



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Determinación del perfil microbiano en patología periodontal en mujeres post-menopáusicas

Scarlette Hernández Viguera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



DETERMINACIÓN DEL PERFIL MICROBIANO EN
PATOLOGÍA PERIODONTAL EN MUJERES POST-
MENOPAÚSICAS

Tesis presentada por

Scarlette Hernández Viguera

Para obtener el título de doctor por la Universitat de Barcelona

Programa de doctorat Ciències Odontològiques

Directores

Dr. José López- López

Dra. Blanca Martínez-Garriga

Tutor

Dr. Ricardo Pérez Tomas

“Es mejor cojear por el camino que avanzar a grandes pasos fuera de él. Pues quien cojea en el camino, aunque avance poco, se acerca a la meta, mientras que quien va fuera de él, cuanto más corre, más se aleja”

Agustín de Hipona

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Carlos y Elba, que me enseñaron que los sueños se cumplen, y el trabajo y perseverancia son recompensadas. Infinitas gracias por todo lo que han hecho por mi. **A Joaquín**, mi amor y compañero de vida, el cual no dudó en acompañarme en esta loca aventura del doctorado, y darme fuerzas en los momentos difíciles. Gracias totales. **A mis hermanas, Karla, Andrea y Marcela**, quienes a pesar de la distancia, siempre están disponibles y agradezco cada día de mi vida por vuestra presencia. A mis bellos **Amalia, José Pablo y Agustina**, que dan felicidad a mi corazón cada día. A mi **tía Maria**, quien es uno de los pilares de mi vida y está presente en los momentos buenos y los malos. Gracias por tu apoyo siempre. Al **Dr. José López**, quien ha tenido la disposición y paciencia con esta estudiante chilena, que partió con una idea, y por el camino fue modificando todo. Gracias por confiar en mi y enseñarme el significado de “currar y currar”. A **Blanca**, gracias por la paciencia, y enseñarme el trabajo de laboratorio, PCR, etc. Gracias por la entrega que pusiste en este proyecto. No olvidaré tu buena disposición siempre. Al **Dr. Miguel Viñas**, quien abrió las puertas de su laboratorio y me ayudo a enmendar el camino.

Gracias por la generosidad y amabilidad conmigo. A mi tutor, **el Dr. Ricardo Pérez**, gracias por la amabilidad y el apoyo brindado en estos años. A mi amigo **Rubén Aquino**, fuiste un gran apoyo en mi estadía en Barcelona y en Bellvitge. A todos los del **Laboratorio de microbiología**, quienes de diferentes maneras me ayudaron a crecer como persona y profesional. A **Maribel** por ser una gran amiga. Te quiero mucho y te extrañaré. A la **Universidad Austral de Chile, y el Instituto de Odontoestomatología**, particularmente a mis compañeros de **Endodoncia y Patología Estomatológica**, quienes sin dudar, me animaron a emprender este camino, sabiendo que significaba una carga extra para ellos. Gracias por ese gesto de compañerismo hacia mi. Finalmente agradecer a **Dios**, por esta tremenda experiencia de vida que ha significado este proceso, y me ha brindado múltiples satisfacciones en el camino.

ÍNDICE

INDICE

ABREVIATURAS	15
1. RESUMEN.....	19
2. INTRODUCCIÓN.....	25
2.1. ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	27
2.1.1. <i>Definición.....</i>	27
2.1.2. <i>Etiología de la enfermedad periodontal</i>	27
2.1.3. <i>El biofilm oral</i>	30
2.1.4. <i>Microbiología de la enfermedad periodontal</i>	32
2.1.4.1. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans.....</i>	37
2.1.4.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	39
2.1.4.3. <i>Campylobacter rectus.....</i>	41
2.1.4.4. <i>Tannerella forsythia</i>	42
2.1.4.5. <i>Fusobacterium nucleatum.....</i>	43
2.1.4.6. <i>Prevotella intermedia.....</i>	44
2.1.5. <i>Criterios diagnósticos</i>	45
2.1.6. <i>Clasificación.....</i>	47
2.1.7. <i>Técnicas de detección de periodontopatógenos.....</i>	49
2.1.7.1. <i>Métodos de cuantificación bacteriana mediante qPCR</i>	51
2.1.7.1.1. <i>SYBR Green</i>	51
2.1.7.1.2. <i>Sondas TaqMan.....</i>	52
2.2. MENOPAUSIA	54
2.2.1. <i>Definición.....</i>	54
2.2.2. <i>Etapas.....</i>	57

2.2.3.	<i>Manifestaciones clínicas de la menopausia</i>	59
2.2.4.	<i>Manifestaciones orales en la menopausia</i>	60
2.3.	OSTEOPOROSIS/OSTEOPENIA.....	63
2.3.1.	<i>Definición</i>	63
2.3.2.	<i>Criterios diagnósticos densitométricos de osteoporosis</i>	66
2.3.3.	<i>Fisiopatología</i>	66
2.4.	MENOPAUSIA, OSTEOPOROSIS Y ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	68
3.	HIPÓTESIS	73
3.1.	HIPÓTESIS.....	75
3.2.	HIPÓTESIS NULA.....	75
4.	OBJETIVOS	77
4.1.	OBJETIVO GENERAL.....	79
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	79
5.	METODOLOGÍA	81
5.1.	TIPO DE ESTUDIO.....	83
5.2.	POBLACIÓN DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	83
5.3.	DATOS CLÍNICOS Y MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS.....	84
5.4.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	87
5.4.1.	<i>Cepas bacterianas y medios de cultivo</i>	87
5.4.2.	<i>Extracción de DNA</i>	88
5.4.3.	<i>Cuantificación mediante qPCR con sondas TaqMan</i>	91

5.4.4.	<i>Cuantificación mediante qPCR con SYBR Green</i>	96
5.5.	ANÁLISIS DE DATOS	100
5.5.1.	<i>Almacenamiento de los datos</i>	100
5.5.2.	<i>Análisis estadístico principal</i>	100
5.5.3.	<i>Análisis estadístico para la comparación entre qPCR con sondas TaqMan y SYBR Green</i>	102
6.	RESULTADOS	105
6.1.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS DATOS CLÍNICOS.....	107
6.2.	CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS PERIODONTALES CON EL USO DE SONDAS TAQMAN	109
6.3.	ANÁLISIS ENTRE VARIABLES CLÍNICAS	111
6.4.	ANÁLISIS ENTRE VARIABLES MICROBIOLÓGICAS.....	116
6.5.	ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y LAS VARIABLES MICROBIOLÓGICAS	119
6.6.	COMPARACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN BACTERIANA MEDIANTE SYBR GREEN Y SONDAS TAQMAN	135
6.7.	ANÁLISIS DE <i>PREVOTELLA INTERMEDIA</i> MEDIANTE qPCR CON EL USO DE SYBR GREEN.....	140
7.	DISCUSIÓN	145
8.	CONCLUSIONES	165
9.	BIBLIOGRAFÍA	171
10.	ANEXOS	185

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ATCC: colección americana de cultivos tipos

BHI: brain-heart infusion

bp: pares de bases

CECT: colección española de cultivos tipo

COPD: índice de dientes con caries, obturaciones o perdidos

Cq: ciclo de cuantificación.

Ct: ciclo umbral

DMO: densidad mineral ósea

DMSZ: colección alemana de microorganismos y cultivos celulares

DNA: ácido desoxirribonucleico

EtOH: etanol

ICC: coeficiente de correlación intraclase.

NAM: ácido N-acetil murámico

NCTC: colección nacional inglesa de cultivos tipo

NTC: control sin muestra o control negativo

OD: densidad óptica

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR cuantitativa o Real Time PCR.

UFC: unidad formadora de colonias.

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Introducción: La osteoporosis así como la periodontitis, son desórdenes comunes en la población de mayor edad (Martínez-Maestre 2012). Se ha sugerido que la mujer posmenopáusica que es susceptible a la osteoporosis también puede ser más susceptible a la enfermedad periodontal. Sin embargo, los estudios que han evaluado esta asociación dan resultados diversos. *El objetivo* de este estudio fue detectar y cuantificar las bacterias periodontopatógenas presentes en la placa subgingival en un grupo de mujeres postmenopáusicas y correlacionarlas con otros parámetros clínicos, principalmente con la pérdida en la densidad mineral ósea. Secundariamente, se comparó la detección y cuantificación de *A. actinomycetemcomitans* mediante qPCR con SYBR Green y con sondas TaqMan.

Metodología: Se realiza un estudio de diseño descriptivo de corte transversal, en la Facultad de Odontología de la Universitat de Barcelona. Se realizaron exploraciones bucales clínicas y radiológicas, así como la recolección de muestras microbiológicas de placa subgingival, en un grupo de 76

mujeres postmenopáusicas. Además, se obtuvieron los datos de las densitometrías óseas de estas mujeres, para determinar su nivel de densidad mineral ósea. La detección de *A. actinomycetemcomitans* se realizó mediante qPCR, con el uso de SYBR Green y con sondas TaqMan para las muestras de placa subgingival recolectadas y posteriormente se realizó la comparación entre ambos métodos.

Resultados: Las bacterias periodontales de mayor prevalencia fueron *T. forsythia*, *P. intermedia* y *C. rectus*, las cuales fueron detectadas en un 100% de las muestras, seguido de *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, con 98,7% de las muestras en ambos casos. Sin embargo, *P. gingivalis* solo se pudo cuantificar en un 84,2% de las muestras; en un 14,5% el valor obtenido estuvo por debajo del límite de cuantificación. La bacteria con la menor prevalencia en este estudio fue *A. actinomycetemcomitans*, detectada en un 73,7% de las muestras. Se detectó periodontitis en un 47,9% de los casos y alteraciones en la densidad mineral ósea en un 78,6% de las mujeres (osteopenia u osteoporosis). Al correlacionar periodontitis con alteraciones en la densidad mineral ósea, no se encontró asociación entre estas variables

($p=0,522$). Por el contrario, entre periodontitis y el nivel de higiene oral se encontró una correlación significativa ($p=0,003$), al igual que entre periodontitis y necesidad de tratamiento (0,001). Al correlacionar la distribución de las bacterias periodontopatógenas estudiadas, de acuerdo a la presencia o ausencia de periodontitis, y con alteraciones en la densidad mineral ósea, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Discusión: La presencia de periodontopatógenos en casi todas las mujeres no tuvo relación con la presencia de periodontitis o de osteoporosis en ellas. Según los resultados de este estudio, la presencia de osteoporosis u osteopenia no influye en la prevalencia de periodontitis en mujeres post menopaúsicas. Además, los resultados obtenidos indican la adecuación del uso de SYBR Green en la PCR en tiempo real, frente al uso de sondas TaqMan, en la cuantificación de *A. actinomycetemcomitans* en muestras subgingivales, cuando se deseen reducir costes.

Conclusión: Las mujeres sanas, no estaban libres de la presencia de los patógenos orales; por lo tanto, la aparición de estas especies no es suficiente para definir la enfermedad.

Se necesita examinar más a fondo la influencia de los posibles factores de confusión para periodontitis y osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, para determinar si la detección de bacterias periodontopatógenas específicas podrían ser utilizadas como marcador diagnóstico de la enfermedad periodontal.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ENFERMEDAD PERIODONTAL

2.1.1. Definición

Dentro del grupo de las enfermedades periodontales, es posible encontrar dos enfermedades muy frecuentes. La primera es la ***gingivitis***, que se define como la inflamación de la encía, en el que la fijación o adhesión del tejido conectivo al diente permanece igual y la inflamación se limita sólo al compartimiento de los tejidos blandos del epitelio gingival y el tejido conectivo. Ésta desaparece cuando se logra un buen control de la placa dental, siendo su efecto completamente reversible. La segunda enfermedad es la ***periodontitis***, definida como la inflamación de los tejidos de soporte del diente, con pérdida progresiva de la fijación y destrucción ósea (Lindhe et al. 2009).

2.1.2. Etiología de la enfermedad periodontal

La periodontitis se considera una infección multifactorial suscitada por un complejo de bacterias que interactúan con los tejidos del huésped y que causan la liberación de una amplia gama de citoquinas inflamatorias, quimioquinas y mediadores, algunos de los cuales

lideran la destrucción de las estructuras periodontales, incluyendo los tejidos de soporte del diente, hueso alveolar y ligamento periodontal (Holt & Ebersole 2005). Sin embargo, la presencia de bacterias no es suficiente para causar la enfermedad. El inicio y progresión de la enfermedad periodontal requiere que ocurran simultáneamente varios factores: i) la virulencia del patógeno periodontal; ii) que el medio ambiente local sea propicio para el desarrollo de estos microorganismos; y iii) que el huésped sea susceptible. Sin embargo, a estos factores se han agregado posteriormente otros factores de riesgo genéticos y adquiridos (Teles et al. 2013).

En las pasadas décadas se ha producido un aumento en el conocimiento de la etiología y patogénesis de la enfermedad periodontal. Parte de este nuevo conocimiento se debe al uso de técnicas de biología molecular, que permiten detectar la presencia de bacterias antes no detectables con métodos de cultivo tradicionales. Además, en 1990, se propuso el potencial rol de los virus en la etiología de la periodontitis (Teles et al. 2013).

Otro de los avances en este campo se debe al cambio en la concepción de que la enfermedad periodontal está causada por un *biofilm*, más

que por una bacteria en estado planctónico. Al introducir este concepto de *biofilm*, se introduce un concepto ecológico en el que se estudia la adquisición y maduración de la microbiota oral (Teles et al. 2013).

Los *biofilms* orales están considerados los agentes etiológicos de las enfermedades bucales más importantes. Las lesiones gingivales y periodontales son el resultado de respuestas inflamatorias inducidas en parte por este *biofilm* oral que involucran tanto el sistema inmune innato como el adaptativo. La inflamación que se limita sólo a la encía es el resultado de una simbiosis balanceada entre el *biofilm* y los tejidos del huésped, mientras que la periodontitis es el resultado de la ruptura de esta simbiosis. Se especula además, que incluso las formas más comunes de las enfermedades periodontales corresponden a fenotipos prácticamente análogos de diferentes vías patogénicas, las cuales se inician por productos del *biofilm*, de los que sólo unos pocos llevan a la destrucción de los tejidos en huéspedes susceptibles (Dentino et al. 2013).

La mayoría de las especies asociadas con la periodontitis son anaerobios obligados, como por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra* y *Fusobacterium nucleatum* o

anaerobios facultativos tales como *Campylobacter rectus* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que por lo general se encuentran en la comunidad madura de la placa dental. A pesar de que estas especies son más comunes y frecuentes en personas con periodontitis que en sujetos sanos, hay diferencias individuales en las combinaciones de especies y cantidades en las que se presentan en la placa dental (Karched et al. 2015).

2.1.3. El *biofilm* oral

Los *biofilms* o biopelículas son comunidades de microorganismos que se adhieren los unos a los otros, así como a superficies (superficies inertes o tejidos vivos) e interfaces (Dentino et al. 2013). Estos microorganismos crecen embebidos en una matriz extracelular, secretada por ellos mismos, que está constituida principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de los microorganismos que constituyen el *biofilm* (Lasa et al. 2005).

La placa dental constituye un claro ejemplo de *biofilm* oral, que recubre las superficies dentales y se origina a partir de la precipitación de proteínas salivales, como la mucina y ciertas

proteínas ricas en prolina. La posterior colonización bacteriana y formación del *biofilm* sigue un patrón establecido a través de interacciones específicas adhesina-receptor, que median la adhesión de ciertas bacterias orales a la película. Los dientes, a su vez, facilitan la formación del *biofilm*, al ser superficies rígidas que no sufren descamación y están expuestas a un medio rico en microorganismos. La formación del *biofilm* se inicia con la adhesión de estreptococos, actinomicetos y *Veillonellae*. A partir de ese momento, otras bacterias se van uniendo sucesivamente al desarrollo de la placa dental, la cual evoluciona gradualmente hacia su comunidad clímax.

Según la localización, el *biofilm* adopta diferentes nombres (Lindhe et al. 2009):

- Placa supragingival, localizada en la proximidad del margen gingival.
- Placa subgingival, localizada en el interior del surco gingival o bolsa periodontal, bajo el margen de la encía
- Placa proximal, localizada en los espacios interproximales.
- Placa de fosas y fisuras, localizada en las superficies oclusales.

2.1.4. Microbiología de la enfermedad periodontal

El microambiente subgingival de la bolsa periodontal se caracteriza por una gran diversidad de especies, lográndose aislar más de 300 en diferentes individuos o 40 incluso en la misma zona de un mismo individuo. Sin embargo, sólo unas pocas de estas especies se asocian con la enfermedad periodontal (Sanz et al. 2004).

En 1996, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*, fueron oficialmente incluidos como agentes etiológicos de la periodontitis (Sanz et al. 2004). Actualmente, se han identificado otros patógenos bacterianos en el *biofilm* subgingival y se han relacionado con la enfermedad periodontal. Además de los tres ya citados, estos patógenos son: *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra* (previamente *Peptostreptococcus micros*) y *Streptococcus intermedius* (Dentino et al. 2013).

Por otro lado, se ha demostrado a través de cultivos, pruebas inmunológicas y de DNA, que algunas de estas especies se encuentran asociadas entre sí. Estas asociaciones o complejos microbianos han sido relacionados con la secuencia de colonización en la superficie del diente, así como con la severidad de ésta.

La organización de las bacterias en el *biofilm* sigue algunas asociaciones específicas entre especies. Así, Socransky y colaboradores en 1998 (Socransky et al. 1998), publicaron un artículo en el que describían la presencia de grupos microbianos específicos dentro de la placa bacteriana, reconociendo 6 complejos bacterianos mayores o grupos de especies bacterianas íntimamente asociadas.

El primero, llamado complejo rojo y formado por un grupo estrechamente relacionado, consiste en *T. forsythia*, *P. gingivalis*, y *T. denticola*.

El segundo complejo denominado naranja, consiste en un grupo central fuertemente relacionado, que incluye miembros de *Fusobacterium nucleatum/periodonticum* subespecies, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Peptoestreptococcus micros*. Especies asociadas con este grupo son: *Eubacterium nodatum*, *C. rectus*,

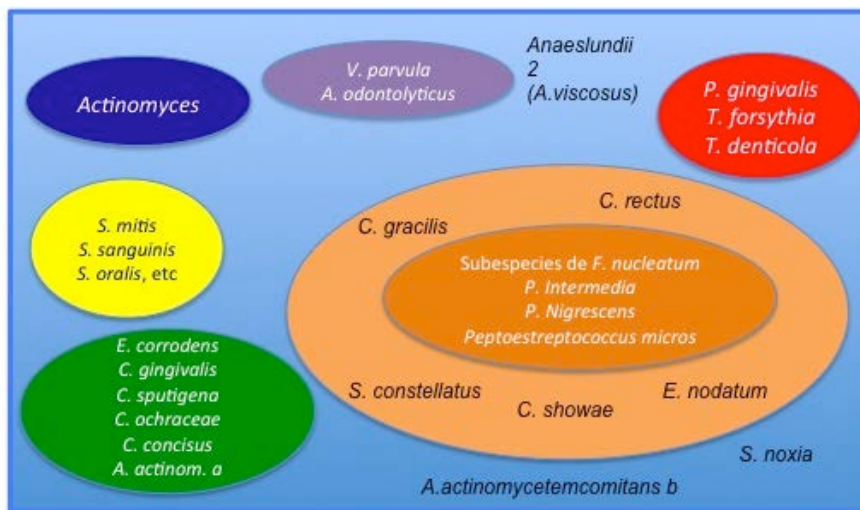
Campylobacter showae, *Streptococcus constellatus* y *Campylobacter gracilis*.

El tercer complejo o complejo amarillo lo constituyen *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus intermedius*.

El cuarto complejo, denominado verde, está formado por tres especies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *A. actinomycetemcomitans* serotipo a. El quinto complejo o complejo violeta, está formado por *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.

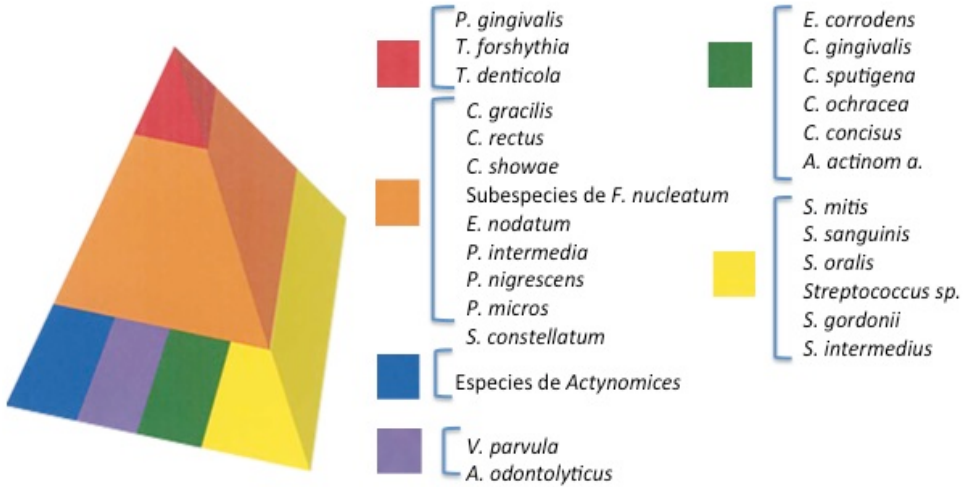
Finalmente, el último complejo, denominado azul, está conformado por especies de *Actinomyces* (Socransky et al. 1998; Lindhe et al. 2009) (ver Figura 1). Todas las asociaciones que describió Socransky son robustas, a excepción del movimiento ocasional de algunas especies.

Figura 1. Representación de los complejos microbianos adaptada de Socransky y colaboradores (Socransky et al. 1998).



Los colonizadores iniciales de la superficie dentaria son especies de *Actinomyces*, complejo amarillo, complejo verde y violeta, cuyo crecimiento suele preceder a los complejos rojo y naranja. Por otro lado, el complejo rojo aparece más tarde en el desarrollo del *biofilm* y se asocia con bolsas periodontales con compromiso más severo (Holt & Ebersole 2005; Socransky et al. 1998). El complejo amarillo que comprende los estreptococos, está asociado con surcos relativamente sanos, mientras que el complejo naranja se identificó en población transicional entre salud y enfermedad periodontal severa (Figura 2).

Figura 2. Pirámide de la asociación entre especies bacterianas subgingivales, adaptada de Socransky y Haffajee (Socransky and Haffajee. 2002)



La base de la pirámide está compuesta por especies que colonizan la superficie dentaria y proliferan en las primeras etapas. El complejo naranja se convierte posteriormente en el más numeroso, y es un puente entre los colonizadores tempranos y el complejo rojo, el cual aumenta en número en las etapas más tardías del desarrollo de la placa subgingival.

Se ha encontrado una reducción en el número de bacterias del complejo rojo y naranja a los 12 meses después de iniciado el tratamiento periodontal, correspondiendo estos cambios a características propias de un tratamiento efectivo (Socransky et al. 1998). Finalmente, estos autores señalaron que los miembros del complejo rojo rara vez se encuentran en ausencia de miembros del complejo naranja. Y que al aumentar la colonización del complejo naranja, más zonas se colonizaron por un número creciente de bacterias del complejo rojo (Socransky et al. 1998).

2.1.4.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans es una bacteria nutricionalmente estricta, pequeño bacilo gram negativo, de extremos redondeados, anaerobia facultativa, inmóvil y no formadora de esporas, cuyo tamaño es de 0.4-0.5 μm x 1.0-1.5 μm . Forma colonias convexas pequeñas con un centro en forma de estrella, cuando se le cultiva en agar sangre. Su pared celular presenta endotoxinas (LPS), pero también es un productor de una variedad de enzimas y toxinas, que le dan gran virulencia, como la leucotoxina, colagenasas, epiteliotoxinas, bacteriocinas (Lindhe et al. 2009).

La inclusión de *A. actinomycetemcomitans* en la lista de patógenos periodontales se basó en estudios de prevalencia en sujetos sanos y con enfermedad periodontal, la presencia de determinantes bacterianos de virulencia que tienen el potencial de promover la enfermedad, y la presencia o ausencia de anticuerpos circulantes en pacientes afectados y en grupos sanos (Dentino et al. 2013)

La evidencia indica que tiene un rol etiológico como patógeno periodontal verdadero, principalmente en relación con la periodontitis agresiva (Sanz et al. 2004).

Falta determinar el rol de otras bacterias ya sean cultivables o no, en combinación con *A. actinomycetemcomitans* (Henderson et al. 2010).

A. actinomycetemcomitans puede agruparse en tres líneas filogenéticas:

- Cepas serotipo b.
- Cepas serotipo c.
- Cepas serotipo a, d, e, f.

La distribución de estos serotipos parece estar en relación a la localización geográfica y el grupo étnico (Brígido et al. 2014). Estos serotipos no parecen ser un indicador directo de la virulencia de la cepa (Henderson et al., 2010). En la cavidad oral, los serotipos a y b

son los más frecuentes en caucásicos, siendo el serotipo b el más frecuentemente asociado con la periodontitis agresiva localizada y, por lo tanto, el más virulento y patogénico (Brígido et al. 2014; Sanz et al. 2004). Sin embargo, la correlación exacta entre los diferentes serotipos y condiciones periodontales, aún no se establece con claridad (Brígido et al. 2014).

2.1.4.2. *Porphyromonas gingivalis*

Es un bacilo gram negativo, anaerobio estricto, no formador de esporas y productor de colonias pigmentadas negras. Su morfología varía entre cocoide y bacilar corta. Pertenece al género *Porphyromonas* de la familia *Bacteroidaceae*. Crece en medio sólido formando colonias suaves, brillantes y convexas, de 1-2 mm de diámetro (Lindhe et al. 2009; Holt & Ebersole 2005; Sanz et al. 2004; Olsen et al. 1999).

El hábitat normal de *P. gingivalis* es la cavidad oral y principalmente el surco gingival. A pesar de ser muy frágil y nutricionalmente estricto, puede transmitirse entre individuos. El ecosistema subgingival provee un ambiente ideal para estas especies, ya que el potencial redox es bajo y se reduce aún más en la enfermedad,

mientras que los nutrientes endógenos son ricos en péptidos y aminoácidos (Olsen et al. 1999). *P. gingivalis* interactúa con el epitelio del surco gingival y potencialmente con los tejidos duros y blandos adyacentes, desempeñando un rol significativo en la progresión de la periodontitis crónica (Duncan, 2003). *P. gingivalis* puede invadir localmente los tejidos periodontales y evadir los mecanismos de defensa del huésped. Para esto, utiliza factores de virulencia que causan la desregulación de las respuestas inmunes e inflamatorias innatas (Mysak et al. 2014). Además, se adhiere rápidamente a la superficie de la célula huésped, perturbando las células epiteliales, llegando a la internalización e incorporación de la bacteria (Mysak et al. 2014). Eventualmente, los procesos inflamatorios e inmunes causan la destrucción de los tejidos circundantes y la pérdida de soporte de los dientes, lo que resulta finalmente en la pérdida dentaria (Mysak et al. 2014).

P. gingivalis parece aumentar en frecuencia a mayor edad, teniendo además una alta correlación con la progresión de la enfermedad, la gravedad y la pérdida de hueso (Olsen et al. 1999).

2.1.4.3. *Campylobacter rectus*

C. rectus es un patógeno periodontal, vibrión móvil gram negativo y anaerobio (Lindhe et al. 2009). Se ha encontrado en niveles y proporciones elevados en periodontitis iniciales y establecidas, al comparar con zonas periodontales sanas o con gingivitis. Esta bacteria participa en la iniciación de la periodontitis mediante el incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias (Macuch & Tanner 2000).

Al menos siete especies de *Campylobacter* han sido localizadas en el *biofilm* subgingival. *C. rectus* fue una de las especies de *Campylobacter* dominantes en el estudio de Macuch y Tanner (Macuch & Tanner 2000), seguida de *C. gracilis*. En este estudio también se detectó *C. showae* en elevados niveles, procedentes de sitios gingivales sanos.

Los niveles de *C. rectus* y *C. gracilis* son elevados en la enfermedad periodontal moderada o avanzada, al compararse con zonas subgingivales sanas, lo que sugiere su directa asociación con la enfermedad periodontal (Macuch & Tanner 2000).

C. rectus produce una variedad de factores de virulencia que pueden inducir la expresión de varios mediadores inflamatorios favoreciendo la periodontitis (Yokoyama et al. 2008).

2.1.4.4. *Tannerella forsythia*

Es una bacteria anaerobia, bacilo gram negativo fusiforme, muy pleomorfa, no pigmentada y sacarolítica. Su hábitat es el surco gingival, y habitualmente se aísla de bolsas periodontales. Además, se detecta en tonsilas, dorso de la lengua y saliva.

Hasta hace poco no era considerado un patógeno periodontal verdadero, ya que sus requerimientos nutricionales estrictos dificultan su crecimiento en medio de cultivo (Lindhe et al. 2009).

Se ha demostrado que expresa un número de actividades enzimáticas y proteolíticas que podrían contribuir a su habilidad por competir eficazmente en el complejo biofilm subgingival. Además, presenta actividad apoptótica, ya que al invadir la bolsa periodontal junto a los otros miembros del complejo rojo, podrían ser atacados por las células defensivas del huésped, donde la actividad inductora de la apoptosis podría resultar en la eliminación de las células inmunes o preinmunes del huésped. Esto favorecería el desarrollo de la colonización bacteriana y el potencial de progresión rápida de la enfermedad (Holt & Ebersole 2005).

2.1.4.5. *Fusobacterium nucleatum*

Es una bacteria gram negativa, bacilo anaerobio fusiforme. Es una de las primeras bacterias gram negativas en establecerse en el *biofilm*, siendo un componente cuantitativamente dominante en el *biofilm* (Signat et al. 2011).

Este microorganismo es un componente estructural clave, tanto en la placa dental normal como en la asociada a la enfermedad periodontal (Duncan 2003). Es importante en la colonización del *biofilm*, así como en el establecimiento de condiciones necesarias para el establecimiento de los anaerobios, siendo considerado un colonizador intermedio o “puente” que facilita la coagregación entre especies (Kolenbrander et al. 2006; Lindhe et al. 2009; Signat et al. 2011).

Se ha aislado de otras localizaciones extraorales como cerebro, sangre, hígado y pulmones, además de ser comúnmente aislado de infecciones intrauterinas y asociado a complicaciones en el embarazo y partos prematuros (Signat et al. 2011).

F. nucleatum tiene una baja habilidad para degradar proteínas o sustratos sintéticos, así como una capacidad limitada para degradar proteínas estructurales o vasculares, por lo que su papel en la

degradación del tejido conjuntivo parece ser limitada (Eley & Cox 2003). Con respecto a la susceptibilidad de esta bacteria, es un microorganismo muy sensible, cuyo crecimiento es fácilmente inhibido por varios antibióticos (Rams et al. 2014; Signat et al. 2011).

2.1.4.6. *Prevotella intermedia*

Bacteria gram negativa, anaerobia, no esporulada, que se presenta en forma de bacilos cortos pleomórficos. Se clasifica como una bacteria pigmentada, ya que forma colonias brillantes y lisas de color gris, café claro o negro cuando se cultiva en agar sangre.

Presenta un amplio rango de factores de virulencia, involucrados en la adhesión y proteólisis, entre otras. Las variables más importantes en la adaptación y patogenicidad de esta bacteria son la adhesión a los tejidos del huésped, o a las bacterias circundantes, y la competencia con las bacterias vecinas. Además, muestra una destacada actividad de recombinación, mediante la cual puede obtener genes patógenos a través de transferencia génica (Ruan et al. 2015).

Tiene proteasas capaces de degradar tejidos, fluidos tisulares y proteínas inmunes. Además, esta bacteria produce un fuerte ácido y

tiene actividad fosfatasa alcalina. Todas estas actividades son capaces de reducir la efectividad del sistema inmune y las defensas inflamatorias (Eley & Cox 2003).

Esta bacteria ofrece además, resistencia a ciertos antibióticos, principalmente a amoxicilina y doxiciclina, pudiendo ser un reservorio de genes de resistencia a dichos antibióticos y una potencial fuente de su propagación a otras especies orales (Rams et al. 2014; Duncan 2003).

2.1.5. Criterios diagnósticos

Los tradicionales criterios diagnósticos clínicos de enfermedad periodontal utilizados incluyen: profundidad del sondaje, sangrado al sondaje, niveles clínicos de inserción, índice de placa y nivel del hueso alveolar determinado mediante radiografía. Estos procedimientos diagnósticos tradicionales tienen ventajas y desventajas. Dentro de las ventajas, estos diagnósticos son fáciles de realizar, coste-efectivos y relativamente no invasivos. Entre las desventajas se encuentra el hecho que muestran la historia o evolución de la enfermedad, pero no su estado real actual. Estos parámetros clínicos no identifican la actividad de la enfermedad que se presenta actualmente en sitios

individuales específicos, ni tampoco pueden predecir la futura pérdida de inserción en diferentes sitios (AlRowis et al. 2014; Dentino et al. 2013).

Los criterios diagnósticos, así como los signos y síntomas más habituales de la enfermedad periodontal se muestran en la Tabla 1 (Dentino et al. 2013).

Tabla 1. Signos, síntomas y factores modificadores de enfermedad periodontal (Adaptado de Dentino et al. 2013).

SIGNOS O SÍNTOMAS		MODIFICADORES	
a	Color de la encía (contorno, textura, volumen)	a	Edad de inicio (temprano-adulto)
b	Necrosis de la encía	b	Progresión (crónica-rápida)
c	Alargamiento gingival	c	Respuesta al tratamiento (estable-recurrente)
d	Recesión gingival	d	Severidad (leve- moderado-severo)
e	Sangrado a la provocación		Extensión (localizado-generalizado)
f	Sangrado al sondaje		
g	Bolsas		
h	Pérdida de inserción		
i	Pérdida ósea		
j	Movilidad del diente		

k	Migración lateral	
l	Dolor	

Los avances en el diagnóstico de enfermedades periodontales y orales se encaminan hacia el desarrollo de métodos en los que el riesgo periodontal pueda ser detectado y cuantificado objetivamente.

Por ejemplo, con determinados biomarcadores en saliva o en fluido crevicular que puedan seleccionar y diferenciar la actividad en los sitios inflamados, prediciendo incluso la futura destrucción tisular (AlRowis et al. 2014; Taba et al. 2005).

2.1.6. Clasificación

La clasificación que se usa en la actualidad como consenso mundial es la “Clasificación de la enfermedad periodontal y condiciones periodontales” presentada el año 1999, en el Workshop Internacional de Periodoncia (Tabla 2). Ésta difiere del sistema de clasificación que se usaba hasta ese entonces, establecido en el Workshop Mundial de 1989, que contenía criterios poco claros de diagnóstico y daba demasiada importancia a la edad del paciente, entre otros aspectos (Armitage 1999).

Tabla 2. Clasificación de enfermedad y condiciones periodontales (Armitage 1999).

I. ENFERMEDAD GINGIVAL
a. Enfermedad gingival inducida por placa dental
b. Lesión gingival no inducida por placa
II. PERIODONTITIS CRÓNICA
a. Localizada
b. Generalizada (más de 30% de zonas involucradas)
III. PERIODONTITIS AGRESIVA
a. Localizada
b. Generalizada (más de 30% de zonas involucradas)
IV. PERIODONTITIS COMO MANIFESTACIÓN DE ENFERMEDAD SISTÉMICA
a. Asociada con desórdenes hematológicos
b. Asociada con desórdenes genéticos
c. No especificado
V. ENFERMEDAD PERIODONTAL NECROTIZANTE
a. Gingivitis ulcerativa necrotizante
b. Periodontitis ulcerativa necrotizante
VI. ABSCESOS DEL PERIODONTO
a. Absceso gingival
b. Absceso periodontal
c. Absceso pericoronal
VII. PERIODONTITIS ASOCIADA CON LESIÓN ENDODÓNTICA
a. Lesión combinada periodóntica-endodóntica
VIII. DEFORMIDADES O ALTERACIONES DEL DESARROLLO O ADQUIRIDAS
a. Factores relacionados con el diente que modifican o predisponen enfermedades gingivales o periodontales inducidas por placa dental
b. Deformidades o condiciones mucogingivales alrededor del diente
c. Deformidades o condiciones mucogingivales en espacios desdentados
d. Trauma oclusal

2.1.7. Técnicas de detección de periodontopatógenos

Los procedimientos basados en técnicas de cultivo son los más frecuentemente utilizados en la detección de periodontopatógenos, y sirven como referencia en la evaluación de nuevos métodos de detección microbiana.

Los cultivos de células bacterianas son capaces de proporcionar medidas cuantitativas de los patógenos periodontales y de determinar su susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*. Sin embargo, dentro de las limitaciones de los cultivos se encuentran la dificultad en el crecimiento de algunas especies, o incluso la imposibilidad de crecer en algunos casos. Su umbral de detección es bastante alto (10^3 - 10^4 ufc/ml), lo que limita su sensibilidad para detectar un bajo número de bacterias. Además, para realizar los cultivos se requiere de personal experimentado y precisa tiempo (Morillo et al. 2003).

Entre varios procedimientos utilizados para detectar patógenos orales, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una herramienta poderosa, debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad. Esta técnica se basa en la amplificación exponencial de una región de DNA flanqueada por un par de oligonucleótidos, llamados *primers*, específicos para la especie objetivo. La presencia

de los productos de amplificación indica la presencia del microorganismo objetivo (Suzuki et al. 2005; Morillo et al. 2003). Dentro de sus ventajas, la PCR cuenta con los mejores límites de detección, identificando un número bajo de células, y no muestra reactividad cruzada en óptimas condiciones de amplificación (Morillo et al. 2003). Sin embargo, la cuantificación con PCR convencional es difícil, ya que las reacciones se evalúan después de la amplificación completa del gen, pudiendo además, afectar en la cuantificación contaminaciones o sustancias que interfieran en ésta, lo que conlleva a la pérdida de datos que pueden ser valiosos (Suzuki et al. 2005).

La PCR en tiempo real (*real time PCR*) o qPCR se diferencia de la PCR convencional en que permite monitorizar en cada ciclo la aparición del DNA producto de la reacción mediante el uso de fluoróforos. Cada vez que se realiza una copia del DNA molde se libera fluorescencia, por lo que ésta es proporcional a la cantidad de DNA generado. La qPCR proporciona la posibilidad de cuantificar la cantidad inicial de DNA diana presente en la muestra, brindando sensibilidad, especificidad y velocidad en la detección (Mackay 2007). En la qPCR, cuantificar es sinónimo de determinar el número de copias de un gen diana presente en la muestra. Para esto, es necesario utilizar una

recta patrón obtenida mediante un banco de diluciones de una solución de DNA del patógeno, de concentración conocida.

Los avances en la síntesis de sondas fluorogénicas y el desarrollo de instrumentos para el monitoreo continuo de la fluorescencia han facilitado el desarrollo de la qPCR para la detección específica y la cuantificación de los productos bacterianos amplificados.

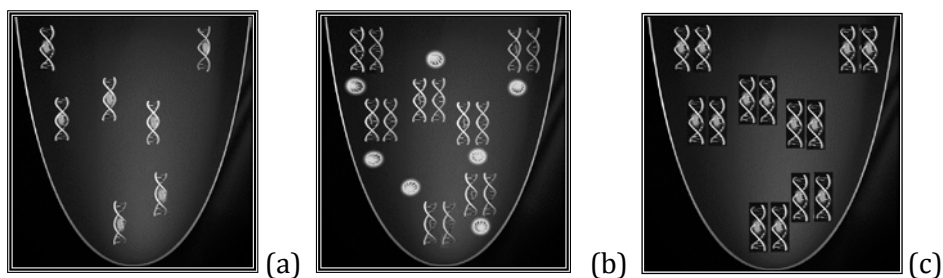
2.1.7.1. Cuantificación bacteriana mediante qPCR

2.1.7.1.1. SYBR Green

El SYBR Green es una tinción usada para detectar productos de PCR uniéndose a las dobles cadenas de DNA formadas durante la amplificación. El proceso es el siguiente:

- ✓ Cuando el SYBR Green es agregado a la muestra, éste se une inmediatamente a todo el DNA de doble cadena.
- ✓ Durante la PCR, la polimerasa amplifica la secuencia diana, lo que crea el producto de PCR o “amplicon”. El SYBR Green se une a cada nueva copia de DNA.
- ✓ El resultado es un incremento en la intensidad de la fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad de producto de la PCR que se haya producido. En la figura 3 se esquematiza el proceso.

Figura 3. Representación de la acción del SYBR Green durante una fase de amplificación de la PCR (Adaptado de Applied Biosystems 2010).



(a) El SYBR Green inmediatamente se une a las dobles cadenas de DNA. (b) Durante la PCR, se amplifican las cadenas. (c) El SYBR Green se une a cada nueva copia de DNA.

Dentro de los métodos de cuantificación bacteriana mediante PCR, el método en que se utiliza SYBR Green, se considera menos específico que cuando se utiliza una sonda de hidrólisis. Sin embargo, esta metodología es más económica que el uso de sondas de hidrólisis, pero requiere de una optimización cuidadosa previa (Morillo et al. 2003).

2.1.7.1.2. Sondas TaqMan

Las sondas TaqMan son sondas fluorescentes de oligonucleótidos, basadas en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa. Este sistema consiste en transferir energía desde un donador o *reporter* fluorescente a un aceptor o *quencher*.

El reportero fluorescente y el *quencher* están en estrecha unión hasta que la sonda hibrida al gen diana. Al hibridarla, ocurren cambios conformacionales tanto en el reportero como en el *quencher*, lo que permite que la Taq polimerasa rompa la unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Mientras no se produzca la unión de la sonda al blanco, no habrá amplificación ni fluorescencia (Suzuki et al. 2005; Livak et al. 1995). Su principal ventaja es la alta especificidad que proporcionan las sondas, lo que permite distinguir entre las numerosas especies estrechamente relacionadas de la cavidad oral (Atieh 2008).

2.2. MENOPAUSIA

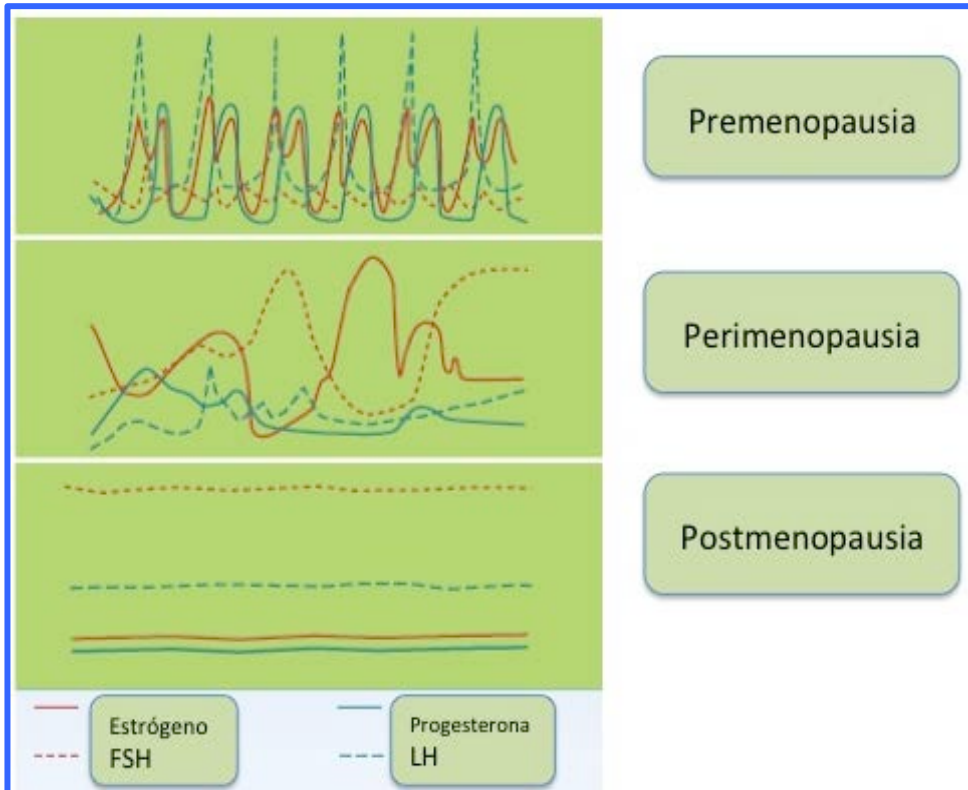
2.2.1. Definición

La menopausia se define como el cese permanente de la menstruación que se produce de manera natural o inducido por cirugía, quimioterapia o radiación. La menopausia natural es reconocida después de 12 meses consecutivos sin períodos menstruales y sin asociación a causas fisiológicas como la lactancia, o a causas patológicas, siendo este evento normal en todas las mujeres (Dutt et al. 2013; Edwards et al. 2013; Nelson 2008).

El cese de la menstruación no es más que uno de los síntomas del climaterio, el final del potencial reproductivo en la mujer, el cual se acompaña de cambios endocrinos, somáticos y psicológicos concomitantes (Edwards & Li 2013).

La menopausia resulta de la disminución de la secreción de las hormonas ováricas, estrógeno y progesterona, que se produce cuando se agota el almacén de folículos ováricos (Figura 4) (Nelson 2008).

Figura 4. Cambios hormonales en el periodo de transición a la menopausia (Adaptado de National Institute on Aging 2008).



Los niveles hormonales de estrógeno, progesterona, hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), en el periodo de pre y perimenopausia, se caracterizan por niveles muy irregulares, mientras que en la postmenopausia, los niveles de estrógeno y progesterona bajan notoriamente y en forma definitiva.

Dentro de los cambios endocrinos, se conoce que poco después de la menopausia hay pocos folículos restantes. Con el tiempo, los niveles de hormona folículo estimulante suben de 10 a 20 veces, y los niveles de la hormona luteinizante se triplican. Éstas llegan a su nivel máximo de 1-3 años después de la menopausia, disminuyendo luego gradualmente. Recordemos que el ovario posmenopáusico segrega principalmente androstenediona y testosterona (Edwards & Li 2013). Después de la menopausia, la concentración de androstenediona cae casi a la mitad, gran parte de ésta, se deriva de las glándulas suprarrenales, y sólo una pequeña cantidad es secretada por el ovario.

Los niveles de dehidroepiandrosterona y sulfato de dehidroepiandrosterona, originarios de la glándula suprarrenal, disminuyen marcadamente con la edad; en la década después de la menopausia los niveles circulantes de dehidroepiandrosterona son 70% menos y los niveles de sulfato de dehidroepiandrosterona son alrededor del 74% menos que los niveles alcanzados en la vida adulta joven.

Con respecto a la producción de testosterona, ésta disminuye en un 25% después de la menopausia, esto ocurre a pesar de que el ovario

posmenopáusico segrega más testosterona que el ovario premenopáusico.

Cuando los folículos han desaparecido y el nivel de estrógenos disminuye, las concentraciones elevadas de gonadotropinas conducen al remanente del tejido estromal del ovario a un aumento de la producción de testosterona. Sin embargo, la cantidad total de testosterona producida se reduce debido a la disminución de la fuente primaria, ya que la conversión periférica de androstenediona se reduce en un 60% (Edwards & Li 2013).

2.2.2. Etapas

En el año 2001, el grupo de expertos “*Stages of Reproductive Aging Workshop*”, definen los periodos o etapas en la vida de la mujer.

Dentro de estas etapas se encuentran (Edwards & Li 2013):

- ***Etapas reproductiva:*** etapa comprendida entre la menarquía (primer periodo menstrual) hasta el inicio de la perimenopausia (cuando el ciclo menstrual se vuelve variable).
- ***Transición a la menopausia:*** es el momento del aumento de la hormona folículo estimulante y un aumento en la

variabilidad de los tiempos del periodo menstrual, dos ciclos menstruales omitidos con 60 o más días de amenorrea (ausencia de menstruación), o ambos. La transición a la menopausia concluye con el ciclo menstrual final y el inicio de la postmenopausia. Es una transición gradual que comienza alrededor de los 35 años y culmina en la menopausia alrededor de los 51 años. Esta disminución en la función del ovario es evidente por una progresiva declinación en la fecundidad, aumento de los abortos espontáneos e irregularidades menstruales en la segunda mitad de la cuarta década de vida y en los años que siguen (Al-Azzawi & Palacios 2009).

- **Postmenopausia:** se inicia con el periodo menstrual final, aunque no se reconoce hasta después de 12 meses de amenorrea.

Las consecuencias del envejecimiento de los ovarios y la privación del estrógeno resultante tiene muchos efectos fenotípicos en la regeneración y mantenimiento de los tejidos. La homeostasis del colágeno en la piel, los huesos y los ligamentos de apoyo son generalmente afectados. Se produce un adelgazamiento epitelial de la

vagina y del triángulo de la vejiga, que resulta en dispareunia, asociado con sequedad vaginal y aumento en la urgencia y frecuencia urinaria (Al-Azzawi & Palacios 2009).

2.2.3. Manifestaciones clínicas de la menopausia

Entre las manifestaciones clínicas que se pueden presentar durante la menopausia se encuentran (Edwards & Li 2013):

- ***Alteraciones en los patrones menstruales:*** incluyendo anovulación, reducción de la fertilidad, progresando hasta amenorrea.
- ***Inestabilidad vasomotora:*** Sofocos y sudores.
- ***Atrofia de los tejidos genitourinarios***
- ***Síntomas del estado anímico***
- ***Condiciones de salud asociadas con déficit de estrógeno:*** como pérdida ósea, osteoporosis, y un posible incremento en la morbilidad cardíaca.

La plasticidad y transmisión neuronal son vulnerables al déficit de estrógeno, lo que puede resultar en irritabilidad, estados de ánimo depresivos, insomnio, falta de concentración y pérdida de la memoria.

Cuanto antes aparece la menopausia, los efectos sobre los factores cognitivos se hacen más profundos, incluso en la incidencia de enfermedad coronaria cardíaca, ya que el estrógeno tiene efectos inductores sobre la sintasa de óxido nítrico y mejora el metabolismo de la lipoproteína, que son mecanismos fundamentales en la promoción de un árbol arterial saludable (Al-Azzawi & Palacios 2009).

2.2.4. Manifestaciones orales en la menopausia

A nivel bucal, durante la menopausia, se produce un adelgazamiento tisular asociado a la disminución de niveles hormonales, lo que implica además, un aumento del dolor oral, xerostomía o que se produzca una inadecuada ingesta nutricional en estas mujeres (Lindhe et al. 2009). Otra de las manifestaciones frecuentes es el aumento de la sequedad oral (López-López et al. 2014).

La sequedad oral es una manifestación común en las personas adultas y de edad avanzada, lo que afecta a las funciones de la cavidad oral, como comer, masticar o deglutir, así como a la calidad de vida. La comida tiene un sabor distinto que cuando se tiene una cantidad normal de saliva, incluso hablar es más difícil.

Esta sequedad oral puede contribuir a la aparición de candidiasis oral, lo que contribuye al empeoramiento de la salud bucal de estas mujeres (Asplund & Aberg 2005; Dutt et al. 2013; Suri & Suri 2014; Meurman et al. 2009).

Las “dinias” son un grupo de síndromes crónicos de dolor focal, con predilección por la zona oral y urogenital. Dentro de este grupo se ha descrito la vulvoestomatodinia, siendo una condición rara, pero que afecta a mujeres postmenopáusicas, produciendo sensación de ardor en las zonas mucosas de ambas regiones (Meurman et al. 2009).

Otro problema muy común en mujeres postmenopáusicas, es la presencia de este ardor, localizado sólo en la mucosa oral, conocido como el síndrome de la boca ardiente (SBA), o también como glosodinia, glosopirosis o estomatodinia. Se caracteriza por ardor intenso y sensación de quemazón que afecta a lengua, labios y encía. A pesar de estos intensos síntomas, generalmente el paciente no presenta ninguna lesión visible. En la práctica, la mayoría de los pacientes con este síndrome son mujeres en el periodo del climaterio, para lo cual no existe un protocolo establecido de tratamiento (Cassol et al. 2014; López-López et al. 2014; Suri & Suri 2014; Dutt et al. 2013; Meurman et al. 2009).

Además, se ha encontrado una leve asociación entre las mujeres postmenopáusicas con baja densidad ósea y una mayor frecuencia de lesiones radiolúcidas periapicales (López-López et al. 2013).

Para las mujeres posmenopáusicas, se recomienda realizar una historia clínica completa, seguido por un examen intraoral exhaustivo, junto con la evaluación completa de las mucosas, examen periodontal y dental, además, de evaluar tanto la cantidad como calidad del flujo salival. Otras pruebas como radiografías, sondaje periodontal y sialometría deben realizarse siempre que sea necesario (Dutt et al. 2013). Por otra parte, para mantener los niveles bajos de placa dental, se deben introducir las ayudas adecuadas de higiene bucal, como el uso de cepillos interproximales, hilo dental y mejorar la técnica de cepillado, junto con el uso de agentes quimioterapéuticos como digluconato de clorhexidina. Además, el uso de pastas dentales, barnices o geles que contienen fluoruros también se aconseja para la prevención de la caries dental, particularmente la radicular, que es más frecuente en este grupo de la población (Dutt et al. 2013).

2.3. OSTEOPOROSIS/OSTEOPENIA

2.3.1. Definición

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica, caracterizada por una pérdida generalizada de masa ósea y el deterioro de la micro-arquitectura, con el consecuente incremento de la fragilidad ósea y la susceptibilidad a fractura. Es la enfermedad metabólica más frecuente en los países occidentales, llegando en España a padecerla más de 3 millones de personas. Se evalúa comúnmente por absorciometría de rayos X de energía dual o densitometría ósea, una tecnología que mide el área cortical y trabecular integrado (bidimensional) en dos zonas estándar: cuello de fémur y columna lumbar, aunque existen estudios que también correlacionan con las medidas obtenidas en mandíbula (Estrugo-Devesa et al. 2013; Drake et al. 2015).

La principal consecuencia de la fragilidad ósea es la fractura, que tiene efectos negativos sobre los individuos y su entorno, ya que generalmente se asocia a una dependencia o discapacidad, llegando incluso a incrementar las tasas de mortalidad en los casos más severos de fractura de fémur o de vértebras (Azagra et al. 2015; Estrugo-Devesa et al. 2013; Edwards & Li 2013; Otomo-Corgel 2012).

El tratamiento se asocia frecuentemente con un enfoque farmacológico; sin embargo, es importante reconocer que para el tratamiento óptimo de la osteoporosis, es importante un enfoque no farmacológicos para limitar el riesgo de fractura. Dentro de las intervenciones no farmacológicas se incluyen limitar el riesgo de caídas, utilizar las técnicas adecuadas al levantarse, mantener una ingesta adecuada de calcio, vitamina D y proteínas, realizar actividad física y ejercicios para mantener o mejorar el equilibrio y la postura, y hacer cambios en el estilo de vida, tales como dejar de fumar y moderar el consumo de alcohol (Drake et al. 2015). De entre los tratamientos farmacológicos considerados, se encuentra el uso de los bisfosfonatos, cuyo uso puede producir en algunos casos osteonecrosis de los maxilares.

Los factores de riesgo asociados a osteoporosis se detallan en la Tabla

3.

Tabla 3. Factores de riesgo para osteoporosis (Adaptada de Otomocorgel 2012).

FACTOR DE RIESGO	MODIFICABLE	CÓMO SE PUEDE MODIFICAR
Sexo	No	
Edad	No	
Menopausia temprana	No	
Pérdida de masa ósea	Si	Tratamiento de la osteoporosis u osteopenia
Delgadez, cuerpo de estructura pequeña	No	
Raza	No	
Falta de calcio	Si	Dieta alta en calcio o vitamina D
Falta de ejercicio	Si	Ejercicio con pesas
Tabaco	Si	Dejar de fumar
Alcohol	Si	Disminuir el consumo de alcohol
Herencia	No	
Enfermedades	Medianamente	Tratamiento
Ciertas medicaciones	Medianamente	Alterar el tratamiento si es factible
Propensión a caer	Medianamente	Fisioterapia, tratamiento neurológico de ser posible.

2.3.2. Criterios diagnósticos densitométricos de osteoporosis

En 1994, la OMS establece los siguientes criterios densitométricos para el diagnóstico de la osteoporosis, y la divide en cuatro categorías (WHO study group 1994):

- **Normal:** DMO entre +1 y -1 del promedio de población adulta joven.
- **Osteopenia:** DMO entre -1 y -2,5 del promedio de población adulta joven.
- **Osteoporosis:** DMO bajo -2,5 del promedio de población adulta joven.
- **Osteoporosis grave:** DMO bajo -2,5 del promedio de población adulta joven y una o más fracturas de tipo osteoporótico.

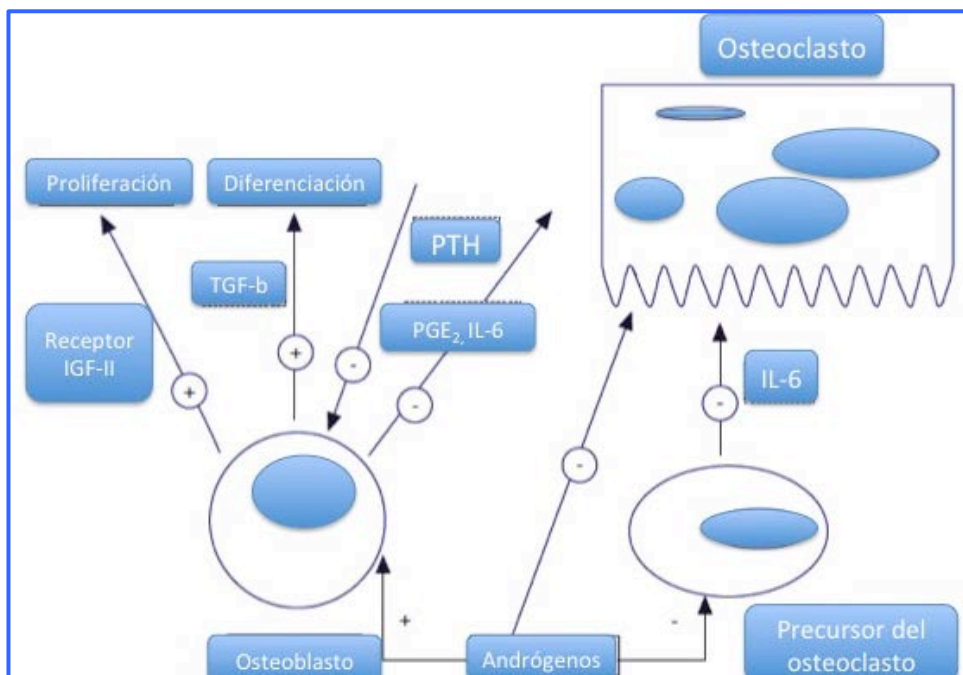
2.3.3. Fisiopatología

La máxima densidad ósea se alcanza entre los 25 y 30 años, y está determinada por múltiples factores, principalmente el factor genético. Además, son importantes los factores nutricionales, la actividad física y factores endocrinos.

El balance en la remodelación ósea se mantiene hasta los 40 años, después se altera el balance entre la formación y la resorción ósea, lo que produce la osteoporosis (WHO study group 1994).

En la osteoclastogénesis son fundamentales la IL-6 e IL-11 y su acción es inhibida por los esteroides sexuales (Figura 5), siendo esto, fundamental en el balance entre actividad osteoblástica y osteoclástica (Picón-César et al. 2000; WHO study group 1994).

Figura 5. Efecto de los esteroides sexuales sobre las células óseas. (Adaptado de Picón-César et al. 2000)



Los andrógenos inhiben la resorción ósea directamente al actuar sobre los osteoblastos, o indirectamente en la osteoclastogénesis.

2.4. MENOPAUSIA, OSTEOPOROSIS Y ENFERMEDAD PERIODONTAL

La osteoporosis representa una importante enfermedad, particularmente en mujeres sobre los 50 años, entre los principales factores que contribuyen en este proceso se encuentra la disminución en los niveles de estrógeno, que acompaña la pérdida de la función ovárica durante la menopausia en la mujer (Estrugo-Devesa et al. 2013; Mundy 2007).

La pérdida de la densidad ósea, marcada por el descenso de los niveles de estrógenos, es el resultado de un marcado incremento en la actividad osteoclástica. Sin embargo, se ha encontrado que los estrógenos no tienen un efecto directo en la actividad del osteoclasto, ya que el efecto en las células clásticas se produce como respuesta a la producción de citoquinas proinflamatorias que se producen a su vez por la retirada de los estrógenos durante la menopausia, siendo por lo tanto, éste el evento responsable de la pérdida característica de la densidad ósea (Mundy 2007).

A nivel bucal, durante la menopausia se produce el descenso de los niveles hormonales que favorecen cambios tisulares como la descamación del epitelio a nivel gingival y osteoporosis. Los cambios

a nivel óseo suelen afectar más el maxilar inferior que el superior (Lindhe et al. 2009).

La osteoporosis así como la periodontitis, son desórdenes comunes en la población de mayor edad (Martínez-Maestre 2012). Se ha sugerido que la mujer posmenopáusica que es susceptible a la osteoporosis también puede ser más susceptible a la enfermedad periodontal. Sin embargo, los estudios que han evaluado esta asociación dan resultados diversos (Martínez-Maestre et al. 2013; Otomo-Corgel 2013; Sultan et al. 2011; Pepelassi et al. 2012; Takahashi et al. 2012).

Por un lado, se ha demostrado que los sujetos con osteoporosis presentan una mayor pérdida de inserción clínica que los sujetos con una densidad mineral ósea normal, lo que sugiere una mayor severidad de la periodontitis. Además, se ha visto que las mujeres con osteoporosis tendrían mayor recesión gingival que las pacientes con densidad mineral ósea normal (Alli et al. 2015; Gondim et al. 2013; Pepelassi et al. 2012; Takahashi et al. 2012). Sin embargo, entre las mujeres con osteopenia y densidad ósea normal, no hay diferencia en cuanto a la pérdida de inserción clínica (Pepelassi et al. 2012).

Se ha encontrado, además, que la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas puede tener una influencia con respecto al tratamiento de la enfermedad periodontal, ya que se ha visto más recurrencia de periodontitis entre las mujeres con osteoporosis (Gomes-Filho et al. 2013).

La terapia de reemplazo hormonal es muy eficaz en revertir el impacto de la menopausia en la densidad ósea, sin embargo, presenta algunos efectos no deseados como aumento en el riesgo de accidente cerebro vascular, trombosis venosa, o posible demencia (Mundy 2007). Se ha estudiado el posible efecto de la terapia de reemplazo hormonal en la salud periodontal de mujeres menopaúsicas, no encontrándose una correlación o diferencias significativas entre las mujeres que usan esta terapia de reemplazo y las que no la usan (Tarkkila et al. 2010). Si se encontró una asociación entre la duración en el uso de estrógenos y el número de dientes totales. A su vez, la porosidad del hueso maxilar, no se asoció significativamente con el número de dientes restante, por lo que se sugiere que el estrógeno puede promover la retención del diente mediante el fortalecimiento de la inserción periodontal que rodea los dientes, pero no a través del aumento de la altura del hueso alveolar ni disminuyendo la porosidad

del hueso (Taguchi et al. 2004), como otros autores han señalado (Reinhardt et al. 1999), siendo también estos resultados diversos.

Por otro lado, algunos autores señalan que la relación entre la periodontitis y la osteoporosis sigue siendo poco clara, sin encontrar diferencias entre un grupo de mujeres postmenopáusicas con historia de fractura por fragilidad y otro grupo control, con respecto a parámetros clínicos o periodontales, e indican que los diferentes resultados que se pueden obtener en los estudios, dependen de la definición o medición que se haga de la osteoporosis o periodontitis, y hasta de la significancia estadística en algunos casos (Martínez-Maestre et al. 2013; Moeintaghavi et al. 2013).

Con respecto al tratamiento odontológico, se sugiere que al producirse un adelgazamiento de los tejidos gingivales y mucosos, se deben tener algunas consideraciones al tratar a estas pacientes, como indicar el uso de cepillos dentales más suaves, uso de pastas dentales con mínima cantidad de partículas abrasivas, uso de enjuagues bucales con baja cantidad o sin alcohol, además de realizar los tratamientos periodontales con el menor trauma posible para los tejidos (Otomo-Corgel 2012).

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

3.1. HIPÓTESIS

Las mujeres postmenopaúsicas con diagnóstico de osteoporosis u osteopenia presentan mayor cantidad de bacterias periodontopatógenas y grados más severos de la enfermedad periodontal.

3.2. HIPÓTESIS NULA

Las mujeres postmenopaúsicas con diagnóstico de osteoporosis u osteopenia no presentan diferencias en cuanto a cantidad de bacterias periodontopatógenas ni grados más severos de la enfermedad periodontal.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Detectar las bacterias periodontopatógenas presentes en la placa subgingival en un grupo de mujeres postmenopáusicas y correlacionarlas con otros parámetros clínicos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la población de mujeres post-menopáusicas según la presencia de osteoporosis u osteopenia, determinando además, otras características clínicas como presencia de enfermedad periodontal, pH salival, nivel de higiene oral y xerostomía.
- Cuantificar 6 bacterias periodontopatógenas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* y

Prevotella intermedia, en muestras clínicas de placa subgingival de un grupo de mujeres post menopaúsicas.

- Relacionar los diferentes antecedentes clínicos obtenidos de las pacientes entre sí.
- Relacionar los datos obtenidos mediante qPCR referente a las bacterias periodontopatógenas y los antecedentes clínicos de los pacientes.
- Comparar dos sistemas de cuantificación mediante PCR para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mediante el uso de SYBR Green y sondas TaqMan.

5. METODOLOGÍA

5. METODOLOGÍA

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio de diseño descriptivo observacional de corte transversal, realizado en la Facultad de Odontología de la Universitat de Barcelona. Las exploraciones clínicas y radiológicas, así como la recolección de muestras microbiológicas, se realizaron en el Hospital Odontológico Universitat de Barcelona (Facultad de Odontología, Campus Universitario de Bellvitge).

5.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE SELECCIÓN

Mujeres postmenopáusicas que se visitaron en el Hospital Odontológico Universitat de Barcelona (Facultad de Odontología, Campus Universitario de Bellvitge).

La realización del estudio cuenta con la aprobación del Comité Ético de la Facultad de Odontología del Campus Universitario de Bellvitge de la Universitat de Barcelona.

Todas las pacientes incluidas en el estudio fueron informadas de los objetivos del presente estudio, además de proporcionarles la información por escrito y aclarar las dudas que tuvieran.

El consentimiento informado fue firmado por todas las participantes del estudio.

Criterios de inclusión

- ✓ Sexo femenino.
- ✓ Mujeres postmenopáusicas.
- ✓ Aceptar participar mediante la firma del consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- ✓ Mujeres que presenten otras enfermedades metabólicas óseas, aparte de la osteoporosis, como osteomalacia u osteodistrofia renal.
- ✓ Mujeres que no acepten participar en el estudio.

5.3. DATOS CLÍNICOS Y MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Ficha clínica y examen bucodental

La ficha clínica se confeccionó en las dependencias del Hospital Odontológico Universitat de Barcelona, donde se registraron datos como nombre y edad.

En el examen bucodental se recabaron los siguientes datos: número de dientes perdidos, índice CAOD (número de dientes cariados, ausentes, obturados), xerostomía (sensación de boca seca), pH salival (determinado mediante tiras reactivas para medir el pH), nivel de higiene oral, presencia de enfermedad periodontal, necesidad de tratamiento periodontal, lesiones en mucosa bucal.

Para el diagnóstico de osteoporosis u osteopenia se determinó mediante una densitometría ósea su nivel de osteopenia y/o osteoporosis a todas las participantes del estudio. Se utilizaron los criterios diagnósticos utilizados por la Organización Mundial de la Salud (WHO study group, 1994). **Normal:** DMO entre +1 y -1 del promedio de población adulta joven. **Osteopenia:** DMO entre -1 y -2,5 del promedio de población adulta joven. **Osteoporosis:** DMO bajo -2,5 del promedio de población adulta joven.

Para el diagnóstico de periodontitis, se utilizaron los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Periodoncia, en el cual la paciente debe tener al menos una zona con sondaje periodontal y pérdida clínica de inserción ≥ 4 mm (Armitage G. 1999).

Obtención de la muestra microbiológica gingival

Las muestras de placa subgingival se obtuvieron previo aislamiento de la zona mediante el uso de rollos de algodón (Luna Roeko nº 2, Dentaltix, Barcelona, España). Se eliminó la placa supragingival, y con el uso de conos de papel estériles (Dentsply Maillefer número 30, Suiza), ubicados a nivel del surco gingival durante 30 segundos, se procedió a recolectar la muestra de placa subgingival. Se recolectaron dos muestras por paciente, una para realizar los cultivos y la otra para realizar extracciones de DNA.

Los conos de papel se almacenaron en tubos *ependorf* estériles. Un cono en solución Ringer y otro en agua destilada estéril, y se congelaron a -80°C hasta su posterior procesamiento en el Laboratorio de Microbiología del Campus Universitario de Bellvitge de la Universitat de Barcelona.

Las bacterias que se buscaron específicamente fueron: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus* y *Prevotella intermedia*, en placa subgingival.

Se utilizaron dos métodos de detección y cuantificación mediante qPCR, que variaron según el tipo de químico utilizado (SYBR Green y sondas de hidrólisis TaqMan), los cuales son descritos posteriormente.

En ambos métodos se utilizaron *primers* específicos para cada bacteria, además del uso de las cepas de cada una de las bacterias estudiadas como controles positivos y para determinar las curvas patrón (Ver Anexos 1A-1G).

5.4. TRABAJO EXPERIMENTAL

5.4.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas utilizadas fueron *P. gingivalis* (ATCC 33277), *A. actinomycetemcomitans* (DSM 8324), *T. forsythia* (ATCC 43037), *C. rectus* (ATCC 33238), *F. nucleatum* (DMSZ 20482) y *P. intermedia* (DSM 20706). Las primeras cinco bacterias se cultivaron en placas de agar sangre (Blood Agar Oxoid N°2, Oxoid, Hampshire, UK), suplementadas con 5% de sangre estéril de caballo (Oxoid, Hampshire, UK), 5,0 mg/mL hemina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 1,0 mg/mL menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% CO₂, y N₂ balanceado) a 37°C, durante

24-72 hrs. Para los cultivos líquidos de *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* se utilizó medio BHI (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Para el caso de *T. forsythia*, se utilizó BHI suplementado con 5,0 mg/mL de hemina (Sigma), 1,0 mg/mL de menadiona (Merck) y 2X NAM (ácido N-acetil murámico, Sigma). Para el caso de *C. rectus*, se utilizó medio TSB suplementado con 0,2% de extracto de levadura; 0,3% peptona; 0,2% C1Na; 0,3% formato de amonio; 0,4% formato sódico; 0,4% de L-aspargina.

P. intermedia se cultivó en agar FAA (Fastidious Anaerobe Agar, LAB M, Lancashire, UK), suplementado con 5% de sangre estéril de caballo (Oxoid, Hampshire, UK). El medio líquido utilizado para el crecimiento de *P. intermedia* fue el medio FAB (Fastidious Anaerobe Broth, LAB M, Lancashire, UK).

5.4.2. Extracción de DNA

La extracción del DNA de las muestras obtenidas de placa subgingival con puntas de papel, así como de las cepas control, se efectuó con el kit de extracción DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones y el protocolo para bacterias gram negativas propuesto por el fabricante.

Protocolo utilizado para extracción de DNA

- ✓ Primero se hace vórtex durante 2-3 min de los tubos con las puntas de papel, para que todo el material adherido a la punta se libere en el agua destilada.
- ✓ Luego, se retira la punta de papel, y se centrifuga por 10 minutos a 14.000 rpm (Centrifuge MPW-65R).
- ✓ Se elimina el sobrenadante y se conserva el pellet, el cual se resuspende en 180 μ L Buffer ATL (proporcionado en el kit). Posteriormente, se añade 20 μ L de Proteinasa K (proporcionado en el kit), se mezcla suave con vórtex y se incuba a 56°C en termoblock (Accublock Mini, Labnet International, Inc) hasta que la muestra esté completamente lisada. Se realiza vórtex ocasional durante la incubación (60 min a 120 min).
- ✓ Se agregan 4 μ L RNasa A (100 mg/ml), se mezcla con vórtex y se incuba a temperatura ambiente (20-24°C) durante 2 minutos.
- ✓ Se realiza vórtex nuevamente durante 15 segundos y se añaden 200 μ L Buffer AL (proporcionado en el kit), y vórtex. Se añade 200 μ L etanol (EtOH 96%) y se mezcla por vórtex.
- ✓ Se traspasa toda la muestra a la mini columna (DNeasy mini spin column) que proporciona el kit con el tubo colector de 2 mL. Se

centrifuga a 8.000 rpm por un minuto. Se elimina el sobrenadante y el tubo colector.

- ✓ Se introduce la mini columna en un nuevo tubo colector de 2 mL (proporcionado en el kit), se añade 500 μ L Buffer AW1, y se centrifuga por un minuto a 8.000 rpm.
- ✓ Se elimina nuevamente el tubo colector con el sobrenadante. Se traspasa la columna a un nuevo tubo colector de 2 mL y se añade 500 μ L de Buffer AW2; se centrifuga por 3 minutos a 14.000 rpm y de nuevo se descarta el tubo colector con el sobrenadante.
- ✓ Se traspasa la minicolumna a un tubo eppendorf limpio y rotulado, y se añade 150 μ L de buffer AE directo en la membrana de la minicolumna. Se incuba a temperatura ambiente por un minuto, y luego se centrifuga por un minuto a 8.000 rpm para eluir.
- ✓ El DNA resultante se mantiene a -20°C hasta la realización de la qPCR.

Todas las muestras de DNA fueron analizadas mediante un equipo Nanodrop 1000 (Modelo ND-1000). Se anotaron las concentraciones (en $\text{ng}/\mu\text{L}$), y los coeficientes 260/280 y 260/230, que indican el grado de pureza y calidad de la muestra extraída.

5.4.3. Cuantificación mediante qPCR con sondas TaqMan

Se realizó el análisis de las muestras mediante qPCR, con el uso de sondas de hidrólisis, en el Laboratorio de Investigación Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, para determinar la prevalencia y cuantificación de las siguientes bacterias periodontopatógenas:

- ✓ *Porphyromonas gingivalis*
- ✓ *Campylobacter rectus*
- ✓ *Tannerella forsythia*
- ✓ *Fusobacterium nucleatum*
- ✓ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Primers y sondas

Los *primers* y sondas utilizadas en la cuantificación de las cinco bacterias señaladas, se especifican en la Tabla 4.

Tabla 4. Primers y sondas usadas para amplificación mediante qPCR.

ESPECIE	OLIGOSECUENCIA (5'- 3')	CONCENTRACIÓN	REFERENCIA
<i>Aa</i>	F: GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA R: TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC S: AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA GGG	P: 300 nM S: 100 nM	Boutaga et al. 2003.
<i>Pg</i>	F: GCG CTC AAC GTT CAG CC R: CAC GAA TTC CGC CTG C S: CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA	P: 300 nM S: 300 nM	Boutaga et al. 2003.
<i>Cr</i>	F: TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC R: CGC TTG CAC CCT CCG TAT S: TCC GTG CCA GCA GCC GC	P: 900 nM S: 100 nM	Figuro et al. 2014.
<i>Tf</i>	F: GGG TGA GTA ACG CGT ATG TAA CCT R: ACC CAT CCG CAA CCA ATA AA S: CCC GCA ACA GAG GGA TAA CCC GG	P: 300 nM S: 200 nM	Boutaga et al. 2003.
<i>Fn</i>	F: GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC R: GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA S: CTC TAC ACT TGT AGT TCC G	P: 600 nM S: 300 nM	Boutaga et al. 2003.

Aa: *A. actinomycetemcomitans*; *Pg*: *P. gingivalis*; *Cr*: *C. rectus*; *Tf*: *T. forsythia*; *Fn*: *F. nucleatum*; F: forward; R: reverse; P: primer; S: sonda

Los *primers* (sintetizados por Invitrogen, USA), y las sondas (sintetizadas por Applied Biosystems, USA), fueron dirigidas para el gen 16S rRNA. Las sondas fueron marcadas con fluoróforos en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3' con 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

Curvas estándar

Se construyó una curva estándar para cada bacteria. Para ello, un mililitro de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus* viables, conteniendo 10^8 , 10^9 , 10^8 , 10^6 UFC/mL, respectivamente, y *F. nucleatum*, conteniendo 10^6 UFC/mL, fueron utilizados para la extracción de DNA. Posteriormente, se realizaron 10 diluciones decimales seriadas, en agua estéril, de los DNAs obtenidos (Water, PCR grade, Roche Diagnostic). Las curvas estándar para cada bacteria fueron realizadas determinando el valor de Cq de las diluciones. El valor de Cq o ciclo de cuantificación (anteriormente conocido como Ct o ciclo umbral) corresponde al ciclo en el cual la fluorescencia se eleva por encima del umbral o base (Ver Anexo 1).

Todos los ensayos fueron realizados usando la calibración de curvas con un rango de detección lineal cuantitativo establecido en un rango

de la pendiente entre 3,2 a 3,7 ciclos/log decade, $r^2 > 0,994$, y un rango de eficiencia de 1,8 a 2,0.

Se adoptaron una serie de medidas para evitar la contaminación u arrastre de DNA, dentro de las cuales se establecieron:

- ✓ Realizar separación de las áreas de laboratorio de pre y post-PCR.
- ✓ Uso de estrictas medidas de barrera (uso de guantes y mascarillas).
- ✓ Manipulación de un solo operador del área donde se cargaron las muestras.

Sin embargo, ninguno de estos métodos, previno la amplificación de DNA inespecífico en algunos NTCs (control sin muestra o control negativo), como sucedió con algunos NTCs de *P. gingivalis*.

Por otro lado, para prevenir los potenciales resultados falsos positivos, el límite de detección fue calculado usando el valor de Cq que estuviera por debajo de las 3 unidades de diferencia del valor más bajo de Cq obtenido en los NTCs de los experimentos. Valores por debajo de este rango pueden ser detectados, pero no cuantificados.

Condiciones de la qPCR

Se utilizó un volumen final de reacción de 10 μL , conteniendo 8 μL de 2x master mix (TaqMan LC 480 probes master, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), el cual contenía la sonda y los *primers* usados según cada bacteria (ver tabla 4), y 2 μL de DNA de las muestras (3-20 ng/ μL). Todas las curvas estándar y las muestras de DNA se analizaron por duplicado en una placa blanca de 384 pocillos (LightCycler 480 multiwell plate 384, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se agregaron para cada bacteria cuatro controles negativos (NTCs), consistentes en 8 μL de la master mix utilizada, incluyendo sonda y *primers*, pero sin DNA. Además, para el caso de muestras que se encontraron en el rango de detección, pero no de cuantificación, fueron repetidas nuevamente, para tener un tercer y cuarto valor de Cq. Los valores por cada muestra fueron promediados para obtener un valor final por muestra (Ver Anexo 2).

Las condiciones de qPCR utilizadas en el termociclador (LightCycler 480 II, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) fue un ciclo de amplificación inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por un minuto.

Análisis de los datos

El ciclo de cuantificación o Cq fue determinado usando el software LightCycler 480 GeneScanning Version 1.5.1 (LC480 Software 1.5, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La cuantificación del DNA de las muestras se basó en curvas estándar para cada bacteria, usando estándares externos apropiados de concentración conocida. Las curvas estándar fueron construidas trazando los valores Cq generados de la qPCR para *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *F. nucleatum* y la concentración bacteriana total (log CFU/mL). La correlación entre los valores Cq y CFU/mL fue generada automáticamente por el software LC480 1.5.

5.4.4. Cuantificación mediante qPCR con SYBR Green

Se realizó la detección y cuantificación bacteriana mediante qPCR con SYBR Green de las siguientes especies:

- ✓ *P. intermedia*
- ✓ *A. actinomycetemcomitans*

Los experimentos se realizaron en el Centro Científico y Tecnológico del Campus Bellvitge de la Universitat de Barcelona.

Los *primers* utilizados para el gen 16S rRNA, se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. *Primers* utilizados en qPCR para SYBR Green.

ESPECIE	OLIGOSECUENCIA (5'- 3')	REFERENCIA
<i>P. intermedia</i>	F: AAT ACC CGA TGT TGT CCA CA R: TTA GCC GGT CCT TAT TCG AA	Maeda et al. 2003.
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	F: CTT ACC TAC TCT TGA CAT CCG AA R: ATG CAG CAC CTG TCT CAA AGC	Maeda et al. 2003.

F: forward; R: reverse.

La extracción de DNA de estas bacterias, procedentes de cultivos puros, se hizo para la construcción de las curvas estándar, con el mismo kit de extracción de DNA utilizado en las muestras subgingivales, según el protocolo señalado anteriormente. Se construyó una curva estándar diferente para cada bacteria (Ver anexos 1F y 1G). Un mililitro de *A. actinomycetemcomitans* viables, conteniendo 10^9 UFC mL y 750 μ L de *P. intermedia*, conteniendo $2,65 \times 10^9$ UFC/mL, respectivamente, fueron utilizados para la extracción de DNA. La construcción de las curvas estándar se realizó siguiendo el mismo protocolo señalado en el apartado anterior.

Las concentraciones y cantidades utilizadas en las reacciones para el protocolo con SYBR Green, se detallan en la tabla 6, para un volumen final de 20 μL .

Tabla 6. Componentes, concentraciones y cantidades utilizadas en cada reacción de qPCR usando SYBR Green.

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. intermedia</i>
2x SensiFAST® SYBR HI-ROX Mix	10 μL	10 μL
Primer F	400 nM	400 nM
Primer R	400 nM	400 nM
H ₂ O para qPCR	Según se requiera	Según se requiera
Template (3-20 ng/ul)	5 μL	5 μL

Todos los ensayos fueron realizados usando la calibración de curvas con un rango de detección lineal cuantitativo establecido en un rango de la pendiente entre 3,4 a 3,7 ciclos/log decade, $r^2 > 0,996$, y un rango de eficiencia de 1,8 a 2,0.

Las condiciones de qPCR utilizadas en el termociclador (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA) (Figura 6) fue un ciclo de amplificación inicial de 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 5 segundos, 60°C por 10 segundos y 72°C por 20 segundos.

Figura 6. Termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, utilizado para PCR Real Time (SYBR Green).



Todas las curvas estándar y las muestras de DNA se analizaron por duplicado en una placa transparente de 384 pocillos (Applied Biosystems, USA). Se agregaron para cada bacteria 4 controles negativos o *no template control* (NTCs).

Al terminar la reacción de qPCR, se procedió a chequear los NTCs para cada set de *primers*, además de chequear la curva de disociación o curva de melting que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones formados son del tamaño esperado. Esto tuvo especial importancia cuando la fluorescencia en C_q era mayor de 38, ya que después de este ciclo puede deberse a una amplificación inespecífica.

5.5. ANÁLISIS DE DATOS

5.5.1. Almacenamiento de los datos

Todos los datos fueron almacenados en una base de datos (archivo Excel, Microsoft Excel 2011 para Mac), para su posterior análisis.

5.5.2. Análisis estadístico principal

Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SPSS® 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), para Microsoft Windows.

Se realizó una estadística descriptiva mediante medidas de tendencia central (media o mediana según criterios de normalidad estudiados por el test de Kolmogorov-Smirnov) y dispersión (desviación estándar, rango intercuartílico).

Se realizó un análisis bivariable para la comparación de variables cualitativas, mediante el test de chi-cuadrado. Las variables cuantitativas se compararon mediante el test de la t de Student, ANOVA, U de Mann-Whitney o test de Kruskal-Wallis, de acuerdo al criterio de normalidad y al número de variables estudiadas. Para comparar variables cuantitativas entre ellas, se usó la correlación de Pearson o Spearman, cuando fue apropiado.

Se realizó un análisis multivariante mediante un modelo de regresión logística binaria, para determinar la asociación entre la osteoporosis y la periodontitis. La significación estadística de las interacciones bidireccionales entre la DMO y otras variables en el modelo de efectos principales se evaluó con el uso de la regresión por pasos hacia adelante para probar si otras variables modificaban el efecto de la densidad mineral ósea en la periodontitis. Para decidir el modelo más preciso se estudió el área bajo la curva (AUC) de cada modelo por las curvas ROC (características operativas del receptor).

Las muestras microbiológicas se consideraron positivas si el valor de Cq estaba por encima del límite de detección. La cantidad de patógeno detectado en cada muestra se expresó en $\log(\text{UFC}/\text{mL})$.

La frecuencia en la detección de los patógenos en las muestras subgingivales fue calculado como la proporción de muestras positivas por cada especie bacteriana.

La significancia estadística aceptada fue de $p < 0.05$.

5.5.3. Análisis estadístico para la comparación entre qPCR con sondas TaqMan y SYBR Green

Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SPSS® 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), para Microsoft Windows.

El análisis estadístico incluyó una estadística descriptiva y un análisis de concordancia. El estudio estadístico descriptivo fue realizado basado en la validez interna como sensibilidad, especificidad, razón de probabilidad positiva y razón de probabilidad negativa; y una validez externa como Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo. Luego estudiamos la sensibilidad y especificidad de acuerdo al PCR Gold Estándar (TaqMan) positivo por la curva de ROC y determinando el área bajo la curva (AUC).

Para evaluar el nivel de concordancia entre ambos test y clasificar sus resultados como positivos o negativos se calculó el índice kappa propuesto por Cohen (Cohen 1968), que mide el acuerdo entre dos evaluadores. Según los criterios publicados, un valor kappa menor a 0 implica un nivel de acuerdo bajo; 0-0,2 indica un nivel de acuerdo leve; 0,21-0,4 aceptable; 0,41-0,6 moderado; 0,61-0,8 bueno; y mayor

a 0,8 es casi perfecto o un nivel de acuerdo muy bueno (Landis & Koch 1977).

Para el análisis agrupado de las mediciones pareadas, los datos de los pacientes fueron agregados para cada medición. La precisión de los diferentes sistemas de qPCR se determinó por el acuerdo entre el Gold Standard qPCR (Sondas TaqMan) y la prueba qPCR mediante el uso de SYBR Green.

1. Usando el método de las diferencias, el método de Bland-Altman (Bland & Altman 1986; Bland & Altman 1995), el cual es una valoración de una escala de datos de acuerdo con el modelo subyacente formulado como un análisis de la varianza de dos vías, se calculó lo siguiente:

a) Diferencia de medias, estándar versus prueba, y el 95% los límites de acuerdo.

b) Representación gráfica de diferencia versus media, donde la trama se utiliza para inspeccionar si la diferencia y su varianza fueron constantes como una función de la media, a través de la correlación de la diferencia versus la media, donde un valor cercano a cero implica acuerdo.

c) El sesgo (diferencia media) y precisión (desviación estándar de las diferencias) entre qPCR gold estándar (sondas TaqMan) y qPCR SYBR Green se calculó para los datos agrupados utilizando el método de Bland-Altman.

2. La concordancia fue estudiada mediante el coeficiente de correlación intraclass (ICC). El ICC es la medida de la fiabilidad de los pares de medidas, así una medida fiable (va desde 0, donde no hay acuerdo al +1, donde el acuerdo es perfecto) se define como la variación entre la varianza de interés y la varianza total. Los niveles óptimos de fiabilidad se han sugerido para ICC entre 0,7-0,75. El ICC estima el acuerdo de dos maneras: por el procedimiento de componentes de la varianza y por el método de los momentos (Carrasco & Jover 2003; Carstensen 2004) con los observadores como efectos fijos. Aunque la propiedad de la ICC en los estudios de concordancia ha sido cuestionada, no hay consenso sobre esta cuestión.

Los enfoques de Bland-Altman son complementarios, indicando el acuerdo o concordancia, o la falta de esta, en dos diferentes escalas.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS DATOS CLÍNICOS

La muestra inicial de este estudio fue de 76 mujeres postmenopáusicas; sin embargo, en algunos casos no fue posible obtener información de alguna de las variables. Las pacientes que tenían algún dato ausente, igualmente fueron consideradas en el estudio, ya que contaban con la mayoría de las variables necesarias para realizar el análisis estadístico.

La mediana de edad encontrada en este grupo de mujeres fue de 63 años (IQR=2). Con respecto al diagnóstico de osteoporosis y osteopenia, realizado mediante densitometría ósea, de un total de 75 mujeres, 16 se encontraban sanas, mientras que las 59 restantes (78,6%) tenían distintos grados de alteraciones en la densidad mineral ósea (osteopenia/osteoporosis).

Con respecto a la presencia de periodontitis, ésta fue detectada en un 47,9% de un total de 73 mujeres de las que se pudo obtener esta información.

Las características generales y descripción de las variables más relevantes de las mujeres que participaron en el estudio, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Características de la población en estudio.

		N	%
Edad (Mediana, IQR)		63,00	2,00
Dientes perdidos (Mediana, IQR)		5,00	8,75
Índice CAOD (Media, SD)		17,21	8,00
Necesidad de tratamiento*	No	5	6,8%
	Higiene profunda	38	52,1%
	Tratamiento periodontal	30	41,1%
Periodontitis*	No	38	52,1%
	Si	35	47,9%
Lesiones en mucosa*	No	45	61,6%
	Si	28	38,4%
Xerostomía*	No	67	91,8%
	Si	6	8,2%
pH (Mediana, IQR)		7,0	1,0
pH*	Básico	14	20,3%
	Neutro	27	39,1%
	Ácido	28	40,6%
Higiene oral*	Buena	24	32,9%
	Regular	32	43,8%
	Mala	17	23,3%
Osteoporosis*	No	16	21,3%
	Osteopenia	40	53,3%
	Osteoporosis	19	25,3%

* Existen datos ausentes en estas variables.

6.2. CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS PERIODONTALES CON EL USO DE SONDAS TAQMAN

En este estudio, las bacterias periodontales con la mayor prevalencia fueron *T. forsythia*, y *C. rectus*, las cuales fueron detectadas en un 100% de las muestras, seguido de *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, con 98,7% de las muestras en ambos casos. Sin embargo, *P. gingivalis* pudo ser cuantificada sólo en un 84,2% de las muestras; en un 14,5% el valor obtenido estuvo por debajo del límite de cuantificación. Esto significa que la qPCR detectó la bacteria, pero la cantidad detectada es inferior al límite de detección obtenido a través de la recta patrón construida para esta bacteria.

La bacteria con la menor prevalencia en este estudio fue *A. actinomycetemcomitans*, la cual fue detectada en un 73,7% de las muestras.

La prevalencia y cuantificación de las cinco bacterias periodontales estudiadas con el uso de las sondas TaqMan se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen de la cuantificación de las bacterias periodontopatógenas mediante qPCR con sondas TaqMan.

		N	%
<i>Pg</i> UFC/mL (Mediana, IQR)		8,31E+02	6,32E+04
log <i>Pg</i> (Mediana, IQR)		3,00	2,56
<i>Pg</i> Cuantificables	Cuantificable	64	84,2%
	Detectado y No cuantificable	11	14,5%
	No detectado	1	1,3%
<i>Tf</i> UFC/mL (Mediana, IQR)		1,22E+05	4,66E+05
log <i>Tf</i> (Mediana, IQR)		5,09	1,76
<i>Tf</i> Cuantificables		76	100,0%
<i>Cr</i> UFC/mL (Mediana, IQR)		2,49E+05	6,98E+05
log <i>Cr</i> (Mediana, IQR)		5,40	1,20
<i>Cr</i> Cuantificables		76	100,0%
<i>Fn</i> UFC/mL (Mediana, IQR)		1,81E+06	3,73E+06
log <i>Fn</i> (Media SD)		6,18	0,64
<i>Fn</i> Cuantificables	Cuantificable	75	98,7%
	No detectado	1	1,3%
<i>Aa</i> UFC/mL (Mediana, IQR)		1,51E+02	1,98E+03
log <i>Aa</i> (Mediana, IQR)		2,50	1,95
<i>Aa</i> Cuantificables	Cuantificable	56	73,7%
	No detectado	20	26,3%

SD: desviación estándar; IQR: rango intercuartílico; UFC: unidades formadoras de colonia; log: logaritmo; *Pg*: *P. gingivalis*; *Tf*: *T. forsythia*; *Cr*: *C. rectus*; *Fn*: *F. nucleatum*; *Aa*: *A. actinomycetemcomitans*.

6.3. ANÁLISIS ENTRE VARIABLES CLÍNICAS

Se realizó un análisis estadístico entre los diferentes parámetros clínicos estudiados. En la tabla 9 se muestra el análisis bivariante entre la enfermedad periodontal frente a las otras variables estudiadas: osteoporosis, edad, número de dientes perdidos, pH oral, índice COPD (dientes con caries, obturados y perdidos), necesidad de tratamiento, higiene oral, xerostomía y lesiones en mucosa oral.

En mujeres sin diagnóstico previo de osteopenia u osteoporosis, se detectó periodontitis en un 22,9% de los casos, en un 57,1% de mujeres con osteopenia y en un 20% de las mujeres que tenían osteoporosis. Sin embargo, no se encontró asociación entre osteoporosis/osteopenia y periodontitis ($p=0,522$).

Por el contrario, entre periodontitis y el nivel de higiene oral se encontró una correlación significativa ($p=0,003$), al igual que entre periodontitis y necesidad de tratamiento ($p=0,001$).

La asociación entre periodontitis y número de dientes perdidos y entre periodontitis y xerostomía no fue significativo ($p=0,120$ y $p=0,098$ respectivamente).

Tabla 9. Análisis bivalente entre periodontitis y otras variables.

		PERIODONTITIS		TOTAL	p-VALOR
		NO (N=38)	SI (N=35)		
Osteoporosis	No	8 (21,10)	8 (22,90)	16 (21,90)	
	Osteopenia	18 (47,40)	20 (57,10)	38 (52,10)	0,522
	Osteoporosis	12 (31,60)	7 (20,00)	19 (26,0)	
Edad (Mediana, IQR)		62,5 (3,0)	63,0 (2,0)	63,0 (2,0)	0,623
Edad	<=60	2 (5,3)	4 (11,4)	6 (8,2)	0,418
	>60	36 (94,7)	31 (88,6)	67 (91,8)	
Dientes perdidos (Mediana, IQR)		4,0 (6,0)	7,0 (13,0)	5,0 (8,75)	0,120
pH	Básico	7 (19,4)	7 (21,9)	14 (20,6)	
	Neutro	12 (33,3)	14 (43,8)	26 (38,2)	0,546
	Acido	17 (47,2)	11 (34,4)	28 (41,2)	
CAOD (Media, SD)		16,53 (7,47)	17,94 (8,60)	17,21 (8,00)	0,454
pH (Mediana, IQR)		7,0 (1,00)	7,0 (1,00)	7,2 (1,00)	0,321
Necesidad de tratamiento	No	4 (10,5)	1 (2,90)	5 (6,8)	0,001
	Higiene profunda	26 (68,4)	12 (34,30)	38 (52,10)	
	Tratamiento periodontal	8 (21,1)	22 (62,90)	30 (41,10)	
Higiene oral	Buena	19 (50,0)	5 (14,30)	24 (32,90)	0,003
	Regular	14 (36,8)	18 (51,40)	32 (43,80)	
	Pobre	5 (13,2)	12 (34,30)	17 (23,30)	
Xerostomía	No	37 (97,4)	30 (85,70)	67 (91,80)	0,098
	Si	1 (2,6)	5 (14,30)	6 (8,20)	
Lesiones en mucosa	No	26 (68,4)	19 (54,30)	45 (61,6)	0,215
	Si	12 (31,6)	16 (45,70)	28 (38,4)	

CAOD: índice de caries, dientes ausente y obturados. IQR: rango Intercuartílico

En el análisis de las correlaciones entre densidad mineral ósea (DMO) (osteoporosis/osteopenia/sanas) y las mismas variables clínicas, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las variables estudiadas (Tabla 10). Sin embargo, al dividir DMO sólo entre dos grupos (grupo normal/osteopenia y el grupo con osteoporosis) la diferencia estadística con el número de dientes perdidos fue significativa ($p < 0,05$). Lo que indica que el grupo de mujeres con osteoporosis presenta un mayor número de dientes perdidos.

El detalle del análisis entre densidad mineral ósea y las variables clínicas se detallan a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis bivariante entre osteoporosis y otras variables.

		DENSIDAD MINERAL ÓSEA			TOTAL	P- VALOR
		NO (N=15)	OSTEOPENIA (N=40)	OSTEOPOROSIS (N=19)		
Edad (Mediana, IQR)		62,00 (2,00)	62,50 (2,00)	63,00 (2,00)	63,0 (2,0)	0,093
Edad	<=60	3 (18,7)	2 (5,0)	1 (5,3)	6 (8,0)	0,262 (0,165)
	>60	13 (81,3)	38 (95,0)	18 (94,7)	69 (92,0)	
Dientes perdidos (Mediana, IQR)		4,00 (4,00)	4,00 (6,00)	8,00 (8,00)	5,0 (8,75)	0,064
pH	Básico	4 (25,0)	4 (11,8)	6 (31,6)	14 (20,3)	
	Neutral	3 (18,8)	17 (50,0)	7 (36,8)	27 (39,1)	0,151 (0,135)
	Ácido	9 (56,3)	13 (38,2)	6 (31,6)	28 (40,6)	
CAOD (Media, SD)		15,56 (8,11)	16,92 (8,15)	19,16 (7,65)	17,21 (8,00)	0,402
pH (Mediana, IQR)		7,8 (1,5)	7,0 (1,0)	7,0 (2,0)	7,2 (1,0)	0,434
Necesidad tratamien- to	No	1 (6,3)	3 (7,9)	1 (5,3)	5 (6,8)	0,760 (0,758)
	Higiene Profunda	9 (56,3)	17 (44,7)	12 (63,2)	38 (52,1)	
	Trata- miento perio- dental	6 (37,4)	18 (47,4)	6 (31,5)	30 (41,1)	
Higiene oral	Buena	6 (37,4)	12 (31,6)	6 (31,6)	24 (32,9)	0,969 (0,969)

	Regular	7 (43,8)	16 (42,1)	9 (47,4)	32 (43,8)	
	Mala	3 (18,8)	10 (26,3)	4 (21,0)	17 (23,3)	
Xerostomía	No	15 (93,8)	36 (94,7)	16 (84,2)	67 (91,8)	0,374 (0,417)
	Si	1 (6,3)	2 (5,3)	3 (15,8)	6 (8,2)	
Lesiones en mucosa	No	11 (68,8)	21 (55,3)	13 (68,4)	45 (61,6)	0,505 (0,503)
	Si	5 (31,2)	17 (44,7)	6 (31,6)	28 (38,4)	

IQR: rango intercuartílico; SD: desviación estándar; CAOD: índice de caries, dientes ausentes y obturados.

6.4. ANÁLISIS ENTRE VARIABLES MICROBIOLÓGICAS

Se analizaron las relaciones entre los cinco patógenos periodontales *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, a través de gráficos de dispersión, y se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman (no paramétricos) (Tabla 11). En la correlación de Spearman, un valor $Rho < 0,2$, indica una muy baja correlación; $Rho < 0,5$, una baja correlación; $Rho < 0,7$, correlación moderada; $Rho < 0,9$, una alta correlación; $Rho > 0,9$, muy alta correlación.

En la Figura 7 se observa el gráfico de dispersión para las relaciones entre las cinco bacterias periodontopatógenas estudiadas. Se encontró una alta correlación entre $\log C. rectus$ y $\log F. nucleatum$ ($r = 0,815$, $p < 0,001$), siendo estadísticamente significativa. Ésta es la más importante de las correlaciones encontradas entre las 5 bacterias periodontopatógenas.

Una correlación moderada ($r = 0,510$) se encontró entre $\log T. forsythia$ y $\log F. nucleatum$, siendo estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

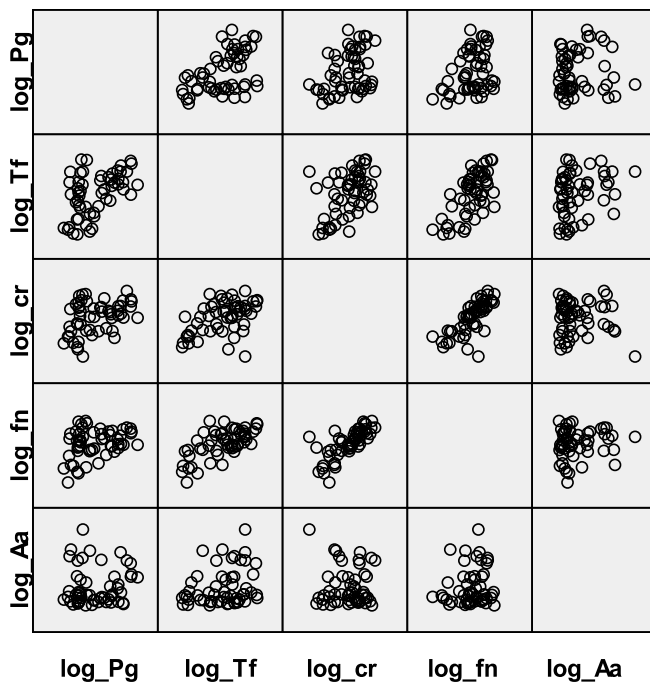
Además, entre log *P. gingivalis* y log *T. forsythia* se encontró una baja correlación ($r=0,410$, $p<0,001$), similar a otras cuatro correlaciones encontradas entre log *T. forsythia* y log *C. rectus* ($r=0,381$, $p=0,001$), log *P. gingivalis* y log *C. rectus* ($r=0,328$, $p=0,004$), log *P. gingivalis* y log *F. nucleatum* ($r=0,268$, $p=0,021$) y log *A. actinomycetemcomitans* y log *T. forsythia* ($r=0,273$, $p=0,042$).

Tabla 11. Correlación de Spearman entre variables microbiológicas.

CORRELACIÓN DE SPEARMAN		log Pg	log Tf	log Cr	log Fn	log Aa
log Pg	r	1,000	0,410**	0,328**	0,268*	0,082
	p-valor	-	0,000	0,004	0,021	0,548
log Tf	r	0,410**	1,000	0,381**	0,510**	0,273*
	p-valor	0,000	-	0,001	0,000	0,042
log Cr	r	0,328**	0,381**	1,000	0,815**	0,009
	p-valor	0,004	0,001	-	0,000	0,949
log Fn	r	0,268*	0,510**	0,815**	1,000	0,116
	p-valor	0,021	0,000	0,000	-	0,397
log Aa	r	0,082	0,273*	0,009	0,116	1,000
	p-valor	0,548	0,042	0,949	0,397	-

log: logaritmo; Pg: *P. gingivalis*; Tf: *T. forshytia*; Cr: *C. rectus*; Fn: *F. nucleatum*; Aa: *A. actinomycetemcomitans*; *p valor <0.05 ; **p valor <0.01 .

Figura 7. Gráfico de dispersión para relación entre patógenos periodontales.

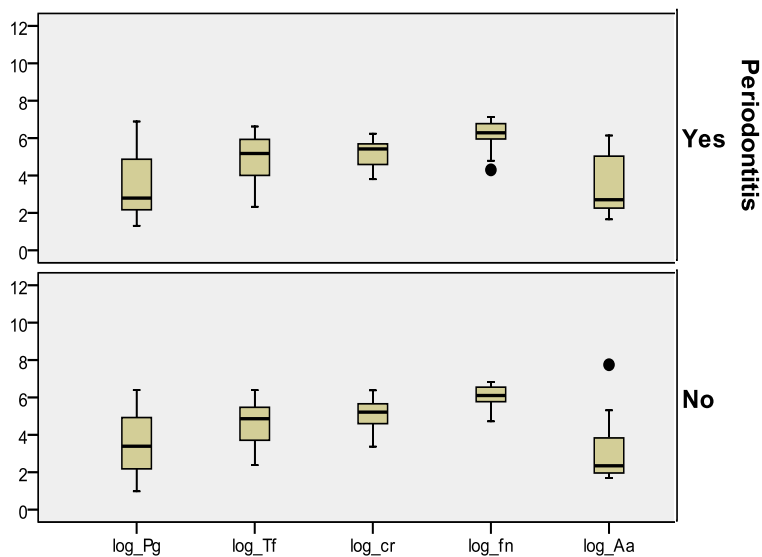


6.5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y LAS VARIABLES MICROBIOLÓGICAS

Se realizaron análisis estadísticos entre las variables clínicas descritas anteriormente y las cinco bacterias periodontopatógenas estudiadas, principalmente enfocado en relacionar los aspectos microbiológicos con la presencia de periodontitis y las alteraciones en la densidad mineral ósea.

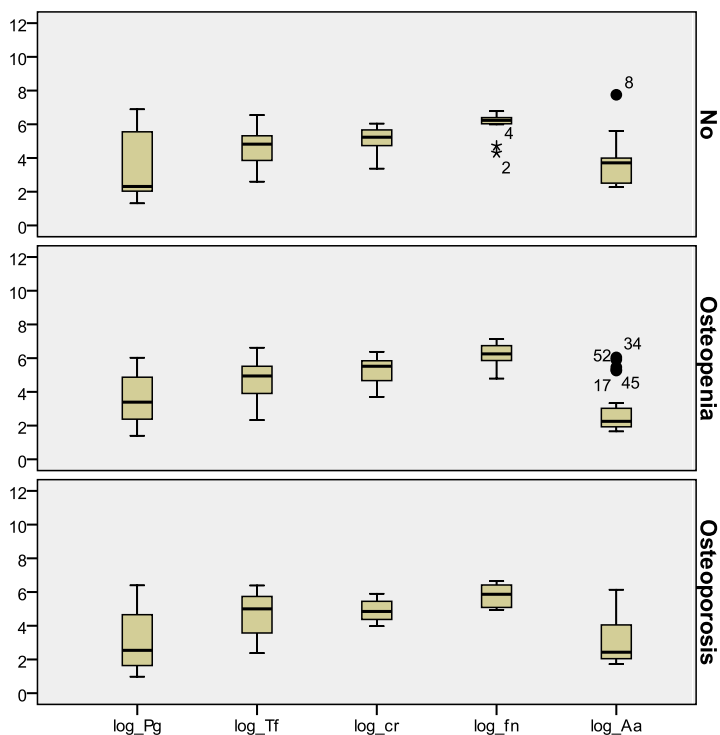
En el diagrama de caja (Figura 8) se observa la distribución de las cinco bacterias periodontopatógenas estudiadas, de acuerdo a la presencia o ausencia de periodontitis. Sin embargo, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Figura 8. Diagrama de caja con distribución de 5 periodontopatógenos según presencia o ausencia de periodontitis.



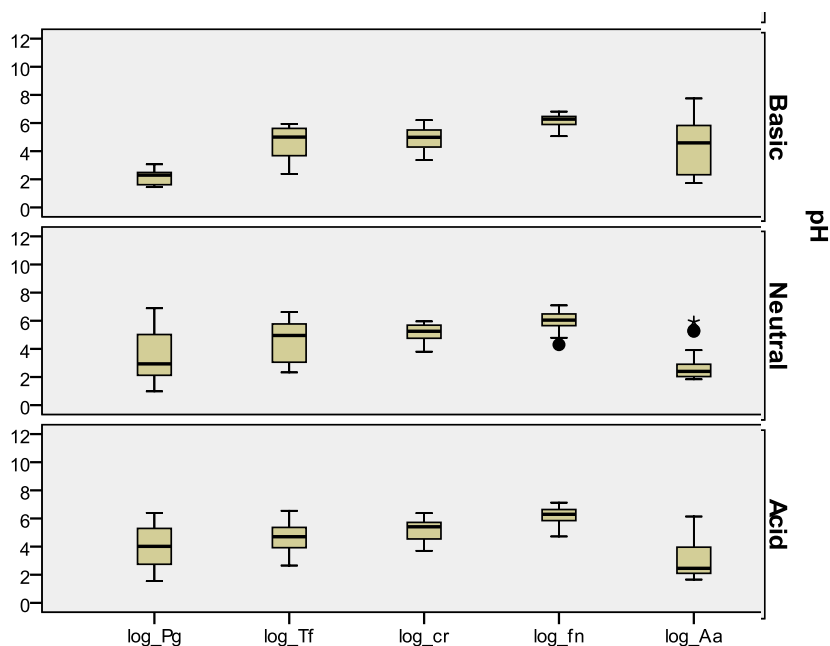
En el siguiente diagrama de caja (Figura 9) se muestra la distribución de las bacterias en relación a la densidad mineral ósea, dividiendo en tres grupos: presencia de osteoporosis, osteopenia y en mujeres sanas. Nuevamente, las diferencias estadísticas no son significativas ($p > 0,05$).

Figura 9. Diagrama de caja con distribución de 5 periodontopatógenos según presencia de osteoporosis/osteopenia o ausencia de estas.



En la Figura 10, se presenta un diagrama de caja con las distribuciones de las cinco bacterias estudiadas, según el nivel de pH salival, ácido, neutro o básico, donde tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Figura 10. Diagrama de caja con distribución de las 5 bacterias periodontales según el nivel de pH salival.



En la Tabla 12, se presentan los análisis realizados entre todas las variables estudiadas y su relación con la presencia de periodontitis en el grupo de mujeres estudiadas. Como se observa en la tabla, sólo se encontró una significancia estadística en relación al nivel de higiene oral y la necesidad de tratamiento ($p < 0,05$).

Tabla 12. Análisis entre las variables estudiadas según presencia o ausencia de periodontitis.

		PERIODONTITIS		TOTAL	p-VALOR
		NO (N=38)	SI (N=35)		
log <i>Pg</i> (Mediana, IQR)		3,03 (2,30)	3,40 (2,49)	3,00 (2,56)	0,528
log <i>Tf</i> (Mediana, IQR)		4,86 (1,86)	5,25 (1,67)	5,09 (1,75)	0,080
log <i>Cr</i> (Mediana, IQR)		5,25 (1,04)	5,42 (1,29)	5,40 (1,19)	0,592
log <i>Fn</i> (Mediana, IQR)		6,23 (0,84)	6,31 (0,81)	6,26 (0,84)	0,460
log <i>Aa</i> (Mediana, IQR)		2,35 (1,88)	2,72 (3,21)	2,50 (1,94)	0,085
Osteoporosis	No	8 (21,1)	8 (22,9)	16 (21,9)	0,522
	Osteopenia	18 (47,4)	20 (57,1)	38 (52,1)	(0,519)
	Osteoporosis	12 (31,6)	7 (20,0)	19 (26,0)	
Edad (Mediana, IQR)		62,5 (3,0)	63,0 (2,0)	63,0 (2,0)	0,623
Edad	≤60	2 (5,3)	4 (11,4)	6 (8,2)	0,418
	>60	36 (94,7)	31 (88,6)	67 (91,8)	
Dientes perdidos (Mediana, IQR)		4,0 (6,0)	7,0 (13,0)	5,0 (8,75)	0,120
pH	Básico	7 (19,4)	7 (21,9)	14 (20,6)	
	Neutral	12 (33,3)	14 (43,8)	26 (38,2)	0,546
	Ácido	17 (47,2)	11 (34,4)	28 (41,2)	
CAOD (mean, SD)		16,53 (7,47)	17,94 (8,60)	17,21 (8,00)	0,454
pH (mediana, IQR)		7,0 (1,0)	7,0 (1,0)	7,2 (1,0)	0,321

Necesidad de tratamiento	No	4 (10,5)	1 (2,9)	5 (6,8)	0,001 (0,001)
	Higiene profunda	26 (68,4)	12 (34,3)	38 (52,1)	
	Tratamiento periodontal	8 (21,1)	22 (62,9)	30 (41,1)	
Higiene Oral	Buena	19 (50,0)	5 (14,3)	24 (32,9)	0,003 (0,002)
	Regular	14 (36,8)	18 (51,4)	32 (43,8)	
	Mala	5 (13,2)	12 (34,3)	17 (23,3)	
Xerostomía	No	37 (97,4)	30 (85,7)	67 (91,8)	0,098
	Si	1 (2,6)	5 (14,3)	6 (8,2)	
Lesiones en mucosa	No	26 (68,4)	19 (54,3)	45 (61,6)	0,215
	Si	12 (31,6)	16 (45,7)	28 (38,4)	

IQR: rango intercuartiles; SD: desviación estándar; CAOD: índice de caries, dientes ausente y obturados; log: logaritmo; *Pg*: *P. gingivalis*; *Tf*: *T. forshytia*; *Cr*: *C. rectus*; *Fn*: *F. nucleatum*; *Aa*: *A. actinomycetemcomitans*.

Además de los datos que hemos presentado, se analizaron todas las variables estudiadas, tanto las clínicas como las microbiológicas, según la presencia de osteoporosis, osteopenia o en mujeres sin alteraciones en la densidad mineral ósea, cuyos resultados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Análisis de las variables estudiadas, según la presencia de osteoporosis, osteopenia o ausencia de éstas.

		OSTEOPOROSIS			TOTAL	p-VALOR
		NO (N=15)	OSTEOPENIA (N=40)	OSTEOPOROSIS (N=19)		
log <i>Pg</i> (Mediana, IQR)		2,50 (3,52)	3,57 (2,40)	2,55 (2,83)	3,00 (2,56)	0,221
log <i>Tf</i> (Mediana, IQR)		4,86 (1,49)	5,09 (1,73)	5,10 (2,54)	5,09 (1,75)	0,790
log <i>Cr</i> (Mediana, IQR)		5,40 (1,02)	5,44 (1,10)	4,98 (1,03)	5,40 (1,19)	0,276
log <i>Fn</i> (Mediana, IQR)		6,32 (0,45)	6,26 (0,91)	6,25 (1,17)	6,26 (0,84)	0,798
log <i>Aa</i> (Mediana, IQR)		3,71 (1,49)	2,26 (1,25)	2,43 (2,00)	2,50 (1,94)	0,063
Edad (Mediana, IQR)		62,00 (2,00)	62,50 (2,00)	63,00 (2,00)	63,0 (2,0)	0,093
Edad	<=60	3 (18,7)	2 (5,0)	1 (5,3)	6 (80.)	0,262 (0,165)
	>60	13 (81,3)	38 (95,0)	18 (94,7)	69 (92,0)	
Dientes perdidos (Mediana, IQR)		4,00 (4,00)	4,00 (6,00)	8,00 (8,00)	5,0 (8,75)	0,064
pH	Básico	4 (25,0)	4 (11,8)	6 (31,6)	14 (20,3)	0,151
	Neutro	3 (18,8)	17 (50,0)	7 (36,8)	27 (39,1)	(0,135)

	Ácido	9 (56,3)	13 (38,2)	6 (31,6)	28 (40,6)	
CAOD (Media, SD)		15,56 (8,11)	16,92 (8,15)	19,16 (7,65)	17,21 (8,00)	0,402
pH (Mediana, IQR)		7,8 (1,5)	7,0 (1,0)	7,0 (2,0)	7,2 (1,0)	0,434
Necesidad de tratamiento	No	1 (6,3)	3 (7,9)	1 (5,3)	5 (6,8)	0,760 (0,758)
	Higiene profunda	9 (56,3)	17 (44,7)	12 (63,2)	38 (52,1)	
	Tratamiento Periodontal	6 (37,4)	18 (47,4)	6 (31,5)	30 (41,1)	
Higiene Oral	Buena	6 (37,4)	12 (31,6)	6 (31,6)	24 (32,9)	0,969 (0,969)
	Regular	7 (43,8)	16 (42,1)	9 (47,4)	32 (43,8)	
	Mala	3 (18,8)	10 (26,3)	4 (21,0)	17 (23,3)	
Xerostomía	No	15 (93,8)	36 (94,7)	16 (84,2)	67 (91,8)	0,374 (0,417)
	Si	1 (6,3)	2 (5,3)	3 (15,8)	6 (8,2)	
Lesiones en mucosa	No	11 (68,8)	21 (55,3)	13 (68,4)	45 (61,6)	0,505 (0,503)
	Si	5 (31,2)	17 (44,7)	6 (31,6)	28 (38,4)	

Log: logaritmo; Pg: *P. gingivalis*; Tf: *T. forshytia*; Cr: *C. rectus*; Fn: *F. nucleatum*; Aa: *A. actinomycetemcomitans*; IQR: rango intercuartílicos; SD: desviación estándar.

Por otro lado, la correlación de Spearman se usó para comparar los cinco patógenos periodontales con los parámetros orales. Una alta y positiva relación se encontró entre dientes perdidos y el índice COPD ($r=0,770$, p -valor menor $0,001$), y sólo fue ligeramente positiva entre $\log P. gingivalis$ y pH ($r=0,285$, $p=0,019$).

Al realizar el análisis de asociaciones entre variables clínicas y valores de pH, no se encontró una correlación significativa entre higiene oral y pH ($p=0,503$). Por el contrario, la diferencia entre pH básico, neutro y ácido y el \log CFU/mL de *A. actinomycetemcomitans* fue significativo, donde se observó una menor cantidad de esta bacteria en un ambiente levemente ácido. A su vez, para *P. gingivalis* el p -valor fue de $0,053$, valor cercano a la significancia estadística, donde se observó una mayor cantidad de \log CFU/mL en ambientes levemente ácidos. En la Tabla 14, se observa el desglose de toda la información.

Tabla 14. Coeficiente de correlación de Spearman (r) y p-valor para las variables en la tabla.

Correlación de Spearman		log Pg	log Tf	log Cr	log Fn	log Aa	Edad	DP	CAOD	pH
log Pg	r	1,000	0,410**	0,328**	0,268*	0,082	-0,117	-0,031	-0,070	0,285*
	p-valor	-	0,000	0,004	0,021	0,548	0,318	0,790	0,558	0,019
log Tf	r	0,410**	1,000	0,381**	0,510**	0,273*	-0,162	0,022	-0,031	-0,056
	p-valor	0,000	-	0,001	0,000	0,042	0,163	0,849	0,794	0,648
log Cr	r	0,328**	0,381**	1,000	0,815**	0,009	-0,021	0,062	0,065	0,024
	p-valor	0,004	0,001	-	0,000	0,949	0,859	0,597	0,585	0,842
log Fn	r	0,268*	0,510**	0,815**	1,000	0,116	-0,052	0,027	-0,002	-0,083
	p-valor	0,021	0,000	0,000	-	0,397	0,661	0,821	0,983	0,501
log Aa	r	0,082	0,273*	0,009	0,116	1,000	-0,195	0,008	0,192	-0,183
	p-valor	0,548	0,042	0,949	0,397	-	0,150	0,955	0,161	0,195
Edad	r	-0,117	-0,162	-0,021	-0,052	-0,195	1,000	0,100	0,064	-0,045
	p-valor	0,318	0,163	0,859	0,661	0,150	-	0,392	0,591	0,712
DP	r	-0,031	0,022	0,062	0,027	0,008	0,100	1,000	0,770**	-0,041

	p-valor	0,790	0,849	0,597	0,821	0,955	0,392	-	0,000	0,741
CAOD	r	-0,070	-0,031	0,065	-0,002	0,192	0,064	0,770**	1,000	-0,059
	p-valor	0,558	0,794	0,585	0,983	0,161	0,591	0,000	-	0,634
pH	r	0,285*	-0,056	0,024	-0,083	-0,183	-0,045	-0,041	-0,059	1,000
	p-valor	0,019	0,648	0,842	0,501	0,195	0,712	0,741	0,634	-

* p valor $<0,05$; ** p valor $<0,01$. DP: dientes perdidos. log: log de unidad formadora de colonia (CFU/mL). *P. gingivalis* (Pg), *T. forsythia* (Tf), *C. rectus* (Cr), *F. nucleatum* (Fn) y *A. actinomycetemcomitans* (Aa).

Además, para valorar la predictibilidad del modelo de regresión logística, se realizaron 5 modelos de predicción, cuyos resultados se presentan en las Tablas 15-19. En todos los modelos se estudió la densidad mineral ósea, que es una de las variables más importantes del estudio. Se incluyó también higiene oral (Modelos 2-5), ajustado según distintas variables, ya que es la variable que demostró una significancia estadística al correlacionarla con periodontitis.

Modelo de regresión logística: Análisis Uni y Multivariante de factores asociados con Periodontitis.

Tabla 15. Modelo 1.

VARIABLE		OR CRUDO (95% CI)	p- VALOR	OR AJUSTADA (95% CI)*	p- VALOR
DMO	Normal	1,0		1,0	
	Osteopenia	0,95 (0,53- 1,69)	0,86	2,04 (0,45- 9,37)	0,36
	Osteoporosis	1,36 (0,63- 2,91)	0,43	1,02 (0,15- 7,08)	0,98

* Ajustada por edad, log *Pg*, log *Tf*, log *Cr*, log *Fn*, log *Aa*. CI: Intervalo de confianza. DMO: Densidad mineral ósea.; OR: odd ratio.

Tabla 16. Modelo 2.

VARIABLE		OR CRUDO (95% CI)	p- VALOR	OR AJUSTADO (95% CI)*	p- VALOR
DMO	Normal	1,0		1,0	
	Osteopenia	0,95 (0,53- 1,69)	0,86	1,09 (0,30- 4,04)	0,89
	Osteoporosis	1,36 (0,63- 2,91)	0,43	0,54 (0,12- 2,55)	0,44
Higiene oral	Bueno	1,0		1,0	
	Regular	1,81 (1,16- 2,81)	0,008	6,383 (1,695- 24,041)	0,006
	Malo	2,69 (1,25- 5,78)	0,001	11,186 (2,37- 52,78)	0,002

* Ajustado por edad y CAOD.

Tabla 17. Modelo 3.

VARIABLE		OR CRUDO (95% CI)	p- VALOR	OR AJUSTADO (95% CI)*	p- VALOR
DMO	Normal	1,0		1,0	
	Osteopenia	0,950 (0,534- 1,689)	0,86	1,79 (0,34- 9,31)	0,49
	Osteoporosis	1,357 (0,63- 2,92)	0,43	0,774 (0,091- 6,551)	0,81
Higiene oral	Buena	1,0		1,0	
	Regular	1,81(1,16- 2,82)	0,008	8,628 (1,22- 60,94)	0,031
	Mala	2,69 (1,25- 5,78)	0,001	13,25 (1,25- 139,96)	0,032

* Ajustada por edad, CAOD, log *Pg*, log *Tf*, log *Cr*, log *Fn*, log *Aa*.

Tabla 18. Modelo 4.

VARIABLE		OR CRUDO (95% CI)	p- VALOR	OR AJUSTADO (95% CI)*	p- VALOR
DMO	Normal	1,0		1,0	
	Osteopenia	0,950 (0,534- 1,689)	0,860	1,11 (0,30- 4,09)	0,88
	Osteoporosis	1,357 (0,631- 2,919)	0,433	0,580 (0,13- 2,67)	0,49
Higiene Oral	Buena	1,0		1,0	
	Regular	1,810 (1,162- 2,82)	0,008	6,351 (1,696- 23,778)	0,006
	Mala	2,69 (1,25- 5,78)	0,001	11,778 (2,528- 54,874)	0,002

* Ajustado por edad.

Tabla 19. Modelo 5.

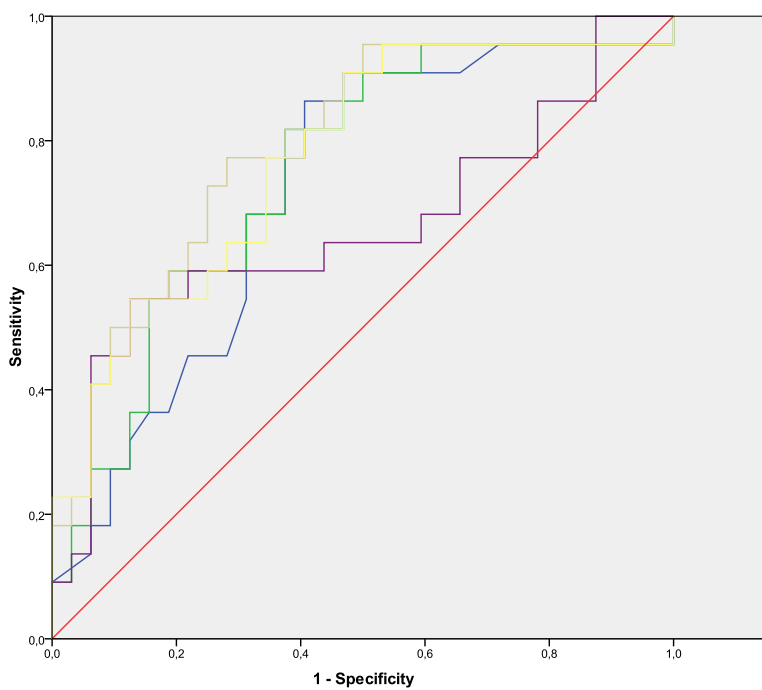
VARIABLE		OR CRUDO (95% CI)	p- VALOR	OR AJUSTADO (95% CI)*	p- VALOR
DMO	Normal	1,0		1,0	
	Osteopenia	0,95 (0,53-1,69)	0,86	1,96 (0,38-10,02)	0,42
	Osteoporosis	1,36 (0,63-2,92)	0,43	0,783 (0,100-6,138)	0,82
Higiene Oral	Buena	1,0		1,0	
	Regular	1,81 (1,16-2,82)	0,008	8,806 (1,298-59,762)	0,03
	Mala	2,69 (1,25-5,78)	0,001	12,967 (1,277-131,651)	0,03

* Ajustado por edad, log *P. gingivalis*, log *T. forsythia*, log *C. rectus*, log *F. nucleatum*, log *A. actinomycetemcomitans*.

Por otro lado, en la Figura 11 se observa la curva de ROC, y en la Tabla 20, los datos usados para los 5 modelos de predicción realizados.

En la curva ROC se observa el comportamiento de los 5 modelos estudiados. El modelo predictivo 3, es uno de los que presenta la mejor curva; por el contrario, el modelo 1 y el 4, son los que se acercan más a la línea de referencia.

Figura 11. Curva ROC.



- Modelo de probabilidad predictivo 4
- Modelo de probabilidad predictivo 2
- Modelo de probabilidad predictivo 3
- Modelo de probabilidad predictivo 1
- Modelo de probabilidad predictivo 5
- Línea de referencia

Tabla 20. Área bajo la curva (AUC).

				INTERVALO DE CONFIANZA ASINTÓTICO 95%	
RESULTADO DEL TEST VARIABLE(S)	ÁREA	ERROR ESTÁNDAR	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA ^B	LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
Predicción Modelo de probabilidad 4	0,718	0,071	0,007	0,578	0,858
Predicción Modelo de probabilidad 2	0,747	0,069	0,002	0,613	0,882
Predicción Modelo de probabilidad 3	0,791	0,064	0,000	0,666	0,917
Predicción Modelo de probabilidad 1	0,661	0,081	0,047	0,501	0,820
Predicción Modelo de probabilidad 5	0,771	0,066	0,001	0,642	0,901

Resultado del test variable(s): Predicción de modelo de probabilidad 4 tiene al menos un lazo entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Estadísticas pueden estar sesgadas. a. Bajo el supuesto de no paramétrico. b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5.

6.6. COMPARACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN BACTERIANA MEDIANTE SYBR GREEN Y SONDAS TAQMAN

Al comparar ambos sistemas de pPCR en la cuantificación de *A. actinomycetemcomitans*, se calcularon los valores de sensibilidad (porcentaje de verdaderos positivos), especificidad (porcentaje de verdaderos negativos), valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, razón de probabilidad positiva y razón de probabilidad negativa, obtenidos a través de los datos presentados en la Tabla 21.

Tabla 21. Valores de respuestas positivas o negativas obtenidas con ambos sistemas de qPCR.

		PCR GOLD ESTÁNDAR		TOTAL
		Positivo	Negativo	
PCR SYBR Green	Positivo	25	3	28
	Negativo	31	17	48
Total		56	20	76

Los valores obtenidos para SYBR Green fueron:

- Sensibilidad= 44,64% (95% CI: 31,35-58,53)
- Especificidad=85,0% (95% CI: 62,08-96,62).
- Valor predictivo positivo= 89,29% (95% CI: 71,75-97,61).
- Valor predictivo negativo= 35,42% (95% CI: 22,17-50,54).

El valor predictivo positivo se define como la probabilidad de que un individuo con resultado positivo en el test esté enfermo, o en este caso, presente las bacterias estudiadas, mientras que el valor predictivo negativo se refiere a la probabilidad de que un individuo con resultado negativo en el test esté sano, o tenga ausencia de las bacterias estudiadas, en este caso.

La razón de probabilidad positiva es de 2,98 (95% CI: 1,01-8,79) y la razón de probabilidad negativa es de 0,65 (95% CI: 0,48-0,88). La razón de probabilidad positiva se calculó dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en los pacientes enfermos entre la probabilidad de un resultado positivo entre los sanos. Por lo tanto, es en definitiva, el cociente entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos (1-especificidad).

A su vez, la razón de probabilidad negativa se calculó dividiendo la probabilidad de un resultado negativo en presencia de enfermedad entre la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la misma. Es por lo tanto, el cociente entre la fracción de falsos negativos (1-sensibilidad) y la fracción de verdaderos negativos (especificidad).

En la Figura 12 se observa la curva ROC y en la Tabla 22, se observan los datos del área bajo la curva (AUC).

Figura 12. Curva ROC.

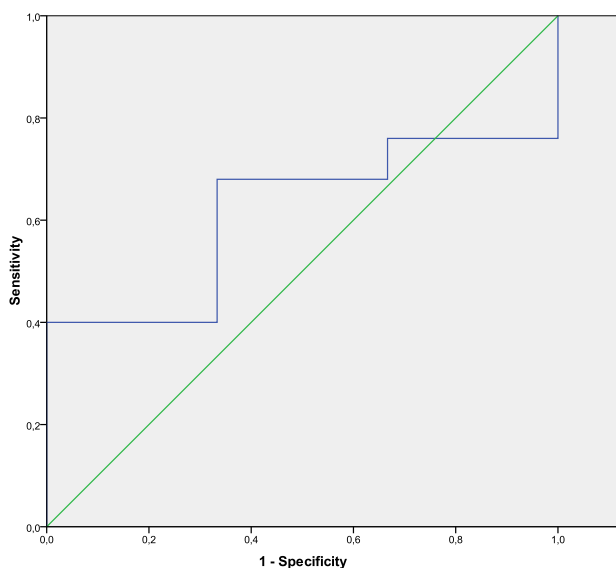


Tabla 22. Área Bajo la Curva (AUC).

Área	Std. Error ^a	Asintótico Sig. ^b	Intervalo de confianza asintótico 95%	
			Límite inferior	Límite superior
0,613	0,122	0,528	0,373	0,853

a. Bajo el supuesto no paramétrico. b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

El AUC fue alto (0,613), pero no estadísticamente significativo ($p=0,528$), con límites muy amplio(0,373-0,853).

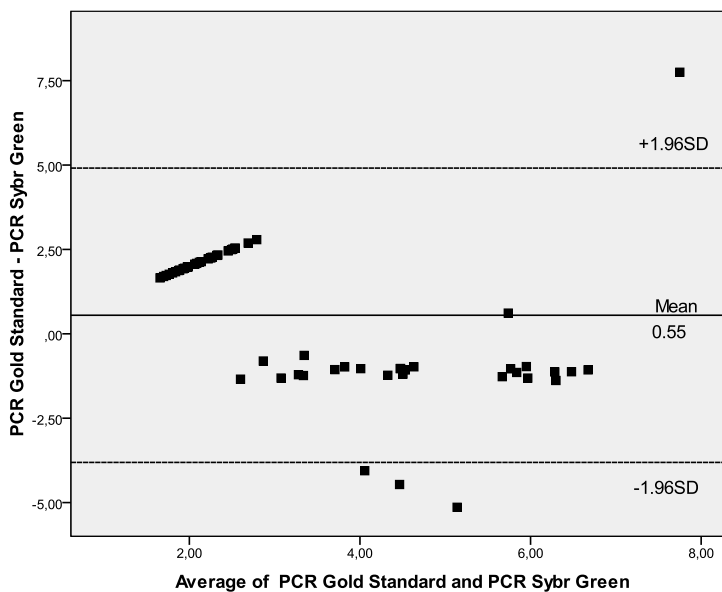
El índice kappa que indica el nivel de concordancia entre los dos sistemas estudiados, es 0,204 (95% CI: 0,048- 0,361), lo que indicó un débil nivel de acuerdo entre los sistemas. A su vez, también se calculó el coeficiente de correlación intraclase, el cual da un valor de 0,72 (95% CI : 0,68-0,99).

La prueba de Bland-Altman muestra un valor promedio óptimo de $0,55 \pm 1,96$ de desviación estándar, como se observa en la Figura 13.

La prueba de Bland-Altman lo que hace es graficar los datos según la diferencia entre 2 medidas que se suponen miden exactamente lo mismo y la diferencia entre 2 medidas. Por consiguiente, cuando la

media es baja, si la diferencia entre medidas es positiva, es que sobreestima, en cambio, si es negativa, es que subestima.

Figura 13. Método Bland-Altman.



6.7. ANÁLISIS DE *PREVOTELLA INTERMEDIA* MEDIANTE qPCR CON EL USO DE SYBR GREEN

La cuantificación bacteriana de *P. intermedia*, se realizó con qPCR mediante el uso de SYBR Green. En la Tabla 23 se ven los datos de mediana de UFC/mL y log *P. intermedia*, de un total de 76 muestras, donde en todas las muestras fue posible detectarla y cuantificarla.

Tabla 23. Cuantificación bacteriana de *Prevotella intermedia* mediante qPCR con SYBR Green.

	MEDIANA	IQR
<i>Pi</i> UFC/mL	2,05E+06	4,96E+08
log <i>Pi</i>	6,30	3,40
<i>Pi</i> Cuantificables (N/%)	76	100,0%

Pi: *Prevotella intermedia*; IQR: rango intercuartílico; log: logaritmo.

En el diagrama de caja (Figura 14) se observa la distribución de *P. intermedia* en pacientes con y sin presencia de periodontitis ($p=0,255$); mientras en la Figura 15 se observa la distribución de ésta bacteria en relación a la presencia de osteoporosis, osteopenia, o la ausencia de éstas ($p=0,553$). En ninguno de estos dos análisis se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ya que en ambos, los valores de p fueron mayores a 0,05.

Figura 14. Diagrama de caja con distribución de *P. intermedia* según la presencia o ausencia de periodontitis.

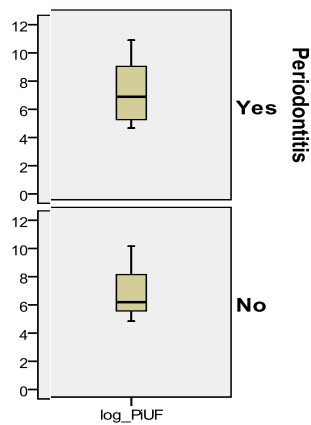
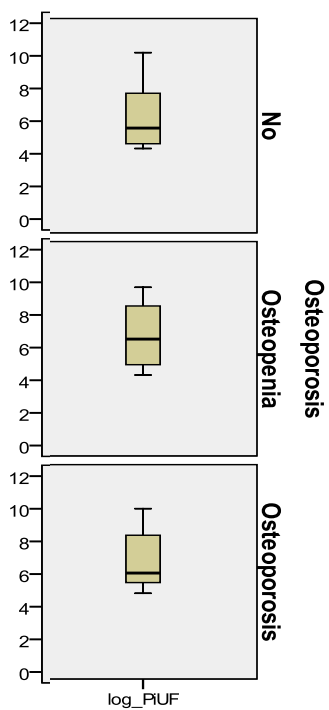


Figura 15. Diagrama de caja con distribución de *P. intermedia* según la presencia o ausencia de osteoporosis u osteopenia.



En la correlación de Spearman realizada entre *P. intermedia* y las otras especies bacterianas, se observa una relación levemente positiva con *P. gingivalis* ($r=0,36$), *T. forsythia* ($r=0,35$), *C. rectus* ($r=0,36$) y *F. nucleatum* ($r=0,24$).

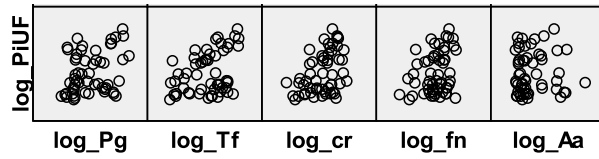
La correlación realizada entre *P. intermedia* y las variables clínicas muestra una baja relación significativa negativa entre *P. intermedia* y CAOD ($r=-0,25$) (Tabla 24). En la Figura 16, se pueden ver las correlaciones entre *P. intermedia*, y los otros cinco patógenos periodontales detectados mediante sonda TaqMan, mientras que en la Figura 17, se puede ver el detalle de la correlación entre *P. intermedia* y *T. forsythia*.

Tabla 24. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho) y *p*-valor para *P. intermedia* y las variables estudiadas.

CORRELACIÓN DE SPEARMAN		log <i>Pg</i>	log <i>Tf</i>	log <i>Cr</i>	log <i>Fn</i>	log <i>Aa</i>	log <i>Pi</i>	Edad	DP	CAOD	pH
log <i>Pi</i>	Rho	0,36**	0,35**	0,36**	0,24*	0,09	1,00	-0,09	-0,10	-0,25*	0,02
	p-valor	0,002	0,002	0,001	0,04	0,53	-	0,43	0,39	0,03	0,84

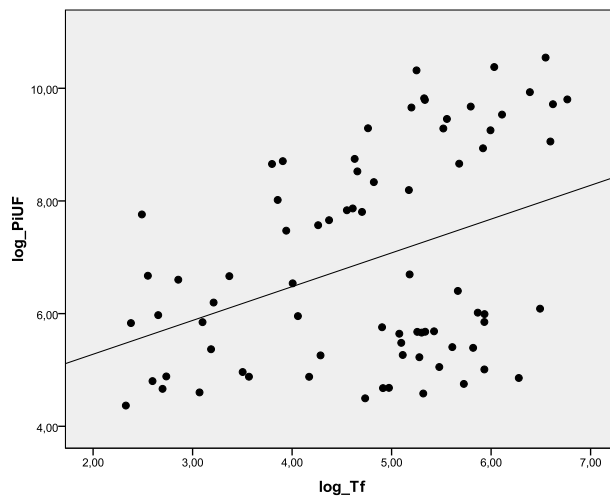
* *p* valor <0.05; ** *p* valor <0.01. DP: dientes perdidos. Log: log de unidades formadoras de colonia (UFC/mL). *P. gingivalis* (*Pg*), *T. forsythia* (*Tf*), *C. rectus* (*Cr*), *F. nucleatum* (*Fn*) y *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*); Rho<0,2, muy baja correlación; Rho <0,5, baja correlación; Rho <0.7, la correlación moderada; Rho <0,9, alta correlación; Rho> 0,9, muy alta correlación.

Figura 16. Gráfico de dispersión para relación entre *P. intermedia* y los otros cinco patógenos periodontales estudiados.



Pi: *P. intermedia*; *Pg*: *P. gingivalis*; *Tf*: *T. forsythia*; *Fn*: *F. nucleatum*; *Aa*: *A. actinomycetemcomytans*.

Figura 17. Gráfico de dispersión para relación entre *P. intermedia* y *T. forsythia*.



$r=0,351$

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se realizó la detección y cuantificación de 6 especies bacterianas periodontales, cuyas prevalencias oscilaron entre el 73,7% y el 100% del total de muestras analizadas. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con periodontitis y los pacientes sanos, así como tampoco entre las pacientes sanas, osteopénicas u osteoporóticas, en los parámetros microbiológicos. Como hipótesis previa esperábamos encontrar un incremento en el nivel de bacterias en los pacientes con periodontitis, o en las mujeres con osteopenia u osteoporosis sin embargo, no encontramos esos resultados. En este estudio, la presencia de periodontopatógenos, observada en casi todas las mujeres incluidas en el estudio, no tuvo relación con la presencia de periodontitis o de osteoporosis en ellas.

Brennan y colaboradores (Brennan et al. 2007), determinaron la prevalencia de especies bacterianas específicas en una extensa muestra de pacientes postmenopáusicas mediante microscopía de inmunofluorescencia indirecta, y encontraron que *T. forsythia* estaba presente en un 37,9% de mujeres, *C. rectus* en un 17,4%, *P. gingivalis* en un 15,1% y *F. nucleatum* en un 14,2%. A su vez, Macuch y Tanner

en el año 2000 (Macuch & Tanner 2000), identificaron *C. rectus* en un 90% de los pacientes con periodontitis iniciales y establecidas, en un 20% de pacientes con gingivitis, y en un 10% de pacientes sanos.

En nuestro estudio sin embargo, la prevalencia de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus* y *F. nucleatum* es mayor que la encontrada por Brennan (Brennan et al. 2007) en su estudio. Esto puede deberse a la diferencia en el método de detección utilizado, así como por las distintas características geográficas y culturales de la población estudiada. Sin embargo, la prevalencia de *C. rectus* reportada por Macuch en sujetos con periodontitis es similar a la prevalencia obtenida en nuestra población (Macuch & Tanner 2000). Los datos son similares, a pesar de que en ese estudio se utilizó como método microbiológico de detección la técnica de cultivo, donde sólo pueden crecer bacterias vivas, y la población estudiada difiere de la nuestra.

La periodontitis, a diferencia de otros tipos de infección, no se origina por una única bacteria específica, sino por un grupo de bacterias; además, presenta múltiples factores que condicionan su aparición o evolución como factores predisponentes sistémicos o locales. Es esencial para el desarrollo de la periodontitis que las especies patogénicas estén presentes, pero la enfermedad igualmente puede

no presentarse hasta que los patógenos no excedan un cierto umbral para el huésped (Jervøe-Storm et al. 2005).

Existen diferencias importantes en la cantidad de bacterias presentes en los huéspedes, además de otros factores como la susceptibilidad del huésped y la virulencia del patógeno, que contribuyen a que la presencia de la bacteria no sirva como patrón para distinguir entre salud y enfermedad (Brennan et al. 2007). Si un patógeno putativo puede ser detectado frecuentemente en sujetos sanos, entonces no todos los humanos son igualmente susceptibles y/o puede haber una variación en la virulencia y el potencial patogénico (Mombelli et al. 2002). Además de las distintas susceptibilidades de los sujetos, los factores microbiológicos, genéticos y ambientales también juegan un rol importante en la aparición de la periodontitis y en su establecimiento (Brennan et al. 2007; Mombelli et al. 2002; Socransky & Haffajee 1992; Umeda et al. 1998). Esto podría explicar nuestros resultados, ya que las mujeres sin periodontitis no estaban libres de las bacterias estudiadas. Quizás, los sujetos sin periodontitis se encontraban en etapas muy tempranas de la enfermedad. Así, la mera presencia de bacterias en el surco gingival, no es suficiente para definir la enfermedad.

Mombelli y colaboradores (Mombelli et al. 2002), en una revisión sistemática, concluyen que la presencia o ausencia de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythia* y *C. rectus*, no puede discriminar entre sujetos con periodontitis agresiva de los que tienen periodontitis crónica

Esto también, ha sido mostrado por Riep y colaboradores (Riep et al. 2009), quienes examinaron la prevalencia de 10 especies bacterianas periodontales en dos grupos de pacientes con periodontitis crónica avanzada o periodontitis agresiva generalizada, así como con un grupo control periodontitis-resistente. No se encontraron diferencias entre los tres grupos al detectar *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*. Sin embargo, estas especies son consideradas muy asociadas con la periodontitis avanzada. La alta prevalencia de estas especies fueron confirmadas en todos los grupos de pacientes, hecho similar al observado en nuestro estudio.

La pérdida ósea es una característica de la periodontitis y la osteoporosis, y en diversos estudios se han analizado si la destrucción causada por la enfermedad periodontal podría ser influenciada por la pérdida ósea sistémica (Martínez-Maestre et al. 2010).

Martínez-Maestre y colaboradores, en una revisión sistemática realizada, encontraron que la relación entre osteoporosis y periodontitis es compleja, ya que ambas enfermedades son multifactoriales. La mayoría de los estudios tienden a demostrar que la periodontitis es un signo precoz de osteoporosis. En cinco estudios de nueve estudios en base a los mismos criterios que los utilizados en nuestro estudio para el diagnóstico de osteoporosis, concluyeron que no había correlación entre la osteoporosis y la periodontitis. Por el contrario, en la mayoría de los estudios basados en criterios radiológicos maxilares se determinó una asociación positiva. Se ha sugerido incluso, que la periodontitis podría ser utilizada como una herramienta de detección para identificar individuos con alto riesgo de osteoporosis. Sin embargo, el tema aún es controvertido, ya que diversos criterios se han establecido y utilizado para definir tanto osteoporosis y periodontitis en la literatura (Martínez-Maestre et al. 2010). En este estudio, se utilizaron los criterios para periodontitis de la Asociación Americana de Periodoncia, de tener al menos un sitio con profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica mayor a 4 mm, y con respecto a osteoporosis se utilizó la densitometría ósea

para calcular el T-score, y determinar si la paciente estaba con una densidad mineral ósea normal, osteopénica u osteoporótica.

Los resultados de dos estudios recientes realizados sobre muestras de mujeres postmenopáusicas también han llegado a conclusiones contradictorias, lo que se añade a la controversia actual y haciendo hincapié -al igual que Martínez- Maestre et al.- en la necesidad de una mayor uniformidad en las metodologías para estudiar la relación entre la osteoporosis y la periodontitis, y la necesidad de estudios bien controlados para determinar mejor esta compleja relación (Moeintaghavi et al 2013;. Passos et al 2013; Martínez-Maestre et al., 2010).

En otros estudios se ha visto que las mujeres posmenopáusicas con mayor riesgo de fractura osteoporótica, tienen significativamente periodontitis más severas que los controles, aunque la higiene oral no difiera significativamente. Sin embargo, los criterios usados para osteoporosis son diferentes a los nuestros (Alli et al. 2015).

Al dividir a las pacientes en dos grupos, normal/osteopénicas y pacientes con osteoporosis, se encontró diferencias significativas en relación con el número de dientes perdidos, así las mujeres con

osteoporosis se relacionan con un mayor número de dientes perdidos.

Las asociaciones entre el estado dental y la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas sanas han sido investigadas previamente. Existe la hipótesis de que la pérdida ósea sistémica contribuye a la pérdida de dientes (Krall et al. 1994), considerándose que la pérdida de dientes es el resultado final de la enfermedad periodontal (Machtei et al. 1999). La inflamación crónica provocada por las bacterias que causan la enfermedad periodontal subyace en la destrucción ósea y en la pérdida de dientes. Tezal y colaboradores (Tezal et al. 2005), informaron de que la enfermedad periodontal es un fuerte e independiente predictor de pérdida de dientes en las mujeres postmenopáusicas.

Sin embargo, en nuestras pacientes, la relación entre periodontitis y dientes perdidos no pudo establecerse. Una explicación es que las pacientes con periodontitis crónica bajo terapia periodontal pueden tener menores tasas de pérdida de dientes (Chambrone y Chambrone 2006; Matuliene et al. 2010; Renvert et al. 2012).

Existen además, otros factores que pueden modificar la enfermedad periodontal; por ejemplo, se ha visto que las estatinas de uso sistémico, tienen un efecto anti-inflamatorio en la enfermedad periodontal y pueden proteger contra la pérdida de dientes (Meisel et al., 2014). Las tasas más altas de pérdida de dientes también se han asociado con un bajo nivel socioeconómico y educativo, con la edad y con el hábito del tabaquismo (Buchwald et al. 2013). Sin embargo, esta información no fue recogida en las participantes de nuestro estudio.

A su vez, en este estudio, la periodontitis está relacionada significativamente con el nivel de higiene oral en los pacientes. Por lo tanto, los efectos potenciales de factores osteoporóticos en los tejidos periodontales podrían ser minimizados mediante la combinación de una buena higiene oral con chequeos regulares.

En este estudio no se examinó la influencia de la profundidad del sondaje periodontal, pero probablemente la detección de las especies bacterianas podría relacionarse con sacos periodontales más profundos, más que con ciertos diagnósticos clínicos (Riep et al. 2009).

La asociación entre periodontitis y xerostomía no fue significativa, pero se observó una tendencia positiva, ya que cinco de las seis mujeres con xerostomía fueron diagnosticadas con periodontitis. Se requiere un estudio con más pacientes que presenten xerostomía para analizar mejor esta relación. El flujo salival es más bajo en las mujeres posmenopáusicas, aunque en mujeres con terapia hormonal se ha demostrado que mejora la producción de saliva (Mahesh et al. 2014; Eliasson et al. 2003).

Se encontró una relación significativa entre el pH y la presencia de *A. actinomycetemcomitans*: se observó que cuanto más ácido es el pH oral, menor es la concentración de esta bacteria. Una relación casi significativa entre pH salival y *P. gingivalis* ha sugerido la mayor abundancia de esta bacteria en condiciones de pH más bajo. Esta información podría ayudar a los clínicos a elegir el mejor enfoque para el tratamiento de las infecciones periodontales causadas por estos microorganismos.

Se ha discutido además, en el desarrollo de la enfermedad periodontal, el posible rol de los virus, ya que los cambios desfavorables en el medio ambiente o alteraciones en los genes del sistema inmune pueden suprimir periódicamente la defensa del

huésped periodontal, y dar lugar a la reactivación de virus residentes, con un aumento de mediadores pro-inflamatorios, seguido por el crecimiento excesivo de las bacterias patógenas (Saygun et al. 2008). Sin embargo, en nuestro estudio no investigamos esta posible correlación, que podría modificar o favorecer un crecimiento de los patógenos estudiados.

Al examinar la potencial correlación entre las especies bacterianas, los resultados son interesantes, ya que se encuentran correlaciones positivas entre *F. nucleatum* y *C. rectus*, entre *P. gingivalis* y *T. forsythia*, y entre *T. forsythia* y *F. nucleatum*. Además, se encontró correlación positiva entre *T. forsythia* y *C. rectus*, *C. rectus* y *P. gingivalis*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, y *A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythia*. Muchas de estas correlaciones se explican al conocer la formación del *biofilm*, y destacar el rol de “puente” o conexión que cumple particularmente *F. nucleatum*, que favorece la colonización de otros patógenos periodontales.

Dentro de las fortalezas de este estudio, se encuentra el uso de qPCR para la cuantificación de las bacterias estudiadas. La diversidad microbiana puede ser enormemente subestimada mediante el uso de cultivos, ya que muchos microorganismos no pueden ser cultivados por técnicas estándar. Los estudios moleculares revelan una inesperada y amplia gama de microorganismos cuya relevancia para la iniciación o progreso de la periodontitis aún debe ser investigado (Riep et al. 2009).

Diferentes métodos han sido usados para la detección de los patógenos periodontales de muestras subgingivales: cultivos bacterianos, métodos basados en el diagnóstico inmune, métodos enzimáticos de detección bacteriana, técnicas de biología molecular como sondas de ácidos nucleicos, técnica de hibridación *checkboard* DNA-DNA, método de PCR. Los cultivos bacterianos han sido las técnicas de referencia para el diagnóstico durante muchos años, y la mayor parte del conocimiento en microbiología periodontal deriva de ellos. Sin embargo, la qPCR ha demostrado un alto grado de sensibilidad y especificidad, especialmente cuando se compara con los cultivos estándar (Sanz et al. 2004). La qPCR se ha convertido en

una importante herramienta para la rápida detección de bacterias patógenas, siendo más sensible y específica.

Jervøe-Storm et al. comparó la qPCR con el cultivo convencional de anaerobios, y encontró una fuerte concordancia entre ambos métodos para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*; una correlación mediana para *T. forsythia*, y una baja correlación para *F. nucleatum* y *P. intermedia*.

Estas discrepancias en los resultados pueden explicarse por la incapacidad en los métodos de cultivo para distinguir entre taxones relacionados y los problemas para mantener las bacterias periodontopatógenas viables, lo que es necesario para el cultivo estándar (Jervøe-Storm et al. 2005).

Una de las limitaciones de este estudio es la homogeneidad de la población estudiada, ya que toda la población fueron mujeres, alrededor de los 60 años, ninguna excedía los 70 años de edad. Sería deseable además, haber recolectado otros datos relacionados con el estilo de vida de estas mujeres, relaciones de pareja o consumo de alimentos.

Los hallazgos de este estudio tienen una importancia clínica en el desarrollo de un sistema de diagnóstico que debe incluir entre otros factores, factores genéticos, para entender cómo genes específicos interactúan con factores microbiológicos, y porque algunos pacientes con altos niveles de bacterias no desarrollan la enfermedad periodontal.

Con respecto a la comparación entre los dos sistemas de cuantificación utilizados con qPCR, en este estudio, la sensibilidad obtenida fue más baja, pero la especificidad es buena, por lo que cuando el número de colonias es bastante baja, la qPCR con sondas TaqMan (Gold Estándar) sobreestima los datos, pero cuando el número de colonias aumenta, la qPCR con SYBR Green sobreestima los datos. Los resultados indican que el uso de SYBR Green en la qPCR es un método con una menor sensibilidad en comparación al uso de sondas TaqMan, aunque presenta una buena especificidad para detectar y cuantificar *A. actinomycetemcomitans*, siendo además de un menor costo.

Maeda y colaboradores, compararon para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* las amplificaciones y cuantificaciones obtenidas con qPCR mediante el uso de sondas TaqMan y SYBR Green, y no hubo diferencias significativas entre éstos en su especificidad, cuantificación y sensibilidad. El uso de SYBR Green, señala que es más simple en su manipulación. Las sondas TaqMan, a pesar de ser más específicas, señala que para estas tres bacterias, la especificidad del SYBR Green es suficiente. El uso de las sondas TaqMan requiere manipulación adicional, y tiene un mayor coste económico, por lo que el autor recomienda el uso de SYBR Green en exámenes clínicos de rutina (Maeda et al. 2003).

Se ha estudiado la cuantificación de *A. actinomycetemcomitans* a través de qPCR con sondas TaqMan y mediante cultivos, y se ha encontrado un buen acuerdo entre ambos sistemas. La discrepancia que existe en general entre estos sistemas, son atribuidas principalmente a la detección en los niveles más bajo, que no logra el cultivo bacteriano y las dificultades en el crecimiento demostrado por algunas bacterias, como por ejemplo *T. forsythia*, además, de la necesidad que para el cultivo las bacterias deben ser viables para crecer (Lau et al. 2004). Además, su precisión en la cuantificación

también justificaría su uso como coadyuvante en el diagnóstico clínico de pacientes periodontales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que una de las ventajas de las técnicas de cultivo es su capacidad para detectar múltiples especies bacterianas casualmente y la posibilidad de probar la resistencia a antibióticos (Lau et al. 2004). En el presente estudio hay que considerar que ambos métodos se realizaron en tiempos distintos, por lo que algunas de las diferencias observadas entre ellos podrían atribuirse a un posible deterioro de las muestras, fruto de los procesos de congelación y descongelación a los que fueron sometidas.

Con respecto a los resultados obtenidos del análisis de *P. intermedia*, se detectó y cuantificó su presencia mediante el uso de SYBR Green, ya que por motivos técnicos no se pudo efectuar el análisis con sondas TaqMan; sin embargo, se consideró la importancia de esta bacteria en la enfermedad periodontal. En el presente estudio, se encontró presente en el 100% de las muestras estudiadas. Su presencia se asocia con bolsas periodontales de dientes con periodontitis más severas (Jervøe-Storm et al. 2005; Kuboniwa et al. 2004). Al revisar otros estudios, la presencia de *P. intermedia* varía según la técnica de detección usada, población y patología

periodontal. En un estudio realizado con un grupo de muestras de pacientes con periodontitis crónica avanzada, compararon los resultados obtenidos a través de sondas TaqMan y de cultivos, encontrando diferencias importantes, ya que con sondas la prevalencia fue del 91% y mediante cultivos alcanzó el 54% (Jervøe-Storm et al. 2005). Con inmunofluorescencia directa en una muestra de más de mil mujeres postmenopaúsicas, se encontró una prevalencia de 43,4% de *P. intermedia*, presentándose casi en un 40% de mujeres sanas (Brennan et al. 2007). En un estudio más reciente, los porcentajes de *P. intermedia* en periodontitis crónica alcanzan el 90% y un 80% en pacientes sanos, sin diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos, en una muestra de mujeres de diversas edades, usando qPCR mediante SYBR Green (Braga et al. 2010). Nonnenmacher y colaboradores, encontraron que en pacientes sanos, con periodontitis agresiva y periodontitis crónica, *P. intermedia* se encontraba presente en más del 60% de las muestras (Nonnenmacher et al 2005).

En la correlación de Spearman entre especies bacterias se encontró una correlación con *P. gingivalis*, *T. forshytia*, *C. rectus* y *F. nucleatum*, todos ellas bacterias periodontales pertenecientes a los complejos

bacterianos naranja y rojo, y parte de los colonizadores tardíos del biofilm, con importancia en la enfermedad periodontal. Además, se observó una correlación con el índice de CAOD, que con la metodología de este estudio no es posible de conocer su origen.

En este estudio, las bacterias investigadas no mostraron diferencias cuantitativas significativas entre mujeres sanas, osteopénicas y osteoporóticas, así como tampoco se correlacionó con las mujeres con o sin periodontitis. Por lo tanto, la presencia de bacterias periodontopatogénicas subgingivales en casi todas nuestras pacientes, demuestra que la aparición de estas especies no es suficiente para confirmar la presencia de la enfermedad periodontal. De hecho, la mera presencia de patógenos orales se reconoce como necesaria, pero no suficiente para la aparición de la enfermedad periodontal. Los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad incluyen la virulencia del patógeno, la interacción entre especies bacterianas y la susceptibilidad propia del huésped. Sin embargo, para que la enfermedad se desarrolle, los niveles del patógeno deben exceder el umbral propio del huésped.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- La técnica de qPCR permitió detectar y cuantificar la presencia de las bacterias periodontopatógenas estudiadas, procedentes de un grupo de mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, su presencia no se correlacionó con la presencia o ausencia de periodontitis o disminución en la densidad mineral ósea.
- En la población estudiada se encontró osteopenia en más de la mitad de las pacientes, seguida de osteoporosis y un menor porcentaje de mujeres sin alteraciones en la densidad mineral ósea. Con respecto a periodontitis, el 47,9% presentaba enfermedad periodontal. La mayoría de las mujeres estudiadas presentó un pH neutro-ácido, con una higiene oral regular y un 8% presentó xerostomía.
- Las bacterias periodontales *T. forsythia*, *C. rectus* y *P. intermedia*, se encontraron presentes en todas las muestras de placa subgingival analizadas mediante qPCR, mientras que *P.*

gingivalis, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans* se detectaron y cuantificaron en más del 73% del total de las muestras.

- Se encontró una relación significativa entre la presencia de periodontitis y el nivel de higiene oral de las pacientes; además, una correlación entre el grupo de mujeres con osteoporosis y un mayor número de dientes perdidos.
- La presencia de las bacterias periodontopatógenas estudiadas no se correlacionó con la presencia o ausencia de periodontitis o disminución en la densidad mineral ósea. Sin embargo, una relación significativa entre el pH y la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, pudiendo ser esta información de utilidad clínica para elegir el mejor enfoque en el tratamiento de las infecciones periodontales.
- En la cuantificación bacteriana obtenida con SYBR Green y con sondas TaqMan para *A. actinomycetemcomitans*, se obtuvieron

niveles de sensibilidad inferiores con el uso de SYBR Green, y niveles de especificidad buenos, por lo que se sugiere adecuar el uso de SYBR Green en la qPCR frente al uso de sondas TaqMan, particularmente para reducir los costes de detección y cuantificación de bacterias periodontopatógenas en muestras subgingivales.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Azzawi, F., Palacios, S. 2009. "Hormonal Changes during Menopause." *Maturitas* 63(2): 135-37.
- Alli, F., Bhandal, GK., Thacker, HL., Palomo, L. 2015. "Can the FRAX Tool Be a Useful Aid for Clinicians in Referring Women for Periodontal Care?" *Menopause* 22(1): 75-78.
- AlRowis, R., AlMoharib, HS., AlMubarak, A., Bhaskardoss, J., Preethanath, RS., Sukumaran, A. 2014. "Oral Fluid-Based Biomarkers in Periodontal Disease - Part 2 . Gingival Crevicular Fluid." *Journal of International Oral Health* 6(5): 126-35.
- Applied Biosystems. 2010. "Fast SYBR ® Green Master Mix Protocol."
- Armitage, GC. 1999. "Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions." *Ann Periodontol.* 4(1): 1-6.
- Asplund, R., Aberg, HE. 2005. "Oral Dryness, Nocturia and the Menopause." *Maturitas* 50(2): 86-90.
- Atieh, M. 2008. "Accuracy of Real-Time Polymerase Chain Reaction versus Anaerobic Culture in Detection of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas Gingivalis*: A Meta-Analysis." *The Journal of periodontology* 79(9): 1620-29.
- Azagra, R., López-Expósito, F., Martín-Sánchez, JC., Aguyé-Batista, A., Gabriel-Escoda, P., Zwart, M., Díaz-Herrera, MA., Pujol-Salud, J., Iglesias-Martínez, M., Puchol-Ruiz, N. 2015. "Incidencia de La Fractura de Fémur En España (1997-2010)." *Medicina Clínica*. doi: 10.1016/j.medcli.2015.02.023. [Epub ahead of print]
- Boutaga, K., Van Winkelhoff, AJ., Vandenbroucke-Grauls, CM., Savelkoul, PH. 2003. "Comparison of Real-Time PCR and Culture for Detection of *Porphyromonas Gingivalis* in Subgingival Plaque Samples." *Journal of clinical microbiology* 41(11): 4950-54.

- Braga, RRR., Carvalho, MAR., Bruña-Romero, O., Teixeira, RE., Eustáquio Costa, J., Mendes, EN., Farias, LM., Magalhães, PP. 2010. "Quantification of Five Putative Periodontal Pathogens in Female Patients with and without Chronic Periodontitis by Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Anaerobe* 16(3): 234–39.
- Brennan, RM., Genco, RJ., Wilding, GE., Hovey, KM., Trevisan, M., Wactawski-Wende, J. 2007. "Bacterial Species in Subgingival Plaque and Oral Bone Loss in Postmenopausal Women." *Journal of periodontology* 78(6): 1051–61.
- Brígido, JA., da Silveira, VRS., Rego, RO., Nogueira, NAP. 2014. "Serotypes of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* in Relation to Periodontal Status and Geographic Origin of Individuals-a Review of the Literature." *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal* 19(2): 184–91.
- Buchwald, S., Kocher, T., Biffar, R., Harb, A., Holtfreter, B., Meisel, P. 2013. "Tooth Loss and Periodontitis by Socio-Economic Status and Inflammation in a Longitudinal Population-Based Study." *Journal of Clinical Periodontology* 40: 203–11.
- Cassol, J., Rodríguez de Rivera, E., Jané Salas, E., López-López, J 2014. "Burning Mouth Syndrome□: Update." *Oral Health and Dental Management* 13(2): 418–24.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., Van Dyke, TE. 2014. "Inflammatory and Immune Pathways in the Pathogenesis of Periodontal Disease." *Periodontology 2000* 64(1): 57–80.
- Chambrone, LA., Chambrone, L. 2006. "Tooth Loss in Well-Maintained Patients with Chronic Periodontitis during Long-Term Supportive Therapy in Brazil." *Journal of Clinical Periodontology* 33(Aap 1998): 759–64.
- Dentino, A., Lee, S., Mailhot, J., Hefti, AF. 2013. "Principles of Periodontology." *Periodontology 2000* 61(1): 16–53.

- Drake, M., Clarke, B., Lewiecki, M. 2015. "The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis." *Clinical Therapeutics* In press(In press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.06.006>.
- Duncan, MJ. 2003. "Genomics of Oral Bacteria." *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 14(3): 175–87.
- Edwards, BJ., Li, J. 2013. "Endocrinology of Menopause." *Periodontology 2000* 61(1): 177–94.
- Eley, BM., Cox, SW. 2003. "Proteolytic and Hydrolytic Enzymes from Putative Periodontal Pathogens: Characterization, Molecular Genetics, Effects on Host Defenses and Tissues and Detection in Gingival Crevice Fluid." *Periodontology 2000* 31: 105–24.
- Eliasson, L., Carlén, A., Laine, M., Birkhed, D. 2003. "Minor Gland and Whole Saliva in Postmenopausal Women Using a Low Potency Oestrogen (oestriol)." *Archives of Oral Biology* 48: 511–17.
- Estrugo-Devesa, A., Gómez-Vaquero, C., López-López, J. 2013. "[Osteoporosis and Oral Diseases]." *Medicina clínica* 140(4): 169–74.
- Figuro, E., Lindahl, C., Marín, MJ., Renvert, S., Herrera, D., Ohlsson, O., Wetterling, T., Sanz, M. 2014. "Quantification of Periodontal Pathogens in Vascular, Blood and Subgingival Samples from Patients with Peripheral Arterial Disease or Abdominal Aortic Aneurysms." *Journal of periodontology*: 1–19.
- Henderson, B., Ward, JM., Ready, D. 2010. "Aggregatibacter (Actinobacillus) Actinomycetemcomitans: A Triple A* Periodontopathogen?" *Periodontology 2000* 54(1): 78–105.
- Henderson, B., Wilson M., Sharp, L., Ward, JM. 2002. "Actinobacillus Actinomycetemcomitans." *Journal of medical microbiology* 51(June): 1013–20.

- Holt, SC., Ebersole, JL. 2005. "Porphyromonas Gingivalis, Treponema Denticola, and Tannerella Forsythia: The 'Red Complex', a Prototype Polybacterial Pathogenic Consortium in Periodontitis." *Periodontology 2000* 38: 72–122.
- Jervøe-Storm, PM., Koltzsch, M., Falk, W., Dörfler, A., Jepsen, S. 2005. "Comparison of Culture and Real-Time PCR for Detection and Quantification of Five Putative Periodontopathogenic Bacteria in Subgingival Plaque Samples." *Journal of clinical periodontology* 32(7): 778–83.
- Karched, M., Bhardwaj, R., Inbamani, A., Asikainen, S. 2015. "Quantitation of Biofilm and Planktonic Life Forms of Coexisting Periodontal Species." *Anaerobe*.
- Klinger, G., Eick, S., Pfister, W., Gräser, T., Moore, C., Oettel, M. 1998. "Influence of Hormonal Contraceptives on Microbial Flora of Gingival Sulcus." *Contraception* 57(6): 381–84.
- Kolenbrander, PE., Palmer, RJ., Rickard, AH., Jakubovics, NS., Chalmers, NI., Diaz, PI. 2006. "Bacterial Interactions and Successions during Plaque Development." *Periodontology 2000* 42(1): 47–79.
- Krall, EA., Dawson-Hughes, B., Papas, A., Garcia, RI. 1994. "Tooth Loss and Skeletal Bone Density in Healthy Postmenopausal Women." *Osteoporosis International* 4(2): 104–9.
- Kuboniwa, M., Amano, A., Kimura, KR., Sekine, S., Kato, S., Yamamoto, Y., Okahashi, N., Iida, T., Shizukuishi, S. 2004. "Quantitative Detection of Periodontal Pathogens Using Real-Time Polymerase Chain Reaction with TaqMan Probes." *Oral microbiology and immunology* 19(3): 168–76.
- Lasa, I., Del Pozo, JL., Penadés, JR., Leiva, J. 2005. "Biofilms Bacterianos E Infección." *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28(2): 163–75.

- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, JM., 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 Samp." *Journal of clinical periodontology* 31(12): 1061–69.
- Lindhe, J, Karring, T., Lang, NP. 2009. *Periodontología Clínica E Implantología Odontológica*: 5a Edición. 5a edición. ed. cop. 2009 Buenos Aires: Médica Panamericana.
- López-López, J., Castellanos-Cosano, L., Estrugo-Devesa, A., Gómez-Vaquero, C., Velasco-Ortega, E., Segura-Egea, JJ. 2013. "Radiolucent Periapical Lesions and Bone Mineral Density in Post-Menopausal Women." *Gerodontology*. doi: 10.1111/ger.12076. [Epub ahead of print].
- López-López, J., Jané Salas, E., Chimenos Küstner, E. 2014. "Prognosis and Treatment of Dry Mouth. Systematic Review." *Medicina clínica* 142(3): 119–24.
- Machtei, EE., Hausmann, E., Dunford, R., Grossi, S., Ho, A., Davis, G., Chandler, J., Zambon, J., Genco, RJ. 1999. "Longitudinal Study of Predictive Factors for Periodontal Disease and Tooth Loss." *Journal of clinical periodontology* 26(1991): 374–80.
- Mackay, IM. 2007. *Real-Time PCR in Microbiology From Diagnosis to Characterization*. ed. Australia Ian M. Mackay Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre, Queensland. Caister Academic Press.
- Macuch, PJ., Tanner, ACR. 2000. "Campylobacter Species in Health, Gingivitis, and Periodontitis." *Journal of Dental Research* 79(2): 785–92.

- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeyuchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S. 2003. "Quantitative Real-Time PCR Using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Prevotella Intermedia*, tetQ Gene and Total Bacteria." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 39(1): 81–86.
- Mahesh, DR., Komali, G., Jayanthi, K., Dinesh, D., Saikavitha, TV., Dinesh, P. 2014. "Evaluation of Salivary Flow Rate, pH and Buffer in Pre, Post & Post Menopausal Women on HRT." *Journal of clinical and diagnostic research* □: *JCDR* 8(2): 233–36.
- Martínez-Maestre, MA., González-Cejudo, C., Machuca, G., Torrejón, R., Castelo-Branco, C. 2010. "Periodontitis and Osteoporosis: A Systematic Review." *Climacteric* □: *the journal of the International Menopause Society* 13(6): 523–29.
- Martínez-Maestre, MA., Machuca, G., González-Cejudo, C., Corcuera Flores, JR., Torrejón Cardoso, R., Castelo-Branco, C. 2013. "Osteoporosis, Fragility Fracture, and Periodontal Disease: A Cross-Sectional Study in Spanish Postmenopausal Women." *Menopause* 20(1): 79–84.
- Matuliene, G., Studer, R., Lang, NP., Schmidlin, K., Pjetursson, BE., Salvi, GE., Brägger, U., Zwahlen, M. 2010. "Significance of Periodontal Risk Assessment in the Recurrence of Periodontitis and Tooth Loss." *Journal of Clinical Periodontology* 37: 191–99.
- Meisel, P., Kroemer, HK., Nauck, M., Holtfreter, B., Kocher, T. 2014. "Tooth Loss, Periodontitis, and Statins in a Population-Based Follow-up Study." *Journal of periodontology* 85(6): e160–68.
- Meurman, JH., Tarkkila, L., Tiitinen, A. 2009. "The Menopause and Oral Health." *Maturitas* 63(1): 56–62.
- Moeintaghavi, A., Pourjavad, M., Dadgar, S., Shayesteh Tabbakh, N. 2013. "Evaluation of the Association between Periodontal Parameters, Osteoporosis and Osteopenia in Post Menopausal Women." *Journal of dentistry (Tehran, Iran)* 10(5): 443–48.

- Mombelli, A., Casagni, F., Madianos, PN. 2002. "Can Presence or Absence of Periodontal Pathogens Distinguish between Subjects with Chronic and Aggressive Periodontitis? A Systematic Review." *Journal of Clinical Periodontology* 29(s3): 10–21.
- Morillo, JM, Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Silva, A. 2003. "Quantitative Real-Time PCR Based on Single Copy Gene Sequence for Detection of Actinobacillus Actinomycetemcomitans and Porphyromonas Gingivalis." *Journal of periodontal research* 38(5): 518–24.
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., Duskova, J. 2014. "Porphyromonas Gingivalis: Major Periodontopathic Pathogen Overview." *Journal of immunology research* 2014: 476068. doi: 10.1155/2014/476068.
- National Institute on Aging. 2008. *Menopause Time for a Change*. eds. National Institutes of Health and U.S. Department of Health and Human Services. [https:// www.nia.nih.gov /health/publication/ menopause-time-change/introduction-menopause](https://www.nia.nih.gov/health/publication/menopause-time-change/introduction-menopause).
- Nelson, HD. 2008. "Menopause." *Lancet* 371(9614): 760–70.
- Nonnenmacher, C., Dalpke, A., Rochon, J., Flores-de-Jacoby, L., Mutters, R., Heeg, K. 2005. "Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection and Quantification of Bacteria in Periodontal Patients." *The Journal of periodontology* 76(9): 1542–49.
- Nørskov-Lauritsen, N., Kilian, M. 2006. "Reclassification of Actinobacillus Actinomycetemcomitans, Haemophilus Aphrophilus, Haemophilus Paraphrophilus and Haemophilus Segnis as Aggregatibacter Actinomycetemcomitans Gen. Nov., Comb. Nov., Aggregatibacter Aphrophilus Comb. Nov. and Aggregatibacter." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56(Pt 9): 2135–46.

- Olsen, I, Shah, HN., Gharbia, SE. 1999. "Taxonomy and Biochemical Characteristics of Actinobacillus Actinomycetemcomitans and Porphyromonas Gingivalis." *Periodontology 2000* 20(340): 14–52.
- Otomo-Corgel, J. 2012. "Osteoporosis and Osteopenia: Implications for Periodontal and Implant Therapy." *Periodontology 2000* 59(1): 111–39.
- Otomo-Corgel, J. 2013. "Dental Management of the Female Patient." *Periodontology 2000* 61(1): 219–31.
- Passos, J.S., Vianna, MIP., Gomes-Filho, IS., Cruz, SS., Barreto, ML., Adan, L., Rösing, CK., Cerqueira, EMM., Trindade, SC., Coelho, JMF. 2013. "Osteoporosis/osteopenia as an Independent Factor Associated with Periodontitis in Postmenopausal Women: A Case-Control Study." *Osteoporosis International* 24: 1275–83.
- Pepelassi, E., Nicopoulou-Karayianni, K., Archontopoulou, AD., Mitsea, A., Kavadella, A., Tsiklakis, K., Vrotsos, I., Devlin, H., Horner, K. 2012. "The Relationship between Osteoporosis and Periodontitis in Women Aged 45-70 Years." *Oral diseases* 18(4): 353–59.
- Rams, TE, Degener, JE., van Winkelhoff, AJ. 2014. "Antibiotic Resistance in Human Chronic Periodontitis Microbiota." *Journal of periodontology* 85(1): 160–69.
- Reinhardt, RA., Payne, JB., Maze, CA., Patil, KD., Gallagher, SJ., Mattson, JS. 1999. "Influence of Estrogen and Osteopenia/osteoporosis on Clinical Periodontitis in Postmenopausal Women." *Journal of periodontology* 70(8): 823–28.
- Renvert, S., Persson, RE., Rutger Persson, G. 2012. "Tooth Loss and Periodontitis in Older Individuals. Results From the Swedish National Study on Aging and Care." *Journal of Periodontology* 84(8): 1–13.

- Riep, B., Edesi-Neuss, L., Claessen, F., Skarabis, H., Ehmke, B., Flemmig, TF., Bernimoulin, JP., Göbel, UB., Moter, A. 2009. "Are Putative Periodontal Pathogens Reliable Diagnostic Markers?" *Journal of clinical microbiology* 47(6): 1705–11.
- Ruan, Y., Shen, L., Zou, Y., Qi, Z., Yin, J., Jiang, J., Guo, L., He, L., Chen, Z., Tang, Z., Qin, S. 2015. "Comparative Genome Analysis of *Prevotella Intermedia* Strain Isolated from Infected Root Canal Reveals Features Related to Pathogenicity and Adaptation." *BMC Genomics* 16(1). doi: 10.1186/s12864-015-1272-3.
- Sanz, M, Lau, L., Herrera, D., Morillo, JM., Silva, A. 2004. "Methods of Detection of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas Gingivalis* and *Tannerella Forsythensis* in Periodontal Microbiology, with Special Emphasis on Advanced Molecular Techniques: A Review." *Journal of clinical periodontology* 31(12): 1034–47.
- Saygun, I., Kubar, A., Sahin, S., Sener, K., Slots, J. 2008. "Quantitative Analysis of Association between Herpesviruses and Bacterial Pathogens in Periodontitis." *Journal of periodontal research* 43(3): 352–59.
- Signat, B., Roques, C., Poulet, P., Duffaut, D. 2011. "Role of *Fusobacterium Nucleatum* in Periodontal Health and Disease." *Curr Issues Mol Biol.* 13(2): 25–36.
- Socransky, SS., Haffajee, AD. 1992. "The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts." *The Journal of periodontology* 63: 322–31.
- Socransky, SS., Haffajee AD., Cugini, MA., Smith, C., Kent, RL. 1998. "Microbial Complexes in Subgingival Plaque." *Journal of clinical periodontology* 25(2): 134–44.
- Socransky, SS., Haffajee, AD. 2002. "Dental Biofilms: Difficult Therapeutic Targets." *Periodontology 2000* 28: 12–55.

- Sultan, N., Rao, J. 2011. "Association between Periodontal Disease and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A Cross Sectional Study." *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* 16(3): e440-47.
- Taba, M., Kinney, J., Kim, AS., Giannobile, WV. 2005. "Diagnostic Biomarkers for Oral and Periodontal Diseases." *Dental clinics of North America* 49(3): 551-71, vi.
- Taguchi, A., Sanada, M., Suei, Y., Ohtsuka, M., Nakamoto, T., Lee, K., Tsuda, M., Ohama, K., Tanimoto, K., Bollen, AM. 2004. "Effect of Estrogen Use on Tooth Retention, Oral Bone Height, and Oral Bone Porosity in Japanese Postmenopausal Women." *Menopause* 11(5): 556-62.
- Takahashi, O., Yoshihara, A., Nakamura, K., Miyazaki, H. 2012. "Association between Periodontitis and Systemic Bone Mineral Density in Japanese Community-Dwelling Postmenopausal Women." *Journal of dentistry* 40(4): 304-11.
- Tarkkila, L., Kari, K., Furuholm, J., Tiitinen, A., Meurman, JH. 2010. "Periodontal Disease-Associated Micro-Organisms in Peri-Menopausal and Post-Menopausal Women Using or Not Using Hormone Replacement Therapy. A Two-Year Follow-up Study." *BMC oral health* 10: 10.
- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B., Haffajee, AD. 2013. "Lessons Learned and Unlearned in Periodontal Microbiology." *Periodontology 2000* 62(1): 95-162.
- Tezal, M., Wactawski-Wende, J., Grossi, SG., Dmochowski, J., Genco, RJ. 2005. "Periodontal Disease and the Incidence of Tooth Loss in Postmenopausal Women." *Journal of Periodontology* 76(July): 1123-28.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, JL., Slots, J. 1998. "Risk Indicators for Harboring Periodontal Pathogens." *Journal of periodontology* 69(10): 1111-18.

WHO study group. 1994. Assessment of Fracture Risk and Its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/39142>.

Yokoyama, M., Hinode, D., Yoshioka, M., Fukui, M., Tanabe, S., Grenier, D., Ito, HO. 2008. "Relationship between *Campylobacter Rectus* and Periodontal Status during Pregnancy." *Oral microbiology and immunology* 23(1): 55–59.

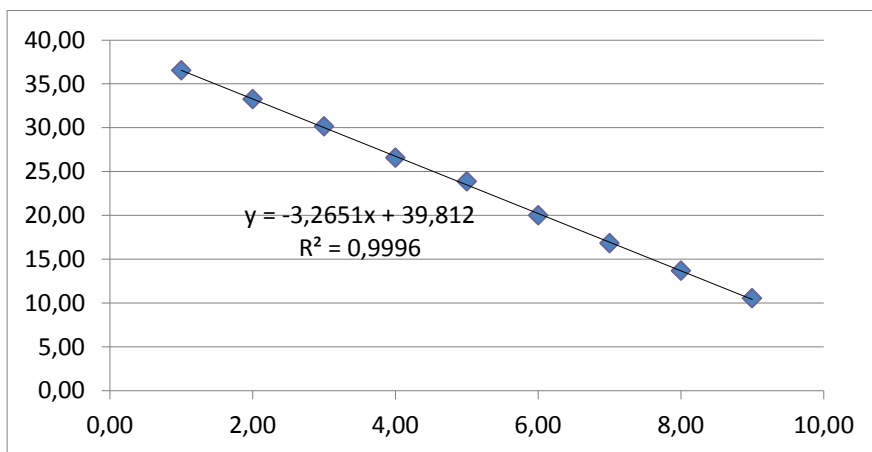
10. ANEXOS

10. ANEXOS

En las Tablas Anexos 1A hasta la 1G, se muestran las estimaciones de CFU/ml para las bacterias cuantificadas, y en las Figuras Anexos 1A hasta 1G, se muestran las rectas patrón para cada bacteria estudiada.

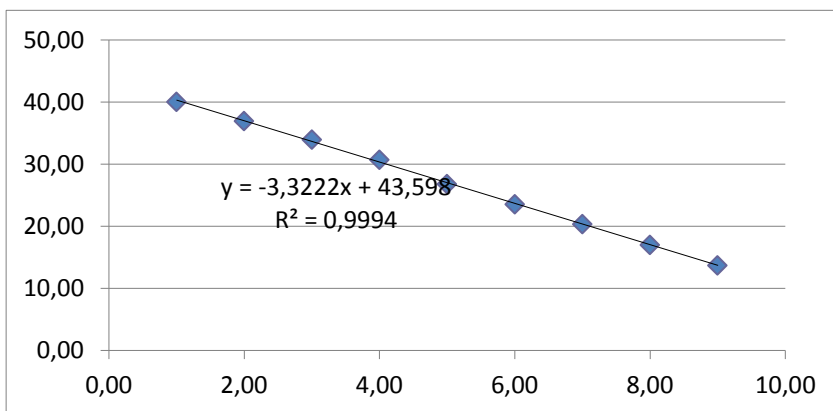
Anexos Tabla 1A. Estimación CFU/mL para *P. gingivalis*.

	Dilución (CFU mL-1)	Dilución (log CFU mL-1)	Cq promedio	Estimación CFU/ml
9	1,00E+09	9,00	10,54	9,23E+08
8	1,00E+08	8,00	13,68	1,01E+08
7	1,00E+07	7,00	16,82	1,10E+07
6	1,00E+06	6,00	19,99	1,18E+06
5	1,00E+05	5,00	23,86	7,68E+04
4	1,00E+04	4,00	26,58	1,13E+04
3	1,00E+03	3,00	30,15	9,13E+02
2	1,00E+02	2,00	33,23	1,04E+02
1	10,00	1,00	36,54	1,00E+01

Anexo Figura 1A. Recta patrón para *P. gingivalis*

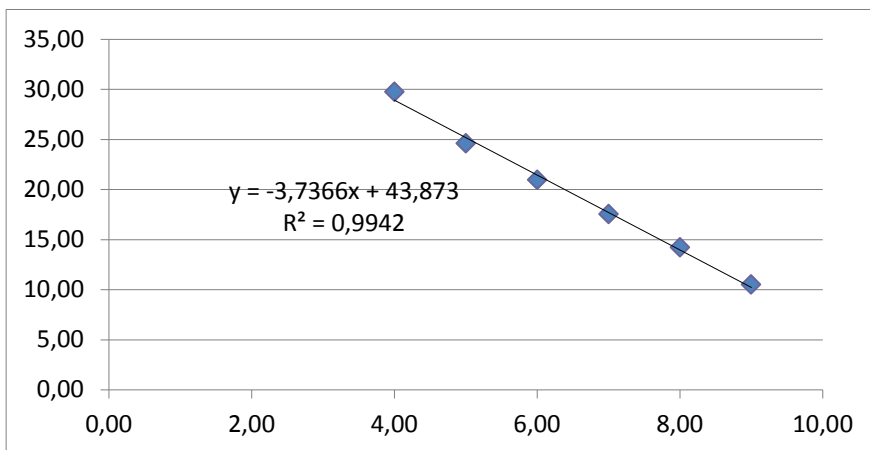
Anexo Tabla 1B. Estimación CFU/mL para *T. forsythia*.

	Dilución (CFU mL-1)	Dilución (log CFU mL-1)	Cq promedio	Estimación CFU/ml
9	1,00E+09	9,00	13,70	9,94E+07
8	1,00E+08	8,00	17,01	9,63E+06
7	1,00E+07	7,00	20,31	9,39E+05
6	1,00E+06	6,00	23,55	9,56E+04
5	1,00E+05	5,00	26,77	9,87E+03
4	1,00E+04	4,00	30,67	6,31E+02
3	1,00E+03	3,00	33,95	6,24E+01
2	1,00E+02	2,00	36,92	7,69E+00
1	10,00	1,00	40,00	8,76E-01

Anexo Figura 1B. Recta patrón para *Tannerella forsythia*.

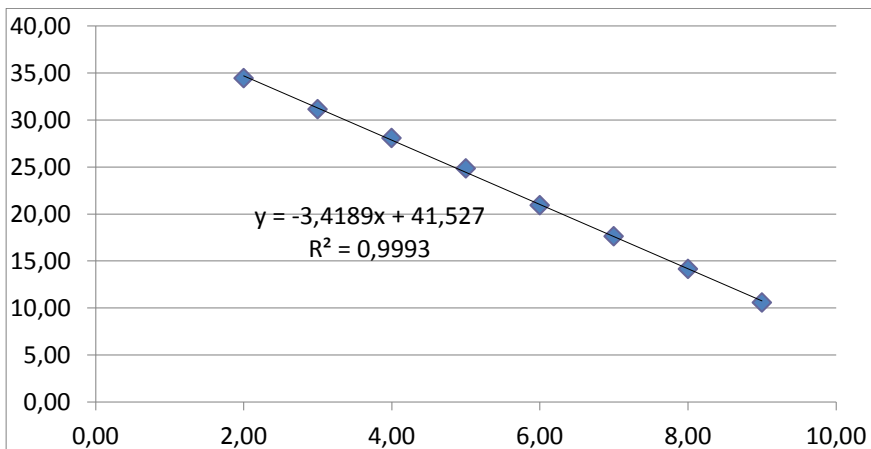
Anexo Tabla 1C. Estimación CFU/mL para *C. rectus*.

	Dilución (CFU mL-1)	Dilución (log CFU mL-1)	Cq promedio	Estimación CFU/ml
9	1,00E+09	9,00	10,50	9,49E+08
8	1,00E+08	8,00	14,21	6,96E+07
7	1,00E+07	7,00	17,52	6,72E+06
6	1,00E+06	6,00	20,96	5,94E+05
5	1,00E+05	5,00	24,59	4,61E+04
4	1,00E+04	4,00	29,74	1,22E+03
3	1,00E+03	3,00	38,20	3,12E+00

Anexo Figura 1C. Recta patrón para *C. rectus*

Anexo Tabla 1D. Estimación CFU/mL para *F. nucleatum*.

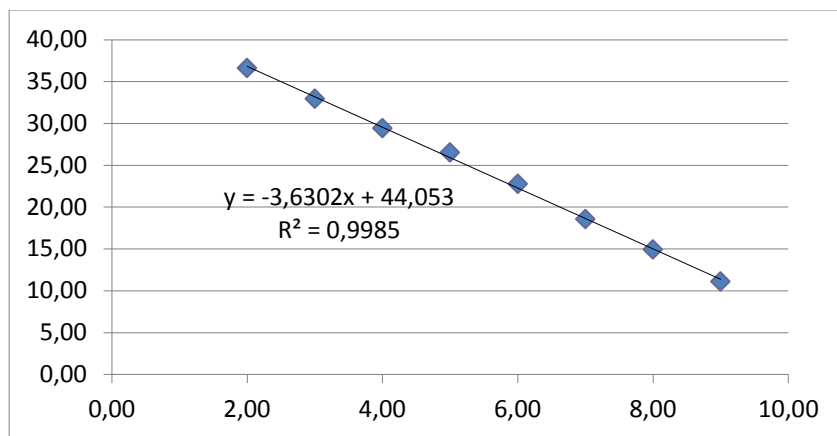
	Dilución (CFU mL-1)	Dilución (log CFU mL-1)	Cq promedio	Estimación CFU/ml
9	1,00E+09	9,00	10,58	8,97E+08
8	1,00E+08	8,00	14,16	7,21E+07
7	1,00E+07	7,00	17,63	6,24E+06
6	1,00E+06	6,00	20,94	6,05E+05
5	1,00E+05	5,00	24,84	3,86E+04
4	1,00E+04	4,00	28,08	3,92E+03
3	1,00E+03	3,00	31,14	4,54E+02
2	1,00E+02	2,00	34,44	4,42E+01
1	10,00	1,00	40,00	8,76E-01

Anexo Figura 1D. Recta patrón para *F. nucleatum*

Anexo Tabla 1E. Tabla para calcular recta patrón de *A. actinomycetemcomitans* mediante sondas TaqMan.

	Dilución (CFU mL-1)	Dilución (log CFU mL-1)	Cq promedio	Estimación CFU/ml
9	1,00E+09	9,00	11,08	1,21E+09
8	1,00E+08	8,00	14,91	1,07E+08
7	1,00E+07	7,00	18,54	1,07E+07
6	1,00E+06	6,00	22,76	7,36E+05
5	1,00E+05	5,00	26,52	6,78E+04
4	1,00E+04	4,00	29,40	1,09E+04
3	1,00E+03	3,00	32,92	1,17E+03
2	1,00E+02	2,00	36,59	1,14E+02
1	10,00	1,00	38,79	2,82E+01

Anexo Figura 1E. Recta patrón para *A. actinomycetemcomitans* (TaqMan)

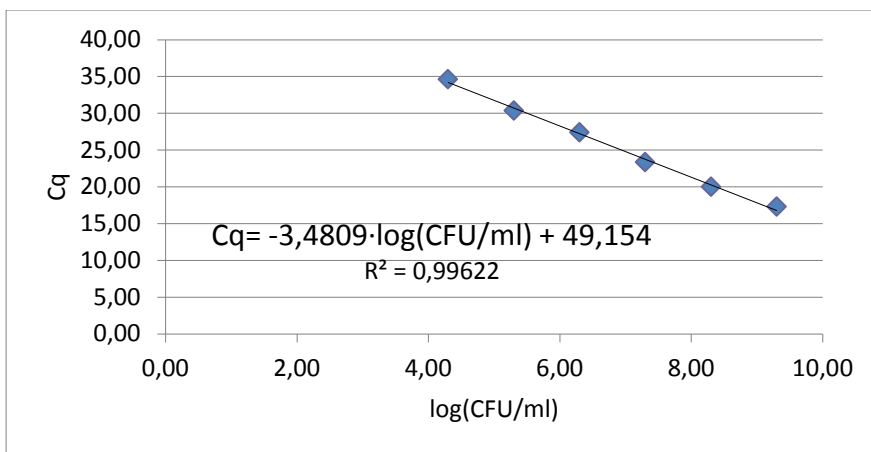


Anexo Tabla 1F. Estimación CFU/mL para *Prevotella intermedia* (mediante SYBR Green)

	Dilución (CFU mL-1)	Dilución (log CFU mL-1)	Cq promedio	Estimación CFU/ml
9	2,00E+09	9,30	17,27	1,45E+09
8	2,00E+08	8,30	19,97	2,42E+08
7	2,00E+07	7,30	23,32	2,63E+07
6	2,00E+06	6,30	27,36	1,82E+06
5	2,00E+05	5,30	30,36	2,51E+05
4	2,00E+04	4,30	34,60	1,52E+04
3	2,00E+03	3,30	ND	ND
2	2,00E+02	2,30	ND	ND
1	20,00	1,30	ND	ND

ND: No detectado

Anexo Figura 1F. Recta patrón para *P. intermedia*

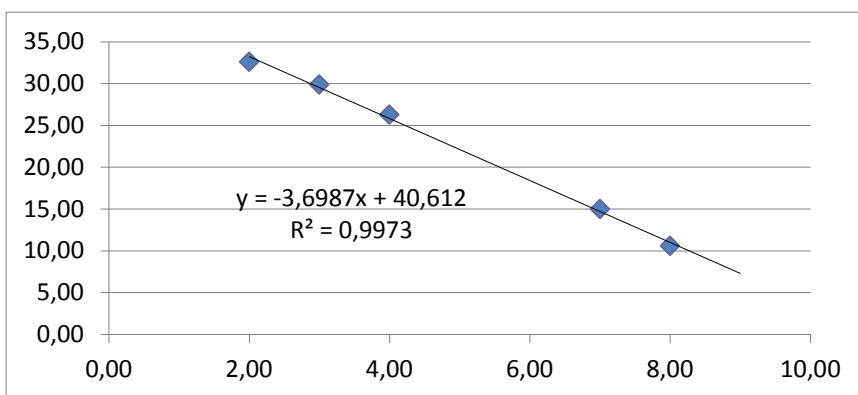


Anexo Tabla 1G. Estimación CFU/mL para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (mediante SYBR Green)

	Dilución (CFU mL-1)	Dilución (log CFU mL-1)	Cq promedio	Estimación CFU/ml
9	1,00E+09	9,00	ND	ND
8	1,00E+08	8,00	10,60	1,64E+09
7	1,00E+07	7,00	14,97	1,03E+08
6	1,00E+06	6,00	ND	ND
5	1,00E+05	5,00	ND	ND
4	1,00E+04	4,00	26,29	4,89
3	1,00E+03	3,00	29,85	8,15E+03
2	1,00E+02	2,00	32,58	1,45E+03
1	10,00	1,00	ND	ND

ND: No detectado

Anexo Figura 1G. Recta patrón para *A. actynomycetemcomitans*.



Anexo Tabla 2. Promedio de cuantificación de las 76 muestras para *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante el uso de sondas TaqMan.

	<i>Pg</i> UFC/mL	<i>Tf</i> UFC/mL	<i>Cr</i> UFC/mL	<i>Fn</i> UFC/mL	<i>Aa</i> UFC/mL
1	5,60E+02	1,14E+04	8,52E+04	1,69E+05	ND
2	1,95E+05	9,86E+05	2,93E+05	1,88E+06	1,06E+03
3	3,49E+02	5,79E+04	7,59E+05	2,39E+06	ND
4	1,41E+02	1,63E+03	1,10E+04	5,28E+04	2,85E+02
5	3,16E+02	1,26E+03	1,34E+04	2,92E+05	ND
6	5,11E+02	3,11E+06	4,66E+04	1,98E+05	ND
7	1,12E+03	3,09E+02	1,57E+05	5,47E+05	2,91E+02
8	5,63E+05	8,19E+04	1,44E+05	1,08E+06	5,81E+01
9	5,65E+03	8,73E+03	3,39E+04	1,52E+05	8,47E+01
10	6,56E+04	1,29E+05	1,39E+05	9,06E+05	2,63E+02
11	3,34E+05	8,55E+05	4,92E+05	2,81E+06	8,28E+05
12	3,36E+04	4,53E+04	3,65E+04	9,12E+05	ND
13	1,43E+02	5,42E+04	7,01E+05	1,24E+07	5,24E+02
14	1,00E+07	5,83E+06	1,45E+06	2,05E+07	ND
15	5,44E+02	1,17E+03	7,66E+05	1,17E+07	ND
16	1,00E+03	1,81E+05	1,28E+06	9,63E+06	ND
17	7,93E+03	2,67E+05	4,18E+05	5,89E+06	1,66E+02
18	9,53E+03	4,78E+05	4,36E+05	3,30E+06	2,05E+05
19	1,17E+03	3,18E+03	3,88E+04	6,34E+05	1,11E+06
20	1,04E+04	5,04E+04	2,71E+05	1,98E+06	2,10E+02
21	3,01E+02	1,29E+06	2,48E+05	ND	5,23E+05

22	2,38E+03	3,68E+03	3,74E+05	4,03E+06	1,16E+02
23	1,08E+02	1,53E+03	7,79E+04	1,68E+06	9,89E+03
24	2,21E+05	3,31E+05	4,80E+05	1,15E+06	8,77E+01
25	5,20E+05	2,12E+05	8,64E+05	5,53E+06	6,89E+01
26	1,07E+06	8,58E+05	2,40E+06	6,65E+06	1,84E+05
27	1,64E+04	8,02E+04	1,10E+06	2,15E+06	1,86E+02
28	1,47E+02	2,18E+05	4,06E+05	8,97E+05	7,48E+01
29	5,84E+02	7,18E+02	3,61E+04	9,95E+04	3,11E+03
30	5,52E+03	6,28E+03	3,26E+04	5,62E+05	ND
31	1,90E+02	7,17E+03	1,71E+05	9,82E+05	4,71E+02
32	1,82E+02	6,24E+05	7,49E+04	5,60E+06	ND
33	1,73E+03	4,51E+02	2,26E+04	6,21E+05	4,99E+01
34	2,08E+02	7,35E+05	6,93E+04	1,40E+06	3,45E+02
35	2,40E+02	4,18E+06	9,05E+05	9,44E+06	1,77E+02
36	5,23E+05	1,25E+05	2,64E+05	4,21E+06	ND
37	6,67E+04	2,16E+05	4,08E+05	2,75E+06	ND
38	5,29E+02	8,06E+03	1,72E+06	1,34E+07	4,53E+01
39	ND	4,63E+05	1,03E+06	6,30E+06	ND
40	2,75E+01	2,08E+05	5,43E+04	2,08E+06	4,04E+05
41	9,56E+00	4,99E+02	9,47E+03	8,81E+04	1,31E+02
42	3,53E+01	4,25E+04	3,33E+04	1,29E+05	1,38E+06
43	2,55E+03	2,34E+03	1,54E+05	7,23E+05	1,22E+02
44	8,98E+01	1,48E+04	5,97E+05	4,34E+06	3,23E+02
45	5,38E+01	2,40E+02	9,95E+03	1,16E+05	5,35E+01
46	1,14E+02	2,13E+02	6,32E+03	6,17E+04	1,81E+02
47	1,09E+04	1,08E+06	7,93E+05	9,41E+06	ND
48	3,63E+04	4,08E+05	2,93E+05	4,37E+06	1,37E+02
49	2,49E+06	2,45E+06	7,95E+05	4,32E+06	1,39E+04

50	2,94E+02	1,52E+05	1,61E+06	6,50E+06	2,92E+05
51	2,05E+02	6,63E+04	2,89E+05	1,71E+06	5,16E+03
52	2,01E+02	1,19E+05	1,33E+06	9,51E+06	ND
53	3,19E+02	8,55E+05	2,35E+03	2,49E+06	5,62E+07
54	6,58E+02	3,94E+06	8,10E+05	1,04E+07	3,12E+02
55	3,01E+04	1,78E+05	1,33E+06	3,17E+06	ND
56	2,38E+04	2,35E+04	4,66E+04	3,70E+05	8,44E+01
57	2,16E+06	3,53E+06	4,64E+05	5,93E+06	1,08E+05
58	3,58E+02	3,55E+02	7,98E+05	4,46E+06	ND
59	7,42E+04	6,60E+05	3,46E+04	4,69E+06	3,41E+02
60	2,88E+05	3,60E+05	2,50E+05	1,83E+06	ND
61	7,74E+06	1,49E+05	1,41E+05	1,07E+06	8,10E+03
62	4,93E+04	1,83E+04	2,57E+05	3,00E+06	1,50E+03
63	2,18E+05	1,58E+05	1,81E+05	7,61E+05	2,14E+03
64	2,24E+06	4,07E+04	9,90E+05	3,64E+06	9,16E+03
65	1,25E+02	9,41E+04	5,02E+03	8,03E+05	6,36E+01
66	3,57E+05	1,90E+06	2,17E+05	1,18E+06	4,89E+02
67	2,05E+01	3,95E+02	1,92E+04	2,00E+04	2,16E+02
68	1,22E+02	1,93E+04	7,17E+04	5,67E+05	1,77E+05
69	5,67E+04	3,01E+05	2,04E+05	9,56E+05	7,70E+01
70	2,51E+01	5,44E+02	1,94E+04	3,32E+05	6,16E+02
71	2,62E+02	5,32E+05	1,98E+05	1,33E+06	ND
72	1,08E+05	2,00E+05	1,68E+04	5,20E+05	9,05E+03
73	1,58E+02	1,01E+04	4,53E+05	1,71E+06	9,55E+01
74	1,63E+02	3,55E+04	1,43E+06	3,37E+06	9,70E+01
75	1,90E+01	1,90E+05	9,46E+04	1,78E+06	ND
76	3,15E+01	8,29E+05	3,56E+05	3,46E+06	9,46E+01

ND: No detectado

Además, se muestra en el Anexo Tabla 3, los datos obtenidos para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante qPCR con sondas TaqMan y con SYBR Green para realizar los análisis comparativos entre ambas técnicas.

Anexo Tabla 3. Tabla de cuantificación con qPCR de muestras subgingivales para *A. actinomycetemcomitans* mediante sondas TaqMan y SYBR Green.

MUESTRA	SONDAS TAQMAN	SYBR GREEN
1	ND	ND
2	1,06E+03	4,63E+03
3	ND	1,14E+04
4	2,85E+02	ND
5	ND	ND
6	ND	1,38E+05
7	2,91E+02	1,86E+03
8	5,81E+01	ND
9	8,47E+01	1,87E+03
10	2,63E+02	5,38E+03
11	8,28E+05	1,10E+07
12	ND	ND
13	5,24E+02	9,02E+03
14	ND	ND
15	ND	ND
16	ND	2,91E+04
17	1,66E+02	ND
18	2,05E+05	4,20E+06
19	1,11E+06	2,70E+05
20	2,10E+02	ND
21	5,23E+05	7,08E+06

22	1,16E+02	ND
23	9,89E+03	1,17E+05
24	8,77E+01	ND
25	6,89E+01	ND
26	1,84E+05	2,57E+06
27	1,86E+02	ND
28	7,48E+01	ND
29	3,11E+03	3,35E+04
30	ND	ND
31	4,71E+02	7,67E+03
32	ND	ND
33	9,55E+01	ND
34	4,99E+01	ND
35	3,45E+02	ND
36	1,77E+02	ND
37	ND	ND
38	ND	ND
39	4,53E+01	ND
40	ND	ND
41	4,04E+05	9,76E+06
42	9,70E+01	ND
43	1,31E+02	ND
44	1,38E+06	1,62E+07
45	1,22E+02	ND
46	3,23E+02	ND
47	5,35E+01	ND
48	1,81E+02	ND
49	ND	ND
50	1,37E+02	ND
51	1,39E+04	1,32E+05
52	2,92E+05	2,73E+06
53	5,16E+03	8,72E+04
54	ND	ND
55	5,62E+07	ND
56	3,12E+02	ND
57	ND	ND
58	8,44E+01	ND

59	1,08E+05	2,01E+06
60	ND	ND
61	3,41E+02	ND
62	ND	ND
63	8,10E+03	1,26E+05
64	1,50E+03	1,73E+04
65	2,14E+03	2,05E+04
66	9,16E+03	9,79E+04
67	6,36E+01	ND
68	4,89E+02	ND
69	2,16E+02	ND
70	1,77E+05	1,93E+06
71	7,70E+01	ND
72	6,16E+02	ND
73	ND	ND
74	9,05E+03	9,69E+04
75	ND	ND
76	9,46E+01	ND

ND: No detectado

Anexo 4. Consentimiento informado



Comitè Ètic d'Investigació Clínica
Clínica Odontològica Universitària

Campus de Bellvitge
Oficina Legal 611
08197 L'Hospitalet de Llobregat
Tel. 93 284 02 84
Tel. 93 402 42 80
Fax. 93 326 47 88

INFORME DEL COMITÈ ÈTIC DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA

Dofia Silvia Sánchez González, Secretaria del Comitè Ètic de Investigació Clínica de la Clínica Odontològica Universitària.

CERTIFICA

Que este Comitè, en reunió del 28 de Octubre de 2008, ha evaluado el protocolo del estudio presentado por los Dr. Albert Estrugo Devesa y Dr. José López López para que sea realizado en este Centro el estudio código de protocolo 08/08 titulado: "Valoració de l'osteoporosi/osteopènia i la seva relació amb les malalties de la cavitat oral" y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad de los investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Los investigadores principales garantizan la confidencialidad de los datos de los pacientes.

Y que este Comitè ACEPTA que dicha investigación sea realizada en el centro: Clínica Odontològica Universitària de la Universitat de Barcelona por los Dr. Albert Estrugo Devesa y Dr. José López López como investigadores principales.

Lo que firmo en L'Hospitalet, a 03 de abril de 2009

Firmado:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Silvia Sanchez Gonzalez'.

Dofia Silvia Sánchez González



Anexo 5. Comunicaciones presentadas en congresos relacionadas con la tesis.

- 8th Conference of the European Federation of Periodontology. Europerio 8. June 3-6, 2015. Londres, Reino Unido. Presentación póster

Real-time PCR quantification of five periodontal pathogens in subgingival samples from postmenopausal women.

Autores: S. Hernández-Vigueras, B. Martínez-Garriga, M.C. Sánchez, M. Sanz, A. Estrugo, T. Vinuesa, J. López-López, M. Viñas.

- XV Congreso Sociedad Española de Gerodontología. SEGER. 18-20 de junio de 2015. La Toja, España. Comunicación Oral
Osteoporosis y periodontitis en mujeres post-menopáusicas de Barcelona, España.

Autores: Hernández Vigueras S, Martínez Garriga B, Estrugo Devesa A, Vinuesa T, Viñas M, López-López J.

- XXV Congreso Nacional de Microbiología, España. 7 al 10 de julio de 2015. Logroño, España. Presentación Póster

Cuantificación de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* en muestras subgingivales de mujeres post menopáusicas mediante PCR en tiempo real.

Autores: Scarlette Hernández Vigueras, Blanca Martínez Garriga, Teresa Vinuesa, José López López, Miguel Viñas.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Patologia i Terapèutica
Experimental
Departament d'Odontostomatologia**



Facultat de Medicina
Facultat d'Odontologia
Campus de Bellvitge

José López López, Profesor Titular de Medicina Bucal del departamento de Odontoestomatología de la Facultad de Odontología de la *Universitat de Barcelona*,
y
Blanca Martínez Garriga, investigadora del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, de la Facultad de Medicina de la misma universidad

HACEN CONSTAR

Que la tesis doctoral presentada por la licenciada Scarlette Hernández Viguera titulada “Determinación del perfil microbiano en patología periodontal en mujeres postmenopáusicas”, se ha desarrollado bajo su dirección en el laboratorio de Microbiología Molecular de este Campus Universitario.

Que la memoria presentada cumple a juicio de los abajo firmantes las condiciones formales y conceptuales necesarias para que la tesis pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste firman el presente en Hospitalet de Llobregat el día 8 de Septiembre de dos mil quince.

Fdp
Prof. Dr. José López López

Dra. Blanca Martínez Garriga

Anexo 5. Manuscrito aceptado para publicación en Journal of Periodontology. DOI 10.1902/jop.2015.150365

Oral Microbiota and Periodontal Status in Postmenopausal Women (JOP-15-0365.R1). S. Hernández-Vigueras; B. Martínez-Garriga; MC. Sanchez; M. Sanz; A. Estrugo-Devesa; T. Vinuesa; J. López-López; M. Viñas.

Oral Microbiota, Periodontal Status and Osteoporosis in Postmenopausal Women

Scarlette Hernández-Vigueras, PhD student^{*}, Blanca Martínez-Garriga, PhD[†], María Carmen Sánchez, PhD[‡], Mariano Sanz, MD, PhD[‡], Albert Estrugo-Devesa, PhD[§], Teresa Vinuesa T, MD, PhD[†], José López-López J, MD, PhD[§], Miguel Viñas, PhD^{†1}

^{*}Faculty of Medicine, Austral University of Chile, Valdivia, Chile.

[†]Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials. Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Hospitalet, Spain.

[‡]Research Laboratory, Faculty of Dentistry, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

[§]Section of Oral Medicine, Department of Odontostomatology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

¹CESPU-INNFACTS, Penafiel, Portugal.

Background: Alterations in hormone levels during menopause decrease bone density and may worsen oral health, favoring the growth of periodontal pathogens, whose detection could improve the diagnosis of periodontitis. The aim of this study was to detect and quantify the main periodontal pathogens in the oral microbiota of postmenopausal women and to explore the relationship between clinical and periodontal parameters.

Methods: This was an observational cross-sectional study of 76 postmenopausal women. Dental examinations and sampling for microbiological evaluation were performed and a history of osteoporosis/osteopenia was collected. Real-time polymerase chain reaction was used for detecting and quantifying *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* and *Tannerella forsythia*. The results obtained were subjected to statistical analyses. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results: Periodontitis was detected in 77.1% of women with osteoporosis/osteopenia ($p > 0.05$). A significant correlation was found between osteoporosis and missing teeth. *T. forsythia* and *C. rectus* were detected in 100% of the samples, *F. nucleatum* and *P. gingivalis* in 98.7% and *A. actinomycetemcomitans* in 73.7%.

Conclusions: Osteoporosis did not influence the prevalence of periodontitis among postmenopausal women. The presence of periodontopathogenic bacteria was not sufficient to confirm disease. A preventive maintenance program for postmenopausal women, particularly osteoporotic women, who are at greater risk of tooth loss, could minimize the potential effects of bone loss on periodontal tissues.

KEYWORDS:

periodontal diseases; postmenopausal women; Real-Time PCR.

Menopause is the permanent cessation of menstrual periods, whether naturally or induced by surgery, chemotherapy, or radiation. It is accompanied by hormonal changes, most prominently, decreases in estrogens and androgens levels, which produce a variety of signs and symptoms: vasomotor symptoms, decreased bone density, hot flushes, profuse perspiration, atrophic vaginitis and oral cavity alterations.¹

The oral symptoms during menopause include dry mouth (xerostomia), burning mouth, and changes in taste perception, and are a common complaint of postmenopausal women.² If xerostomia is left untreated, it may change the oral pH and increase the risk of developing oral diseases. These symptoms have been attributed to reduced salivary flow, and oral

pathologies seem to be affected by changes in salivary and crevicular fluid composition. These symptoms have been attributed to reduced salivary flow, and oral pathologies seem to be affected by changes in salivary and crevicular fluid composition.³ Saliva contributes to maintenance of the oral pH by neutralizing acids from food and beverages, as well as from bacterial activity, thereby reducing the risk of periodontal disease.³ After menopause, reduced salivary flow rate and low pH may make women more prone to oral health problems.⁴ Decreased estrogen levels, in addition to worsening periodontal conditions, increase the risk of osteoporosis in postmenopausal women.³ Osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by a generalized and progressive loss of bone mineral density (BMD) and an increased propensity to fracture.^{5,6} Its prevalence increases with age and it affects all bones of the body, including the jaw bone, resulting in cortical thinning and a reduction of cancellous bone⁶.

For women, in addition to age, the menopausal transition itself causes a period of rapid bone loss (12–20% in the first 5 years after menopause) such that the risk of fracture in postmenopausal women is higher than in men of the same age⁷.

The changes in bone composition also have implications for oral health,⁸ including the risk of enhanced progression of periodontitis.^{5,6} Thus, bone loss is a feature shared by periodontal disease and osteoporosis. The relationship between the skeletal loss of mineral density and the increased periodontal bone loss has been ascribed to several factors.⁵ Greater periodontal bone loss may occur simply because the bone surrounding the teeth is less dense and therefore less resistant to resorption.⁵ In addition, the loss of alveolar BMD may leave bone more susceptible to periodontal bacteria, increasing the risk for periodontitis and tooth loss.⁹

Osteoporotic women show greater clinical attachment loss (CAL) and gingival recession than women with a normal BMD, which suggests a greater severity of periodontitis.¹⁰ The early diagnosis of reduced BMD, prior to the establishment of a significant negative impact on the periodontal tissues, has been recommended.⁹

The pathogenic microbial population involved in periodontitis is highly complex. However, the literature contains reports of associations between periodontal disease and certain microorganisms, such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Tannerella forsythia*.^{11,12} A quantitative analysis of these periodontal pathogens could improve both the diagnosis and evaluation of periodontitis and our understanding of its relationship to osteoporosis.

The aim of this study was to detect and quantify the main periodontal pathogens in the oral microbiota of postmenopausal women in order to explore the relationship between the microbiota and clinical and periodontal parameters. The measurement of pH was done as a general parameter since it is strongly related with consumption of sugar and acidic beverages, xerostomia and oral microbiota.³

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This was an observational cross-sectional study of 76 postmenopausal women who were treated at the Dental Hospital of the University of Barcelona (Spain). Dental examinations and sampling for microbiological evaluation were performed between May 2009 and September 2012.

The study population was selected from 694 women who participated in a questionnaire related to fracture risk factors in the Rheumatology Service of the University Hospital of Bellvitge in 1999. Only 137 of the 427 women who could be contacted agreed to participate. Subgingival samples were collected from 76 of these women, who were finally included in the study. None of them were under specific estrogen replacement treatment.

The study was approved by The Ethical Committee of the Faculty of Dentistry, University of Barcelona. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (revised in 2013). All of the patients were informed about the objectives and methodology and provided written informed consent to participate in the study.

Oral Examination

All of the participants received a complete oral examination. The following variables were assessed: number of missing teeth, not including third molars (28 maximum); pocket depth, assessed with a World Health Organization (WHO) probe in all teeth; oral hygiene status, determined according to the criteria of the index of Greene and Vermillion.¹³ CAOD index (carious, absent, and obturated teeth index), which was obtained by summing carious, missing and obturated teeth, and dividing by the total number of teeth; the presence of mucosal injury; periodontal treatment needs, examined by using the Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN) recommended by the WHO; oral pH, measured by using pH indicator strips that were placed on the floor of the mouth; and xerostomia, determined by using a specific questionnaire and performing the test of the mirror (sticking of a dental mirror to the buccal mucosa was taken as a positive result for xerostomia).

Diagnosis of Osteoporosis/Osteopenia

Osteopenia was assessed from densitometry reports. The methods and criteria used in the diagnosis of osteoporosis were those established by the WHO.¹⁴ According to these criteria, osteoporosis is defined as a BMD ≥ 2.5 standard deviations (SDs) below the average value for young healthy women (T-score ≤ -2.5 SD), and osteopenia as 1–2.5 SD (T-score between -1.0 SD and -2.5 SD). Association between osteopenia and oral bone loss as well as between osteopenia and oral state were accomplished as recommended in the literature.^{15,16}

Diagnosis of Periodontitis

Women were considered to have periodontitis if they met the criteria established by the American Academy of Periodontology, which state that the patient must have at least one site with a pocket depth and CAL ≥ 4 mm.¹⁷

Specimen Collection

Subgingival samples were taken after supragingival plaque removal. Two paper points (size 30)[#] were inserted in the deepest periodontal pocket for 20 s and placed in labeled sterile test tubes containing 500 μ L of bi-distilled water. The vials were immediately frozen at -80°C . Despite the limitation derived from the sampling of only one pocket, we harvested samples from the deepest one, since deeper pockets offer a better environment for anaerobes and are useful as a general parameter.

Reference Bacterial Strains

Standard reference strains of *Fusobacterium nucleatum* DMSZ 20482, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSMZ 8324, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Campylobacter rectus* ATCC 33238, and *Tannerella forsythia* ATCC 43037 were used.

DNA Extraction

The tubes containing the paper points were thawed, vortexed for 2–3 min and then centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. The pellet was processed with a commercial DNA extraction kit^{**} following the manufacturer's protocol for gram-negative bacteria. DNA purity and concentrations were determined spectrophotometrically using a NanoDrop 1000 spectrophotometer.^{††} DNA from the controls (reference bacterial strains) was obtained using the same method. Purified genomic DNA of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, and *F. nucleatum*, was obtained from 1 mL of viable bacteria containing 10^8 , 10^9 , 10^8 , 10^6 , and 10^6 colony-forming units (CFU)/mL, respectively. Ten-fold serial dilutions of each DNA were prepared in sterile water.^{‡‡} All DNA samples were frozen at -20°C until used.

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (Qpcr)

Primers and Probes. The primers^{§§} and probes^{||} sequences used to target the 16S rRNA gene are listed in Table 1. The oligonucleotide probes were labeled at the 5' end with fluorescent 6-carboxyfluorescein (FAM) and at the 3' end with 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA).

QPCR Conditions. PCR amplification was performed in a total reaction mixture volume of 10 μL , containing 8 μL of $2 \times$ master mixture^{¶¶} and 2 μL of DNA from the samples. Each DNA sample was analyzed in duplicate. The no template control (NTC) consisted of 8 μL of master mixture without DNA. The samples were placed in white 384-well plates^{###} and subjected to an initial amplification cycle of 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min in a thermocycler.^{***} To avoid carryover DNA, the laboratory was separated into pre- and post-PCR areas and strict barrier measures were used. However, none of these methods prevented the amplification of unspecific bacterial in some of the NTCs.

Data Analysis. Quantification cycle (Cq) values were determined using a software package.^{†††}

Quantitation of the DNA samples was based on accurate standard curves for each bacterium in each run, using appropriate external standards of known concentration. Standard curves were constructed by plotting the Cq values generated from the qPCR against *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, (see supplementary Figures 1 through 5 in the online *Journal of Periodontology*) and total cell concentrations (log CFU/mL). The correlation between Cq values and CFU/mL was automatically generated.

All assays were developed with a linear quantitative detection range established by a slope of 3.2–3.7 cycles/log decade, $r^2 > 0.994$, and an efficiency range of 1.8–2.0. The limit of detection was calculated using the Cq value from the last point on the standard curve that differed by 3 units from the lowest Cq value of the NTC. Values below this detection range may be detectable but they are not quantifiable. Samples were considered positive when the Cq values were above the detection limit.

Statistical Analysis

A descriptive statistical analysis was performed based on the mean or median according to normality criteria (Kolmogorov-Smirnov) and the SD or interquartile range (IQR), respectively. A bivariate analysis was performed using the χ^2 test for the comparison of

qualitative variables. Student's t-test, analysis of variance, the Mann-Whitney U-test, or the Kruskal-Wallis test for quantitative variables was used according to normality criteria and number of categories studied. Pearson's or Spearman's correlation tests were used to compare quantitative variables when appropriate. A multivariate analysis using binary logistic regression was conducted to determine the association between osteoporosis and periodontitis. The statistical significance of the two-way interactions between BMD and other variables in the main effects model was assessed using forward stepwise regression to test whether other variables modified the effect of BMD on periodontitis. To select the most accurate model the area under the curve of each model was analyzed according to the receiving operating characteristics curves. A statistical package^{***} was used for all statistical analyses. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

The general characteristics and relevant variables regarding the oral health status of the 76 women who participated in the study are listed in Table 2. For some women the data were incomplete because they could not attend all sessions of data collection. All subjects were kept in the analysis since the percentage of missing data was less than 10% of total for all variables.

The participants had a median age of 63.0 years (IQR=2). Periodontitis was detected in 47.9% of the patients and 41.1% required periodontal treatment. Most (78.6%) had been previously diagnosed with osteopenia or osteoporosis.

Table 3 provides a cross-tabulation of periodontal disease versus osteoporosis, age, number of missing teeth, oral pH, CAOD, need for treatment, oral hygiene, xerostomia, and mucosal injury. Periodontitis was detected in 22.9% of the women with no previous diagnosis of osteopenia/osteoporosis, in 57.1% of the women with osteopenia, and in 20% of those with osteoporosis, although there was no association between osteoporosis/osteopenia and periodontitis ($p=0.522$). There was a significant correlation between periodontitis and oral hygiene ($p=0.003$) and between periodontitis and the need for treatment ($p=0.001$). The associations between periodontitis and missing teeth and between periodontitis and xerostomia were not significant ($p=0.120$ and $p=0.098$, respectively).

An analysis of the correlation between osteoporosis and the same clinical variables (data not shown) showed that among the two groups (normal/osteopenia and osteoporosis) only the relationship to the number of missing teeth was significant ($p < 0.05$).

The most prevalent bacteria were *T. forsythia* and *C. rectus*, which were detected in 100% of the samples, followed by *F. nucleatum* and *P. gingivalis* (98.7% in both cases) and *A. actinomycetemcomitans* (73.7%). It should be highlighted that in all cases but *P. gingivalis* it was feasible to quantify bacteria when present. *P. gingivalis* was quantifiable in only 84.2% of the samples, since in 14.5% the value was below the minimal needed to quantify. Quantification of periodontal bacteria according to the presence or absence of periodontitis is reported in Table 4.

The box plot in Fig. 1a shows the distribution of the five periodontal bacteria, according to the presence or absence of periodontitis; the differences were statistically non-significant ($p > 0.05$). The box plot in Fig. 1b shows the distribution of bacteria in osteoporotic, osteopenic, and normal patients. Again, the differences between the groups were not significant ($p > 0.05$).

Scatter plots were used to analyze the relationship between the periodontal pathogens *F. nucleatum* (Fn), *T. forsythia* (Tf), *C. rectus* (Cr), *P. gingivalis* (Pg), and *A.*

actinomycetemcomitans (Aa) and non-parametric Spearman correlation coefficients were calculated (Table 5). Statistically significant positive relationships were found between log Cr and log Fn ($r=0.815$, $p<0.001$) and log Tf and log Fn ($r=0.510$, $p<0.001$). Other significant relationships among bacteria included a moderately positive relationship between log Pg and log Tf ($r=0.410$, $p<0.001$) and slightly positive relationships between log Tf and log Cr ($r=0.381$, $p=0.001$), log Pg and log Cr ($r=0.328$, $p=0.004$), log Pg and log Fn ($r=0.268$, $p=0.021$), and log Aa and log Tf ($r=0.273$, $p=0.042$).

Spearman's correlation was used to compare periodontal pathogens and oral parameters. A significant highly positive relationship was found between missing teeth and CAOD ($r=0.770$, $p<0.001$), and a slightly positive relationship between log Pg and pH ($r=0.285$, $p=0.019$).

Analysis of the associations between clinical variables and pH values (data not shown) failed to demonstrate a significant correlation between oral hygiene and pH ($p=0.503$). Only the differences between basic, neutral, and acidic pH groups and the log CFU/mL of *A. actinomycetemcomitans* were significant ($p=0.014$). For *P. gingivalis*, the p-value was 0.053.

DISCUSSION

According to our findings, the presence of osteoporosis/osteopenia does not influence the prevalence of periodontitis among postmenopausal women. Our criteria for the diagnosis of periodontitis were clinical examination parameters. In a systematic review by Martínez-Maestre et al.,¹⁸ five of nine studies based on the same criteria concluded that the correlations between osteoporosis and periodontitis were negative. By contrast, in most of the studies based on maxillary radiological criteria a positive association was determined. Martínez-Maestre et al.¹⁸ highlighted the need for well-controlled studies to better determine the complexity of this relationship.

The results of two recent studies performed on samples from postmenopausal women also reached conflicting conclusions, thus adding to the current controversy and emphasizing the need for greater uniformity in the methodologies to study the relationship between osteoporosis and periodontitis.^{19,20} Methodological limitations include small sample sizes, non-comparable study populations, and the diverse criteria used to define osteoporosis and periodontitis.

Although there was no correlation between both diseases, when the patients were evaluated in groups of normal/osteopenia and osteoporosis, significant differences were found with respect to the number of missing teeth. The associations between dental status and skeletal bone density in healthy postmenopausal women have been previously investigated. Some findings support the hypothesis that systemic bone loss contributes to tooth loss.²¹

Tooth loss is considered the ultimate outcome of periodontal disease.²² The chronic inflammation triggered by the bacteria that cause periodontal disease underlies both destruction of the jaw bone and tooth loss. Tezal et al. reported that periodontal disease is a strong and independent predictor of tooth loss in postmenopausal women.²³ However, in our patients a relationship between periodontitis and missing teeth could not be established. One explanation for the different findings is that patients with chronic periodontitis undergoing therapy may have lower rates of tooth loss.²⁴⁻²⁶ For example, the systemic statins frequently used in lipid-lowering therapies have an anti-inflammatory effect on periodontal disease and protect against tooth loss.²⁷ Higher rates of tooth loss have also been associated with low socioeconomic status, a low level of education, and low income and with age and smoking

habits.²⁸ However, this information was not collected from the participants in our study. Our results showed that in our patients periodontitis was correlated with the level of oral hygiene. Therefore, the potential effects of osteoporotic factors on the periodontal tissues could be minimized by combining good oral hygiene with regular check-ups.

The association between periodontitis and xerostomia was not significant but a positive trend was evident, since five of the six women with dry-mouth symptoms were diagnosed with periodontitis. More patients with xerostomia are required to better analyze this relationship. Salivary flow rates are lower in postmenopausal women, although hormone therapy has been shown to improve saliva production.^{29,30}

In this study, quantitative qPCR assays were successfully used to determine the abundance of periodontal pathogens known to be associated with the progression and severity of periodontal disease in paper-point samples collected from postmenopausal women. We harvest samples only from the deepest pocket, since deeper pockets offer a better environment for anaerobes and, consequently, their more extensive colonization, and are useful as a general parameter. The prevalences of four of the five periodontal bacteria analyzed (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *F. nucleatum*) were very high (98.7–100%) and *A. actinomycetemcomitans* was detected in 73.7% of the patients. In a similar study, Brennan et al.³¹ determined the prevalence of infection with periodontal bacterial species in a sample of postmenopausal women. They found *T. forsythia* in 37.9% of the samples and *C. rectus*, *P. gingivalis*, and *F. nucleatum* in 14–17%.²⁶ Disparities between study methods may account for the differences in their sensitivities with respect to the detection and quantification of periodontal pathogens. Brennan et al.³¹ used indirect immunofluorescence microscopy, which has important drawbacks compared to quantitative PCR, including a limited capability for accurate quantification and higher limits of detection.³²

Macuch and Tanner identified *C. rectus* in 90% of their patients with newly diagnosed and established periodontitis, in 20% of those with gingivitis and in 10% of those considered healthy. However, the samples in that study originated from a different source population than in our study and relied on bacterial culturing methods, which have a lower sensitivity of detection.³³

The sensitivity and specificity of qPCR are higher because this method overcomes most of the limitations of the other techniques.^{32,34,35} Therefore, the use of qPCR is one of the strengths of our work.

Riep et al.³⁴ examined the prevalence of ten periodontal bacterial species in three groups of patients, those with chronic or generalized aggressive periodontitis and those in a periodontitis-resistant control group. PCR of 16S rRNA gene fragments and subsequent dot-blot hybridization were used as the detection method. The prevalence of *T. forsythia*, *P. gingivalis*, and *P. intermedia* was high in all groups (60–95% of positive patients), without significant differences between them even though these species are considered to be highly associated with advanced periodontitis.²⁹ The prevalence of some of the target species in that study are similar to those detected in our study.

In examining the potential correlation between bacterial species, we found significant associations between *F. nucleatum* and *C. rectus* this will fit with orange complex of Socransky et al.³⁵, *F. nucleatum* and *T. forsythia*, and *P. gingivalis* and *T. forsythia* (red complex), among others. The simultaneous presence of these bacteria suggests their interdependence, which could further promote the progression of periodontal disease.

The lower presence of *A. actinomycetemcomitans* detected in this study was correlated with an acidic oral environment. These results are in agreement with the observed optimal

pH range for growth of this bacterium.³⁶ Our findings also suggest a greater abundance of *P. gingivalis* under acidic conditions (pH below 7), although optimum pH for growth is close to neutrality.³⁷ Maybe the association could be due to low salivary flow more than to pH. This information could help clinicians choose the best approach for treating periodontal infections caused by these microorganisms.

The bacterial species investigated in this study did not show significant quantitative differences between healthy, osteopenic, and osteoporotic patients. The correlations between women with periodontitis and healthy patients were also negative. Therefore, the presence of subgingival periodontopathogenic bacteria in almost all of our patients demonstrates that the appearance of these species is not sufficient to confirm the presence of periodontal disease. In fact, the mere presence of oral pathogens is recognized as being necessary but not sufficient for disease occurrence. Factors that influence disease development include the expression of virulence by the pathogen, the presence of interacting bacterial species, and the susceptibility of the individual host.^{26,38-40} Still, disease will not necessarily develop as long as the levels of the pathogen do not exceed the threshold for the host.³⁶ In our study, some of the healthy patients may have had early-stage, albeit, by the criteria of this study, nondetectable disease, which may have blunted any significant differences between patients with periodontitis and those who were apparently healthy.

CONCLUSION

In our study, osteoporosis did not influence the prevalence of periodontitis among postmenopausal women. The presence of periodontopathogenic bacteria was not sufficient to confirm disease, although we did not examine the influence of periodontal pocket depth on the prevalence of the pathogens analyzed. Probably, the detection of these bacterial species may be more closely related to the depth of the sampled pocket than to the diagnosis of periodontitis, since deeper pockets offer a better environment for anaerobes and, consequently, their more extensive colonization.^{34,41} A preventive maintenance program for postmenopausal women, particularly osteoporotic women, who are at greater risk of tooth loss, could minimize the potential effects of bone loss on periodontal tissues. Additional studies are needed to examine the influence of confounding factors for periodontitis and osteoporosis in postmenopausal women.

REFERENCES

1. Al-Azzawi F, Palacios S. Hormonal changes during menopause. *Maturitas*. 2009;63: 135–137.
2. Ben Aryeh H, Gottlieb I, Ish-Shalom S, David A, Szargel H, Laufer D. Oral complaints related to menopause. *Maturitas*. 1996;24:185–189.
3. Marcotte H, Lavoie MC. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 71–109.
4. Saluja P, Shetty V, Dave A, Arora M, Hans V, Madan A. Comparative Evaluation of the Effect of Menstruation, Pregnancy and Menopause on Salivary Flow Rate, pH and Gustatory Function. *J Clin Diagn Res* 2014;8:ZC81-ZC85.
5. Krejci C, Bissada N. Women's health issues and their relationship to periodontitis. *J Am Dent Assoc*. 2002;133:323–329.
6. Darcey J, Devlin H, Lai D, et al. An observational study to assess the association between osteoporosis and periodontal disease. *Br Dent J* 2013; 215:617–621.
7. Edwards BJ, Li J. Endocrinology of menopause. *Periodontol 2000* 2013;61:177-194.

8. López-López J, Castellanos-Cosano L, Estrugo-Devesa A, Gómez-Vaquero C, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ. Radiolucent periapical lesions and bone mineral density in post-menopausal women. *Gerodontology* 2013 Oct 28. doi:10.1111/ger.12076. [Epub ahead of print].
9. NIH Osteoporosis and Related Bone Diseases-National Resource Center. Oral Health and Bone Disease 2012; January: 1-2. www.niams.nih.gov.
10. Pepelassi E, Nicopoulou-Karayianni K, Archontopoulou AD, et al. The relationship between osteoporosis and periodontitis in women aged 45-70 years. *Oral Dis* 2012;18:353–359.
11. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 2008;35:106–113.
12. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol* 2008;79:670–676.
13. Greene J, Vermillion J. The simplified oral hygiene index. *J Am Dent Assoc* 1964;68:7–13.
14. WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a World Health Organization technical report series. Switzerland 1994;843:1-129.
15. Jeffcoat M. The association between osteoporosis and oral bone loss. *J Periodontol* 2005;76:2125–2132.
16. Estrugo-Devesa A, Gómez-Vaquero C, López-López J. Osteoporosis and oral diseases. *Med Clin (Barc)* 2013;140:169–174.
17. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
18. Martínez-Maestre M, González-Cejudo C, Machuca G, Torrejón R, Castelo-Branco C. Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. *Climacteric* 2010;13:523–529.
19. Moeintaghavi A, Pourjavad M, Dadgar S, Tabbakh NS. Evaluation of the association between periodontal parameters, osteoporosis and osteopenia in post menopausal women. *J Dent (Tehran)* 2013;10:443–448.
20. Passos JS, Vianna MIP, Gomes-Filho IS, et al. Osteoporosis/osteopenia as an independent factor associated with periodontitis in postmenopausal women: A case-control study. *Osteoporos Int* 2013;24:1275–1283.
21. Krall E, Dawson-Hughes B, Papas A, RI G. Tooth loss and skeletal bone density in healthy postmenopausal women. *Osteoporos Int* 1994;4:104–109.
22. Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, et al. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 1999;26:374–80.
23. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Dmochowski J, Genco RJ. Periodontal disease and the Incidence of tooth loss in postmenopausal women. *J Periodontol* 2005;76:1123–1128.
24. Chambrone L a., Chambrone L. Tooth loss in well-maintained patients with chronic periodontitis during long-term supportive therapy in Brazil. *J Clin Periodontol* 2006;33:759–764.
25. Matuliene G, Studer R, Lang NP, et al. Significance of periodontal risk assessment in the recurrence of periodontitis and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2010;37:191–199.
26. Renvert S, Persson RE, Persson GR. Tooth Loss and Periodontitis in older Individuals. results from the swedish national study on aging and care. *J Periodontol* 2012;84:1–13.
27. Meisel P, Kroemer HK, Nauck M, Holtfreter B, Kocher T. Tooth loss, periodontitis, and statins in a population-based follow-up study. *J Periodontol* 2014;85:e160–168.
28. Buchwald S, Kocher T, Biffar R, Harb A, Holtfreter B, Meisel P. Tooth loss and periodontitis by socio-economic status and inflammation in a longitudinal population-based study. *J Clin Periodontol* 2013;40:203–211.
29. Mahesh DR, Komali, G, Jayanthi, K, Dinesh D, Saikavitha TV, Dinesh, P. Evaluation of salivary flow rate, pH and buffer in pre, post & post menopausal women on HRT. *J Clin Diagn Res* 2014 ;8:233–236.
30. Eliasson L, Carlén A, Laine M, Birkhed D. Minor gland and whole saliva in postmenopausal women using a low potency oestrogen (oestriol). *Arch Oral Biol* 2003;48:511–517.

31. Brennan RM, Genco RJ, Wilding GE, Hovey KM, Trevisan M, Wactawski-Wende J. Bacterial species in subgingival plaque and oral bone loss in postmenopausal women. *J Periodontol* 2007;78:1051–1061.
32. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004;31:1034–1047.
33. Macuch PJ, Tanner AC. *Campylobacter* species in health, gingivitis, and periodontitis. *J Dent Res* 2000;79:785–792.
34. Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol* 2009;47:1705–1711.
35. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque *J Clin Periodontol* 1998;25:134–44.
36. Jervøe-Storm P-M, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2005;32:778–783.
37. Bhattacharjee MK, Childs CB, Ali E. Sensitivity of the periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at mildly acidic pH. *J Periodontol* 2011;82:917–925.
38. Takahashi N, Schachtele CF. Effect of pH on the growth and proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. *J Dent Res* 1990;69:1266–1269.
39. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 2002;29(s3):10–21.
40. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:322–331.
41. Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol* 1998;69:1111–1118.

Address for correspondence: Blanca Martinez-Garriga, Laboratory of Molecular Microbiology, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain, Tel. +34-934024265, E-mail: mvinyas@ub.edu

Submitted June 16, 2015; accepted for publication September 9, 2015.

Figure 1:

(a) Box plot of normal patients and the periodontitis group and quantification of periodontal bacteria. (b) Box plot of normal, osteopenic or osteoporotic patients and quantification of periodontal bacteria. *P. gingivalis* (Pg), *T. forsythia* (Tf), *C. rectus* (Cr), *F. nucleatum* (Fn), and *A. actinomycetemcomitans* (Aa).

Table 1.**Primers and probes used for quantification of genomic DNA from the target bacteria. Primers and probes targeted the 16S rRNA gene.**

Bacterial species	Sequence (5'-3')	Concentration (nM)	Target gen	Reference
<i>Aa</i>	F: GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA	Primers: 300	16S rRNA	Boutaga et al. ³⁷
	R: TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC	Probe: 100	(80 bp)	
	Probe: AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTA GGG			
<i>Pg</i>	F: GCG CTC AAC GTT CAG CC	Primers: 300	16S rRNA	Boutaga et al. ³⁷
	R: CAC GAA TTC CGC CTG C	Probe: 300	(67 bp)	
	Probe: CAC TGA ACT CAA GCC CGG CAG TTT CAA			
<i>Cr</i>	F: TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC	Primers: 900	16S rRNA	Figuro et al. ³⁸
	R: CGC TTG CAC CCT CCG TAT	Probe: 100		
	Probe: TCC GTG CCA GCA GCC GC			
<i>Tf</i>	F: GGG TGA GTA ACG CGT ATG TAA CCT	Primers: 300	16S rRNA	Boutaga et al. ³⁷
	R: ACC CAT CCG CAA CCA ATA AA	Probe: 200		
	Probe: CCC GCA ACA GAG GGA TAA CCC GG			
<i>Fn</i>	F: GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC	Primers: 600	16S rRNA	Boutaga et al. ³⁷
	R: GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA	Probe: 300	(162 bp)	
	Probe: CTC TAC ACT TGT AGT TCC G			

Aa, *A. actinomycetemcomitans*; Pg, *P. gingivalis*; Cr, *C. rectus*; Tf, *T. forsythia*; Fn, *F. nucleatum*; F, forward; R, reverse; bp, base pairs

Table 2:**Characteristics of the patients (N=76).**

Variable	N	IQR/%
Age (Median, IQR)	63.00	2.00
Missing teeth (Median, IQR)	5.00	8.75
CAOD index (Mean, SD)	17.21	8.00
Treatment need *	No	5 6.8%
	Profound hygiene	38 52.1%
	Periodontal treatment	30 41.1%
Periodontitis *	Negative	38 52.1%
	Positive	35 47.9%
Mucosal injury *	No	45 61.6%
	Yes	28 38.4%
Xerostomia *	No	67 91.8%
	Yes	6 8.2%
pH (Median, IQR)	7.0	1.0
pH *	Basic (> 7)	14 20.3%
	Neutral (6.5-7)	27 39.1%
	Acid (< 6.5)	28 40.6%
Oral hygiene *	Good	24 32.9%
	Regular	32 43.8%
	Bad	17 23.3%
Osteoporosis *	No	16 21.3%
	Osteopenia	40 53.3%
	Osteoporosis	19 25.3%

CAOD: Carious, absent, and obturated teeth index; SD: Standard deviation; IQR: Interquartile range; Log: Logarithm; * Information missing for some patients.

Table 3.**Correlation between periodontitis and clinical and oral variables.**

Variable		Periodontitis		Total	p value
		Negative (N=38)	Positive (N=35)		
Osteoporosis	No	8 (21.1)	8 (22.9)	16 (21.9)	0.522
	Osteopenia	18 (47.4)	20 (57.1)	38 (52.1)	
	Osteoporosis	12 (31.6)	7 (20.0)	19 (26.0)	
Age (Median, IQR)		62.5 (3.0)	63.0 (2.0)	63.0 (2.0)	0.623
Age	≤60	2 (5.3)	4 (11.4)	6 (8.2)	0.418
	>60	36 (94.7)	31 (88.6)	67 (91.8)	
Missing teeth (Median, IQR)		4.0 (6.0)	7.0 (13.0)	5.0 (8.75)	0.120
pH	Basic	7 (19.4)	7 (21.9)	14 (20.6)	0.546
	Neutral	12 (33.3)	14 (43.8)	26 (38.2)	
	Acid	17 (47.2)	11 (34.4)	28 (41.2)	
CAOD (mean, SD)		16.53 (7.47)	17.94 (8.60)	17.21 (8.00)	0.454
pH (median, IQR)		7.0 (1.0)	7.0 (1.0)	7.2 (1.0)	0.321
Treatment	No	4 (10.5)	1 (2.9)	5 (6.8)	0.001

need	Profound hygiene	26 (68.4)	12 (34.3)	38 (52.1)	
	Periodontal treatment	8 (21.1)	22 (62.9)	30 (41.1)	
Oral Hygiene	Good	19 (50.0)	5 (14.3)	24 (32.9)	0.003
	Regular	14 (36.8)	18 (51.4)	32 (43.8)	
	Bad	5 (13.2)	12 (34.3)	17 (23.3)	
Xerostomia	No	37 (97.4)	30 (85.7)	67 (91.8)	0.098
	Yes	1 (2.6)	5 (14.3)	6 (8.2)	
Mucosal Injury	No	26 (68.4)	19 (54.3)	45 (61.6)	0.215
	Yes	12 (31.6)	16 (45.7)	28 (38.4)	

CAOD: Carious absent, and obturated teeth index.

Table 4.

Quantification of subgingival *P. gingivalis* (Pg), *T. forsythia* (Tf), *C. rectus* (Cr), *F. nucleatum* (Fn) and *A. actinomycetemcomitans* in the total study sample (N=76).

Variable	Periodontitis		Total	p-value
	Negative (N=38)	Positive (N=35)		
log_Pg (Median, IQR)	3.03 (2.30)	3.40 (2.49)	3.00 (2.56)	0.528
log_Tf (Median, IQR)	4.86 (1.86)	5.25 (1.67)	5.09 (1.75)	0.080
log_Cr (Median, IQR)	5.25 (1.04)	5.42 (1.29)	5.40 (1.19)	0.592
log_Fn (Median, IQR)	6.23 (0.84)	6.31 (0.81)	6.26 (0.84)	0.460
log_Aa (Median, IQR)	2.35 (1.88)	2.72 (3.21)	2.50 (1.94)	0.085

Table 5.

Spearman correlation coefficients (r) and p values for all pairs of variables shown in the table * p value<0.05; ** p value<0.01. CAOD: Caried, absent, and obturated teeth index. Log colony forming units (CFU/mL). *P. gingivalis* (Pg), *T. forsythia* (Tf), *C. rectus* (Cr), *F. nucleatum* (Fn) and *A. actinomycetemcomitans* (Aa).

Spearman		log_Pg	log_Tf	log_Cr	log_Fn	log_Aa	Age	Missing teeth	CAOD	pH
log_Pg	r	1.000	0.410**	0.328**	0.268*	0.082	-0.117	-0.031	-0.070	0.285*
	p-value	-	0.000	0.004	0.021	0.548	0.318	0.790	0.558	0.019
log_Tf	r	0.410**	1.000	0.381**	0.510**	0.273*	-0.162	0.022	-0.031	-0.056
	p-value	0.000	-	0.001	0.000	0.042	0.163	0.849	0.794	0.648
log_Cr	r	0.328**	0.381**	1.000	0.815**	0.009	-0.021	0.062	0.065	0.024
	p-value	0.004	0.001	-	0.000	0.949	0.859	0.597	0.585	0.842
log_Fn	r	0.268*	0.510**	0.815**	1.000	0.116	-0.052	0.027	-0.002	-0.083
	p-value	0.021	0.000	0.000	-	0.397	0.661	0.821	0.983	0.501
log_Aa	r	0.082	0.273*	0.009	0.116	1.000	-0.195	0.008	0.192	-0.183
	p-value	0.548	0.042	0.949	0.397	-	0.150	0.955	0.161	0.195
Age	r	-0.117	-0.162	-0.021	-0.052	-0.195	1.000	0.100	0.064	-0.045
	p-value	0.318	0.163	0.859	0.661	0.150	-	0.392	0.591	0.712
Missing teeth	r	-0.031	0.022	0.062	0.027	0.008	0.100	1.000	0.770**	-0.041
	p-value	0.790	0.849	0.597	0.821	0.955	0.392	-	0.000	0.741
CAOD	r	-0.070	-0.031	0.065	-0.002	0.192	0.064	0.770**	1.000	-0.059
	p-value	0.558	0.794	0.585	0.983	0.161	0.591	0.000	-	0.634
pH	r	0.285*	-0.056	0.024	-0.083	-0.183	-0.045	-0.041	-0.059	1.000
	p-value	0.019	0.648	0.842	0.501	0.195	0.712	0.741	0.634	-

[†] Merck, Darmstadt, Germany

Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland

** DNeasy blood and tissue kit, Hilden, Germany

†† Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

‡‡ PCR grade water, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

§§ Synthesized by Invitrogen, Carlsbad, California, USA

|| Synthesized by Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA

¶¶ Taq Man LC 480 probes master, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

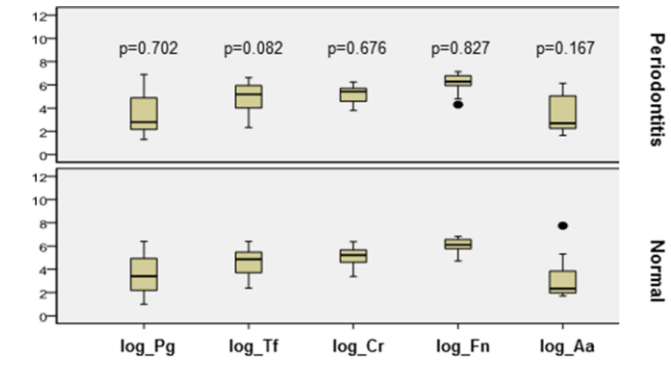
LightCycler 480 Multiwell Plate 384, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

*** LightCycler 480 II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

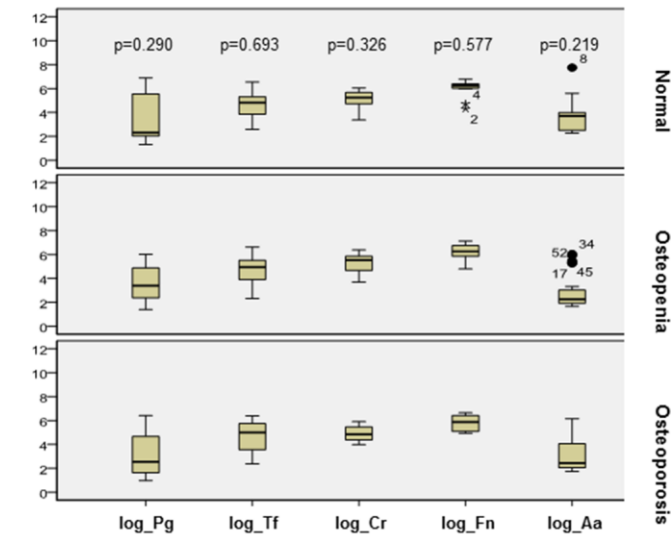
††† LC480 Software 1.5, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

‡‡‡ SPSS v17.0 for Microsoft Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA.

unedited



(a)



(b)

Unauthenticated