al); (2) Laser de alta potencia, que en general causan un efecto térmico (corte, vaporización tejidual y hemiostasis), y los más utilizados son de Neodimio (Nd: YAG), Erblio (Er: YAG), Holmio (Ho: YAG), dióxido de

carbono (CO₂) y Argonio. Los resultados de las investigaciones in vivo todavía muestran resultados contradictorios: mientras autores como Schwarz et al. (2006) encuentran superficies radiculares mejor desbridadas con el laser, Eberhard et al. (2003) encontraron mejores resultados con la terapia manual.

La eliminación completa de placa y cálculo subgingival es un procedimiento “no quirúrgico” muy difícil, cuando no imposible. Estudio de diversos autores demuestran que la instrumentación “cerrada” es infectiva para eliminar todos los depósitos de cálculo (Rylander & Lindhe 2003). Pero el estudio de Haffajee et al. (1997) concluyó que los procedimientos mecánicos indudablemente eliminan la mayoría de los microorganismos que colonizan las superficies dentales, quizás hasta un 90% o proporciones aún mayores.

8.1.3. Tratamiento quirúrgico

Dado que las enfermedades periodontales están asociadas a la placa bacteriana, también queda muy claro que el tratamiento quirúrgico puede ser considerado como coadyuvante en la terapia dirigida a eliminar el factor etiológico principal (Wennström et al. 2003). Las técnicas quirúrgicas deben ser realizadas para facilitar la eliminación de depósitos subgingivales, el control de placa por el paciente y para promocionar salud a largo plazo.

Normalmente, la cirugía se realiza después de una evaluación de la respuesta a la fase inicial de la terapia (cambios en la higiene oral y RAR).

A lo largo de los años, la variedad de técnicas quirúrgicas descritas y empleadas en el tratamiento de las enfermedades periodontales es enorme. Inicialmente, las técnicas empezaron a ser propuestas para lograr acceso a las superficies radiculares afectadas por la enfermedad. Con la modificación del concepto de la enfermedad periodontal, sugiriendo que ciertos tejidos deberían ser eliminados, las técnicas quirúrgicas también fueron cambiando. Y así, se propusieron gingivectomías para la eliminación de tejido blando inflamado, después colgajos para la remodelación del tejido óseo, cirugías mucogingivales para mantener el complejo mucogingival, y por último, las cirugías para posibilitar la regeneración tisular.

8.2. Terapéutica antimicrobiana:

La terapéutica antimicrobiana se emplea como coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades periodontales. Está claro que la administración de un antibiótico, o de un antiséptico, no puede eliminar el cálculo y ni los residuos bacterianos. Dado que las evidencias científicas previamente revisadas, indican que la periodontitis es una infección causada por microorganismos vivos, el objetivo del uso de antimicrobianos es la erradicación efectiva del patógeno con la menor dosis posible en un corto

periodo de duración, y con una ocurrencia mínima de efectos adversos (Ebert & Craig 1990).

Aunque haya evidencias claras de la penetración bacteriana en los tejidos periodontales, no hay un consenso de que esta invasión sea esencial para la progresión de la enfermedad periodontal (Mombelli 2003). Además, las bacterias de la placa subgingival interactúan con los tejidos del huésped. Por lo tanto, para que el fármaco tenga efecto es necesario que alcance una concentración suficientemente alta dentro del ambiente subgingival, así como en los tejidos periodontales. Debido a la gran cantidad de microorganismos dentro de las bolsas subgingivales y a su organización en forma de biofilms, los agentes quimioterápicos pueden ser neutralizados o degradados por otros microorganismos diferentes del diana. Los biofilms actúan protegiendo efectivamente las bacterias (Mombelli 2003).

Por todos los factores señalados, el tratamiento de la enfermedad periodontal por agentes antimicrobianos por sí solos, no será suficiente para solucionar la enfermedad, y la indicación clara es que es necesaria la terapia física para romper el biofilm y eliminar la masa de depósitos bacterianos, y que el raspado debe de preceder la terapia antimicrobiana (Mombelli 2003, Herrera et al. 2008 a).

En el presente estudio se evaluaron los efectos *in vitro* de antimicrobianos de los grupos de las Penicilinas, Tetraciclinas, Macrólidos, Fluoroquinolonas, Lincosamidas y Nitromidazoles sobre las muestras de placa subgingival de

pacientes con periodontitis crónica brasileños. Los mecanismos de acción de cada grupo de antimicrobianos son distintos y, así, los microorganismos que pueden ser eliminados por cada grupo también son distintos. El abordaje del tema interesa para un mejor entendimiento del por qué del fármaco en cada tratamiento.

8.2.1. Penicilinas:

Las penicilinas actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana: el anillo beta-lactámico es la clave de su modo de acción, pues se fijan a la pared bacteriana inactivando las enzimas involucradas en el proceso de síntesis de la pared celular (Walker 1993, Forbes et al. 1998, Andrade 1999). A este grupo pertenecen, además de las penicilinas, las amoxicilinas y ampicilinas. La sensibilidad de las bacterias a las penicilinas es baja y cada vez más frecuentemente las bacterias se hacen resistentes a este antibiótico (Murria & Moellering 2000, van Winkelhoff et al. 2005, Herrera et al. 2000).

8.2.2. Penicilinas con Clavulanato:

En estos casos, puede ser útil la combinación de penicilinas con clavulanato (van Winkelhoff et al. 2005, Herrera et al. 2000). Precisamente, la clave del modo de acción de las penicilinas, el anillo β -lactámico, es también la causa de su inactivación. Este anillo puede ser destruido por algunas enzimas bacterianas, llamadas β -lactamasas, que tienen gran afinidad por el ácido

clavulánico. El grupo de las penicilinas que incluye al clavulanato pasan a tener una molécula β -lactámica sin actividad antibacteriana que se fija a la enzima β -lactamasa bacteriana y la convierte en inactiva. La asociación de amoxicilina y clavulanato fue evaluado en pacientes con periodontitis con aceptables resultados (Winkel et al. 1999).

8.2.3. Tetraciclinas:

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana por medio de la unión a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos. La resistencia bacteriana a esta droga está mediada por varios genes que llevan a la eliminación activa de la tetraciclina de la célula bacteriana, o a la reducción de la afinidad de los ribosomas bacterianos por la tetraciclina (Murray & Niles 1990, Motgomery 2000). Las tetraciclinas también son capaces de inhibir la colagenasa, lo que puede interferir en la degradación de los tejidos en la enfermedad periodontal. Una ventaja de la droga es que se une a la superficie dental siendo liberada a lo largo del tiempo (Mombelli 2003)

8.2.4. Macrólidos:

Azitromicina es un antibiótico macrólido, de la familia de la eritromicina, y son drogas bacteriostáticas que actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana, pero por medio de la unión a la subunidad 50S en los ribosomas bacterianos, distinto de las tetraciclinas. Presenta una vida media plasmática

biológica mucho más prolongada en los tejidos y su espectro de acción es mayor que de la eritromicina (Motgomery 2000).

Las tetraciclinas, clindamicinas y macrólidos tienen amplio espectro de acción y son bacteriostáticas (Mombelli 2003).

8.2.5. Fluoroquinolonas:

Las drogas del grupo de las fluoroquinolonas, o quinolonas, están representadas por ciprofloxacino, que es altamente activo contra bacterias Gram-positivas, pero no es muy eficaz contra los anaerobios (Motgomery 2000). Actúa inhibiendo la síntesis de DNA, al igual que el metronidazol (Mombelli 2003).

8.2.6. Lincosamidas:

Clindamicina es un fármaco de la clase de las lincosamidas que actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana. Es un bacteriostático, penetra en el medio intracelular, posee actividad inmune estimuladora, pues potencializa la opsonización bacteriana y acelera la quimiotaxis y fagocitosis de los leucocitos. Es muy activa contra *Capnocytophaga* sp., anaerobios de la microbiota oral y orofaríngea y microorganismos Gram-positivos. No tiene mucha acción sobre los bacilos entéricos (Montgomery 2000).

8.2.7. Nitromidazoles

Metronidazol, del grupo de los nitromidazoles, es activo contra un amplio rango de bacterias anaerobias. Actúan inhibiendo la síntesis de DNA, y el fármaco es convertido en varios metabolitos de vida corta después de la difusión dentro de los microorganismos anaerobios. Estos productos se unen con el DNA y otras macromoléculas bacterianas, resultando en la muerte celular (Mombelli 2003). Este proceso es efectivo en anaerobios estrictos y protozoarios, pero no en microorganismos aerobios o microaerófilos (Mombelli 2003). La microflora en las periodontitis está dominada por especies anaerobias estrictas, por eso su utilización es común en el tratamiento de distintos tipos de periodontitis, muchas veces como el antimicrobiano de primera elección. El metronidazol parece tener un efecto a largo plazo más pronunciado (Socransky & Haffajee 2002). La gran mayoría de las especies testadas muestra una buena susceptibilidad a esta droga. Metronidazol actúa sinérgicamente con amoxicilina en las periodontitis asociadas a *A. actinomycetemcomitans* (Winkel et al. 2003, Winkel et al. 1998).

8.2.8. Administración del antimicrobiano:

Los antibióticos pueden ser administrados por vía directa, en la bolsa periodontal, o por vía sistémica. Cada método tiene ventajas y desventajas específicas. La terapia local puede ser efectiva donde el microorganismo

diana esté restringido a la lesión clínica visible, y se puede administrar una cantidad de fármaco localmente en un nivel que no puede ser logrado por vía sistémica. La terapia sistémica puede alcanzar, a su vez, a una bacteria ampliamente distribuida. Muchos estudios demuestran que las bacterias periodontopatógenas pueden estar distribuidas por toda la cavidad oral, incluyendo superficies no dentales (Mombelli 2003). La desventaja de la vía sistémica está asociada al hecho de que la droga se distribuye por todo el organismo y apenas una pequeña porción de la dosis total logra, de hecho, llegar a la microflora subgingival dentro de la bolsa periodontal. Las reacciones adversas son también una gran preocupación y más frecuentes si la droga es distribuida sistémicamente. Otra desventaja es que la administración sistémica adecuada depende de la colaboración del paciente (Mombelli 2003).

8.2.9. Posología del antimicrobiano:

Además, de la selección del agente antimicrobiano, la determinación de la posología apropiada depende del conocimiento e integración de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del antibiótico (Ebert & Craig 1990), que deben explicar la relación entre la concentración y la actividad antimicrobiana y/o toxicidad. Según Ebert & Craig (1990), uno de los parámetros farmacodinámicos más frecuentemente utilizado para caracterizar la actividad antimicrobiana es la determinación de la

concentración inhibitoria mínima (CIM o MIC, del inglés, *minimum inhibitory concentration*). Turnidge (1998) afirmó que la MIC sería el único parámetro *in vitro* capaz de medir la actividad intrínseca de los antimicrobianos, una vez que posibilita obtener una medida simple de la concentración, directamente comparable con las concentraciones en la sangre, fluidos corporales y tejidos.

Para lograr la predicción *in vitro* de la eficacia clínica (*in vivo*) del antibiótico, se emplean los umbrales de concentración antibiótica sugeridos por los protocolos del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI). Los umbrales, o *breakpoints*, de concentración son generalmente dos o cuatro veces menores que el nivel antibiótico alcanzable en el sitio diana (Baker et al. 1985), y dependen de la dosis dada y de la ruta de administración del fármaco (Baker et al. 1985).

Las sugerencias para la interpretación de MICs sugeridas por el CLSI se distribuyen en cuatro categorías interpretativas: susceptible, moderadamente susceptible, resistente y condicionalmente susceptible. estas categorías resultan apropiadas para varias situaciones clínicas (Baker et al. 1985).

Para investigar la susceptibilidad antimicrobiana de los fármacos se pueden usar distintos tests, entre ellos el E-test (técnica Epsilometer - AB Biodisk, Solna, Suecia), considerado un método moderno que emplea la difusión del antibiótico en placa de agar frente a los microorganismos viables.

8.3. Otras Terapias

8.3.1. Terapias que afectan el medio microbiológico: eliminación de la placa supragingival.

- Mantenimiento Periodontal

En ecología microbiana, las especies colonizadoras afectan el hábitat, así como el hábitat afecta el organismo colonizador. El ambiente subgingival proporciona el medio adecuado a la multiplicación de los microorganismos de los complejos naranja y rojo, y tal vez permita que estas bacterias induzcan destrucción tisular. Si el medio alrededor de la microbiota subgingival es alterado, entonces habrá cambios en el número, proporción y prevalencia de las especies (Socransky & Haffajee 2002). Los factores ambientales que pueden afectar a la placa subgingival incluyen el tejido de la bolsa periodontal y la placa supragingival. Cambios en uno de los dos medios llevan a cambios en la composición de la placa subgingival. Hace mucho tiempo que se reconoce que la eliminación meticulosa de la placa supragingival lleva a una mejora en los parámetros asociados a la inflamación gingival. Ximenez-Fyvie et al. (2000), en un estudio longitudinal de 12 meses con cuidados de mantenimiento periodontal, verificados con exámenes clínicos y microbiológicos, observaron que hubo una reducción significativa y continua de los recuentos bacterianos a lo largo del tiempo en

34 especies de las 40 evaluadas, incluyendo a *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

Para lograr el control en enfermedades infecciosas hay normalmente dos enfoques posibles: el primero es controlar el nivel de los organismos en el medio, frecuentemente a través de procedimientos médicos; y el otro enfoque es atacar el organismo en el huésped infectado que está exhibiendo signos de enfermedad.

El control de la placa bacteriana debe de ser considerado como un “procedimiento” médico que reduce los niveles de las especies potencialmente patogénicas, tanto como el control de aguas residuales, el suministro de aguas, la manipulación de alimentos y otras medidas de salud pública (Socransky & Haffajee 2002).

- Promoción de Salud Pública

Watt y Marinho (2005) revisaron 443 estudios de 1995 a 2004, y concluyeron que las intervenciones públicas educativas sobre los niveles de placa y salud gingival son habitualmente realizadas para estudiantes y adultos, en el lugar de trabajo o en clínicas. No hay estudios que evalúen el desarrollo de políticas u otras formas de promoción de salud. El conocimiento sobre el valor de las intervenciones públicas no educativas para promover la salud periodontal es restringido, pues faltan investigaciones bien diseñadas. Los autores también especulan que las intervenciones cuyo primer objetivo

sea mejorar otros resultados de salud, como por ejemplo, las políticas públicas que restringen el uso del tabaco, pueden tener un impacto positivo significativo sobre el control de placa y sangrado gingival.

Considerado como medida sanitaria, la eliminación del biofilm supragingival restringe la fuente de nutrientes, el medio físico y químico para la proliferación de organismos subgingivales, y también reduce la inflamación, favoreciendo la función de barrera al epitelio y reduciendo la segunda fuente de crecimiento bacteriano. La alteración del hábitat subgingival es uno de los principales mecanismos por los cuales se logra el control de los patógenos subgingivales (Socransky & Haffajee 2002).

- Nuevos enfoques terapéuticos

Se están investigando nuevos enfoques terapéuticos, por ejemplo con el objetivo de modificar el biofilm bacteriano, mediante péptidos antimicrobianos (Gorr & Abdolhosseini 2011), que podrían cambiar la homeostasis de la cavidad oral por medio de la eliminación total o selectiva de bacterias, afectando la colonización bacteriana o exhibiendo actividad antiinflamatoria. Todavía es muy pronto para poder valorar los resultados de este tipo de terapia.

Los probióticos pueden ser otra alternativa como terapia preventiva de las enfermedades periodontales, pues parecen demostrar propiedades antiinflamatorias, por medio de cambios en la microbiota oral, al menos a

corto plazo, pero todavía son necesarios más estudios para aclarar su efectividad preventiva y terapéutica (Tonetti & Chapple 2011)

8.3.2. Terapias antimicrobianas combinadas:

El uso de terapias combinadas se muestra muy efectivo en el tratamiento de infecciones médicas importantes, al igual que en periodoncia. La combinación sistémica de la administración de amoxicilina y metronidazol para el tratamiento coadyuvante de ciertas enfermedades periodontales parece ser muy efectiva.

La combinación del tratamiento de raspado con la administración adjunta de amoxicilina y metronidazol redujo significativamente la detección de *A. actinomycetemcomitans* asociado a la periodontitis del adulto, periodontitis juvenil localizada, periodontitis refractaria y rápidamente progresiva (van Winkelhoff et al. 1992). Otros estudios también muestran que esta combinación es efectiva para el control de los niveles de otros patógenos como *P. gingivales*, *T. forsythia* y *P. intermedia* (Berglundh et al. 1998, Lopez & Gamonal 1998, Pavicic et al. 1994, Rudiger et al. 1999, Winkel et al. 1997). Socransky & Haffajee (2002) sugieren, en una revisión, que las terapias combinadas pueden ser más efectivas en el tratamiento y/o prevención de las periodontitis recurrentes. Describen también que las terapias individuales son generalmente efectivas en sujetos en los que la

enfermedad es rápidamente controlada por cualquiera de los diversos abordajes terapéuticos.

Una hipótesis probable es que el tratamiento periodontal puede también afectar la respuesta del huésped, posiblemente por una especie de “vacunación” durante los procedimientos de desbridamiento mecánico o usando antiinflamatorios, o agentes modificadores locales o sistémicos del huésped (Socransky & Haffajee 2002).

8.3.3 Nuevas terapias

Un campo de investigación que parece prometedor es la modificación de la respuesta del huésped. Van Dyke (2011), investigando los mediadores pro-resolución lipídicos para el control de la inflamación periodontal en conejos, observó la eliminación espontánea de patógenos periodontales (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*). La utilización de estas moléculas puede ser una abordaje preventivo y terapéutico interesante que protegerá contra la adquisición o sobrecrecimiento de bacterias patogénicas (Tonetti & Chappel 2011). Las investigaciones de modulación nutricional con efecto en las enfermedades periodontales actualmente parecen ganar interés. Hay evidencias de la asociación directa entre el incremento del consumo de alimentos calóricos y la inflamación por la vía metabólica de la glucosa y las vías de señalización (estrés oxidativo post-prandial) (Esposito et al. 2008) y indirectamente a través del acúmulo de grasa visceral (adiposidad) (O’Keefe

et al. 2008). El aumento de la prevalencia de periodontitis estaría asociada con el aumento de la adiposidad central (Pischon et al. 2007).

A pesar del avance significativo de los nuevos abordajes terapéuticos periodontales que están siendo investigados, hay limitaciones importantes en la comprensión de las enfermedades periodontales, lo que tiene un impacto importante en el desarrollo de tales terapias para tratamiento y prevención de las enfermedades periodontales (Tonetti & Chapple 2011)

9. Justificación del estudio

Las enfermedades periodontales son altamente prevalentes, están entre las infecciones más comúnmente observadas y representan una gran preocupación en la salud pública mundial (Papapanou 1996, Loe & Silness 1963, Van Dyke 2005, Teng 2006). Su causa primaria son las bacterias de los biofilms orales. Hay evidencias muy claras que demuestran que varias especies bacterianas, de entre las que residen en el biofilm dental, están claramente asociadas a las periodontitis (Flemmig 1999).

Aunque hay varias investigaciones que han estudiado la prevalencia de periodontopatógenos en pacientes con tipos distintos de periodontitis en la población brasileña, muy pocos han evaluado la susceptibilidades frente a antimicrobianos de dichos microorganismos. Normalmente, los clínicos siguen protocolos de uso de antimicrobianos similares para todos los pacientes del mundo, asumiendo que todos los pacientes en todos los lugares geográficos tienen la misma microbiota o que el fármaco actuará en los síntomas de la enfermedad y no en el microorganismo vivo (Mombelli 2003).

Se han propuesto hipótesis señalando que las diferencias étnicas, geográficas y socioeconómicas podrían afectar a la presencia de los

patógenos periodontales en pacientes con periodontitis en distintas poblaciones, lo que ha sido respaldado por diferentes investigaciones epidemiológicas. Los estudios de prevalencia de patógenos periodontales en dos o más poblaciones geográficas, usando los mismos métodos microbiológicos, son escasos, a pesar de ser muy necesarios para encontrar si existen diferencias reales en la composición de las microbiotas subgingivales entre sujetos de lugares geográficos distintos. Una posible consecuencia de que existan diferencias geográficas verdaderas en la prevalencia de periodontopatógenos sería el abordaje terapéutico diferente, especialmente en el uso de terapia antimicrobiana sistémica adyunta.

La presente tesis trata de estudiar la composición de la microbiota de los pacientes con periodontitis crónica brasileños, además de la actuación de ocho fármacos antimicrobianos con respecto a la susceptibilidad y resistencia de los periodontopatógenos encontrados.

10. Hipótesis

Hay diferencias en la composición de la microbiota subgingival de pacientes con periodontitis crónica de diferentes regiones del planeta. Los espécimenes y cantidad de periodontopatógenos que componen el biofilm bacteriano también difieren. Las causas de tal contraste pueden ser variadas, pasando desde las condiciones de higiene individual, hasta las políticas de salud pública de cada país.

Los cambios en la composición del biofilm bacteriano para cada región, una vez observados, deben de ser asociados con una adecuada verificación de la susceptibilidad antibiótica *in vitro*. Dada la variabilidad existente entre poblaciones en la composición de la microbiota subgingival, se espera encontrar también importantes diferencias en las susceptibilidades frente a antimicrobianos de las bacterias implicadas, por lo que los protocolos antibióticos también deberían alterarse, ya que no son apropiados para suprimir los patógenos causantes de periodontitis de todas las poblaciones y de todos los países.

Los microorganismos sobre-infectantes u oportunistas podrían estar involucrados en tales cambios y podrían dificultar la elección del antimicrobiano adecuado.

11. Objetivos del estudio

El objetivo principal del estudio fue investigar la microflora subgingival de pacientes adultos brasileños con periodontitis crónica, usando el método de cultivo.

De manera concreta, se trató de evaluar la frecuencias de detección, cantidad y proporciones de microbiota de: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia / nigrescens*, *T. forsythia*, *P. micra*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *Streptococcus* β -hemolíticos, *Capnocytophaga* sp., y los microorganismos oportunistas: *Candida* sp., bacilos entéricos y *Pseudomonas* sp.

Un segundo objetivo fue evaluar las susceptibilidades antimicrobianas *in vitro* por medio de E-test de los periodonto-patógenos encontrados.

Los fármacos fueron seleccionados según su grupo, acción y utilización en odontología, para los test de susceptibilidades frente a antimicrobianos: penicilina, amoxicilina, amoxicilina con clavulanato, tetraciclina, clidamicina, ciprofloxacino, metronidazol y azitromicina.

Un tercer objetivo fue la comparación entre los resultados de las prevalencias de microbiotas subgingivales de pacientes de poblaciones

distintas con periodontitis en Brasil, Colombia, Chile y España, usando métodos clínicos y bacteriológicos idénticos.

12. Material y Métodos

12.1. Diseño del estudio

Investigación epidemiológica clínica y microbiológica transversal de una población sin tratamiento periodontal previo, con diagnóstico de periodontitis crónica en Brasil.

El centro de la investigación fue Campinas (en la provincia de São Paulo – Brasil) en una consulta privada. Cada sujeto de la investigación fue examinado por una única investigadora en una cita única.

12.2. Pacientes

Los pacientes se incluyeron según los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Hombres o mujeres mayores de 30 años
- Con al menos 12 dientes (excluyendo el tercer molar)
- Con al menos un 25% de sangrado en las zonas evaluadas según el Índice de Sangrado Gingival (ISG)
- No fumadores
- Periodontitis crónica, según los criterios de Armitage (1999), con cuatro o más localizaciones con por lo menos 5 mm de profundidad

de sondaje y pérdida de inserción mayor de 2 mm (Offenbacher et al. 2001).

Criterios de exclusión

- Pacientes incluidos en ensayos clínicos
- Historia de enfermedad médico o psiquiátrico grave
- Enfermedades sistémicas tales como:
 - Inflamatorias (diabetes, artritis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y otras...).
 - Infecciones crónicas (como infección por VIH,...)
 - Neoplasias
- Cirugía sistémica en los últimos tres meses
- Uso crónico (más de 15 días) de cualquier producto antimicrobiano tópico (p.e. colutorios, geles)
- Historia de tratamiento periodontal previo
- Historia conocida de adicción al alcohol o drogas
- Embarazadas o en periodo de lactancia

Todos los pacientes seleccionados no habían tomado antibióticos, fármacos antiinflamatorios esteroideos, o antiinflamatorios no esteroideos en un ciclo de dos o más días, y tampoco, inmunoestimulantes, inmunosupresores o antimetabólicos en las seis semanas anteriores a la inclusión. No estaban en

tratamiento con ningún producto tópico (colutorios, gel,...), ni con en tratamiento con productos experimentales en los últimos tres meses.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Ministerio de Salud brasileño: *parecer no. 1006/2005 CONEP – comissão nacional de Ética em pesquisa* (Anexo I)

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para participar del estudio después de una explicación verbal y escrita de la naturaleza y métodos de la investigación presente (Anexo II).

12.2.1. Visita de estudio

Cada paciente fue asignado a una cita de un mínimo de una hora de duración en la consulta privada y se asignó un código para cada paciente.

Los pacientes fueron instruidos en seguir su higiene oral habitual y no se les dio ninguna instrucción de técnica de cepillado adicional previa al estudio.

En la ficha de datos de los pacientes (anexo V) se apuntó el nombre, dirección, número de teléfono para contacto, edad, fecha de nacimiento, nacionalidad, origen, profesión, sexo y principal queja.

La anamnesis médica consistió en preguntas dicotómicas sobre su situación médica: si estaba en tratamiento médico, si tenía alguna infección,

transplante de órganos, diabetes, cardiopatías, tensión alta, hepatitis, desórdenes hormonales, y si era fumador. Además preguntamos, con contestaciones sí o no, si usaba medicación como antibióticos, aspirinas, medicación para reumatismo o artritis, anticoagulantes, corticoides u otros que no habían sido mencionados.

En la anamnesis odontológica, con respuestas dicotómicas se evaluó si se hizo tratamiento periodontal previo, y si ya tuvo algún episodio de dolor o absceso en las encías.

Después, con contestaciones simples, se investigó sobre la higiene oral, como la frecuencia, ocasiones en que se cepillaba, tipo de cepillo dental utilizado, tipo de cerdas del cepillo, si usaba colutorios, el método de cepillado, si usaba hilo dental o medios auxiliares para limpiar entre los dientes y, por último, si el paciente había sufrido heridas u otros problemas como consecuencia del cepillado.

La evaluación para determinar la selección de los pacientes se basó en sondaje de todos los dientes, en seis localizaciones por diente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual y distolingual), excluidos los terceros molares, con una sonda milimetrada PQW Willians (Hu-Friedy, Chicago, EE.UU.).

Toda la cita de evaluación la realizó una única examinadora entrenada, con la ayuda de una auxiliar de consulta, que registró todos los datos en la ficha de estudio, además de ayudar en la colocación de las muestras en el vial y en taparlo rápidamente.

12.3. Variables respuesta: clínicas

Los parámetros clínicos fueron registrados en la ficha de estudio por la auxiliar de la consulta en cada cita, incluyendo:

12.3.1. Índice de Sangrado Gingival – ISG, el sangrado al sondaje se evaluó como presente (1) o ausente (0). Se sondaron todos los dientes en seis puntos por diente, y se evaluó el sangrado dentro de 30 segundos después del sondaje; según lo descrito por Ainamo & Bay (1975).

12.3.2. Se evaluó el índice de placa – IP, mediante la observación del acúmulo de placa bacteriana, con sonda, en cuatro localizaciones por diente (mesial, vestibular, distal y lingual) de toda la boca y registrando los hallazgos de acuerdo con el sistema dicotómico (presente u ausente) de Silness y Løe (1964).

12.3.3. Profundidad de sondaje- PS de la bolsa periodontal, fue evaluada mediante sondaje manual usando la sonda milimetrada PQW Willians (Hufriedy, Chicago, EE.UU.), desde la base de la bolsa hasta la margen gingival, en seis localizaciones por diente en todos los dientes.

12.3.4. Con el mismo instrumento se midió el nivel de inserción clínica - NIC, desde la unión cemento-esmalte hasta la base de la bolsa, en seis localizaciones por diente de todos los dientes, siendo anotado en el periodontograma.

12.3.5. Además, se registró el índice de supuración - IS y se evaluó como presente o ausente (0 o 1) en dos sitios por diente (vestibular o lingual).

Cuando se consideró necesario, se hicieron radiografías de aletas de mordida, para evaluar defectos verticales y la pérdida ósea en las localizaciones seleccionadas.

Los parámetros de evaluación se obtuvieron en todos los dientes. Sin embargo, para el análisis estadístico se emplearon solamente PS y NIC de los cuatro dientes en donde se tomaron las muestras microbiológicas. Los demás índices fueron analizados estadísticamente en toda la boca.

12.4. Variables respuesta: microbiológicas

12.4.1. Muestras microbiológicas

Se seleccionaron cuatro localizaciones por paciente, preferiblemente uno en cada cuadrante de la dentición, basado en hallazgos periodontales clínicos y cuando fue necesario, radiográficos. Las localizaciones seleccionadas tenían la mayor profundidad de sondaje del cuadrante (Mombelli et al. 1991a) y sangrado al sondaje (Mombelli et al. 1991b, Lang et al. 1990). Entre las localizaciones con hallazgos clínicos parecidos, se elegían las linguo-palatinas. En todas las muestras se tuvo el cuidado de evitar la saliva y la contaminación por placa supragingival, usando para ello aislamiento con rollos de algodón, secado con jeringa de aire y, cuando era necesario, eliminación de la placa supragingival con una bolita de algodón seco.

Después de aisladas las localizaciones seleccionadas, se introdujo una punta de papel estéril (tamaño medio, Maillefer, Ballaigues, Suiza), hasta el fondo de la bolsa. Se mantuvo en el sitio durante 10 segundos, y se llevó esta punta de papel colocando a un vial con 1.5 mL de RTF (*reduced transport fluid*, líquido reducido de transporte) (Syed & Loesche. 1972), Se insertó, de manera consecutiva, otra punta de papel estéril en el mismo sitio y se mantuvo allí por otros 10 segundos, siendo después transferida al mismo vial. El mismo procedimiento se repitió para las cuatro localizaciones seleccionadas, agrupando las ocho puntas de papel en el mismo vial

(muestras agrupadas). Se tuvo el cuidado de solamente abrir el vial para introducir las puntas de papel y cerrar con la tapa lo más rápido posible.

Las muestras microbiológicas del biofilm subgingival de cada paciente, identificado en su vial con número arábigos por una auxiliar, fueron enviadas al laboratorio Biolabor, en la ciudad de São Paulo (capital de la provincia) donde fueron procesadas dentro de las siguientes 24 horas, Mientras no fueron procesadas quedaron bajo refrigeración entre 5-10°C. en nevera. El laboratorio no tuvo acceso a los pacientes o a sus registros.

12.4.2. Procesado de las muestras en el laboratorio

Las puntas de papel transferidas al vial con RTF fueron transportadas al laboratorio, donde las muestras se dispersaron (30 segundos de Vortex), se diluyeron de manera seriada y se inocularon en tres medios diferentes:

- a) Medio de agar sangre (numero 2 de Oxoid; Ltd. de Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), con sangre de caballo al 5%, y con hemina (5 mg/l) y menadiona (1 mg/l);
- b) medio de bacitracina-vancomicina con suero y tripticasa soja (TSBV) (Slots, 1982);
- c) en placa Denta-1 (Alsina et al. 2001) para aislamiento selectivo de *A. actinomycetemcomitans*.

Las placas de agar sangre se estudiaron después de 7 y 14 días de incubación anaerobia (80% N₂; 10% H₂; 10% CO₂ a 37°C); y las placas de

TSBV/Dentaid-1 después de 3-5 días de incubación en 37°C en aire con el 5% CO₂.

Los recuentos microbianos totales se evaluaron en las placas de agar sangre, examinadas con lupa estereoscópica (lamda LET 2, ATTO instruments CO, Hong Kong) con tres aumentos. Las colonias fueron diferenciadas de acuerdo con sus características microscópicas en las placas, observándose tamaño, color, forma, textura, elevación, opacidad y hemólisis. Para la identificación estandarizada se empleó el RapID ANAII System (Innovative Diagnostic System Inc., Atlanta, GA, EE.UU.).

En estas placas, se identificaron *P. gingivalis*, *P. intermedia/nigrescens*, *T. forsythia*, *P. micra*, *C. rectus*, y *F. nucleatum*. Se contó el número de colonias de cada patógeno y se calculó el porcentaje sobre la flora total.

A. actinomycetemcomitans se identificó en las placas de TSBV/Dentaid-1, basándose en la morfología de los microorganismos de la colonia y la reacción positiva de la catalasa y en un kit de enzimas específicas.

Adicionalmente, todas las colonias que crecieron en el medio Dentaid-1, y se sospechó que fueran bacterias entéricas, fueron aisladas, y transferidas a una placa de Agar McConkey. El medio Dentaid-1, como el TSBV, tiene una

excelente cobertura para las especies *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. Las bacterias sospechosas no orales, gram-negativas, anaerobias facultativas (Slots et al. 1990) fueron subcultivadas en Agar McConkey, purificadas y clasificadas usando Sistemas de Kits de identificación comercial (API 20 E - Baxter Healthcare, West Sacramento, CA, EE.UU.). Los paneles e inoculaciones bacterianas se prepararon según las recomendaciones del fabricante. Se incubaron de 18 a 24 horas a 35°C en un incubador con CO₂. La especificidad bacteriana se basó en 34 tests de reacciones taxonómicas, realizadas usando el software aportado por el fabricante.

Las colonias identificadas como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, o *T. forsythia*, y las bacterias entéricas fueron aisladas, y subcultivadas hasta cultivo puro, y preservadas para posterior análisis.

El sistema *Protect-Bacteria Preservers* (STC Technical Service Consultants LTD, Heywood Lancashire, Reino Unido) se empleó para preservar estas cepas, con las colonias tomadas de cultivos frescos (18-24 horas), colocados en viales y agitadas. El líquido fue tomado del vial, y preservado por medio de refrigeración a -70 °C.

12.5. Susceptibilidad antimicrobiana para microorganismos periodontales: E-test – técnica Epsilometer (anexo III)

Las cepas aisladas de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia/nigrescens*, *P. micra*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, bacilos entéricos, *Capnocytophaga* sp., *Candida* sp., *Pseudomonas* sp., y *Streptococcus* β -*hemolyticus* fueron evaluadas en cuanto a susceptibilidad o resistencia frente a los siguientes agentes antimicrobianos: penicilina, amoxicilina, amoxicilina con clavulanato, metronidazol, tetraciclina, ciprofloxacino, clidamicina y azitromicina.

La técnica usada para determinar susceptibilidad antimicrobiana fue la técnica Epsilometer (E-test).

El sistema E-test (AB BIODISK, Solna, Suecia) consiste en una tira plástica de 50 mm de largo y 3 mm de ancho, que contiene en un lado un gradiente de concentración del antimicrobiano elegido y en el otro lado una escala numérica que indica la concentración del fármaco. La tira de E-test puede detectar un rango de concentración del fármaco de 0.016 a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con un total de 29 diferentes concentraciones agrupadas de dos en dos, representando 15 niveles de dilución (Bolmström 1993).

12.5.1. Preparación de la suspensión bacteriana

Con una punta de algodón emulsificada se tomó un número apropiado de colonias aisladas en subcultivos con tres a siete días de crecimiento,

obtenidas por los procedimientos descritos arriba, y se transfirieron a una suspensión PBS (*phosphate buffer saline*, tampón salino con fosfato) para lograr una densidad padrón para anaerobios de McFarland 0.5 ($\sim 10^8$ UFC (unidades formadoras de colonia)/mL de bacterias). Se eliminó el exceso de fluido presionando la punta de algodón contra la pared lateral del tubo de test universal.

12.5.2. Inoculación

Se centrifugó la suspensión 10 segundos. Se colocó una torunda de algodón estéril, no-tóxica, dentro de la suspensión bacteriana. Luego se aplicó la torunda sobre una placa Petri con superficie de Agar, rodando la placa aproximadamente 90 grados cada vez a fin de asegurar una distribución uniforme para la inoculación. Se usó una nueva torunda de algodón para cada placa. Las placas Petri estandarizadas tienen 140 mm de diámetro y 7 mm de profundidad con agar sangre suplementado con 5% de sangre de caballo, 1% hemina y 1% menadiona como medio de crecimiento. Se inocularon cuatro placas para cada cultivo, etiquetados como I, II, III y IV.

La cepa de referencia usada para la inoculación fue *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), para confirmar el funcionamiento del E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) con respecto al correcto manejo del sistema y la calidad y consistencia del test de susceptibilidad con los materiales y métodos usados (control de calidad).

12.5.3. Aplicación del E-test

El test de susceptibilidad se realizó colocando las tiras de E-test en la superficie de las placas de agar inoculadas (Citron et al. 1991). Se permitió primero que el exceso de líquido tras la inoculación fuera absorbida durante 10 a 15 minutos. Cuando la superficie estuvo completamente seca, se aplicó la tira de E-test. Después de abrir los embalajes del E-test, las tiras de E-test para cada uno de los ocho antibióticos testados fueron colocadas en una placa estéril, para facilitar la manipulación. Usando un par de pinzas, se aplicaron dos tiras de E-test, paralelas la una a la otra, en la superficie de Agar inoculada, comprobando que el lado de la tira con la escala MIC estuviese mirando hacia arriba y las dos puntas de las tiras próximas al borde de la placa. Las concentraciones máximas fueran colocadas en lados opuestos la una de la otra (siguiendo las instrucciones del E-test). Se comprobó que la extensión total de la tira estuviese en contacto completo con la superficie de Agar. Una vez aplicada, la tira no se podía mover.

Se colocaron dos tiras en cada una de las cuatro placas inoculadas como se describe, para evitar cualquiera efecto sinérgico entre los ocho antibióticos testados:

Placa I: Penicilina (PG)

Clindamicina (CM)

Placa II: Tetraciclina (TC)

Ciprofloxacino (CI)

Placa III: Metronidazol (MZ)

Amoxicilina con clavulanato (XL)

Placa IV: Amoxicilina (AC)

Azitromicina (AZ)

Durante la manipulación, las placas estériles con las tiras de E-test fueron mantenidos en refrigeración a -20°C .

12.5.4. Incubación

La incubación fue realizada inmediatamente después de la colocación de las tiras de E-test en la placa, según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Las placas inoculadas con E-test fueron incubadas al 37°C en atmósfera de anaerobiosis (80-85% N_2 , 5-10% CO_2 , 10% H_2), durante cuatro días.

12.5.5. Interpretación de los resultados

Se hizo de acuerdo con las directrices para interpretación de resultados del E-test.

Después del período requerido para la incubación, el crecimiento bacteriano debe distinguirse claramente y se ve también una elipse de inhibición alrededor de la tira. Entonces se leyó el valor de la concentración inhibitoria

mínima (MIC) en el punto de intersección entre el límite de la elipse de inhibición y la tira del E-test, es decir, donde la escala numérica indica la concentración del fármaco será la menor concentración del fármaco (del antibiótico) que no se ha observado el crecimiento bacteriano (ver imágenes en el Anexo III).

De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, la interpretación de los valores MIC del E-test en diferentes categorías de susceptibilidad fue realizada según el guía de interpretación de CLSI (M100 S12), y *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) se utilizó como cepa de referencia para los tests de susceptibilidad.

Los resultados de cada cepa y cada antibiótico fueron expresados en µg/ml. Los resultados cualitativos fueron obtenidos comparando cada cepa con un *breakpoint* (umbral) predefinido (ver cuadro siguiente).

Cuando el valor estuvo por debajo del *breakpoint*, la cepa fue definida como susceptible, y la infección causada por cepas de bacterias susceptibles puede ser previsiblemente resuelta por la droga en cuestión; y la cepa fue considerada resistente si el valor era igual o más alto en la escala de lectura del *breakpoint*, lo que significa que las infecciones causadas por cepas resistentes no pueden ser controladas con el antibiótico testado (Baker et al. 1985).

En la tabla siguiente, se muestra el *breakpoint* o umbral definido de susceptibilidad para cada uno de los antimicrobianos según el guía de interpretación del CLSI - M100 S12 para *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)

Agente antimicrobiano	susceptibilidad	resistencia
Amoxicilina	≤ 8 µg/mL	≥16 µg/mL
Amoxicilina + clavulanato	≤ 8 µg/mL	≥16 µg/mL
Azitromicina	≤ 4 µg/mL	≥16 µg/mL
Tetraciclina	≤ 4 µg/mL	≥16 µg/mL
Penicilina	≤ 0.5 µg/mL	≥4 µg/mL
Ciprofloxacino	≤ 0.5 µg/mL	≥4 µg/mL
Clindamicina	≤ 0.5 µg/mL	≥4 µg/mL
Metronidazol	≤8 µg/mL	

Cuando el crecimiento aparece a lo largo de la cinta entera, sin haber ninguna elipse de inhibición, el MIC se registra como mayor que (>) el valor más alto en la escala de lectura. Cuando la elipse de inhibición estuvo por debajo del límite de la tira, esto es, cuando el límite de la zona no corta con la tira, el MIC se registró como menor que (<) el valor más bajo de la escala de lectura. Si el valor de MIC en el E-test se encontraba entre dos valores, se redondeó hacia arriba, lo más cerca de la segunda dilución más alta antes de la categorización. Siempre se evaluó el punto de inhibición completa de todo el crecimiento, incluyendo colonias aisladas o difusas. En

los casos de puntos difusos y especialmente con fusobacterias, la placa se evaluó inclinada y/o con el uso de una lente de aumento para examinarla.

El porcentaje de cepas resistentes y cepas sensibles fue calculado para cada patógeno y antimicrobiano con relación al total de las cepas aisladas.

Las concentraciones en las que 50% de las cepas y 90% de las cepas fueron sensibles o susceptibles son definidas como MIC 50 o MIC 90, respectivamente. Siendo así que MIC 50 es la concentración mínima inhibitoria que incluye 50% de las cepas, y MIC 90, el 90% de las cepas.

12.6. Análisis de los datos

Los resultados fueron tabulados con ayuda del software Excel (Microsoft office 2007 – Microsoft EE.UU.), como se observa en el Anexo IV, cada tabla en una hoja en separado.

Las variables demográficas como edad, sexo, fueron obtenidas en la cita de anamnesis. La edad fue registrada en el día de la recogida de muestras del biofilm subgingival, en años completos.

Las medias de estas variables fueron obtenidas sumándose todos los valores y dividiendo por la n de la investigación (o sea 30). La desviación estándar fue usada para medir el grado de dispersión de los valores en relación al valor medio de las variables estudiadas y ha sido obtenido de la raíz cuadrada de la sumatoria de las medias de los valores al cuadrado,

dividido por el $n - 1$. La variable máxima es el valor más alto de todos los valores de una variable, y la mínima es el valor más bajo.

La Tabla 1 describe las características demográficas de la población seleccionada para el estudio. En la columna de la izquierda vemos la n , que es el número de sujetos de la investigación, la edad en años completados y el sexo de los sujetos. La columna de la derecha está la media de edad, desviación estándar, la edad máxima y la mínima de los pacientes. Después la cantidad de mujeres y hombres de la investigación y sus porcentajes.

La Tabla 2 muestra los datos clínicos de los pacientes muestreados. En la primera línea están: la edad en años completados en el día de la muestra, el número de dientes presentes excluyendo las muelas del juicio, IP es el índice de placa, IS el índice de supuración, PS profundidad de sondaje, NIC nivel de inserción clínico y SS sangrado al sondaje.

IP fue evaluado mediante la visualización del acúmulo de placa bacteriana detectado con la punta de la sonda, en cuatro localizaciones por diente (mesial, vestibular, distal y lingual) de toda la boca y registrado por el sistema dicotómico (presente o ausente); todos las localizaciones positivas fueron sumadas y divididas por el número de localizaciones presentes en el paciente.

El índice de supuración también se evaluó como presente o ausente en dos localizaciones por diente (vestibular o lingual). Se sumaron las localizaciones positivas y se dividieron por el número de localizaciones evaluadas.

La profundidad de la bolsa periodontal, fue evaluada mediante sondaje manual desde la base de la bolsa hasta la margen gingival, en la localización de los dientes donde fueron obtenidas las muestras. Se sumaron los resultados de los cuatro sitios muestreados y se dividió por cuatro para obtener la media de la profundidad de sondaje.

Para la profundidad de sondaje y el nivel de inserción clínico se emplearon solamente los cuatro dientes en donde se tomaron las muestras microbiológicas. Los demás índices fueron analizados estadísticamente en toda la boca.

Con la sonda manual se midió el nivel de inserción clínica - NIC, desde la unión cemento-esmalte hasta la base de la bolsa, en las localizaciones de los cuatro dientes donde se obtuvieron muestras microbiológicas, después se sumaron todos los resultados y se calculó el promedio.

Índice de sangrado al sondaje también fue evaluado como presente (1) o ausente (0), obtenido en seis puntos de todos los dientes: todos los puntos que presentaron sangrado fueron sumados y divididos por el número de localizaciones evaluadas.

En la Tabla 3 se presentan los datos clínicos de la población de la muestra, con la media, desviación estándar, el número máximo y el número mínimo de las siguientes variables: 1. cantidad de dientes presentes en los sujetos de la población, 2. profundidad de sondaje de los sitios muestreados, 3. nivel de inserción clínico de cada sitio muestreado, 4. índice de sangrado, 5. índice de supuración y 6. índice de placa.

Las variables microbiológicas se transformaron en logaritmos con base específica 10, para reducir el tamaño de los dígitos y aproximarse a una distribución normal, y son presentadas a partir de la Tabla 4.

La Tabla 4 presenta el total de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada sujeto de la investigación. En la primera columna de la izquierda está la codificación del paciente, la segunda columna a la izquierda la edad en años completados, después el UFC total, donde colocamos los números del total de las UFC en logaritmos. UFC se presenta en número total (variable UFC total), es decir, el número de todas las unidades formadoras de colonias que fueron vistas en las placas Petri. Y la última columna el porcentaje de UFC de periodonto-patógenos: calculado dividiendo los UFC de los periodonto-patógenos de cada sujeto entre los UFC totales.

Las Tablas 5 y 6 describen la relación entre los sujetos de la investigación, con su respectivo código en la columna de la izquierda. En la segunda columna está el sexo del paciente, en la tercera la edad, en la cuarta el total

de UFC, y en las siguientes la UFC de cada periodonto patógeno: 1. *A. actinomycetemcomitans*, 2. *P. gingivalis*, 3. *P. intermedia*, 4. *T. forsythia* y, por ultimo, 5. *P. micra*. En la Tabla 6 se presenta la continuación de la Tabla 5, pero con los siguientes patógenos: 1. *F. nucleatum*, 2. *C. rectus*, 3. *Streptococcus* β -hemolíticos, 4. *Candida* sp., 5. *Capnocytophaga* sp., 6. bacilos entéricos y 7. *Pseudomonas* sp.

El numeral presentado, por ejemplo, 1,00E+06 corresponde a 1.00×10^6 (uno elevado a logaritmo de 10 a la potencia de 6) o 1.000.000

La Tabla 7 refiere la frecuencia de detección de los periodonto-patógenos estudiados sobre el total de las muestras, o sea, el porcentaje de pacientes que albergan un determinado patógeno con relación al total de los microorganismos viables. Este porcentaje ha sido determinado tomando la cantidad de pacientes positivos para una determinada bacteria y dividiéndolo por el total de sujetos de la muestra (n=30). En la columna de la izquierda se presenta cada periodonto patógeno y en la columna de la derecha están los porcentajes de cada uno dentro de la muestra total.

En la Tabla 8 está la proporción de cada microorganismo estudiado. El cálculo ha sido tomado del total de microorganismos observados en logaritmo en cada muestra y dividido por la cantidad de muestras positivas

para dicho patógeno, o sea una media con relación al total de las muestras positivas.

En las Tablas 9 y 10 observamos los resultados del E-test con las cepas periodonto-patógenas descritas en la columna del lado izquierdo de las tablas.

En la Tabla 9, en la columna de los patógenos, está su rango, el MIC 50 y MIC 90. Las drogas están en la línea superior de la tabla: por sus siglas PG - penicilina, AC - Amoxicilina, XL - amoxicilina con clavulanato, TC - tetraciclina, CM - clidamicina, CL - ciprofloxacino, MZ - metronidazol y AZ - azitromicina.

Para representar el rango de susceptibilidad de los antibióticos, se tomó el mayor y menor número de todas las placas; estos números fueron determinados por la observación de la elipse que se forma alrededor de la tira del E-test (Anexo III). La tira está marcada cada 1.5 mm, aproximadamente, con un numeral correspondiente a la concentración del fármaco en la cita. MIC 50 es la concentración mínima inhibitoria que incluye 50% de las cepas, que fue determinado por la media obtenida de todas las MIC 50, y lo mismo pasó con la MIC 90 que corresponde al 90% de las cepas. Dichos resultados de los valores MIC 50 y MIC 90 han sido obtenidos de la mediana y percentil de las MIC de todas las cepas conforme los valores de *breakpoint* para cada droga, descrito por NCCLS en 2003.

La Tabla 10, también se refiere a los resultados del E-test, pero con respecto al número (n) de cepas susceptibles al antibiótico, o sea, que el antibiótico tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del microorganismo; y el porcentaje de cepas resistentes al antibióticos, que no provocaron la elipse de inhibición en torno de la cita del E-test, o si hubo inhibición, ocurrió en una concentración que no se puede administrar al paciente.

La línea superior están los antibióticos por su sigla PG - penicilina, CM - clidamicina, TC - tetraciclina, CL - ciprofloxacino, MZ – metronidazol, XL - amoxicilina con clavulanato, AC - Amoxicilina y AZ - azitromicina.

En la columna de la izquierda tenemos el nombre del patógeno periodontal, el número (n) de placas donde ocurrió la inhibición de crecimiento bacteriano, y que son consideradas cepas susceptibles al antibiótico, la n (número) de placas con dicho microorganismo en total y el porcentaje de placas con cepas resistentes al antibiótico.

Observamos los resultados cualitativos comparándose cada cepa con los umbrales MIC definidos o *breakpoints*. Cuando el valor fue inferior al del límite, la cepa fue considerada susceptible, y se consideró la cepa resistente si el MIC obtenido fue igual o superior al umbral.

El porcentaje de cepas resistentes fue calculado para cada uno de los 11 patógenos frente a cada droga.

La Tabla 11 refiere los datos demográficos de los resultados de la investigación de Herrera et al. (2008 b) y los datos de la investigación

presente. La línea superior están los países involucrados en estas dos investigaciones: Chile, Colombia, España y Brasil. En la columna de la izquierda están la edad con su media, desviación estándar, el valor máximo y el valor mínimo. Luego el sexo, el número total de mujeres, el número total de hombres y abajo el porcentaje de mujeres y hombres, y el número de pacientes no fumadores, los fumadores habituales (que usan tabaco al menos de 5 veces por día) y el número de pacientes fumadores con el porcentaje de no fumadores y fumadores.

La Tabla 12 compara los datos clínicos de los pacientes evaluados de Chile, Colombia, España y Brasil. En la línea superior están los países evaluados. La columna de la izquierda está PS con la media, DE, la profundidad máxima y la mínima de cada país. Los datos de Chile, Colombia y España fueron compilados del estudio de Herrera et al. 2008 b, la media de Brasil se obtuvo de los resultados de la profundidad de sondaje de todos los sitios muestreados (cuatro por paciente) y divididos por el total de sitios muestreados ($n=30 \times 4$ sitios muestreados = 120 sitios). La desviación estándar fue calculada con la siguiente formula:

$$\sqrt{\frac{\sum (X-\bar{X})^2}{(n-1)}}$$

—

Donde \bar{X} es la media de la muestra, $\sum X$ es la sumatoria de todas las medias, n es el tamaño de la muestra. La desviación estándar es una medida del grado de dispersión de los valores con respecto al valor medio (media).

También se registró el valor máximo y el mínimo de las profundidades de sondaje obtenidos de todos los sitios muestreados. Se hicieron los mismos cálculos para cada variable clínica: NIC para los sitios muestreados, SS de todos los dientes y IP de todos los dientes, como en la Tabla 3.

La Tabla 13 compara el logaritmo del total de UFC por mililitro encontradas en las muestras de los países Chile, Colombia, España, compilados de Herrera et al. 2008 b, con los datos obtenidos en este estudio.

Se calculó la media del logaritmo UFC total, o sea, del total de unidades formadoras de colonias obtenidos de las 30 muestras brasileñas y dividido por n ($n=30$). En la media fue utilizada la fórmula descrita en la Tabla 12 y luego el logaritmo máximo encontrado y el mínimo.

En la Tabla 14 están representados los porcentajes de las frecuencias detectadas de las especies bacterianas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium sp.*, *P. micra*, *E. corrodens* y bacilos entéricos de Chile, Colombia, España y Brasil. En la columna de la izquierda están denominados los patógenos, en la línea superior los países. Los datos de Chile, Colombia y España han sido

compilados de Herrera et al. (2008 b), mientras que los datos de Brasil han sido tomados de la Tabla 7.

La Tabla 15 compara las proporciones, en porcentaje de periodontopatógenos, en muestras de sitios positivos para los siguientes microorganismos: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium sp.*, *P. micra*, *E. corrodens* y bacilos entéricos de Chile, Colombia, España y Brasil. En la columna de la izquierda están denominados los patógenos, en la línea superior los países. Los datos de Chile, Colombia y España han sido compilados de Herrera et al. (2008 b), mientras que los datos de Brasil han sido tomadas de la Tabla 8.

Tabla 16 y 17, tratan de comparar este trabajo con el estudio de van Winkelhoff et al. (2005), en relación a los resultados de susceptibilidad y resistencia de los patógenos *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micra*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* entre tres países: Holanda, España y Brasil. Los datos de Brasil han sido tomados de la Tabla 10. En línea superior de la Tabla 16 están los antimicrobianos PG - penicilina, CM - clidamicina, TC - tetraciclina, y CL - Ciprofloxacino; mientras que en la línea superior de la Tabla 17 están los antimicrobianos restantes: MZ - metronidazol, XL - amoxicilina con clavulanato, AC - amoxicilina y AZ -

azitromicina. En las dos tablas, en la columna de la izquierda están los patógenos discriminados con la n susceptible, o sea el número de cepas susceptibles, la n total que corresponde al total de placas obtenidas en los estudios, y el porcentaje de cepas resistentes con la sigla % resistentes.

13. Resultados

13.1. Datos demográficos de la muestra

Se evaluaron 57 pacientes consecutivos en la consulta de la investigadora SMPC en la ciudad de Campinas, provincia de São Paulo, en Brasil, con una media de 60 minutos por cita para cada paciente.

Cada sujeto leyó la hoja de información y firmó la hoja del consentimiento informado (modelo en el Anexo III), luego pasó por una anamnesis (modelo en el Anexo V) donde tuvieron que describir sus síntomas en las encías o en la boca, cuando fue la última cita que tuvieron en el dentista, si ya se habían hecho algún raspado periodontal, si estaban tomando alguna medicación y para qué, y si tenían alguna enfermedad crónica.

Los pacientes fueron entonces discriminados de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión como se ha descrito en la sección de Material y Métodos. Finalmente, se incluyeron 30 pacientes con periodontitis severa o moderada: 17 mujeres (56,66%) y 13 hombres (43,33%) con una media de edad de 47,1 y rango de 33 a 86 años, sin tratamiento previo para periodontitis. Todos los pacientes eran no fumadores.

13.2. Características clínicas de la muestra

La mayoría de los sujetos (63,33%) se quejaron de sangrado de la encía al cepillarse, o incluso espontáneamente; 46,66% refirieron síntomas de halitosis, 20% de dolor en las encías, 3 pacientes reconocieron no sentir ningún problema, y 10% se quejaron de movilidad en uno o más dientes, mal gusto o sensibilidad en la boca.

17 pacientes (56,66%) habían tenido uno o más episodios de abscesos previamente al estudio, pero no buscaron tratamiento.

Todos dijeron cepillarse al menos una vez al día con un promedio de 3 veces al día y un rango de 1 a 10 veces. 16 pacientes se cepillaban con el método de Bass, o Bass Modificado, los demás usaban por igual los métodos de Fone's o de Charter's. El 80% usaba hilo dental por lo menos una vez a la semana. El 33,33% reflejó algún tipo de trauma en las encías por cepillarse demasiado en uno o más dientes.

En el examen intrabucal la media de dientes presentes era de 24,1 con un rango de 14 a 28 dientes, con la exclusión de las muelas del juicio.

Como se ha descrito previamente en la sección de Material y Métodos, se evaluaron 5 índices periodontales: (1) índice de placa (*IP*), (2) índice de supuración (*IS*), (3) profundidad de sondaje (*PS*), (4) nivel de inserción clínica (*NIC*) y (5) índice de sangrado gingival (*ISG*). En la Tabla 2 están

descritos cada paciente con el número asignado, sexo y edad, y los índices periodontales evaluados en este estudio.

En la Tabla 3 están los índices periodontales en su media, desviación estandar, mínimo y máximo.

Para IP se observó un promedio de 71,30% de placa, con variación de 29 a 100%, y una desviación estándar de 24,72.

IS osciló entre 0 y 35,41% con un promedio de 6,94%.

ISG tuvo un rango de 31,25 y 100%, con promedio de 72,84% y desviación estándar de 20,38.

PS tuvo un rango de 5,5 a 9 mm por localización (media de 6,72 mm y desviación estándar de 0,85).

NIC ha quedado entre 5,75 mm a 11,5 mm con una media de 7,7 mm y desviación estándar de 1,38.

De un modo general, todos los valores son mayores en los sujetos del sexo masculino que en los del sexo femenino, exceptuando ISG, que ha sido significativamente mayor en las mujeres ($p > 0,05$).

13.3. Recuentos bacterianos totales (tablas 4, 5 y 6)

Dentro las 30 muestras tomadas, 3 (tres) no presentaron crecimiento de los periodonto-patógenos estudiados, aunque los pacientes presentaban signos

clínicos de periodontitis crónica y gran cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias anaerobias totales. Estos pacientes estaban distribuidos al azar en el muestreo, y sus muestras fueran procesadas como las demás.

El total de recuentos bacterianos fue expresos en logaritmo (log) de UFC por ml.

En la Tabla 4 están los recuentos bacterianos totales en UFC y el porcentaje de periodontopatógenos dentro de cada recuento. La media obtenida de los log de UFC de todos los pacientes fue de $1,54 \times 10^7$ o sea aproximadamente de 15.400.000 de bacterias por ml. Con desviación estándar de $1,94 \times 10^7$ con log mínimo de $1,0 \times 10^5$ y máxima de $9,0 \times 10^7$. El porcentaje de patógenos putativos periodontales tuvo una media de 18,40% con desviación estándar de 0,099, el porcentaje mínimo en el estudio fue de 0%, pues 3 pacientes no presentaron los patógenos investigados, mientras que el valor máximo de microorganismos patogénicos en porcentaje fue de 34,50%.

En las Tablas 5 y 6 están recuentos de los patógenos investigados de todos los pacientes.

13.4. Frecuencia de detección de diferentes especies bacterianas (Tabla 7)

Se detectó *A. actinomycetemcomitans* en cuatro pacientes (frecuencia de 13,33%), en pacientes entre 41 a 60 años. *P. gingivalis* fue detectado en 26,66% de los pacientes, más prevalente en hombres que mujeres (5 hombres y 3 mujeres). *P. intermedia/nigrescens* y *F. nucleatum* fueron detectados en 66,66% de los pacientes, y fueron los patógenos más prevalentes en los pacientes brasileños, *P. intermedia* ha sido más prevalente en mujeres que en hombres: trece mujeres y siete hombres. *P. micra* apareció en 46,60 % de los sujetos. *C. rectus* con un 33,30%, *Capnocytophaga* sp. con un 23,30%, *T. forsythia* con 20,00%, los bacilos entéricos también fueron encontrados en 20,00% de los pacientes. 13,30% pacientes presentaron *Candida* sp. *Streptococcus* β -hemolíticos se identificó en el 10% y *Pseudomonas* sp. en el 6,66%. *E. corrodens* no fue detectado en ninguna muestra de placa subgingival de pacientes brasileños.

13.5. Proporción de muestras positivas de diferentes especies bacterianas (Tabla 8)

Dentro de las muestras positivas *A. actinomycetemcomitans* se encontró en número muy bajo en todo el grupo, con un 0,01%. Dentro de la flora positiva, la proporción más alta de los patógenos encontrados en las muestras ha sido de *S. β hemoliticus*, representando un 8,53%, pero este patógeno ha

sido encontrado en solo 3 pacientes. *P. micra* representó un 6,83%, los patógenos más frecuentes en las muestras *P. intermedia* y *F. nucleatum* fueron encontrados con las proporciones de 5,87% y 5,57% respectivamente. *Capnocytophaga sp.* colonizaba el 4,66% de los sitios positivos, *T. forsythia* un 2,58%, y *P. gingivalis* el 2,51%. Los oportunistas *Pseudomonas sp.* representaron el 5,00% al igual que *Candida* (5,00%) y bacilos entéricos también 5,00%. En los sitios positivos, *C. rectus* fue detectado en 5,91% de los recuentos totales bacterianos. Y *E. corrodens* no ha sido encontrado en ninguna muestra, y por lo tanto, no tuvo su frecuencia detectada.

13.6. Test de Susceptibilidad antimicrobiana

Las susceptibilidades de los periodontopatógenos aislados en la investigación frente a antimicrobianos fueron evaluadas con los E-test como se ha descrito en la sección de Material y Métodos. Los antimicrobianos utilizados en esta investigación fueron: Penicilina (PG), Clindamicina (CM), Tetraciclina (TC), Ciprofloxacino (CL), Amoxicilina con clavulanato (XL), Metronidazol (MZ), Amoxicilina (AC) y Azitromicina (AZ).

13.6.1. Resultados cuantitativos (Tabla 9):

Los valores de MIC (concentración inhibitoria mínima) de referencia de la cepa *B. fragilis* estuvieron en el rango esperado.

En la Tabla 9 está un resumen de los valores de MIC 50 y MIC 90 para los periodontopatógenos aislados en el estudio, contra el grupo seleccionado de antibióticos.

Penicilina, amoxicilina, amoxicilina con clavulanato y tetraciclina no tuvieron efecto inhibitorio sobre las cepas de *Candida* sp., bacilos entéricos y *Pseudomonas* y fueron apuntadas con un “-“, así como los resultados de clindamicina para bacilos entéricos y *Pseudomonas* sp.. Azitromicina tampoco logro inhibir el crecimiento de *Pseudomonas* sp. y también quedo en la tabla con un “-“. Ciprofloxacino fue el único antimicrobiano con efecto inhibitorio sobre las cepas de *Pseudomonas* sp. y sobre los bacilos entéricos aislados. Los valores de MIC 50 y MIC 90 de *Candida* sp. han sido obtenidos de solamente una cepa susceptible, las demás cepas tuvieron los valores de MIC altos, así que no hubo rango de susceptibilidad.

Los valores de MIC 50 y MIC 90 para *P. gingivalis*, de manera general, fueron muy altos, y los dos antimicrobianos capaces de inhibir verdaderamente las cepas fueron Amoxicilina con Clavulanato y Metronidazol, que obtuvieron valores MIC bajos.

A. actinomycetemcomitans tuvo valores MIC bajos para casi todos los antimicrobianos, apareciendo solamente una cepa resistente a tetraciclina.

Los valores de MIC referentes a *F. nucleatum* fueron bajos solamente para Amoxicilina con Clavulanato, Tetraciclina y Azitromicina. Los demás antibióticos tuvieron un rango con valores de MIC muy altos.

P. micra y *Capnocytophaga* sp. tuvieron valores de MIC bajos para todos los antimicrobianos.

P. intermedia presentó escasa susceptibilidad a antimicrobianos: los valores de MIC para casi todos los antibióticos fueron altos, solo quedando bajos para Amoxicilina con Clavulanato para todas las cepas del estudio.

C. rectus tuvo valores bajos de MIC para Amoxicilina con Clavulanato, Metronidazol y Azitromicina.

13.6.2. Porcentaje de cepas resistentes (Tabla 10)

F. nucleatum fue susceptible a Tetraciclina, Amoxicilina con Clavulanato y Azitromicina. Para los demás antibióticos hubo susceptibilidad, pero no en el 100% de las cepas evaluadas.

P. intermedia solo fue completamente susceptible a Amoxicilina con Clavulanato y fue resistente a Penicilina (95% de las cepas), a Clindamicina (65%) y a Amoxicilina (60%).

P. micra fue susceptible a todos los antibióticos en un 100%.

Para *A. actinomycetemcomitans*, solamente una cepa de la muestra fue resistente a Tetraciclina, las demás fueron susceptibles a todos los antibióticos de la investigación.

P. gingivalis fue 100% resistente a Penicilina, Clindamicina y Tetraciclina, siendo solamente susceptible al Metronidazol y a Amoxicilina con Clavulanato.

Los bacilos entéricos y *Pseudomonas* sp. solo fueron susceptibles a Ciprofloxacino. Y *Candida* sp. fue resistente a todos los antibióticos.

C. rectus ha sido susceptible a Metronidazol, a Amoxicilina con clavulanato, a Amoxicilina y a Azitromicina, y para los demás antibióticos se observó una resistencia de un 10% de las cepas.

Capnocytophaga sp. fue susceptible a todos los antibióticos, solamente una cepa no fue susceptible a Penicilina.

Streptococcus β -hemolíticos fue susceptible a Metronidazol, Amoxicilina con clavulanato, Amoxicilina y Azitromicina.

En la Tabla 10 vemos el número total de cepas, el número de cepas susceptibles y el porcentaje de cepas resistentes comparando los valores de MIC con el *breakpoint* para cada cepa y antibiótico.

P. gingivalis, *Pseudomonas* sp. y *Candida* sp. mostraron una clara resistencia a los antibióticos utilizados.

14. Discusión

Los acontecimientos que ocurren durante la colonización oral por periodonto-patógenos involucran una compleja relación de factores multidisciplinarios. Entre los determinantes de la colonización se incluyen mecanismos de defensa específicos y no específicos del huésped, predisposición genética a la colonización microbiana, y factores del medio ambiente, tales como la calidad del suministro del agua, el rango de sujetos infectados dentro de la comunidad, estrés psicológico o enfermedades infecciosas (Umeda et al. 1998). Aunque la inmunología sea una línea de investigación muy prometedora, está claro que sin periodonto-patógenos no habría enfermedades periodontales.

Los estudios de prevalencia microbiana ayudan a aclarar más y más el papel de los patógenos periodontales en el inicio y la progresión de las enfermedades periodontales. Los datos de la microflora subgingival obtenidos en diversos lugares del mundo permiten, a menudo, aumentar el entendimiento de las periodontitis.

En su gran mayoría, los datos sobre la composición de la microflora subgingival han sido obtenidos de poblaciones de países industrializados, principalmente de Norteamérica, Europa y Japón. Por el contrario, hay pocos estudios de la composición de la microbiota subgingival en América Latina. Y todavía aun menos estudios haciendo comparaciones entre estos países. La literatura ha demostrado que geográficamente hay variaciones en las prevalencias y proporciones de cada periodonto-patógeno (Sanz et al. 2000, Haffajee et al. 2004, Herrera et al. 2008 b).

Los resultados de esta investigación, realizada en Brasil, se pueden comparar con los resultados de prevalencias de periodonto-patógenos obtenidos de tres países (Chile, Colombia y España) del estudio de Herrera et al. (2008 b), aunque que no haya habido calibración específica de la metodología microbiológica entre los cuatro laboratorios. Sin embargo, en este estudio se ha empleado la misma metodología de transporte, procesamiento y cultivo de los microorganismos que el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de Universidad Complutense de Madrid (España). Con esa metodología se han realizado numerosos estudios de prevalencia comparativa (Herrera et al. 2008 b, Herrera et al. 2000 a, Sanz et al. 2000, van Winkelhoff et al. 2000, van Winkelhoff et al. 2005).

La comparación no será directa y ni estadística, pero se puede considerar una comparación indirecta, debido a la similitud entre las dos investigaciones ya que los datos han sido tomados con base al mismo protocolo aprobado en los cuatro países, coordinado por los mismos investigadores principales. La comparación de los resultados de los datos demográficos y clínicos permite sugerir la comparación entre los datos microbiológicos también.

Por los mismos motivos, es pertinente comparar indirectamente, los resultados del presente estudio con Herrera et al. (2000 a), Sanz et al. (2000) y van Winkelhoff et al. (2000 y 2005).

Desde 1997, Papapanou et al. (1997) especularon que puede haber grandes diferencias entre las microbiotas subgingivales de distintas razas o poblaciones. Y que el abordaje terapéutico podría ser distinto para los sujetos de cada población. Las diferencias geográficas en la distribución de los microorganismos podrían tener un impacto en los protocolos para el tratamiento de las enfermedades periodontales (Herrera et al. 2008 b). Diferentes poblaciones también podrían comportarse desigualmente con respecto a las concentraciones antimicrobianas necesarias para inhibir de manera efectiva ciertos patógenos. De hecho, cepas de un mismo microorganismo de una determinada población pueden ser resistentes a un antimicrobiano dado por culpa de variaciones de virulencia bacteriana, o

variaciones de serotipo de la misma cepa (Zabon et al. 1983, Papapanou et al. 1997).

Los agentes antimicrobianos son usados con efectividad en el tratamiento de enfermedades periodontales infecciosas, pero su uso indiscriminado puede potenciar el desarrollo de resistencias bacterianas (Socransky & Haffajee. 2002). En Brasil tal hecho, además de la automedicación, representa un grave problema de salud pública. Tanto es así, que el Ministerio de la Salud de este país ha cambiado la venta de antimicrobianos. La resolución de la directora colegiada de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria Brasileña (ANVISA) ha sido publicada en 28 de octubre de 2010 bajo el número 44/2010. La nueva normalización obliga la presentación de la prescripción por profesional debidamente habilitado, en dos documentos para que uno sea conservado en la farmacia (RDC 44/2010 Anvisa).

14.1. Datos demográficos

No hubo diferencias en cuanto a las variables demográficas que fueron abordadas en el estudio entre los pacientes brasileños y los pacientes del estudio de Herrera et al. (2008 b), tanto de Chile, como de Colombia y España. Aunque hay que tener en cuenta que no se estudiaron otras

variables demográficas, como el estatus económico y el nivel educacional de las poblaciones. La Tabla 12 muestra los resultados comparados.

Las condiciones específicas de vida de cada país pueden influenciar en las diferencias clínicas de las periodontitis (Gjeramo et al. 2002, Sheiham & Netuveli 2002), aunque también pueden estar implicados factores genéticos de la enfermedad (Loos et al. 2005).

Las diferencias en la exposición al tabaco, respuesta del huésped, hábitos de higiene oral, acceso a los cuidados con la salud y la composición microbiológica pueden ayudar a explicar tales diferencias regionales en la expresión clínica de la periodontitis en las zonas investigadas (van der Velden et al. 2003). Pero entre la investigación de Herrera et al. (2008 b) y esta investigación, el tabaco no estuvo correlacionado con un incremento de la destrucción periodontal. De hecho, los países con mayor frecuencia de fumadores, Chile y España, no presentaban un aumento de los indicadores de enfermedad periodontal cuando eran comparados con Colombia y Brasil, que prácticamente no incluyeron pacientes fumadores en la investigación.

14.2. Datos clínicos

Las localizaciones interproximales revelaron más signos clínicos de enfermedad periodontal, como inflamación y mayor profundidad de sondaje, que los sitios vestibulares o linguales. En dichas localizaciones también

había más acúmulo de placa bacteriana, corroborando los resultados de otros estudios de prevalencia brasileños (Colombo et al. 2002, Tinoco et al. 1997). Los hombres exhibían una higiene oral peor que las mujeres, lo que está de acuerdo con los trabajos de Grossi et al. (1995). Un dato interesante es resaltar que todos los pacientes de Brasil indicaban que cepillaban los dientes al menos 3 veces al día, y la mayoría usan el hilo dental al menos 3 veces a la semana.

Los datos de los resultados clínicos se observan en la Tabla 13, con los cuatro índices periodontales utilizados en los dos estudios, de Herrera et al. (2008 b) y el presente estudio. Es relevante observar que las medias de la profundidad de sondaje son mayores en Brasil, respecto a España y Chile, pero más bajas que Colombia, el país con mayor profundidad de sondaje según los datos. Lo mismo ocurrió con el nivel de inserción clínica. Por el contrario, los niveles de sangrado de Brasil eran comparables a los de Chile, y claramente más bajos que los de Colombia y España; mientras que los niveles de placa mostraban el comportamiento contrario, similares a los de Chile, pero claramente más altos que en España y Colombia.

14.3. Datos microbiológicos

A pesar de reconocerse que el cultivo puede subestimar la cantidad de los microorganismos periodontales, especialmente si las muestras no son procesadas rápidamente, es más difícil obtener un resultado falso positivo que en metodologías que utilizan sondas de DNA o PCR (Colombo et al. 2002). Los resultados del cultivo son de células viables, o sea que están vivas y pueden reproducirse.

El análisis microbiológico reveló una microbiota subgingival compleja incluyendo la prevalencia de diferentes periodonto-patógenos, reforzando el papel de dichos microorganismos en la etiología de la periodontitis en brasileños. La frecuencia de los microorganismos encontrados ha sido similar a otras investigaciones de prevalencia en poblaciones brasileñas (Colombo et al. 2002, Tinoco et al. 1997).

Uno de los más importantes patógenos periodontales, *A. Actinomycetemcomitans*, mostró una frecuencia de detección semejante entre Brasil (13,30%) y Chile (19,40%). En el estudio de Zimmermann et al. (2003), que utilizó medio TSBV para el cultivo de *A. actinomycetemcomitans*, los investigadores evaluaron los resultados microbiológicos de 1.386 pacientes brasileños, encontrando *A. actinomycetemcomitans* en 149

pacientes, o sea, 10,8%, sin diferencias significativas entre los sexos, pero sí con relación a la edad, disminuyendo la incidencia del patógeno con el aumento de la edad. Los autores evaluaron también que, aunque la muestra sea numéricamente relevante, ha sido procesada en un laboratorio particular y obtenido de pacientes post-raspado radicular, pero sin lograr resultados clínicos satisfactorios.

Las especies del complejo rojo *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* son consideradas importantes agentes etiológicos en la patogénesis de la periodontitis (Umeda et al. 1998, Haffajee et al. 1998, Sanz et al. 2000). En el presente estudio, la prevalencia de *P. gingivalis* fue parecida a la del estudio de Kantorski et al. (2006) con una frecuencia del 17,80% en pacientes brasileños, y una mayor prevaecía en hombres que mujeres, al igual que el presente estudio. Pero, cuando se compara con la investigación de Herrera et al. (2008 b), la diferencia se acentúa, ya que *P. gingivalis* fue encontrado en 26,66% de las muestras en Brasil, mucho menos que en Chile (83,8%), Colombia (65,9%) o España (77,8%) (Herrera et al. 2008 b). La cifra del Brasil es claramente diferente a las encontradas en Kenya (70%, Dahlén et al. 1989), Rumanía (75,8%, Ali et al. 1996) así como los valores encontrados en Noruega (Ali et al. 1994), Holanda y España (Sanz et al. 2000). Papapanou et al. (1997) y Lopez et al. (2000), encontraron 100% y 96% de prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes chinos y chilenos,

respectivamente. Estos resultados pueden, en parte, ser explicados por el método de análisis de la microbiota subgingival empleado. Los estudios mencionados usaron sondas de DNA, que no necesitan de células viables y identifican bacterias con una sensibilidad más alta que el cultivo (Papapanou et al. 1997, Lopez et al. 2000, Ali et al. 1994), y puede presentar reacciones cruzadas con otros microorganismos, lo que tiende a sobreestimar las cifras (Ali et al. 1992, Papapanou et al. 1997, Lopez et al. 2000).

P. intermedia ha sido el microorganismo más prevalente de la microbiota de pacientes con periodontitis en Brasil, junto a *F. nucleatum*, y *P. micra* fue el microorganismo con la mayor proporción de flora de todos los periodonto-patógenos estudiados en Brasil. En general, las proporciones de flora eran más bajas en Brasil respecto a los microorganismos encontrados en Colombia, Chile y España. Los menos prevalentes fueron *Pseudomonas* sp. y *S. β hemolyticus*.

Con respecto a la prevalencia de periodonto-patógenos de los complejos amarillo y rojo en Brasil, los microorganismos encontrados fueron menos prevalentes que los encontrados en países desarrollados, tanto en la prevalencia como, principalmente, en la proporción de la flora bacteriana de cada muestra. Pero, la baja prevalencia no se asoció a una reducción de los indicadores clínicos de enfermedad periodontal, sino justo al contrario, los

índices periodontales de la enfermedad de pacientes brasileños fueron parecidos a los encontrados en el estudio de Herrera et al. (2008 b). La explicación para tal hecho puede pasar por varias hipótesis, desde implicaciones geográficas, étnicas y de estrés individual, por culpa de las condiciones socioeconómicas del país y de los métodos de higiene oral, hasta la más alta prevalencia de microorganismos oportunistas (Peres et al. 2007, Haffajee et al. 2004, Slots et al. 1991).

Por supuesto, la presencia de microorganismos oportunistas en pacientes con periodontitis crónica brasileños es alta, con un 40% de prevalencia y con una proporción de 5% de tales microorganismos encontrados en la microflora subgingival viable, lo que no ocurre en los países de América del Norte y Europa, y que puede afectar los resultados finales de la terapia periodontal. También se aislaron especies de enterobacterias también en el estudio de Colombo et al. (2002) que utilizó DNA-DNA checkboard: los autores especularon dos posibilidades: que dichas especies son más predominantes en pacientes que no han recibido tratamiento periodontal o puede ser simplemente una característica de la microbiota subgingival de la población. Se ha observado también que los microorganismos oportunistas fueron detectados de solo un tipo en cada una de las muestras, o sea las muestras no presentaban *Candida* sp. y bacilos entericos juntos.

El dato más interesante es que los bacilos entéricos fueron detectados en los tres países de América del Sur, pero no en España (Herrera et al. 2008 b). En el estudio de Slots et al. (1991) en la población de República Dominicana, Centroamérica, observaron un 23% de pacientes con bacilos entéricos y cuestiona si estos microorganismos están presentes en la microbiota periodontal debido a las malas condiciones del tratamiento dado al suministro del agua local. Colombo et al. (2002), especulan que dichos resultados deben ser tomados con mucha precaución, ya que su presencia puede también haber sido causada por un transporte prolongado de las muestras en medio VMGA III.

En las Tablas 14 y 15, se observa la comparación entre los resultados de la microbiota subgingival de los diferentes patógenos en diferentes poblaciones con periodontitis en localizaciones geográficas distintas. La Tabla 14 están los logaritmos del UFC total y se ve las similitudes entre Chile, Brasil y España, pero claramente más bajos que los niveles de Colombia. En la Tabla 15, se comparan los datos de prevalencia de los diferentes patógenos para cada país. La prevalencia de diferentes patógenos periodontales varía entre diferentes regiones geográficas, no solo en este estudio, sino en, por lo menos, otro estudio transversal de prevalencia microbiológica como el de Sanz et al. (2000).

En la Tabla 16 se compara el promedio, en porcentaje sobre el total de la flora, que representaba cada periodonto-patógeno presente en la flora subgingival.

No fue evaluado el serotipo de las cepas encontradas, pero parece una línea de estudio muy interesante para proyectos futuros, ya que cepas altamente leucotóxicas están asociadas a más inflamación y destrucción periodontal, sugiriendo que cepas menos leucotóxicas pueden estar presentes en sitios sin enfermedad (Colombo et al. 2002, Tinoco et al. 1997b) Así, parece que la simple presencia del microorganismo no es suficiente para causar la enfermedad o su progresión. De hecho, hay estudios que parecen sugerir que algunos patógenos precisan estar presentes en determinadas cantidades para asociarse a una pérdida de inserción previsible (Colombo et al. 2002).

14.4. Susceptibilidades frente a antimicrobianos

La gran ventaja del cultivo con relación a las técnicas moleculares (sondas de DNA, PCR) es que se puede hacer una evaluación de la eficacia de antimicrobianos sistémicos *in vitro*, lo que puede permitir elegir el fármaco más adecuado para cada sujeto. Es evidente que hay limitaciones y problemas en este tipo de enfoque, y numerosos autores discuten la eficacia

real de los tests antimicrobianos *in vitro* (Socransky & Haffajee 2002), ya que los biofilms reaccionan de manera diferente frente los agentes antimicrobianos *in vivo*. Pero el uso de antimicrobianos debería estar basado en la concentración de la droga requerida para inhibir el crecimiento de la bacteria involucrada en la enfermedad, y también en el conocimiento de si la dosis inhibitoria se alcanzaría en el sitio de la infección.

Para predecir la eficacia clínica de cada antimicrobiano, la evaluación fue efectuada para cada especie bacteriana y se seleccionaron según la guía de interpretación del CLSI: las concentraciones umbral (*breakpoints*) son, generalmente, dos o cuatro veces menores que el nivel de la droga que se obtiene en el lugar de acción, en este caso, el fluido sulcular o crevicular.

Se empleó el E-test para el antibiograma, por ser un método ya utilizado para cuantificar la susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos periodontopatógenos (Nachnani et al. 1992), y por ser un test fiable, con un alto porcentaje de concordancia con la dilución en agar, además de ser más rápido (Nachnani et al. 1992).

En la investigación de van Winkelhoff et al. (2005), el E-test fue utilizado para verificar la eficacia *in vitro* de ocho antimicrobianos en dos poblaciones diferentes: Holanda y España. La metodología utilizada es similar en los dos

estudios y los resultados se comparan en la Tabla 16. Las drogas utilizadas en los dos estudios fueron: Penicilina, Clindamicina, Tetraciclina, Ciprofloxacino, Metronidazol, Amoxicilina más clavulanato, Amoxicilina y Azitromicina.

En las Tablas 17 y 18, se comparan los resultados del presente estudio con los de los estudios de Herrera et al. (2000 a) y van Winkelhoff et al. (2000 y 2005). Se observa en las dos tablas que *P. intermedia* y *P. gingivalis* de los pacientes brasileños son más resistentes a las drogas estudiadas que las cepas españolas y holandesas. La alta resistencia microbiana en las muestras brasileñas se detectó con penicilina y amoxicilina, cuando se comparaban con muestras de pacientes españoles y holandeses, mientras que cuando se comparó con amoxicilina más clavulanato, se apreció que la susceptibilidad antimicrobiana fue alta.

Las explicaciones para tal hecho podrían ser la mayor virulencia de la cepa encontrada en Brasil, la automedicación y la falta de cooperación (cumplimiento o *compliance*) del paciente con las drogas administradas por médicos y dentistas en Brasil, que también pueden ser una causa del aumento de la resistencia. Los altos valores de MIC encontrados en aislados bacterianos brasileños y el porcentaje alto de cepas resistentes pueden ser debidos a los mismos factores.

Los microorganismos oportunistas investigados tuvieron una alta resistencia a todos los antimicrobianos testados. Las cepas de *Pseudomonas* sp. y de bacilos entéricos fueron susceptibles solamente a ciprofloxacino, mientras que las cepas de *Candida* sp. no fueron suprimidas por ningún antimicrobiano.

15. Sumario

Cuando se comparan los datos microbiológicos de Brasil y de países europeos y de Norteamérica, encontramos una microflora subgingival distinta. Los patógenos periodontales con mayor fuerza de asociación a la periodontitis, principalmente los del complejo rojo (*P. gingivalis* y *T. forsythia*) y *A. actinomycetemcomitans*, se presentaron en una menor proporción en Brasil que en los otros países mencionados. Sin embargo, la susceptibilidad antimicrobiana de estos microorganismos era parecida a la de los otros países (Holanda y España).

Encontramos, por otro lado, patógenos oportunistas como *Candida* sp., bacilos entéricos y *Pseudomonas* sp. Presentes en el biofilm subgingival de pacientes con periodontitis en Sudamérica y Centroamérica. Hay algunas hipótesis que debemos tener en cuenta cuando analizamos tales datos, que pueden ser: el tratamiento dado al suministro de agua de la región, que puede estar contaminada con los microorganismos, y la manipulación inadecuada de los profesionales involucrados en el transporte y cultivo de las muestras microbiológicas.

Los patógenos oportunistas pueden tener un papel importante en las enfermedades periodontales, y son necesarias más investigaciones para profundizar sobre su papel en la patogenia y la respuesta al tratamiento. Otra duda, que surge del análisis de los resultados, es si las terapias utilizadas actualmente (como el raspado y alisado radicular) serían capaces de eliminar los patógenos oportunistas de una manera permanente y predecible, y aun más, si tales microorganismos, en el caso de ser eliminados por dichas terapias, pueden luego recolonizar las localizaciones subgingivales, cambiando nuevamente la ecología local.

Los fármacos usados en esta investigación no fueron adecuados para suprimir los microorganismos oportunistas *in vitro*. Es evidente que la resistencia a los antimicrobianos usados en este estudio fue muy alta, pero tampoco se evaluaron fármacos específicamente seleccionados contra dichos microorganismos. Estos datos pueden sugerir la necesidad de cambios en los regímenes antimicrobianos a suministrar en los países de Sudamérica, por ejemplo, dado que los protocolos antimicrobianos suministrados a pacientes brasileños con periodontitis son los mismos que los de Europa y Norteamérica, donde las investigaciones microbiológicas no han encontrado con frecuencia patógenos oportunistas.

Visto de esta manera, es interesante plantearse estudios microbiológicos y de susceptibilidad antimicrobianos *in vitro* como un paso necesario y suplementario en el diagnóstico de pacientes con periodontitis, y también investigar el papel de los microorganismos oportunistas en las enfermedades periodontales, y cuál sería la terapia más eficaz para suprimilos.

Queda claro que son necesarios más estudios para investigar las variaciones de la microflora subgingival. La comparación geográfica y de las resistencias a las drogas antimicrobianas, son fundamentales para decidir los tratamientos adecuados en las enfermedades periodontales. Sería de especial interés que dichas comparaciones se hiciesen con metodologías similares.

16. Conclusiones

1. En pacientes brasileños con periodontitis, *P. intermedia* y *F. nucleatum* fueron los patógenos periodontales más prevalentes, con una frecuencia de detección de 66,66%. Las especies menos prevalentes fueron *Pseudomonas* sp. y *S. B-hemoliticus*, y no se detectó *E. corrodens*. *P. gingivalis* fue identificado en 26,66% de las muestras, *T. forsythia* en el 20,00% y *A. actinomycetemcomitans* en el 13,33%.

2. En pacientes brasileños con periodontitis, *P. micra* demostró las mayores proporciones con un 6,83% del total de la flora, seguido de *P. intermedia* y *F. nucleatum* con las proporciones de 5,87% y 5,57% respectivamente. *A. actinomycetemcomitans* representó una baja proporción (0,01%), *P. gingivalis* el 2,51% y *T. forsythia* el 2,58%.

3. Los microorganismos oportunistas estuvieron presentes en el 40% de los pacientes brasileños, y solo fue identificado un tipo de microorganismo oportunista en cada una de las muestras positivas, representando una proporción del 5%. Los bacilos entéricos se detectaron en el 20,00% de las muestras, *Candida* sp. en el 13,3% y *Pseudomonas* sp. en el 6,66%.

4. El antimicrobiano más efectivo frente a todos los periodontopatógenos investigados en las muestras brasileñas fue amoxicilina con clavulanato, con la excepción de los microorganismos oportunistas. *P. intermedia* fue susceptible solamente a amoxicilina con clavulanato, y resistente a todos los demás antimicrobianos investigados. Los bacilos entéricos y *Pseudomonas* sp. únicamente fueron susceptibles a ciprofloxacino. *Candida* sp. eran resistentes a todos los antimicrobianos, incluido el ciprofloxacino.

5. La microflora subgingival de los pacientes con periodontitis crónica en Brasil fue diferente a la encontrada en países de Europa y Norteamérica, con menores prevalencias y proporciones de los microorganismos más patógenos (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans*).

Agradecimientos

Dr. Mariano Sanz Alonso

Dr. David Herrera Gonzalez

Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo (in memorian)

TSB Flávia Kelly Fernandes Batista

Marco Antonio Scandurra

Dr. Newton A. Raphael (Biolabor)

Dr. Sérgio Salvador (USP – Ribeirão Preto)

Dr. Paulo Neto

Ana O'Connor

Itziar González

Carmen Roiz (Mamen)

Dra. Ângela Tizziane

Dr. Vitor Ramos de Souza (Laboratório Ramos de Souza)

Maria Cristina da Silva (Fundação Centro Médico de Campinas)

Dra. Marcela Andrea Duran Haun

Maria Aparecida (Biolabor)

Iseu Nunes

Profesores de la disciplina de Periodoncia de la Universidad de São Paulo

USP Brasil

17. Bibliografía

1. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 5721 – 5732.
2. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária – ANVISA Resolução da Diretoria Colegiada (2010) RDC 44/ 2010.
3. Ainamo, J., Barnes, D., Beagrie, G., Cutress, T., Martin, J. & Sardo-Infirri, J. (1981) Development of the World Health Organization (WHO) Community Periodontal Index of treatment Needs (CPITN). *WHO index of treatment needs* **32**, 281-292.
4. Ainamo, J. & Bay, I. (1975) Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal* **25**, 229-235.
5. Aisikainen, S., Lai, C-H., Alaluusua, S. & Slots, J. (1991) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiology and Immunology* **6**, 115-118.
6. Ali, R. W., Lie, T. & Skaug, N. (1992) Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *Journal of Periodontology* **63**, 540-547.
7. Ali, R. W., Bakken, V., Nilsen, R. & Skaug, N. (1994) Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese an

Norwegian adult periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **65**,1046-1052.

8. Ali, R. W., Velcescu, C., Jivanescu, M. C., Lofthus, B. & Skaug, N. (1996) Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **23**,133-139.
9. Alsina, M., Olle, E., & Frias, J. (2001) Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 509-513.
10. Andrade, E.D. (1999) *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia*. 1ª. Edição, São Paulo, Artes Médicas.
11. Araki, M., Hiratsuka, K., Kiyama-Kishikawa, M., Abiko, Y. (2004) Monitoring of dnaK gene expression in *Porphyromonas gingivalis* by oxygen stress using DNA microarrays. *Journal of Oral Sciency* **46** (2), 93-100.
12. Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
13. Assaf, M., Yilmaz, S., Kuru, B., Ipci, S. D., Noyun, U. & Kadir, T. (2007) Effect of the diode laser on bacteremia associated with dental ultrasonic scaling: a clinical and microbiological study. *Photomedicine and Laser Surgery* **25**, 250-256.

14. Backer, P. J., Evans, R. T., Slots, J. & Genco, R. J. (1985) Antibiotic Susceptibility of anaerobic Bacteria from the Human Oral Cavity. *Journal of Dental Research* **64**, 1233-1244.
15. Baelum, V., Fejerskov, O. & Karring, T. (1986) Oral hygiene, gingivitis and periodontal breakdown in adult Tanzanians. *Journal of Periodontal Research* **21**, 221–232.
16. Baelum, V., Fejerskov, O. & Manji, F. (1988 a) Periodontal diseases in adult Kenyans. *Journal of Clinical Periodontology* **15**, 445–452.
17. Baelum, V., Wen-Min, L. & Fejerskov, O. (1988 b) Tooth mortality and periodontal conditions in 60-80-years-old Chinese. *Scandinavian Journal Dental Research* **96**, 99-107
18. Barbosa, F. C., Mayer, M. P., Saba-Chuifi, E. & Cai, S. (2001) Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonas from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology* **16**, 306-310.
19. Barros, L. & Witkop, C. J. (1963) Oral and genetic study of Chileans, 1960 – V. factors that influence the severity of periodontal disease. *Archives of Oral Biology* **8**, 765- 770.
20. Beck, J. D., Koch, G. G., Rozier, R. G. & Tudor G. E. (1990) Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in population of older community – dwelling black and whites. *Journal of Periodontology*. **61**, 521-528.

21. Beck, J. D., Cusmano, L., Green-Helms, W., Koch, G. G. & Offenbacher, S. (1997) A 5-year study of attachment loss in community-dwelling of older adults: incidence density. *Journal of Periodontology Research* **32**, 506-515.
22. Beck, J., Garcia, R. Heiss, G., Vokonas, P.S. & Offenbacher, S. (1996) Periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of Periodontology* **67**, 1123-1137.
23. Benigeri, M., Brodeur, J. M., Payette, M., Charbonneau, A. & Ismaïl, A. I. (2000) Community periodontal index of treatment needs and prevalence of periodontal conditions. *Journal of Clinical Periodontology* **27**: 308-312.
24. Berglundh, T., Krok, L., Liljenberg, B., Westfelt, E., Serino, G., Lindhe, J. (1998) The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 354-362.
25. Bolmström, A. (1993) Susceptibility testing of anaerobes with Etest. *Clinical Infectious Disease* **4**, 367-370.
26. Bradshaw, D. J., McKee, A. S. & Marsh, P. D. (1989) Effects of carbohydrate pulses and pH on populations shifts within oral microbial communities in vitro. *Journal of Dental Research* **68**, 1298-1302.
27. Brecx, M., Mac Donald, L. L., Legary, K., Cheang, M. & Forgay, M. G. E. (1993) Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining and bacterial vitality. *Journal of Dental Research* **72**, 1194-1197.

28. Brown, P. O. & Botstein, D. (1999) Exploring the new world of genoma with DNA microarrays. *Nature Genetics* **21**, 33-37.
29. Bukley, L. A. & Crowley, M. J. (1984) A longitudinal study of untreated periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **11**, 523–530.
30. Burt, B. A., Ismail, A. I., & Eklund S. A. (1985) Periodontal disease, tooth loss, and oral hygiene among older Americans. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* **13**, 93–96.
31. Burt, B. A. (1998) Public Health implications of recent research in Periodontal Disease. *Journal of Public Health Dentistry* **48**, 252-256.
32. Callens, A. (1992) Darkfield or phase contrast microscopy. Usefulness in periodontology. *Nederlands Tijdschrift voor Tandheelkunde* **99**, 381-384.
33. Carrillo-de-Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D. & Bascones-Martinez, A. (2010) Gengival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 230-240.
34. Chambrone, L., Lima, L. A. P. A. & Chambrone, L. A. (2008) Prevalence of Periodontal Diseases in Brazil. Part II. 1993-2003. *Revista Odontologica Metodista* **31**, 69–76.
35. Chiu, B. (1999) Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *American Heart Journal* **138**, S534-536.
36. Chung, H. J., Chung, C. P., Son, S. H. & Nisengard R. J. (1989) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leucotoxicity in

- Korean localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology* **60**, 506-511.
37. Citron, D. M., Ostavari, M. I., Karlssons, A. & Goldstein, E. J. (1991) Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 2197-2203.
38. Clarke, N. G., Carey, S. E., Srikandi, W., Hirsch, R. S. & Leppard, P. I. (1986) Periodontal disease in ancient populations. *American Journal of Physical Anthropology*, **71**, 173 -183
39. Colombo, A. P., Teles, R. P., Torres, M. C., Souto, R., Rosalem, W. Jr., Mendes, M. C. & Uzeda, M. (2002) Subgingival Microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology* **73**, 360-369.
40. Consensus Report. (1999) International Workshop for Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology - AAP* **4**, 1-112.
41. Contreras, A. & Slots, J. (2000) Herpesviruses in human periodontal disease. *Journal of Periodontology Research* **35**, 3 -16.
42. Cortelli, J. R., Cortelli, S. C., Pallos, D. & Jorge, A. O. (2002) Prevalence of aggressive periodontitis in adolescents and young adults from Vale do Paraíba. *Pesquisa Odontologica Brasileira* **16**(2), 163-168.
43. Dahlén, G., Manji, F., Baelum, V. & Fejerskov, O. (1989) Black-pigmented *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in

- subgingival plaque of adults Kenyans. *Journal of Clinical periodontology* **16**, 305-310.
44. Dasanayake, A. P., Boyd, D., Madianos, P. N., Offenbacher, S. & Hills, E. (2001) The association between Porphyromonas gingivalis-specific maternal serum IgG and low birth weight. *Journal of Periodontology* **72**, 1491-1497.
45. Delima, S. L. McBride, R. K., Preshaw, P. M., Heasman, P. A. & Kumar, P. S. (2010) Response of subgingival bacteria to smoking cessation. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 2344-2349.
46. Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. Yu, W. H., Lakshmanan, A. & Wade, W. G. (2010) The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology* **192**, 5002-5017.
47. Diamanti-Kipiotti, A., Papapanou, P. N., Moraitaki-Tsami, A., Lindhe, J. & Mitsis, F. (1993) Comparative estimation of periodontal conditions by means of different index systems. *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 656-661.
48. Dixon, D. R., Bainbridge, B. W. & Darveau, R. P. (2004) Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontology 2000* **35**, 53-74.
49. Dogan, B., Saarela, M. H., Jousimies-Somer, H., Alaluusua, S. & Asikainen, S. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype e-biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. *Oral Microbiology and Immunology* **14**, 98-103.

50. Douglass, C. W. & Fox, C. H. (1993) Cross-sectional study in periodontal disease: Current status and implications for dental practice. *Advances in Dental Research* **7**, 25–31.
51. Dyer, J. K., Reinhardt, R. A., Petro, T. M. & Strom E. A. (1992) Serum antibody responses in human periodontitis to cellular components of *Capnocytophaga*. *Archives of Oral Biology* **37** (9), 725-731.
52. Eberhard, J., Ehlers, H., Falk, W., Açil, Y., Albers, H. K. & Jepsen, S. (2003) Efficacy of subgingival calculus removal with Er:YAG laser compared to mechanical debridement: an in situ study. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 511-518.
53. Ebersole, J. L., Holt, S. C., Hansard, R. & Novak, M. J. (2008) Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *Journal of Periodontology* **79**, 637-646.
54. Ebersole, J. L., Machen, R. L., Steffen, M. J. & Willmann, D. E. (1997). Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clinical and Experimental Immunology* **107**, 347-352.
55. Ebert, S. C. & Craig, W. A. (1990) Pharmacodynamics properties of antibiotics: application to drug monitoration and dosage regimen design. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **11**, 319-326.
56. Ellwood, R., Worthington, H. V., Cullinan, M. P., Hamlet, S., Clerehugh, V. & Davies, R. (1997) Prevalence of suspected periodontal pathogens identified using ELISA in adolescents of differing ethnic origins. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 141-145.

57. Esposito, K., Ciotola, M., Carleo, D., Schisano, B., Sardeli, L., Di Tommaso, D., Misso, L., Saccomanno, F., Ceriello, A. & Giugliano, D. (2008) Post-meal glucose peaks at home associated with carotid intima-media thickness in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**, 1345-1350.
58. Faveri, M., Figueiredo L. C., Duarte, P. M., Mestnik, M. J., Mayer, M. P. A. & Feres, M. (2009) Microbiological Profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 739-749.
59. Feres, M., Haffajee, A. D., Allard, K., Som, S. & Socransky, S. S. (2001) Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 597–609.
60. Flemmig, T. F. (1999) Periodontitis. *Annals of Periodontology* **4**(1), 32-38.
61. Flynn, M. J. & Slots, J. (1993) Beta-hemolytic streptococci in advanced periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 295-297.
62. Forbes, B. A., Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. (1998) in *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Tenth Edition, eds Missouri: MOSBY, orber.
63. Gillespie, J., De Nardin, E., Radel, S., Kuracina, J., Smutko, J. & Zambon, J. J. (1992) Production of an extracellular toxin by the oral pathogen *Campylobacter rectus*. *Microbial Pathogenesis* **12**, 69-77.
64. Gjermo, P., Rösing, C. K., Susin, C. & Oppermann, R. (2002) Periodontal Disease in Central and South America. *Periodontology 2000* **29**, 70-78.

65. Gmur, R., Strub, J. R. & Guggenheim, B. (1989) Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *Journal of Periodontal Research* **24**, 113-120.
66. Gorr, S. U. & Abdolhosseini, M. (2011) Antimicrobial peptides and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 126-141.
67. Graves, D. T., Jiang, Y. & Genco, C. (2000) Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Current Opinion on Infectious Diseases*. **13**, 227-232
68. Grossi, S. G., Genco, R. J., Machtei, E. E., Ho, A. W., Koch, G., Dunford, R. G., Zambon, J. J. & Hausmann, E. (1995) Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for Bone Loss. *Journal of Periodontology* **66**, 23-29.
69. Grossi, S. G., Zambon, J. J., Ho, A. W., Koch, G., Dunford, R. G., Machtei, E. E., Norderyd, O. M. & Genco, R. J. (1994) Assessment of risk of periodontal disease I: Risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology* **65**, 260-267.
70. Gumerlock, P. H., Tang, Y. J., Meyers, F. J. & Silva, J. Jr. (1991) Use of the polymerase chain reaction for the specific and direct detection of *Clostridium difficile* in human feces. *Reviews of Infectious Disease* **13**, 1053-1060.
71. Haffajee, A. D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J. & Socransky, S. S. (2004) Subgingival microbiota of chronic periodontitis

subjects from different geographic locations. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 996-1002.

72. Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R. L. Jr. & Socransky, S. S. (1997) The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 324-334.

73. Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L. Jr. & Socransky, S. S. (1998) Subgingivsl microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 346-353.

74. Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Smith, C. & Dibart, S. (1992 a) The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 84-91.

75. Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Smith, C., Dibart, S. & Goodson, J. M. (1992 b) Subgingival temperature (III). Relation to microbial counts. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 417-422.

76. Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* **5**, 78-111.

77. Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2006) Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontology 2000* **42**, 7-12.

78. Hafstrom, C. & Dahlén, G. (1997) Pathogenicity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates in a wound chamber model in rabbits. *Oral Microbiology and Immunology* **12**, 148-154.
79. Hasegawa, Y. Mans, J. J., Mao, S., Lopez, M. C., Baker, H. V., Handfield, M. & Lamont, R. J. (2007) Gingival epithelial cell transcriptional responses to comensal and opportunistic oral microbial species. *Infection and Immunity* **75**, 2540-2547.
80. Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S. & Kilian, M. (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* **19** (371), 237-242.
81. Herrera, D., van Winkelhoff, A. J., Dellempjn-Kippuw, N., Winkel, E. G. & Sanz, M. (2000) Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 520-525.
82. Herrera, D., Alonso, B., León, R., Roldán, S. & Sanz, M. (2008 a) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* **35** (Suppl 8), 45-66.
83. Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E. & León, R. (2008 b) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 106-113.

84. Herrera, D., Roldán, S., González, I. & Sanz, M. (2000 a) The periodontal abscess (I). Clinical and microbiological findings. *Journal of Clinical Periodontology*. **27**, 387-394
85. Herrera, D., Roldán, S., O'Connor, A. & Sanz, M. (2000 b) The periodontal abscess (II). Short-term clinical and microbiological efficacy of 2 systemic antibiotic regimes. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 395-404
86. Hill, G. B. (1998) Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. *Annals of Periodontology* **3**, 222-232.
87. Hooper, L. V. (2009) Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Reviews. Microbiology* **7**, 367-374.
88. Hugoson, A., Laurell, L. & Lundgren, D. (1992) Frequency distribution of individual's age 20-70 years according to severity of periodontal disease experience in 1973 and 1983. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 227-232.
89. Hujoel, P. P., Cunha-Cruz, J., Loesch, W. J. & Robertson, P. B. (2005) Personal bucal hygiene and chronic periodontitis: a systematic revision. In Evidence-Based Periodontal Disease Prevention and Treatment. *Periodontology 2000* **37**, 29-34.
90. Kamma, J.J., Contreras, A. & Slots, J. (2001) Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 879-885.

91. Kantorski, K. Z., Zimmermann, G. S., Rodrigues, A. S. & Lotufo, R. F. M. (2006) Ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* em pacientes portadores de periodontite no Brasil. *Ciencias Odontologicas Brasileira* **9** (3), 26-31.
92. Kaplan, J. B., Perry, M. B., MacLean, L. L., Furgang, D., Wilson, M. E. & Fine, D. H. (2001) Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infection and Immunity* **69** (9), 5375-5384.
93. Kerr, N. W. (1991) Prevalence and natural history of periodontal disease in Scotland – the medieval period (900 – 1600 A.D.), *Journal of Periodontal Research* **26**, 346 – 354.
94. Kerr, N. W. (1994) Prevalence and natural history of periodontal disease in a London Spitalfields, population (1645 – 1852). *Archives of Oral Biology* **39**, 581-588.
95. Kremer, B. H., Loss, B. G., van der Velden, U., van Winkelhoff, A. J., Craandijk, J., Bulthuis, H. M., Hutter, J., Varoufaki, A. S. & van Steembergen, T. J. (2000) Peptostreptococcus micros smooth and rough genotypes in periodontitis and gingivitis. *Journal of Periodontology* **71**, 209-218.
96. Kinane, D. F., Adonogianaki, E., Moughal, N., Winstanley, F. P., Mooney, J. & Thornhill, M. (1991) Immunocytochemical characterization of cellular infiltrate, related endothelial changes and determination of GCF acute phase proteins during human experimental gingivitis. *Journal of Periodontal Research* **26**, 286-288.

97. Kinane, D. F., Berglundh, T. & Lindh, J. (2003) Interactions between parasites and hosts in periodontal disease. in Lindhe, J., Karring, T. & Lang, N. P. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 4th ed. Eds Blackwel Munksgaard. **5**, 148-175.
98. Komiya, A., Kato, T., Nakagawa, T., Saito, A., Takahashi, J., Yamada, S. & Okuda, K. (2000) A rapid DNA probe method for detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontology* **71**, 760-767.
99. Kuo, W. P., Kim, E. Y., Trimarchi, J., Jenssen, T. K., Vinterbo, S. A. & Ohno-Machado, L. (2004) A primer on gene expression and microarrays for machine learning researchers. *Journal of Biomedical Informatic* **37** (4), 293-303.
100. Kuo, W. P., Wipple, M. E., Sonis, S. T., Ohno-Machado, L. & Jenssen, T. K. (2002) Gene expression profiling by DNA microarray and its application to dental research. *Oral Oncology*, **38** (7): 650-656.
101. Lai, C. H., Listgarten, M. A., Shirakawa, M. & Slots, J. (1987) *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **2** (4), 152-157.
102. Lang, N. P., Adler, R., Joss, A. & Nyman, S. (1990) Absence of bleeding on probing - an indicator of periodontal stability. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 714-721.
103. Lang, N. P. & Tonetti, M. S. (2003) Periodontal Risk Assessment (PRA) for patients in Supportive Periodontal Therapy (SPT) *Oral Health & Preventive Dentistry* **1**, 7-16.

104. Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martín, C. & Silva, A. (2004) Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 1061–1069.
105. Levy, R. M., Giannobile, W. V., Feres, M., Haffajee, A. D., Smith, C. & Socransky, S. S. (2002) The effect of apically repositioned flap surgery on clinical parameters and the composition of the subgingival microbiota: 12 month data. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **22**, 209-219.
106. Lindhe, J. (1989) *Textbook of Clinical Periodontology*. 2nd edition. Copenhagen: Blackwell Munkgaard.
107. Listgarten, M. A., Lai, C. H. & Young, V. (1993) Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *Journal of Periodontology* **64**, 155-161.
108. Listgarten, M. A. & Schifter, C. (1982) Differential dark field microscopy of subgingival bacteria as an aid in selecting recall intervals: results after 18 months. *Journal of Clinical Periodontology*. **9**, 305-316.
109. Listgarten, M. A., Schifter, C. C. & Laster, L. (1985) 3-year longitudinal study of the periodontal status of an adult population with gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* **12**, 225-238.

110. Liu, L., Wen, X., He, H., Shi, J. & Ji, C. (2003) Species-specific DNA probe for the detection of *Porphyromonas gingivalis* from adult chinese periodontal patients and healthy subjects. *Journal of Periodontology* **74**, 1000-1006.
111. Löe, H., Anerud, A., Boysen, H. & Morrison, E. (1986) Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *Journal of Clinical Periodontology* **13** (5), 431-445.
112. Löe, H., Anerud, A., Boysen, H., & Smith, M. (1978) The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. *Journal of Periodontology* **49**, 607-620.
113. Löe, H. & Silness, J. (1963) Periodontal Disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica* **21**, 533-551.
114. Löe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965) Experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontology* **36**, 177-187.
115. Löe, H., Theilade, E., Jensen, S. B & Schiott, C. R. (1967) Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *Journal of Periodontal Research* **2**, 282-289.
116. Loesche, W. J., Bretz, W. A., Kerschensteiner, D., Stoll, J., Socransky, S. S., Hujoel, P. & Lopatin D. E. (1990) Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoil-DL-arginine-naphthylamide. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 1551-1559.

117. Loesche, W. J., Syed, S. A., Laughon, B. E. & Stoll, J. (1982) The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Journal of Periodontology* **53**, 223-230.
118. Loesche, W. J. (1986) The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiology and Immunology* **1**, 65-72.
119. Loomer, P. M. & Armitage, G. C. Microbiology of Periodontal disease. in Rose, L. R., Mealey, B. L., Genco, R. J. & Cohen, D. W. (2006) *Periodontics medicine, surgery an Implants*. 1nd. Edition. Edn. Elsevier Mosby **4**: 69-84.
120. Loos, B. G., Craandijk, J., Hoek, F. J., Wertheim-van Dillen, P. M. & Van der Velden, U. (2000) Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **71**,1528-1534.
121. Loos, B. G. (2005) Systemic markers of inflammation in periodontitis. *Journal of Periodontology* **76**, 2106-2115.
122. López, N. J. (2000) Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **71** (6), 948-954.
123. López, N. J. & Gamonal, J. A. (1998) Effects of metronidazole plus amoxicilin in progressive untreated adult periodontitis: results of a sigle 1 week course after 2 and 4 months. *Journal of Periodontology* **69**, 1291-1298.

124. Machtei, E. E., Hausmann, E., Dunford, R., Grossi, S., Ho, A., Chandler, J., Zambon, J. & Genco, R. J. (1999) Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 374-380.
125. Maeda, N., Okamoto, M., Kondo, K., Ishikawa, H., Osada, R., Tsurumoto, A. & Fujita, H. (1998) Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. *Microbiology and Immunology* **42**, 583-589.
126. Marsh, P. D. (2005) Dental Plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 7-15.
127. Marsh, P. D. & Devine, D. A. (2011) How is the development of dental biofilms influenced by the host? *Journal of Clinical Periodontology* **38** (suppl 11), 28-35.
128. Marsh, P. D. & Martin, M. V. (2009) *Oral Microbiology*, 5th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone.
129. Marsh, P. D., McKee, A. S. & McDermid, A. S. (1993) Continuous culture studies. In: Shah, H. N., Mayrand, D. & Genco, R. J. (eds). *Biology of the Species Porphyromonas gingivalis*, pp. 105-123. Boca Raton: CRC Press.
130. McKee, A. S., McDermid, A. S., Baskerville, A., Dowsett, A. B., Ellwood, D. C. & Marsh, P. D. (1986) Effects of hemin on the physiology and virulence of bacteroides gingivalis W50. *Infection and Immunity* **52**, 349-355.

131. Michalowicz, B. S., Diehl, S. R., Gunsolley, J. C., Sparks, B. S., Brooks, C. N., Koertge, T. E., Califano, J. V., Burmeister, J. A. & Schenkein HA. (2000) Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **71**, 1699-1707.
132. Milward, M. R., Chappel, I.L., Wright, H., Millard, J. L., Mathews, J. B. & Cooper, P. R. (2007) Differential activation of NF-Kappa B and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens, *Clinical and Experimental Immunology* **148** (2), 307-324.
133. Mitchel-Lewis, D., Engebretson, S. P., Chen, J., Lamster, I. B. & Papapanou, P. N., (2001) Periodontal infections and pre-term birth: Early findings from a cohort of young minority women in New York. *European Journal of Oral Sciences* **109**, 34-39.
134. Mitsis, F. J. & Taramidis, G. (1995) Alveolar bone loss on neolithic man remains on 38 skulls of khirokitia's (Cyprus) inhabitants. *Journal of Clinical Periodontology* **22**, 788–793.
135. Miyazaki, H. (1996) A global overview of periodontal epidemiology. In Pack A. R. C. & Newman. H. N., editors: Periodontal needs of developing nations. Middlesex NJ, *International Academics Periodontology, Science Reviews limited*.
136. Mombelli, A. (2003) Antibiotics use in periodontal therapy. in Lindhe, J., Karring, T. and Lang, N. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4th edition. Edn. Blackwell Munksgaard **23**, 478-494.

137. Mombelli, A., McNabb, H., & Lang, N. P. (1991a) Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P.gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **26**, 308-313.
138. Mombelli, A., McNabb, H. & Lang, N. P. (1991b) Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. I. Topographic distribution in the human dentition. *Journal of Periodontal Research* **26**, 301-307.
139. Mombelli, A., Schmid, B., Rutar, A. & Lang, N. P. (2000) Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *Journal of Periodontology* **71**, 14-21.
140. Mombelli, A. (2005) Clinical parameters: biological validity and clinical utility. *Periodontology 2000* **39**, 30-39.
141. Montgomery, E. (2000) Agentes antimicrobianos na prevenção e tratamento das infecções. In Yagiela, J. A., Neidle, E. A. & Dowd, F. J. *Farmacologia e terapêutica para dentistas 4^a*. Edição. Rio de Janeiro. Edn. Guanabara Koogan, 597-606.
142. Moore, W. E., Holdman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. & Ranney, R. R. (1985) Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infection and Immunity* **48**, 507-519.
143. Moore, W. E., Burmeister, J. A., Brooks, C. N. Ranney, R. R. Hinkelmann, K. H., Schieken, R. M. & Moore, L. V. (1993) Investigation of the influences of puberty, genetics and environment on the composition of subgingival periodontal floras. *Infection and Immunity* **61**, 2891-2898.

144. Moritz, A., Schoop, U., Goharkhay, K., Schauer, P., Doertbudak, O., Wernisch, J. & Sperr W. (1998) Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers in Surgery and Medicine* **22**, 302-311.
145. Murakami, Y. Masuda, T., Imai, M., Iwami, J., Nakamura, H., Noguchi, T. & Yoshimura, F. (2004) Analysis of major virulence factors in *Porphyromonas gingivalis* under various cultura temperatures using specific antibodies. *Microbiology and Immunology* **48**, 561-569.
146. Murray, P. R. & Niles, A. C. (1990) In vitro activity of meropenem (SM-7338), imipenem, and five other antibiotics against anaerobic clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **13**, 57-61.
147. Murria, B. R. C., Moellering, Jr. (2000) Tipos de resistencia antibiótica y mecanismos correspondientes. *Clinica Medica Norteamericana* **5**, 909–932
148. Nachnani, S., Scuteri, A., Newman, M. G. Avanesian, A. B. & Lomeli, S. L. (1992) E-test: a new technique for Antimicrobial Susceptibility Testing for Periodontal Microorganisms. *Journal of Periodontology* **63**, 576-583
149. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003).
150. Neish, A. S. (2009) Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* **136**, 65-80.
151. Newman, M. G., Socransky, S. S., Savitt, E. D., Propas, D. A. & Crawford, A. (1976) Studies of microbiology of Periodontosis. *Journal of Periodontology* **47**, 373-379.

152. Newman, M. G. & Socransky, S. S. (1977) Predominant Cultivable microbiota in periodontosis. *Journal of Periodontal Research* **12**, 120-128.
153. Nociti, F. H. Jr., Cesco De Toledo, R., Machado, M. A., Stefani, C. M., Line, S. R. & Gonçalves, R. B. (2001) Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **12**, 295-300.
154. Offenbacher, S., Lieff, S., Boggess, K. A., Murtha, A. P., Madianos, P. N., Champagne, C. M., McKaig, R. G., Jared, H. L., Mauriello, S. M., Auten, R. L. Jr., Herbert, W. N. & Beck, J. D. (2001) Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Annals of Periodontology* **6**, 164-174.
155. Ogawa, T., Shimauchi, H. & Hamada, S. (1989) Mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice to *Bacteroides gingivalis* fimbriae administered orally. *Infection and Immunity* **57**, 3466-3471
156. O'Keefe, J. H., Gheewala, N. M. & O'Keefe, J. O. (2008) Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation and cardiovascular health. *Journal of American College of Cardiology* **51**, 249-255.
157. Page, R. C. (1986) Current understanding of aetiology and progression of periodontal disease. *International Dental Journal* **36**, 153-161.

158. Papapanou, P. N. (1996) Periodontal Diseases: Epidemiology. *Annals of Periodontology* **1**, 1-36.
159. Papapanou, P. N. & Lindhe, J. (2003) Epidemiology of Periodontal Disease. In: Lindhe, J., Karring, T. & Lang, P. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. **4th**. Edition. Copenhagen. Blackwell Munksgaard.
160. Papapanou, P. N., Baleum, V., Luan, W. M., Madianos, P. N., Chen, X., Fejerskov, O. & Dahlén, G. (1997) Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *Journal of Periodontology* **68**, 651-666.
161. Papapanou, P. N., Neiderud, A. M., Papadimitriou, A., Sandros, J. & Dahlén, G. (2000) "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and their antibody responses: a case-control study. *Journal of Periodontology* **71**, 885-897.
162. Pavicic, M. J., van Winkelhoff, A. J., Douqué, N. H., Steures, R. W. & Graaff, J. (1994) Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicilin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2 year evolution. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 107-112.
163. Peres, M. A., Antunes, J. L. F., Boing, A., Peres, K. G. & Bastos, J. L. (2007) Skin colour is associated with periodontal disease in Brazilian adults: a population-based oral health survey. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 196-201.

164. Persson, G. R. (2005) Site-based versus subject-based on periodontal diagnosis. *Periodontology 2000* **39**, 145-163.
165. Pihlstrom, B. L. (2001) Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontology 2000* **25**, 37-58.
166. Pischon, N., Heng, N., Bernimoulin, J. P., Kleber, B. M., Willich, S. N. & Pischon, T. (2007) Obesity, inflammation, and periodontal disease. *Journal of Dental Research* **86**, 400-409.
167. Qadri, T., Miranda, L., Tunér, J. & Gustafsson, A. (2005) The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 714-719.
168. Rams, T. E., Listgarden, M. A., & Slots, J. (1994) Utility of radiographic crestal lamina dura for predicting periodontitis disease activity. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 571-576.
169. Rams, T. E. & Slots, J. (1991) Candida biotype in human adult periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **6**, 191-192.
170. Rams, T. E., Feik, D., Young, V., Hammond, B. F. & Slots J. (1992) Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 249-252.
171. Riggio, M. P., Lennon, A. & Smith, A. (2001) Detection of *Peptostreptococcus micros* DNA in clinical samples by PCR. *Journal of Medical Microbiology* **50**, 249-254.

172. Ritz, H. L. (1969) Fluorescent antibody staining of Neisseria, Streptococcus and Veillonella in frozen sections of human dental plaque. *Archives of Oral Biology* **14**, 1073-1083.
173. Ronderos, M. & Michalowicz, B. S. (2006) Epidemiology of Periodontal disease and risk factors. in Rose, L. R., Mealey, B. L., Genco, R. J. and Cohen, D.W. *Periodontics – medicine, surgery, and implants*. 1th edition. Edn. Elsevier Mosby **3**, 32-68.
174. Ross, R. (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* **14**, 115-126.
175. Rudiger, S., Petersilka, G. & Flemming, T. F. (1999) Combined systemic and local antimicrobial therapy of periodontal disease in Papillon-Lefèvre syndrome. A report of 4 cases. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 847-854.
176. Rudney, J. D., Chen, R. & Sedgewick, G.J. (2001) Intracellular Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infection and Immunity*. **69**, 2700-2707.
177. Russell, A. L. (1967) Epidemiology of periodontal disease. *International Dental Journal* **17**, 282–296.
178. Rylander, H. & Lindhe, J. (2003) Periodontal therapy associated with cause. In: Lindhe, J., Karring, T. and Lang, N. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4th edition. Copenhagen: Blackwell Munksgaard **20**, 419-449.

179. Rylev, M. & Kilian, M. (2008) Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 346-361.
180. Saito, A., Hosaka, Y., Nakagawa, T., Seida, K., Yamada, S., Takazoe, I. & Okuda K. (1993) Significance of serum antibody against surface antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with adult periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **8**,146-53.
181. Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Dellemljn-Kippuw, N., Simón, R. & Winkel, E. (2000) Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and Netherlands. *European Journal of Oral Sciences* **108**, 383-392.
182. Sanz, M. & van Winkelhoff, A. J. (2011) Periodontal infections: understanding the complexity – consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **38** (suppl. 11), 3-6.
183. SB 2000. (2004) Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília – DF. *Ministério da Saúde*, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Nacional de Saúde Bucal.
184. Schenkein, H. A. (2006) Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology 2000* **40**, 77-93.

185. Schenkein, H. A., Burmeister, J. A., Koertge, T. E., Brooks, C. N., Best, A. M., Moore, L. V. & Moore, W. E. (1993) The influence of race and gender on periodontal microflora. *Journal of Periodontology* **64**, 292-296.
186. Schroeder, H. E. & Attström, R. (1980) Pocket formation: an hypothesis in: the borderland between caries and periodontal disease II. Edn T. Lehner and G. Cimasoni, Eds., London, Academic Press: 99-123.
187. Schwarz, F., Bieling, K., Venghaus, S., Sculean, A., Jepsen, S. & Becker, J. (2006) Influence of fluorescence-controlled Er:YAG laser radiation, the Vector system and hand instruments on periodontally diseased root surfaces in vivo. *Journal of Clinical Periodontology* **33** (3), 200-208.
188. Shah, H. N. & Gharbia, S. E. (1992) Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *prevotella nigrescens* sp. nov. *International Journal Systematic Bacteriology* **42**, 542-546.
189. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
190. Sheiham, A. & Netuveli G.S. (2002) Periodontal diseases in Europe. *Periodontology 2000* **29**, 104-121.
191. Silness, J. & Løe, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 112-135.

192. Slade, G. D., Offenbacher, S., Beck, J. D., Heiss, G. & Pankow, J. S. (2000) Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in US population. *Journal of Dental Research* **79**, 49-57.
193. Slots, J. (1976) The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scandinavian Journal of Dental Research* **84**,1-10.
194. Slots, J. (1977) The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scandinavian Journal of Dental Research* **85**, 114 -121.
195. Slots, J. (1982) Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **15**, 606 - 609.
196. Slots, J., Feik, D. & Rams, T. E. (1990) Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **5**, 149 -154.
197. Slots, J & Listgarten, M. A. (1988) *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **15**, 85–93.
198. Slots, J., Rams, T. E., Feik, D., Taveras, H. D. & Gillespie, G. M. (1991) Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *Journal of Periodontology* **62**, 543-547.
199. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000* **5**, 7-25.

200. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C. & Duff, G. W. (2000) Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphism in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 810-818.
201. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. Jr. (1998) Microbial complexes in Subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134–144.
202. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2003) Microbiology of Periodontal disease. In: Lindhe, J., Karring, T., Lang, N. P. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 4th Edition. Copenhagen: Blackwel Munksgaard. **4**, 105-147.
203. Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Bio Bio techniques* **17**, 788-792.
204. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., Martin, L., Haffajee, J. A. Uzel, N. G. & Goodson, J. M. (2004) Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 352–362.
205. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28**, 12-55.
206. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**, 135-187.
207. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1993) Effect of therapy on periodontal infections. *Journal of Periodontology* **64**, 754–759.

208. Sreenivasan, P. K., Meyer, D.H. & Fives-Taylor, P. M. (1993) Factors influencing the growth and viability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 361-369.
209. Syed, S. A. & Loesche, W. J. (1972) Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology* **24**, 638-644.
210. Tanner, A. & Bouldin, H. (1989) The microbiota of early periodontitis lesion in adults. *Journal of Clinical Periodontology* **16**, 467–471.
211. Tanner, A. C., Haffer, C., Bratthall, G. T., Visconti, R. A. & Socransky, S. S. (1979) A study of bacteria associated with advancing periodontitis in man. *Journal of Clinical Periodontology* **6**, 278–307.
212. Tanner, A. C., Kent, R., Maiden, M. F. & Taubman, M. A. (1996) Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *Journal of Periodontal Research* **31**, 195–204.
213. Tanner, A. C., Maiden, M. F., Zambon, J. J., Thoren, G. S. & Kent, R. L. Jr. (1998) Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **33**, 105–117.
214. Tervonen, T., Raunio, T., Knuutila, M. & Karttunen, R. (2007) Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 377-383.

215. Teng, Y. T. (2006) Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1- innate and humoral immunity and the periodontium. *Journal of Dental Research* **85**, 198-208.
216. Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S. B. & Løe, H. (1966) Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *Journal of Periodontal Research* **1**, 1-13
217. Tinoco, E. M., Beldi, M. I., Loureiro, C. A., Lana, M., Campedelli, F., Tinoco, N. M., Gjermo, P. & Preus, H. R. (1997) Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. *European Journal of Oral Sciences* **105**, 9-14.
218. Tinoco, E. M., Stevens, R., Haubek, D., Lai, C. H., Balaclandrans, S. & Preus, H. (1997b) Relationship of serotype leukotoxin gene type and lysogeny in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to periodontal disease status. *European Journal of Oral Sciences* **105**, 310-317.
219. Tomasi, C., Schander, K., Dahlén, G. & Wennström, J. L. (2006) Short-term clinical and microbiologic effects of pocket debridement with an Er:YAG laser during periodontal maintenance. *Journal of Periodontology* **77**, 111-118,
220. Tonetti, M. S. & Claffey, N. (2005) Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C Consensus report of the 5th European workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 210-213.

221. Tonetti, M. S. & Chapple I. L. (2011) Biological approaches to development of novel periodontal therapies – consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 114-118.
222. Tran, S. D., Rudney, J. D., Sparks, B. S. & Hodges, J. S. (2001) Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**, 1–10.
223. Turnidge, J. D. (1998) The pharmacodynamics of Beta-lactams. *Clinical Infectious Disease* **27**, 10–22.
224. Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J. L. & Slots, J. (1998) Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *Journal of Periodontology* **69**, 1111–1118.
225. Van der Velden, U., Varoufaki, A., Hutter, J. W., Xu, L., Timmerman, M. F., van Winkelhoff, A. J. & Loos, B. G. (2003) Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 603-610.
226. Van der Velden, U. (2005) Propose and problems of periodontal disease classification. *Periodontology 2000* **39**, 13-21.
227. Van Dyke, T. E. & Sheileh, D. (2005) Risk factors for periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology* **7**, 3–7.

228. Van Dyke, T. E. (2011) Proresolving lipid mediators: potencial for prevention and treatment of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 119-125.
229. van Winkelhoff, A. J., Bosch-Tijhof, C. J., Winkel, E. G. & van der Reijden, W. A. (2001) Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**, 666-671.
230. van Winkelhoff, A. J., Tijhof, C. J. & Graaff, J. (1992) Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodotitis. *Journal of Periodontology* **63**, 52-57.
231. van Winkelhoff, A. J., Rams, T. E. & Slots, J. (1996) systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontology 2000* **10**, 45-78.
232. van Winkelhoff, A. J., Herrera Gonzales, D., Winkel, E. G., Dellempjn-Kippuw, N., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Sanz, M. (2000) Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparision between The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 79-86.
233. van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Oteo, A. & Sanz, M. (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 893-898.
234. van Winkelhoff, A. J. & Winkel, E. G. (2005) Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontology 2000* **39**, 40-52.

235. Waerhaug, J. (1967) Prevalence of periodontal disease in Ceylon. Association with age, sex, oral hygiene, socio-economic factors, vitamin deficiencies, malnutrition, betel and tobacco consumption and ethnic group. Final report. *Acta Odontologica Scandinavica* **25**, 205-231.
236. Walker, C. B., Gordon, J. M., Magnusson, I. & Clark, W. B. (1993) A role of antibiotics in the treatment of refractory periodontitis. *Journal of Periodontology* **64**, 772-781.
237. Watt, R. G. & Marinho, V. C. (2005) Does Oral health promotion improve oral hygiene and gingival health? *Periodontology 2000* **37**, 35-47.
238. Wennström, J. L., Heijl, L. & Lindhe, J. (2003) Periodontal surgery: surgery access. in Lindhe, J., Karring, T. & Lang N. P. *Clinical Periodontology and Implant dentistry*. 4th. Edition. Edn. Blackwell Munksgaard **25**, 502-541.
239. Wilderer, P. A. & Charaklis, E. G. (1989) Structure and function of biofilms. In: Charaklis, E. G. & Eilderer, P. A., eds. *Structure and function of biofilms*. Chichester UK: John Wiley 5-17.
240. Wilson, R. & Crouch, E. A. (1987) Risk assessment and comparisons: an introduction. *Science* **236**, 267-270.
241. Winkel, E. G., Roldán, S., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D. & Sanz, M. (2003) The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc-lactate on the microflora of oral

- halitosis patients. A dual-center, double-blind placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 427-434
242. Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., Vangsted, T. & Van der Velden, U. (1997) Effects of metronidazole in patients with “refractory” periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 573-579.
243. Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J., Barendregt, D. S., van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F. & van der Velden, U. (1999) Clinical and microbiological effects of initial periodontal therapy in conjunction with amoxicillin and clavulanic acid in patients with adult periodontitis. A randomised double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **26**(7), 461-468.
244. Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J. & van der Velden, U. (1998) Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **25** (11 pt 1), 857-864.
245. Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D., Som, S., Thompson, M., Torresyap, G. & Socransky, S. S. (2000) The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra and subgingival microbiota. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 637-647.
246. Yoshida-Minami, I., Suzuki, A., Kawabata, K., Okamoto, A., Nishihara, Y., Nagashima, S., Morisaki, I. & Ooshima, T. (1997) Alveolar bone loss in rats infected with a strain of *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium*

nucleatum isolated from a child with prepubertal periodontitis. *Journal of Periodontology* **68**, 12-17.

247. Yoshida, A., Kawada, M., Suzuki, N., Nakano, Y., Oho, T., Saito, T. Yamashita, Y. (2004) TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of *Treponema denticola* numbers with the severity of periodontal disease. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 196-200.
248. Zbon, J. J., Christersson, L. A. & Slots, J. (1983 a) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patients groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *Journal of Periodontology* **54**, 707-711.
249. Zbon, J. J., Slots, J. & Genco, R. J. (1983 b) Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitan* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infection and Immunity* **41**, 19–27.
250. Zaura, E. Keijser, B. J. Huse, S. M. & Crielaard, W. (2009) Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiology* **9**, 259-266.
251. Zimmermann, G. S., Lotufo, R. F., Kantorski, K.Z. & Rodrigues, A. S. (2003) The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with Periodontitis in a Brazilian population. São Paulo; S.N. 69 pilus, tab (Br) Faculdade de Odontologia Universidade de São Paulo.

Anexo I

Parecer del ministerio de la salud brasileño

Registro de la investigación en el ministerio de la salud de Brasil



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

12/2005

PARECER Nº 1006/2005

Registro CONEP: 11772 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0012.1.017.000-05

Processo nº 25000.045791/2005-41

Projeto de Pesquisa: "Estudo comparativo de prevalência, susceptibilidade antimicrobiana e perfis sorológicos de diferentes periodontopatógenos de pacientes portadores de periodontite crônica em populações distintas na América Latina e Espanha".

Pesquisador Responsável: Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo.

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. CEP /FOUSP.

Área Temática Especial: pesquisa com cooperação estrangeira.

Data entrada CEP: 02/03/2005

Entrada na CONEP: 11/04/2005

Objetivos

Avaliar a microbiota subgengival de pacientes portadores de periodontite crônica de diferentes populações no Brasil, Colômbia, Chile e Espanha, usando os mesmos métodos clínicos e laboratoriais.

Avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana da microbiota subgengival dos pacientes com periodontite.

Caracterizar geneticamente as cepas isoladas através da reação de polimerase em cadeia (PCR).

Sumário/comentários

Segundo o pesquisador, cerca de 30% da população mundial é portadora de periodontite crônica, sendo que a principal causa desta doença é a presença de placa bacteriana no ambiente subgengival. São mais de 400 diferentes espécies bacterianas que podem colonizar a microbiota subgengival, e poucas espécies demonstraram etiologia clara na patogênese da periodontite. O reconhecimento do perfil microbiológico das infecções periodontais, assim como dos diferentes padrões de susceptibilidade antimicrobiana da microbiota envolvida na periodontite em diferentes países, poderá trazer importantes informações sobre o comportamento etiológico destes microorganismos.

A amostra será composta por 30 sujeitos de pesquisa (em cada centro), que procurarem tratamento odontológico periodontal na clínica de pós-graduação do Curso de Periodontia da FOUSP.

Dentre os critérios de inclusão e exclusão encontram-se homens e mulheres igual ou maior que 30 anos, portadores de periodontite crônica e de 4 ou mais sítios com pelo menos 5mm de profundidade clínica de sondagem e evidência radiográfica de perda óssea.

Exclui-se, entre outras condições, fumantes, portadores de doenças sistêmicas, ou mulheres grávidas.

Serão feitas coletas da microbiota do sulco gengival dos sujeitos da pesquisa e cultivo para detectar as cepas existentes e avaliar perfil de susceptibilidade antimicrobiana.

Cont. Parecer CONEP nº 1006/2005.

Análise estatística: nível de significância de 5% de dois lados e nível de confiança estabelecido em 95%. Será usado ANOVA para variáveis clínicas e variáveis microbiológicas

O Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE está bem elaborado, informa o sujeito da pesquisa de riscos, benefícios, liberdade de participar ou não, objetivos da pesquisa, nome e telefones dos pesquisadores. Usa linguagem acessível e de forma bastante clara atende ao que está estabelecido no Cap. IV da Res. CNS nº 196/96.

Cronograma (Fluxograma) de Realização das Atividades Realizada consta um período de 22 dias a partir da seleção dos sujeitos da pesquisa.

Consta do protocolo que todo material coletado será processado e avaliado no país de origem, Colômbia. Foi anexado o documento de aprovação ética deste país.

O financiamento do estudo será solicitado à FAPESP ou CNPq.

Este estudo será desenvolvido na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Brasil; Faculdade de Odontologia do Chile, Faculdade de Odontologia da Universidade Del Vale, Colômbia e na Faculdade de Odontologia da Universidade Complutense de Madri, Espanha.

Considerações

Trata-se de um estudo transversal epidemiológico de população. O assunto é de extremo interesse por se tratar de doença que afeta a população mundial, e por envolver uma variedade muito grande de espécies bacterianas.

O presente protocolo atende aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 e complementares sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Brasília, 24 de maio de 2005.



WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

Anexo II

Modelo de consentimiento para el paciente

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Título do estudo: **Estudo comparativo de prevalência, susceptibilidade antimicrobiana e perfis sorológicos de diferentes periodonto-patógenos em pacientes portadores de periodontite crônica em populações distintas na América Latina e Espanha.**

Nome do pesquisador: Stella M. P. Corrêa

Você está sendo convidado para participar como voluntário num estudo que tem como objetivo estabelecer uma relação entre o estado de saúde de sua gengiva e as bactérias presentes na sua gengiva e as diferenças entre as bactérias dos brasileiros, dos colombianos dos chilenos e dos espanhóis. Para tanto serão utilizados exames clínico, radiográfico e microbiológico. Estes exames serão realizados na cadeira do dentista onde colocaremos um instrumento (sonda periodontal) entre seu dente e a sua gengiva. Este exame é feito rotineiramente pelos dentistas e poderá causar um pequeno desconforto, principalmente se sua gengiva estiver inflamada. O exame radiográfico constará de 2 radiografias uma de cada lado da sua boca. E o exame microbiológico constará de uma coleta de placa bacteriana da superfície de 4 (quatro) dentes de sua boca através de uma ponta de papel que será colocada entre seu dente e a gengiva, esta amostra será encaminhada para um laboratório e dentro de cerca de 20 dias saberemos quais as bactérias presentes na sua gengiva e qual o tipo de antibiótico que pode ser usado para auxiliar no seu tratamento.

Você tem total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento. Sua desistência não lhe trará nenhum prejuízo, nem prejudicará o tratamento que você está recebendo nesta escola.

Sua identidade será preservada em sigilo, seu nome não aparecerá nas publicações da pesquisa, nem será citado em cursos, palestras ou aulas.

Os desconfortos durante os exames citados não constituem um risco para a sua saúde maior que aquele de uma consulta odontológica.

O benefício direto por sua participação será determinar se você tem alguma bactéria mais agressiva á sua saúde gengival e qual o antibiótico que pode ser ministrado para auxiliar no tratamento de sua boca. Além disso, você estará colaborando com o maior conhecimento sobre o assunto e nos ajudará a identificar se há diferenças entre as bactérias do Brasil e de outras partes da América latina e Espanha.

Em caso de qualquer problema relativo a este estudo você poderá entrar em contato com a pesquisadora Dra. Stella M. P. Corrêa pelo telefone (019) 3237-7437.

Eu, _____RG_____,
declaro estar de acordo com os termos acima descrito e entendido os procedimentos deste estudo, e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

_____, data ____/____/200 .

Anexo III

Fotografías de las placas Petri con el E-test

1. Placa Petri con cita de E-test



2 Elipse de inhibición



3. MIC – mínima concentración inhibitoria



Anexo IV

Tablas del estudio

Tabla 1: Características demográficas de la población seleccionada para el estudio

Características demográficas de los pacientes brasileños		
n		30
Edad	media	47,10
	desviación estándar	11,60
	máximo	86
	mínimo	33
Sexo	mujeres	17
	hombres	13
	% mujeres	56,66%
	% hombres	43,33%

Tabla 2: Datos clínicos de los pacientes de la investigación

Datos clínicos						
edad	Nº. de dientes	IP	IS	PS	NIC	SS
33	26	43,26	0,00	6,50	6,50	43,59
40	14	0,00	0,00	5,50	6,50	100
55	14	50,00	10,71	7,00	8,25	88,37
36	25	84,37	12,50	8,25	8,25	95,14
42	21	86,90	4,76	6,75	6,75	100
39	26	71,15	7,69	7,00	8,25	100
54	24	32,29	0,00	5,75	6,75	84,02
86	24	100	8,33	6,50	7,00	83,30
52	24	72,91	10,41	6,25	6,25	79,16
41	24	54,16	0,00	6,25	8,00	31,25
35	28	100	3,57	6,00	6,50	82,14
50	27	97,22	11,11	7,25	7,75	99,38
49	24	80,20	25,00	7,75	9,00	64,58
38	28	73,21	0,00	5,75	6,25	54,16
38	25	29,00	0,00	6,00	6,00	60,00
60	25	84,00	4,00	7,25	9,75	69,33
52	26	61,53	5,76	6,25	7,75	37,17
34	27	73,14	0,00	6,00	6,00	89,50
71	15	100	3,33	6,00	11,50	56,66
53	28	44,64	0,00	6,75	8,00	49,40
35	24	100	0,00	5,50	5,75	71,38
54	26	98,07	3,84	6,25	9,25	58,33
50	21	65,47	4,76	7,25	9,25	53,17
41	28	61,60	10,71	9,00	9,00	77,38
47	25	56,00	2,00	7,75	9,00	54,00
44	28	100	23,21	7,00	7,00	100
58	18	86,11	13,88	7,00	8,75	63,55
42	27	71,29	7,40	6,00	6,00	61,72
45	27	86,11	0,00	7,25	7,25	92,59
39	26	76,40	35,41	8,00	8,75	86,11

- edad del paciente en años completos.
- nº. de dientes: cantidad de dientes en las dos arcadas,
- IP Índice de placa, IS índice de supuración, PS profundidad de sondaje, NIC nivel de inserción clínico, SS sangrado al sondaje.

Tabla 3: Datos clínicos en las localizaciones donde se tomaron las muestras: Profundidad de sondaje (PS), nivel de inserción clínico (NIC), índice de sangrado gingival (ISG) y porcentaje de sitios con placa bacteriana (IP):

Datos clínicos de los sitios de las muestras		
Numero de dientes	media	24,17
	desviación estándar	4,04
	máximo	28
	mínimo	14
Profundidad de sondaje	media	6,72
	desviación estándar	0,85
	máximo	9,00
	mínimo	5,50
Nivel de inserción clínica	media	7,70
	desviación estándar	1,38
	máximo	11,50
	mínimo	5,75
Índice de sangrado gingival	media	66,89
	desviación estándar	25,91
	máximo	100
	mínimo	0,00
Índice de supuración	media	7,06
	desviación estándar	8,43
	máximo	35,41
	mínimo	0,00
Índice de placa	media	69,63
	desviación estándar	27,72
	máximo	100
	mínimo	0

Tabla 4: Unidades formadoras de colonia (UFC) total de cada sujeto de la investigación relacionado a su codificación, edad y porcentaje de UFC de periodontopatógenos

UFC total de cada sujeto de la investigación			
n	edad	UFC Total*	% UFC periodonto patógenos
1	33	8 x10 ⁶	20,00%
2	34	2 x10 ⁷	15,00%
3	40	1 x10 ⁶	0,00%
4	55	5 x10 ⁶	27,00%
5	36	8 x10 ⁶	21,25%
6	42	1 x10 ⁷	16,50%
7	71	4 x10 ⁶	17,50%
8	53	9 x10 ⁶	13,81%
9	35	1 x10 ⁶	0,00%
10	39	1 x10 ⁷	10,00%
11	54	1 x10 ⁵	0,00%
12	86	6 x10 ⁶	19,90%
13	52	1 x10 ⁷	24,90%
14	41	9 x10 ⁷	19,80%
15	54	6 x10 ⁷	5,00%
16	35	2 x10 ⁷	31,50%
17	50	1 x10 ⁷	19,00%
18	49	3 x10 ⁶	23,20%
19	50	1 x10 ⁷	17,50%
20	41	8,5 x10 ⁶	27,53%
21	47	3 x10 ⁶	11,60%
22	38	1,6 x10 ⁷	34,40%
23	44	6 x10 ⁶	29,68%
24	58	1 x10 ⁷	20,00%
25	42	1,5 x10 ⁷	23,46%
26	38	1,2 x10 ⁷	18,30%
27	60	1,8 x10 ⁷	33,80%
28	45	5 x10 ⁷	11,00%
29	52	1 x10 ⁷	6,00%
30	39	2 x10 ⁷	34,50%
Media		1,54X10⁷	18,40%
Desviación estándar		1,94X10⁷	0,099

- En la columna **UFC total 8×10^6** o debe de leerse 8.000.000 de unidades formadoras de colonia.

Tabla 5: Relación entre los sujetos de la investigación, el sexo, la edad, el total de UFC (UFC tot) el UFC de *A. actinomycetencomitans* (UFC Aa), de *P. gingivalis* (UFC Pg), *P. intermedia* (UFC Pi), *T. forsythia* (UFC Tf) y *P. micra* (UFC Mm)

n	sexo	edad	UFC Tot*	UFC Aa	UFC Pg	UFC Pi	UFC Tf	UFC Pm
1	M	33	8,00 E+06	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+05	0,00E+00	6,00E+05
2	H	34	2,00E+07	0,00E+00	0,00E+00	7,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
3	M	40	1,50E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4	M	55	5,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
5	M	36	8,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+05	0,00E+00	5,00E+05
6	M	42	1,00E+07	0,00E+00	1,50E+05	6,00E+06	0,00E+00	0,00E+00
7	H	71	4,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
8	H	53	9,00E+06	9,00E+02	1,98E+05	5,94E+05	0,00E+00	0,00E+00
9	H	35	1,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
10	M	39	1,00E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
11	M	54	1,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
12	M	86	6,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	3,96E+05	0,00E+00	0,00E+00
13	M	52	1,20E+07	0,00E+00	0,00E+00	9,96E+05	0,00E+00	0,00E+00
14	M	41	9,00E+07	9,00E+03	0,00E+00	3,96E+06	0,00E+00	7,92E+06
15	H	54	6,00E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
16	M	35	2,00E+07	0,00E+00	5,00E+05	2,00E+06	4,00E+05	1,00E+06
17	M	50	1,00E+07	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+05	0,00E+00	8,00E+05
18	M	49	3,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,98E+05
19	H	50	1,00E+07	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05	0,00E+00	6,00E+05
20	H	41	8,50E+06	0,00E+00	1,45E+05	5,78E+05	2,41E+05	0,00E+00
21	H	47	3,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,98E+05
22	M	38	1,60E+07	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+06	0,00E+00	1,00E+06
23	H	44	6,00E+06	6,00E+02	1,98E+05	0,00E+00	1,85E+05	4,98E+05
24	H	58	1,00E+07	0,00E+00	0,00E+00	9,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
25	H	42	1,50E+07	0,00E+00	3,90E+05	9,90E+05	2,50E+05	1,20E+06
26	M	38	1,20E+07	0,00E+00	0,00E+00	6,00E+05	0,00E+00	9,96E+05
27	M	60	1,80E+07	1,80E+03	5,94E+05	1,49E+06	6,12E+05	0,00E+00
28	H	45	5,00E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,50E+06
29	M	52	1,00E+07	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05	0,00E+00	0,00E+00
30	H	39	2,00E+07	0,00E+00	6,00E+05	1,50E+06	0,00E+00	1,00E+06

* En las columnas de **UFC 8,00E+06** debe de leerse como **8x10⁶** o 8.000.000 de unidades formadora de colonia.

Tabla 6: Relación de sujetos investigados y UFC total de *F. nucleatum* (UFC Fn), *C. rectus* (UFC Cr), *Streptococcus* β -hemolíticos (UFC S β h), UFC *Candida* sp., UFC *Capnocytophaga* sp., UFC bacilos entéricos y UFC *Pseudomonas* sp.

n	UFC Total*	UFC Fn	UFC Cr	UFC S β h	UFC Candida	UFC Capnocytophaga	UFC B. entéricos	UFC Pseudomonas
1	8,00 E+06	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2	2,00E+07	8,00E+05	9,00E+05	6,00E+105	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3	1,50E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4	5,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	8,00E+05	2,50E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5	8,00E+06	4,00E+05	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6	1,00E+07	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
7	4,00E+06	0,00E+00	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+05	0,00E+00
8	9,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,50E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
9	1,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
10	1,00E+07	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
11	1,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
12	6,00E+06	4,98E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+05	0,00E+00
13	1,20E+07	7,92E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,00E+05	6,00E+05	0,00E+00
14	9,00E+07	0,00E+00	5,94E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
15	6,00E+07	3,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
16	2,00E+07	0,00E+00	8,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	6,00E+05	1,00E+06	0,00E+00
17	1,00E+07	6,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
18	3,00E+06	1,50E+05	0,00E+00	1,98E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+05
19	1,00E+07	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+05
20	8,50E+06	4,76E+05	0,00E+00	0,00E+00	4,25E+05	4,76E+05	0,00E+00	0,00E+00
21	3,00E+06	1,50E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
22	1,60E+07	1,20E+06	1,50E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	8,00E+05	0,00E+00
23	6,00E+06	6,00E+05	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
24	1,00E+07	6,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
25	1,50E+07	6,90E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
26	1,20E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
27	1,80E+07	9,90E+05	1,49E+06	0,00E+00	0,00E+00	9,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
28	5,00E+07	3,00E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
29	1,00E+07	2,00E+05	2,50E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
30	2,00E+07	8,00E+05	1,50E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+06	0,00E+00

- En las columnas de **UFC 8,00E+06** debe de leerse como **8x10⁶** o 8.000.000 de unidades formadora de colonia.

Tabla 7. Frecuencia de la detección de diferentes especies bacterianas en las muestras positivas. Promedio en porcentajes (%) de flora en sitios positivos

Especie	%
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	13,33
<i>P. gingivalis</i>	26,66
<i>P.intermedia</i>	66,66
<i>T. forsythia</i>	20,00
<i>P. micra</i>	46,60
<i>Fusobacterium sp.</i>	66,66
<i>C. rectus</i>	33,33
<i>E. corrodens</i>	0,00
<i>Candida sp.</i>	13,33
<i>Capnocytophaga sp.</i>	23,30
<i>Pseudomonas</i>	6,66
<i>Bacilos entéricos</i>	20,00
<i>S. β hemolíticos</i>	10,00

Tabla 8. Proporción de flora de diferentes especies bacterianas en las muestras totales.

<i>Especie</i>	%
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,01
<i>P. gingivalis</i>	2,51
<i>P.intermedia</i>	5,87
<i>T. forsythia</i>	2,58
<i>F. nucleatum</i>	5,57
<i>P. micra</i>	6,83
<i>C. rectus</i>	5,91
<i>Capnocytophaga sp.</i>	4,66
<i>E. corrodens</i>	0,00
<i>Candida sp.</i>	5,00
<i>S. β hemoliticus</i>	8,53
<i>Pseudomonas sp.</i>	5,00
<i>Bacilos entéricos</i>	5,00

Tabla 9.: Resultados en valores MIC 50 y MIC 90 de antibióticos para los periodontopatógenos aislados de pacientes brasileños con periodontitis crónica:

Especie	PG	AC	XL	TC	CM	CL	MZ	AZ
<i>F. nucleatum</i>								
Rango	0,016-32	0,016-256	0,016-0,064	0,016-0,064	0,016-32	0,016-6	0,25-48	<0,016
MIC 50	0,50	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,250	<0,016
MIC 90	1	256	0,023	0,5	0,64	1,5	48	<0,016
<i>P. intermedia</i>								
Rango	0,25-48	0,094-96	<0,016	0,016-32	0,016-64	0,016-24	0,016-24	0,016-64
MIC 50	0,25	0,125	<0,016	0,125	0,016	0,016	0,016	0,016
MIC 90	256	256	<0,016	16	64	0,5	0,5	1
<i>P. micra</i>								
Rango	<0,016	<0,016	<0,016	0,016-1,0	<0,016	0,016-0,75	0,016-0,75	<0,016
MIC 50	<0,016	<0,016	<0,016	0,125	<0,016	0,125	0,016	<0,016
MIC 90	<0,016	<0,016	<0,016	0,25	<0,016	0,16	0,016	<0,016
<i>A. actinomyces temcomitans</i>								
Rango	<0,016	<0,016	0,023-0,094	0,016-24	0,016-0,50	0,016-0,38	0,016-0,38	<0,016
MIC 50	<0,016	<0,016	0,023	0,125	0,016	0,016	0,016	<0,016
MIC90	<0,016	<0,016	0,5	0,5	0,25	0,016	0,125	<0,016
<i>P. gingivalis</i>								
Rango	16-256	0,125-96	<0,016	12-256	6-256	0,75-32	0,125-0,50	0,094-8
MIC 50	24	0,125	<0,016	24	32	1	0,125	0,094
MIC90	256	64	<0,016	256	256	32	0,5	0,5
<i>B. entéricos</i>								
Rango	-	-	-	-	-	0,016-0,50	0,75-16	0,50
MIC 50	-	-	-	-	-	0,25	0,750	0,50
MIC 90	-	-	-	-	-	0,25	6	0,5
<i>C. rectus</i>								
Rango	0,016-6	0,016-2	<0,016	<0,016-12	0,016-6	0,016-8	<0,016	<0,016
MIC 50	<0,016	0,016	<0,016	<0,016	0,016	0,016	<0,016	<0,016
MIC90	1	0,125	<0,016	6	1	4	<0,016	<0,016
<i>Capnocytophaga</i>								
Rango	<0,016	<0,016	<0,016	0,25-2	<0,016	<0,016	<0,016	<0,016
MIC 50	<0,016	<0,016	<0,016	0	<0,016	<0,016	<0,016	<0,016
MIC 90	<0,016	<0,016	<0,016	0,5	<0,016	<0,016	<0,016	<0,016
<i>Candida</i>								
Rango	-	-	-	-	-	-	-	-
MIC 50	-	3	0,5	-	2	1	0,940	0,50
MIC90	-	3	0,5	-	2	1	0,940	0,50
<i>Pseudomonas</i>								
Rango	-	-	-	-	-	0,25	0,380	-
MIC 50	-	-	-	-	-	0,25	0,380	-
MIC 90	-	-	-	-	-	0,25	0,380	-
<i>S. β-hemoliticus</i>								
Rango	0,016-16	0,5-32	<0,016	0,05-1	0,125-6	0,25-64	0,25-0,125	0,25
MIC 50	0,5	2	<0,016	1	0,125	0,250	0,250	0,25
MIC 90	1,5	24	<0,016	1	6	32	0,125	0,25

Tabla 10. Número de cepas susceptibles y resistentes a Penicilina (PG), Clindamicina (CM), Tetraciclina (TC), Ciprofloxacino (CL), Metronidazol (MZ), Amoxicilina + clavulanato (XL), Amoxicilina (AC) y Azitromicina (AZ):

	PG	CM	TC	CL	MZ	XL	AC	AZ
<i>F. nucleatum</i>								
n susceptible	16	18	20	19	18	20	18	20
n total	20	20	20	20	20	20	20	20
% resistente	20%	10%	0%	5%	10%	0%	10%	0%
<i>P. intermedia</i>								
n susceptible	1	7	10	17	18	20	8	19
n total	20	20	20	20	20	20	20	20
% resistente	95%	65%	50%	15%	10%	0%	60%	5%
<i>P. micra</i>								
n susceptible	14	14	14	14	14	14	14	14
n total	14	14	14	14	14	14	14	14
% resistente	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. actinomycetemcomitans</i>								
n susceptible	4	4	3	4	4	4	4	4
n total	4	4	4	4	4	4	4	4
% resistente	0	0	25%	0	0	0	0	0
<i>P. gingivalis</i>								
n susceptible	0	0	0	3	8	8	1	5
n total	8	8	8	8	8	8	8	8
% resistente	100	100	100	62,5%	0	0	87,5%	37,5%
Bacilos entéricos								
n susceptible	0	0	0	6	4	0	0	1
n total	6	6	6	6	6	6	6	6
% resistente	100	100	100	0	66,66%	100	100	83,33%
<i>C. rectus</i>								
n susceptible	9	9	9	9	10	10	10	10
n total	10	10	10	10	10	10	10	10
% resistente	10%	10%	10%	10%	0	0	0	0
<i>Capnocytophaga sp.</i>								
n susceptible	6	7	7	7	7	7	7	7
n total	7	7	7	7	7	7	7	7
% resistente	14,28%	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida sp.</i>								
n susceptible	0	1	0	1	1	1	1	1
n total	4	4	4	4	4	4	4	4
% resistente	100	75%	100	75%	75%	75%	75%	75%

	PG	CM	TC	CL	MZ	XL	AC	AZ
<i>Pseudomonas sp.</i>								
n susceptible	0	0	0	2	1	0	0	0
n total	2	2	2	2	2	2	2	2
% resistente	100%	100%	100%	0	50%	100%	100%	100%
St. B-hemolíticos								
n susceptible	2	2	2	2	3	3	3	3
n total	3	3	3	3	3	3	3	3
% resistente	33,33%	33,33%	33,33%	33,33%	0	0	0	0

Tabla 11: datos demográficos de las poblaciones seleccionadas

Datos Demográficos					
n		Chile	Colombia	España	Brasil
		37	41	36	30
edad	media	44,6	41,5	44,9	47,1
	desviación estandar	8,1	10,6	11,7	11,6
	máximo	60	64	67	86
	mínimo	31	25	26	33
sexo	mujeres	25	25	20	17
	hombres	12	16	16	13
	% mujeres	67,6%	61,0%	55,6%	56,66%
	% hombres	32,4%	39,0%	44,4%	43,33%
fumadores	no fumadores	26	37	21	30
	fumadores	11	3	12	0
	fumadores formales	0	1	3	0
	% no fumadores	70,3%	90,2%	63,6%	100%
	% fumadores	29,7%	7,3%	36,4%	0,0%
	% fumadores formales	0,0%	2,4%	9,1%	0,0%

Datos de Chile, Colombia y España tomados del estudio de Herrera et al.

2008

Tabla 12: comparación de datos clínicos de sitios de muestras: profundidad de sondaje (PS), Nivel de inserción clínico (NIC). Porcentaje de sitios con sangrado al sondaje (SS) y porcentaje de sitios con placa (IP)

		Datos clínicos de los sitios muestreados			
		Chile	Colombia	España	Brasil
PS	media	5,401	7,963	5,757	6,725
	DE	0,489	1,303	0,942	0,8544
	máximo	6,5	11,5	9,3	9
	Mínimo	5,0	5,2	4,5	5,5
NIC	media	5,905	8,088	6,458	7,7
	DE	0,350	1,679	1,326	1,387
	máximo	6,5	12,1	11,5	11,5
	Mínimo	5,0	3,1	4,8	5,75
SS	media	68,92%	100%	90,28%	72,84%
	DE	22,36%	0	20,07%	20,38%
	máximo	100%	100%	100%	100%
	Mínimo	0%	100%	25%	31,25%
IP	media	77,03%	59,15%	47,22%	71,30%
	DE	21,55%	28,92%	41,31%	24,72%
	máximo	100%	100%	100%	100%
	Mínimo	25%	25%	0%	29%

DE – desviación estandar

Datos de Chile, Colombia y España tomados del estudio de Herrera et al. 2008 b

Tabla 13: comparación entre el logaritmo (LOG) del total de unidades formadoras de colonias anaerobias (UFC) por mililitro.

LOG del total de UFCs/ml				
	Chile	Colombia	España	Brasil
media	6,688	8,379	7,351	6,930
DE	1,01	0,26	0,54	0,55
máxima	9,6	8,8	8,5	7,95
mínima	4,7	7,6	5,9	5,0

DE – desviación estandar

Datos de Chile, Colombia y España tomados del estudio de Herrera et al.

2008 b

Tabla 14: Comparación de la frecuencia de detección de diferentes especies bacterianas

	Frecuencia de detección			
	Chile	Colombia	España	Brasil
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	19,4%	17,1%	16,7%	13,3%
<i>P. gingivalis</i>	83,8%	65,9%	77,8%	26,6%
<i>P.intermedia</i>	19,4%	72,5%	97,2%	66,6%
<i>T. forsythia</i>	16,2%	39,0%	36,1%	20,0%
<i>Capnocytophaga sp.</i>	13,5%	9,8%	16,7%	23,3%
<i>Fusobacterium sp.</i>	63,9%	82,9%	100%	66,6%
<i>P. micra</i>	29,7%	2,4%	61,1%	46,6%
<i>E. corrodens</i>	34,3%	27,5%	11,1%	0,0%
<i>Bacilos entéricos</i>	17,6%	36,6%	0,0%	20,0%

Datos de Chile, Colombia y España tomados del estudio de Herrera et al. 2008 b

Tabla 15: Comparación de las proporciones en muestras positivas de diferentes especies bacterianas

	% Media de patógeno en sitios positivos			
	Chile	Colombia	España	Brasil
A.				
<i>actinomyces comitans</i>	2,86	0,22	0,20	0,01
<i>P. gingivalis</i>	34,01	5,49	22,21	2,51
<i>P. intermedia</i>	15,23	6,71	6,74	5,87
<i>T. forsythia</i>	6,43	4,39	5,54	2,58
<i>Capnocytophaga sp.</i>	4,62	2,00	0,77	4,66
<i>Fusobacterium sp.</i>	2,76	5,08	5,31	5,57
<i>P. micra</i>	10,83	2,00	2,41	6,83
<i>E. corrodens</i>	10,14	1,77	0,83	0,00
Bacilos entéricos	14,22	8,10	0,00	5,00

Datos de Chile, Colombia y España tomados del estudio de Herrera et al. 2008 b

Tabla 16: Resultados de susceptibilidad y resistencia de cinco periodontopatógenos aislados en pacientes en Holanda (HL), España (Es) y Brasil (Bra): con relación a Penicilina (PG), Clindamicina (CM), Tetraciclina (TC) y Ciprofloxacino (CL), basada en valores de *breakpoints* seleccionados.

		PG			CM			TC			CL		
		HL	Es	Bra	HL	Es	Bra	HL	Es	Bra	HL	Es	Bra
Fn	nS	20	8	16	20	9	18	20	10	20	19	10	19
	n total	20	10	20	20	10	20	20	10	20	20	10	20
	%R	0	20,0	20,0	0	10,0	10,0	0	0	0	5,0	0	5,0
Pi	nS	18	11	1	24	16	7	24	15	10	24	18	17
	n total	24	18	20	24	18	20	24	18	20	24	18	20
	%R	25,0	38,9	95,0	0	11,1	65,0	0	16,7	50,0	0	0	15,0
Pm	n S	23	19	14	23	19	14	22	19	14	23	19	14
	n total	23	19	14	23	19	14	22	19	14	23	19	14
	%R	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aa	n S	8	4	4	14	7	4	18	10	3	18	9	4
	n total	18	10	4	18	10	4	18	10	4	18	10	4
	%R	55,6	60,0	0,0	22,2	30,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	10,0	0,0
Pg	n S	26	15	0	26	15	0	26	15	0	26	15	3
	n total	26	15	8	26	15	8	26	15	8	26	15	8
	%R	0,0	0,0	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0	100	0,0	0,0	62,5

ns – número de cepas susceptibles

n total – número total de cepas

% R – porcentaje de cepas resistentes a la droga.

Datos de Holanda y España tomados del estudio de van Winkelhoff et al.

2005.

Tabla 17: Resultados de susceptibilidad y resistencia de cinco periodontopatógenos aislados en pacientes en Holanda (HL), España (Es) y Brasil (Bra): con relación a Metronidazol (MZ), Amoxicilina más clavulanato (XL), Amoxicilina (AC) y Azitromicina (AZ), basada en valores de *breakpoints* seleccionados.

		MZ			XL			AC			AZ		
		HL	Es	Bra	HL	Es	Bra	HL	Es	Bra	HL	Es	Bra
Fn	n S	19	8	18	20	10	20	20	8	18	18	9	20
	n total	19	10	20	20	10	20	20	10	20	20	10	20
	%R	0,0	20,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	10,0	10,0	10,0	0,0
Pi	n S	24	18	18	24	18	20	23	12	8	24	16	19
	n total	24	18	20	24	18	20	24	18	20	24	18	20
	%R	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	4,2	33,3	60,0	0,0	11,1	5,0
Pm	n S	23	18	14	23	19	14	23	19	14	20	17	14
	n total	23	19	14	23	19	14	23	19	14	23	19	14
	%R	0,0	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,0	10,5	0,0
Aa	n S	13	4	4	18	9	4	18	6	4	18	6	4
	n total	18	10	4	18	10	4	18	9	4	18	9	4
	%R	27,8	60,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	33,3	0,0
Pg	n S	26	15	8	26	15	8	26	15	1	26	15	5
	n total	26	15	8	26	15	8	26	15	8	26	15	8
	%R	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	87,5	0,0	0,0	37,5

ns – número de cepas susceptibles

n total – número total de cepas

% R – porcentaje de cepas resistentes a la droga.

Datos de Holanda y España tomados del estudio de van Winkelhoff et al. 2005.

Anexo V

Hojas de registro del paciente

**Prevalencia microbiológica e
susceptibilidade antimicrobiana
de Pacientes com Periodontite crônica
no Brasil**

Stella M. P. Corrêa
Periodontista

Prontuário n°. _____

Pesquisa Prevalencia e susceptibilidade antimicrobiana de
periodontopatógenos em pacientes com periodontite crônica no Brasil

Código do paciente: _____

Prontuário do paciente

Código do paciente: _____ Sexo: F() M() Estado
civil: _____ Idade: _____ Nascim: _____ Nacionalidade _____
Naturalidade _____ Profissão: _____
Queixa principal: _____

Anamnese médica:

1. Está sob tratamento médico? Sim () Não ()
2. Epilepsia? Sim () Não ()
3. Alguma infecção? Sim () Não ()
4. Transplante de órgãos? Sim () Não ()
5. Problemas de defesa (imunidade)? Sim () Não ()
6. Diabetes? Sim () Não ()
7. Cardiopatia? Sopro? Sim () Não ()
8. Pressão alta? Sim () Não ()
9. Artrite ? Sim () Não ()
10. Colite ? Sim () Não ()
11. Doença de Crohn? Sim () Não ()
12. Câncer ? Sim () Não ()
13. HIV? Sim () Não ()
14. Hepatite? Sim () Não ()
15. Inflamações ulcerativas? Sim () Não ()
16. Outras? Qual? _____
17. Desordem hormonal _____ Anticoncepcional _____
18. Gravidez _____ meses _____
19. Menopausa _____ Osteoporose _____
20. Fuma? Sim () Não () quantidade? _____/dia

Pesquisa Prevalencia e susceptibilidade antimicrobiana de
periodontopatógenos em pacientes com periodontite crônica no Brasil

Código do paciente: _____

DOENÇAS CONCOMITANTES

Doença

Data de início da doença ____/____/____

Atualmente está em que estágio? _____

Doença

Data de início da doença ____/____/____

Atualmente está em que estágio ? _____

Doença

Data de início da doença ____/____/____

Atualmente está em que estágio ? _____

Doença

Data de início da doença ____/____/____

Atualmente está em que estágio ? _____

Pesquisa Prevalencia e susceptibilidade antimicrobiana de
periodontopatógenos em pacientes com periodontite crônica no Brasil

Código do paciente: _____

Medicação Concomitante

1. Está usando algum remédio ? Sim () Não ()
2. Tomou algum dos seguintes remédios nas últimas 4 (quatro semanas)?
3. Antibióticos ? Sim () Não ()
4. Aspirina ? Sim () Não ()
5. Medicamentos para reumatismo e artrite? Sim () Não ()
6. Anticoagulantes ? Sim () Não ()
7. Corticóides? Sim () Não ()
8. Algum outro medicamento que não foi mencionado? Sim () Não ()
9. Qual?

Nome comercial _____

Agente farmacológico _____

Dose diária _____/24 horas

Nome comercial _____

Agente farmacológico _____

Dose diária _____/24 horas

Nome comercial _____

Agente farmacológico _____

Dose diária _____/24 horas

Nome comercial _____

Agente farmacológico _____

Dose diária _____/24 horas

Pesquisa Prevalencia e susceptibilidade antimicrobiana de
periodontopatógenos em pacientes com periodontite crônica no Brasil

Código do paciente: _____

Anamnese Dental

1. Já fez tratamento gengival? Sim () Não () _____
2. Qual o último tratamento que fez? _____
3. Extração? Sim () Não ()
4. Teve hemorragia? Sim () Não ()
5. Respira pela boca? Sim () Não ()
6. Bruxismo? Sim () Não ()
7. Bruxomania? Sim () Não ()
8. Alterações na mucosa Sim () Não ()
9. Quantidade de tártaro? Sim () Não ()
10. Já teve algum episódio de dor na gengiva ou abscesso? Sim () Não ()

Higiene Oral – Controle de Placa

1. Frequência _____
2. Ocasião _____
3. Tipos de escovas _____
4. Tipos de cerdas _____
5. Marca da pasta de dentes _____
6. Está usando algum colutório? _____
7. Ou Gel? _____
8. Método de escovação _____
9. Meios auxiliares _____
10. Traumas decorrentes da escovação _____
11. Traumas decorrentes da escovação _____

Pesquisa Prevalencia e susceptibilidade antimicrobiana de
periodontopatógenos em pacientes com periodontite crônica no Brasil

Código do paciente: _____

Índice de placa

Vestibular

18	17	16	15	14	13	12	11

21	22	23	24	25	26	27	28

38	37	36	35	34	33	32	31

41	42	43	44	45	46	47	48

Vestibular

Índice de Supuração

Vestibular

18	17	16	15	14	13	12	11

21	22	23	24	25	26	27	28

38	37	36	35	34	33	32	31

41	42	43	44	45	46	47	48

