

Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas

José Liébana ⁽¹⁾, Ana María Castillo ⁽²⁾, Marta Álvarez ⁽³⁾

(1) Catedrático de Microbiología Oral. Facultad de Odontología. Universidad de Granada

(2) Profesora Titular de Microbiología. Facultades de Medicina y Odontología. Universidad de Granada

(3) Facultativa Especialista de Área de Microbiología. Hospital Clínico San Cecilio. Granada

Correspondencia:

Dr. D. José Liébana Ureña

Cátedra de Microbiología Oral

Facultad de Odontología

Colegio Máximo

Campus de la Cartuja s/n

18071 Granada

958-24 06 21/39

E-mail: liebana@ugr.es

Liébana J, Castillo AM, Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2004;9 Suppl:S75-91.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1137 - 2834

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed
-EMBASE, Excerpta Medica
-Indice Médico Español
-IBECS

RESUMEN

En las gingivitis asociadas a placa, la localización de ésta a nivel de la porción gingival del diente juega en su génesis un papel fundamental. Sin embargo, a veces también pueden influir tanto factores locales como otros que modifican la respuesta del hospedador. La patogenia de las periodontitis es más compleja. Los microorganismos de la placa subgingival pueden ejercer una acción directa sobre los tejidos periodontales o modificar la respuesta del hospedador, mientras que la participación *per se* de la misma (normal, disminuida o aumentada) es tan decisiva como la acción de las propias bacterias en la aparición de la enfermedad. Los distintos tipos de periodontitis se asocian a determinados microorganismos, señalándose como más periodontopatógenos a *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythensis*. Las periodontitis son el origen de complicaciones como caries radicular, procesos endoperiodontales y abscesos periodontales. Recientemente, se han relacionado con diversas enfermedades como aterosclerosis, diabetes e infecciones respiratorias entre otras y con la aparición de halitosis oral patológica. En el diagnóstico microbiológico de las periodontitis destacan las distintas modalidades de PCR, en sentido negativo figura el no poder realizar estudios de sensibilidad *in vitro*. En el tratamiento antibiótico de las periodontitis, en primera línea estarían amoxicilina/ácido clavulánico, metronidazol (asociado o no a amoxicilina) y clindamicina.

Palabras clave: Gingivitis, periodontitis, fisiopatología, complicaciones, diagnóstico, antibióticos, PCR, biopelículas

INTRODUCCION

Las enfermedades periodontales, sin un consenso universalmente aceptado para clasificarlas (1), son procesos que afectan a los tejidos de soporte dentario. Esta revisión tan solo se centrará

en aquellos cuadros que están relacionados con la placa y de ellos únicamente se señalarán sus aspectos microbiológicos más significativos. Se trata pues de entidades clínicas en las que, aparte de tener una importante relación con la respuesta del hospedador, están implicados directamente microorganismos que, colonizando las superficies dentales del margen de la encía y del surco gingival, conforman biopelículas. Con este término se conoce a las comunidades microbianas que se asocian a cualquier superficie no descamable. Las biopelículas en la cavidad oral son conocidas como placas; tienen similitudes y diferencias según el ecosistema primario en el que se establezcan y con las de otras localizaciones. En los dos grandes grupos en los que pueden dividirse los procesos periodontales, las gingivitis están relacionadas con la placa coronal o supragingival de superficies lisas en la zona gingival del diente y las periodontitis con la placa subgingival.

ENFERMEDADES GINGIVALES ASOCIADAS A PLACA

Resulta difícil establecer la composición cuantitativa de la placa de la zona gingival del diente maduro y del tártaro, más aun cuando hay diferencias apreciables según existan o no condiciones de salud, simple gingivitis o periodontitis asociada, cosa esta última nada infrecuente (2). Pueden aislarse más de 40 especies bacterianas diferentes (3). En líneas generales la microbiota, en las afecciones gingivales relacionadas con la placa, mostraría en torno a un 50% de anaerobios facultativos (con claro predominio de estreptococos orales y *Actinomyces* spp.), anaerobios estrictos representando hasta el 45% (en los inicios especialmente *Veillonella* spp.) y treponemas hasta un 5%; estos dos últimos grupos alcanzarían estas cifras y mostrarían gran diversidad a medida que la placa se va engrosando, localizándose en las zonas de más bajo potencial de óxido-reducción, y en las

que se producen en el tránsito del medio supragingival al subgingival (4).

Puede decirse que las bacterias habituales a nivel de la zona gingival del diente, con claro predominio de estreptococos orales de hasta un 82%, se encuentran en equilibrio con los tejidos de la encía. Cuando éste se rompe surgen las enfermedades gingivales ligadas a placa (Figura 1). Todas ellas tienen en común la presencia de una placa inespecífica a nivel de la porción gingival del diente que, junto al tártaro, desencadenan el proceso inflamatorio, con características clínicas comunes o diferentes según sean las causas que rompan el citado equilibrio, y sin participación, en principio, del resto de la mucosa oral ni afectación de los demás tejidos periodontales (5). De acuerdo con estas causas puede establecerse la siguiente clasificación (6): a) gingivitis sin factores favorecedores, etiológicamente relacionadas con la placa y cálculo ante la falta de higiene, suele afectar con mayor o menor gravedad a toda la población en algún momento de la vida; b) gingivitis con factores locales favorecedores, en las que a la placa y cálculo se unen alteraciones anatómicas dentales como el apiñamiento dental, o causas yatrogénicas por obturaciones y restauraciones defectuosas o aparatos de ortodoncia que favorecen el acúmulo de placa y dificultan su eliminación; c) enfermedades gingivales asociadas a placa con modificaciones de la respuesta del hospedador, en estos casos al factor microbiano se unen otros sistémicos de muy

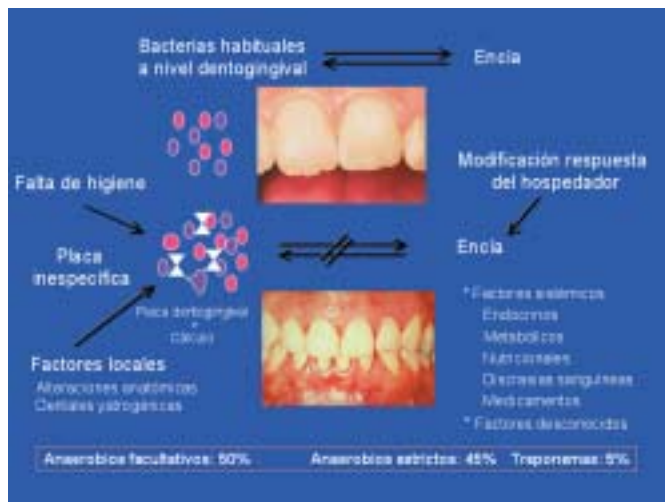


Fig. 1. Enfermedades gingivales asociadas a placa.

diversa naturaleza y suelen acompañarse de agrandamientos gingivales, es el caso de fenómenos endocrinos fisiológicos (pubertad, ciclo menstrual o embarazo), endocrinos patológicos (especialmente diabetes *mellitus*), nutricionales (como déficit de vitamina C), discrasias sanguíneas (como ciertos tipos de leucemias) y algunos medicamentos (anticonceptivos orales, algunos antiepilépticos, inmunosupresores y ciertos antagonistas del calcio) y d) enfermedades gingivales asociadas a placa y con factores desconocidos, en estos casos sólo cabe calificarlas como idiopáticas.

PERIODONTITIS

Concepto

Bajo este término se incluye a unas enfermedades inflamatorias que conducen a la destrucción del aparato de sostén dental. Con la implicación del hueso alveolar se afecta la estabilidad del diente y la masticación y esto se traduce en una manifiesta incapacidad. Las periodontitis pueden evolucionar por brotes episódicos, seguir un curso en etapas (desde una forma inicial a otra avanzada), tener un carácter crónico o agresivo y ser localizadas o generalizadas (7). Como en el caso de las gingivitis sólo estudiaremos los aspectos microbiológicos más significativos de las afecciones del periodonto asociadas a placa, sin hacer mención a las implicaciones sistémicas en estas estructuras ni a otros tipos de deformidades.

La placa subgingival

Es la localizada a nivel del espacio virtual del surco gingival escasamente colonizado en estado de salud periodontal, sin embargo, la cantidad y diversidad de microorganismos aumentan en presencia de enfermedad, desarrollando a este nivel una biopelícula y transformándose el espacio virtual en auténtica bolsa, que lleva a la destrucción del hueso alveolar. Esta biopelícula se caracteriza por adoptar una estructura diferente a las de localización supragingival y radicular que sólo se adhieren a la superficie dental. El desarrollo de la placa subgingival se lleva a cabo según el clásico esquema de colonización, sucesión y asociaciones microbianas debido a Sockransky y cols. (3) y después algo modificado por Sockransky y Haffajee (4) y en el que hemos introducido pequeños cambios en la figura 2. En ella puede observarse que a los primeros colonizadores del surco, procedentes por contigüidad de la biopelícula del margen gingival (grupos 6, 5 y 4), seguirán los colonizadores secundarios (grupo 3) que actuarán de puente con los terciarios (grupo 2) a los que se unirán los cuaternarios (grupo 1). Tanto el grupo 2 como el 1 se volverán predominantes en las fases tardías.

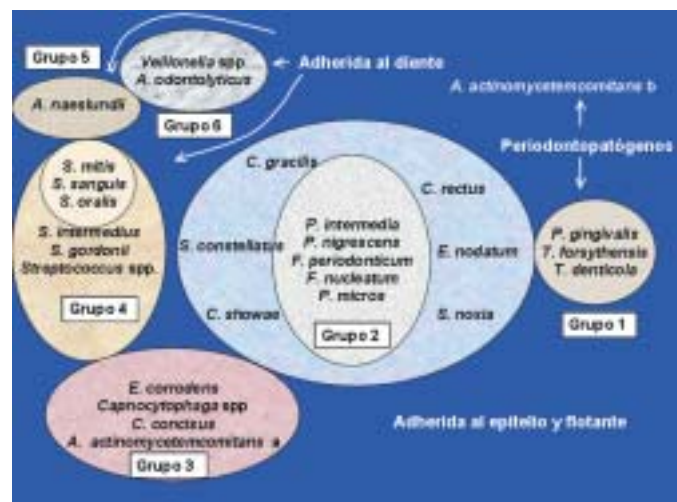


Fig. 2. Desarrollo de la placa subgingival.

Entre los microorganismos de los grupos 6, 5 y 4, que conforman una auténtica biopelícula, predomina la adhesión al diente y entre los de los grupos 3, 2 y 1 la coagregación y adhesión al epitelio. Como el ingente estudio original fue realizado en adultos (13.321 muestras de placas subgingivales tomadas de la cara mesial de cada diente en 185 individuos), estaría en baja o nula proporción *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo b que debería sustituir o asociarse a los del grupo 1 si se hubiesen incluido individuos jóvenes. Sólo así se explicaría la clara prevalencia de este último en periodontitis agresivas y *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* y *Treponema denticola* en las formas crónicas.

Tipos de infecciones periodontales

La figura 3, modificada de Van Winkelhoff y cols (8), muestra que se pueden considerar dos tipos de infecciones periodontales: las producidas por microorganismos residentes y por exógenos (en la actualidad el origen de estos últimos es cuestionable, ya que de haberse utilizado las modernas técnicas de biología molecular, se hubiesen detectado como microorganismos endógenos en pequeñas cantidades, aun así pensamos que esta clasificación no ha perdido parte de su vigencia). En el primer caso la microbiota habitual de la cavidad oral en un hospedador comprometido producirá una infección oportunista o, ante modificaciones locales, un sobrecrecimiento. En estos dos casos la causalidad estaría relacionada con una placa ecológica. Pero los microorganismos pueden tener un origen exógeno, aunque, también como indicábamos, algunas veces estarán como residentes en baja proporción o no son habituales de la cavidad oral, originando una infección verdadera, un estado de portador, o una sobreinfección. Especialmente periodontopatógenos serían *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythensis*, y su asociación con las periodontitis se debería a una placa relativamente específica.

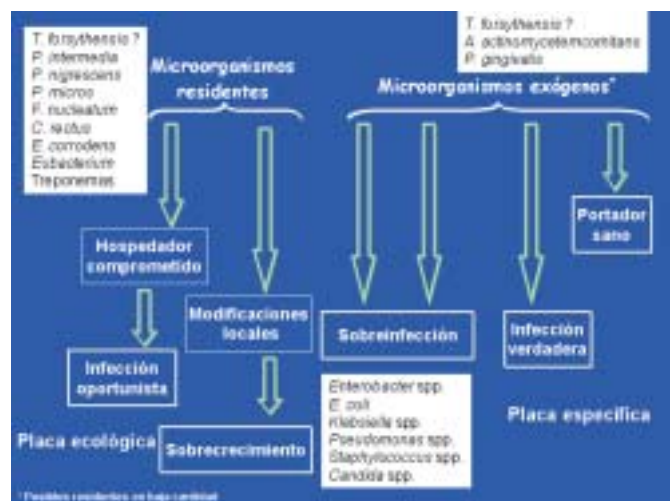


Fig. 3. Tipos de infecciones periodontales.

Relación microorganismos-periodontitis

Se han realizado múltiples estudios en este sentido, con tantas variables clínicas y de diagnóstico por el laboratorio (p. ej.:

cultivo o biología molecular), que todo lo que indiquemos al respecto no tiene un carácter definitivo sino hasta cierto punto provisional. De una forma esquemática puede decirse que las periodontitis crónicas son clínicamente significativas a partir de los 35 años, evolucionan lentamente, la funcionalidad de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) es aparentemente normal y se implican una amplia gama de microorganismos como *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythensis*, *Prevotella nigrescens* y otros (9). Las periodontitis agresivas suelen iniciarse en edades infantiles o en adultos jóvenes, muestran una evolución rápida, responden peor al tratamiento, se acompañan de un déficit en la funcionalidad de los PMN y el microorganismo más prevalente es *A. actinomycetemcomitans* serotipo b (10), sin embargo, recientes estudios implican también a *Campylobacter rectus*, *T. forsythensis*, genotipos II y IV (11) y a *P. gingivalis* (12). Aunque el término de periodontitis refractaria ya no debería ser aceptado (1,6), se sigue haciendo referencia al mismo y parece asociarse a *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y otros microorganismos (13,14). En cuanto a las enfermedades periodontales necrosantes (gingivitis y periodontitis), aparte de diversos factores asociados, se relacionan con microorganismos como *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. denticola* y *Fusobacterium nucleatum* (9).

Fisiopatología de las periodontitis

Clásica es la hipótesis de que para que aparezca periodontitis previamente debe existir gingivitis (15). En este tránsito, siguiendo el esquema desarrollado por nuestro grupo (9) (Figura 4), influyen factores bacterianos de periodontopatogenicidad asociados a la placa subgingival, y otros dependientes del hospedador. De muchos de ellos solo se tiene evidencia *in vitro*, siendo difícil conocer realmente lo que ocurre *in vivo*.

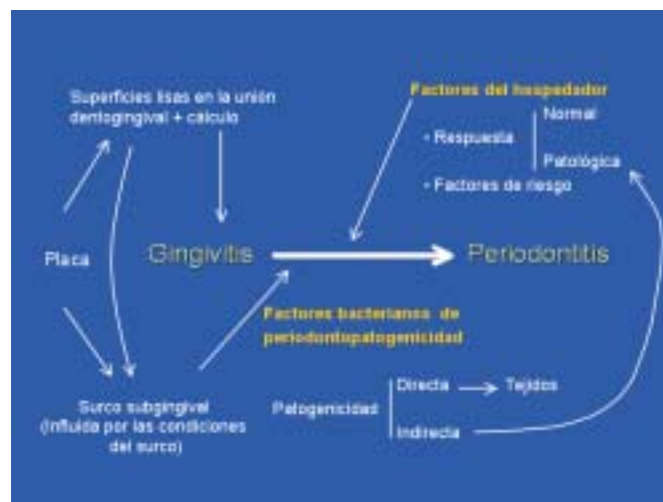


Fig. 4. Factores que influyen en la transición gingivitis-periodontitis.

Factores de periodontopatogenicidad

Se clasifican en directos e indirectos.

- Patogenicidad directa. Se debe a la acción de elementos estructurales, metabólicos, exotoxinas, exoenzimas y otros productos

elaborados por las bacterias que inciden directamente sobre los tejidos periodontales. Así, provocan lesiones tisulares, muerte celular, disminución de la proliferación de fibroblastos, avance microbiano, penetración en las células epiteliales, incremento de la apoptosis, fenómenos de citotoxicidad, etc. (16-23) (Figura 5). De estos fenómenos cabría destacar la penetración en los tejidos epiteliales, especialmente ligada a *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* y probablemente a *T. forsythensis* y *T. denticola*. Esta epiteliopenetración puede estar relacionada con la actina u otros mecanismos y determinar la muerte celular, acúmulo de células fagocíticas, liberación de factores inflamatorios (24) o sensibilizar a los tejidos para reacciones de hipersensibilidad (25). Recientemente, se ha descrito una toxina citoletal (CDT) en *A. actinomycetemcomitans* que induce una progresiva distensión celular y eventual citotoxicidad (22). Por otra parte se ha señalado la inducción de apoptosis en células epiteliales por *T. forsythensis* (26) que en este caso provocarían un acúmulo de macrófagos para eliminar dichas células.

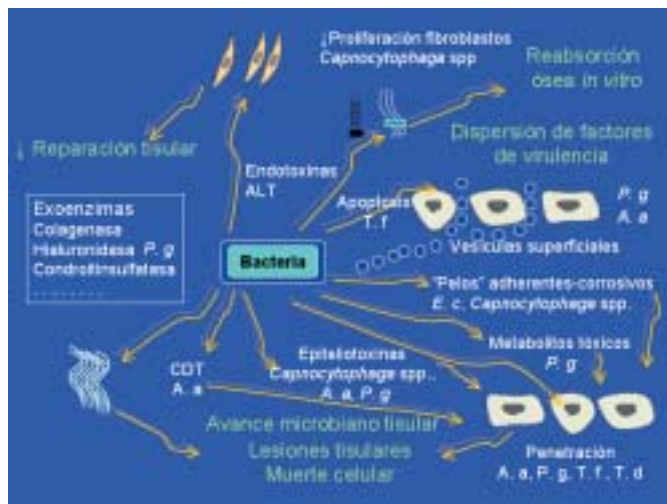


Fig. 5. Algunos ejemplos de patogenicidad bacteriana directa en la génesis de la periodontitis. (P. g: *Porphyromonas gingivalis*; A. a: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; T. f: *Tannerella forsythensis*; T. d: *Treponema denticola*; F. n: *Fusobacterium nucleatum*; P. i: *Prevotella intermedia*; E. c: *Eikenella corrodens*).

• Patogenicidad indirecta. Unas veces disminuyen y otras aumentan la respuesta del hospedador. En el primer caso, por un lado puede interferirse la fagocitosis por múltiples mecanismos (18,19,21) (Figura 6), de ellos destaca la elaboración de una leucotoxina por *A. actinomycetemcomitans*, uno de sus principales factores de virulencia (18,27), especialmente cuando se produce en elevadas cantidades (28), y que además parece que induce la apoptosis en PMN (29). Existe la hipótesis de que la producción de proteasas por parte de *P. gingivalis* y *P. intermedia* podría destruir esta leucotoxina y disminuir la patogenicidad de *A. actinomycetemcomitans* (28). Por otra parte, los microorganismos pueden interferir la respuesta específica mediante proteasas que destruyen inmunoglobulinas y factores del complemento, produciendo linfotoxicidad, activando linfocitos T supresores, inhibiendo la proliferación de linfocitos B activándolos policlonalmente, etc (18, 19, 21). En ocasiones la patogenicidad indirecta se traduce en un incremento de la respuesta del hospedador, destruyendo proteasas reguladoras.

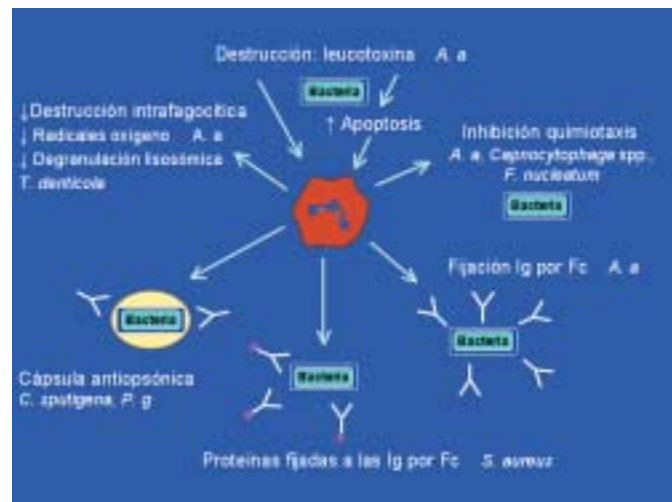


Fig. 6. Algunos ejemplos de patogenicidad bacteriana indirecta en la génesis de la periodontitis. Interferencia con la fagocitosis. (P. g: *Porphyromonas gingivalis*; A. a: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*).

Así se activan metaloproteasas latentes, el sistema calicreína-cinina o se destruyen proteínas antiinflamatorias. Por otra parte, los lipopolisacáridos (endotoxinas) pueden inducir la activación de macrófagos y estos excretar enzimas lisosómicas, NO, radicales de oxígeno, quimiocinas, citoquinas y prostaglandina E-2 (PGE-2) que contribuyen a la inflamación y a la reabsorción ósea (18,19,21,30,31) (Figura 7).

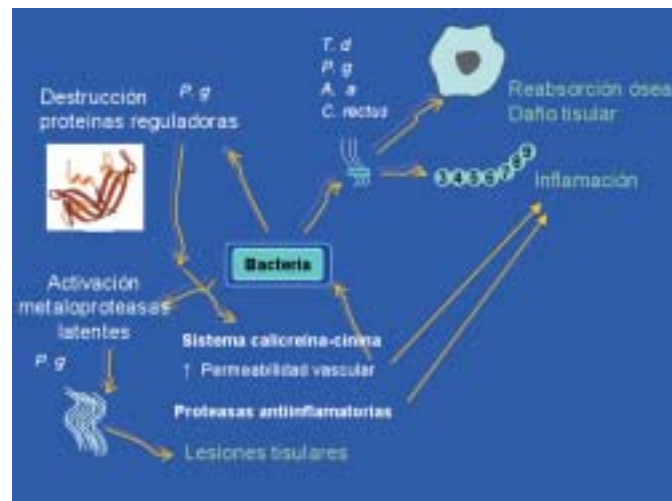


Fig. 7. Algunos ejemplos de patogenicidad bacteriana indirecta en la génesis de la periodontitis. Incremento de la respuesta del hospedador. (P. g: *Porphyromonas gingivalis*; A. a: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; T. d: *Treponema denticola*).

Factores del hospedador (Figura 8)

La respuesta del hospedador puede ser normal o patológica. En este último caso puede ser debida a una hiperrespuesta específica con la participación de linfocitos T y B y producción de anticuerpos neutralizantes o no (32,33), que activan el complemento o si, son de clase IgE, a los mastocitos. La elevación de IgG subclase 2 parece estar en relación con la agresividad de las periodontitis (34), cosa que no parece acontecer en las de evolución crónica (35). Al activarse los linfocitos T y macrófagos (monocitos) se

liberan una serie de mediadores como citoquinas, quimiocinas y PGE-2 que establecen interrelaciones con diversas células y contribuyen al proceso inflamatorio, al daño tisular y a la destrucción ósea (36-39). También la hiperrespuesta puede tener un carácter inespecífico inducido por las endotoxinas. Estas interaccionan con los macrófagos y liberan, como previamente se señaló, quimiocinas, citoquinas, PGE-2, enzimas lisosómicas y radicales de oxígeno y NO (40), igualmente pueden activar el complemento por la vía alternativa. Además el acúmulo de células inflamatorias y no inflamatorias, vía elastasa y catepsina B, degradan proteoglicanos, mientras que mediadores inflamatorios como GMC-CSF disminuyen la apoptosis de PMN favoreciendo su incremento a nivel sulcular (41). También la respuesta del hospedador puede estar disminuida, bien por factores microbianos ya comentados, o intrínsecamente debido a una reducción de la respuesta específica (SIDA, medicación inmunosupresora, etc.) o inespecífica, que afecta principalmente a los PMN; en estas circunstancias la progresión de la enfermedad se hace más rápida ante la falta de control de las bacterias y a un incremento de su agresividad (9).

En resumen, tanto el efecto de las bacterias como la respuesta no controlada del hospedador determinan fenómenos destructivos en los tejidos periodontales y la formación de bolsas, estas a su vez favorecen que se cree un bajo potencial de óxido-reducción y el desarrollo de microorganismos anaerobios.

Factores de riesgo asociados a la patogenia de las periodontitis



Fig. 8. Respuesta de los tejidos periodontales en la génesis de las periodontitis.

En la figura 9 se recogen algunos de ellos divididos en compartacionales, sobreañadidos (locales y sistémicos) y genéticos. Entre estos últimos se encuentran determinados deficit hereditarios que afectan a la respuesta específica y sobre todo a la inespecífica (p. ej.: neutropenia cíclica familiar) y determinados polimorfismos, entre ellos los referidos a la interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), receptor de la vitamina D, interleucina 4 (IL-4) y otros (42). De ellos el más estudiado es el polimorfismo de IL-1 (43, 44), sin embargo, la correlación entre el mismo y el perfil de enfermedad periodontal dista mucho de haber sido aclarada (45).

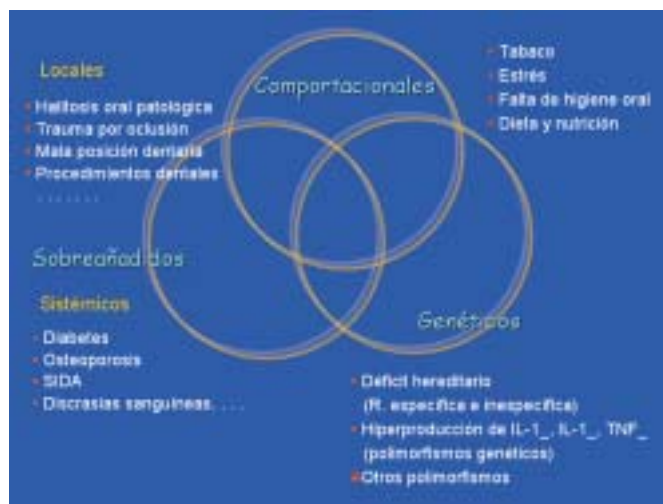


Fig. 9. Factores de riesgo asociados a la patogenia de las periodontitis.

Complicaciones de las periodontitis

A las ya clásicas lesiones endoperiapicales, caries radicular y abscesos periodontales, se han sumado otras muchas en los últimos años:

- Relación con *Helicobacter pylori*, y por tanto, con procesos como gastritis y carcinoma gástrico. Los datos sobre el posible reservorio de esta bacteria en el surco gingival en pacientes con periodontitis son contradictorios (46,47).
- Osteoporosis. Todo apunta a que este proceso es un factor de riesgo de padecer periodontitis mas que una complicación de las mismas (48).
- Diabetes. Se han establecido: a) relaciones epidemiológicas con las periodontitis (49); b) un incremento de la hemoglobina glicosilada en sujetos con periodontitis severas (50), y su reducción con desbridamiento y administración de antibióticos (51); c) una asociación con un incremento de la respuesta humoral frente a ciertos periodontopatógenos (52); y d) que exista una implicación de monocitos MO+ (vease después) con inflamación que destruya las células productoras de insulina. Pese a todo ello son necesarios nuevos estudios para establecer una clara relación ya que, en principio, todo apunta a que la diabetes es otro de los factores de riesgo de las periodontitis por la disminución de la funcionalidad de los PMN, pero con incremento de la liberación de colagenasa, por la típica microangiopatía diabética (53) o porque los sujetos con periodontitis controlan peor la glucemia (54).
- Periodontitis-aterosclerosis (PAS). Aunque los datos epidemiológicos son discordantes, esta relación y sus implicaciones en el infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares ha sido ampliamente estudiada. Se han señalado una serie de factores de riesgo clinicogenéticos: polimorfismos de IL-1 (55), caracteres genéticos comunes, periodontitis severas o no controladas, pérdidas de inserción ósea de 3 mm o más, etc. (56). Como modelos patogénicos se han propuesto varios; así la existencia de monocitos hiperactivos (MO+) que responden a las endotoxinas bacterianas del surco gingival, produciendo abundantes quimiocinas y citoquinas que conducen a un incremento de lípidos, a una proliferación de las células endoteliales, a una atracción de

PMN y en definitiva a un engrosamiento de las paredes vasculares. También las endotoxinas pueden activar el complemento por la vía alternativa y otro tanto ocurre con la proteína C reactiva originando infiltrado subluminal de PMN. Los MO+ igualmente pueden liberar factores que inducen agregación plaquetaria (57). Se han descrito receptores en las plaquetas para un antígeno de *P. gingivalis* que determinan su agregación, la capacidad invasiva endotelial *in vitro* de algunos periodontopatógenos y la presencia de ADN de estos en placas de ateroma (58,59), que jugarían un papel directo en la aterosclerosis, junto al descrito previamente por mecanismo inmunológico.

- Partos prematuros y neonatos de bajo peso. Su relación con las periodontitis no parece clara, se ha señalado la influencia de periodontopatógenos como desencadenantes de un proceso inflamatorio endometrial y placentario (60).
- Halitosis oral patológica. Se produce por la génesis de compuestos volátiles (CVs) de bacterias orales, entre ellas las relacionadas con gingivitis y periodontitis; al mismo tiempo dichos compuestos volátiles favorecen las propias enfermedades periodontales (61) (Figura 10).



Fig. 10. Enfermedades periodontales y halitosis patológica oral.

• Otros procesos. Las bacterias de las bolsas periodontales pueden ser aspiradas, pasar a las vías respiratorias y originar neumonías; en otros casos, asociadas al proceso inflamatorio inmunológico, similar a otras complicaciones ya señaladas, las periodontitis pueden relacionarse con enfermedades crónicas obstructivas pulmonares. El paso de periodontopatógenos a sangre podrá ocasionar endocarditis y abscesos cerebrales, este último caso en pacientes especialmente inmunodeprimidos (59).

Diagnóstico por el laboratorio

Debe contribuir a responder a una serie de preguntas como: ¿Cuándo se transformará una gingivitis en una periodontitis? ¿Qué tasa de pérdida de inserción se presentará? ¿Qué individuos son más vulnerables? ¿Se ha controlado la enfermedad con el tratamiento? ¿Qué patrón de mantenimiento debe establecerse? En el momento actual puede decirse que, pese a los avances de

los últimos años, no existe ninguna prueba de laboratorio que permita contestar a todos estos interrogantes (62). El diagnóstico microbiológico debería ir dirigido a la detección de las bacterias periodontopatógenas y el inmunológico a evaluar la respuesta del hospedador y sus consecuencias.

Diagnóstico microbiológico

No sólo debe evaluar la presencia de los periodontopatógenos sino además cuantificarlos. Esto parece que predice mejor el riesgo de pérdida ósea que los meros estudios de prevalencia. La especificidad de sitio es una limitación importante; así para afirmar que un sujeto no está infectado, con un 95% de confianza, 25 zonas examinadas deben ser negativas para *A. actinomycetemcomitans*, y 6 y 3 respectivamente para *P. gingivalis* y *T. forsythensis*, a partir de bolsas de más de 5 mm elegidas al azar. En cuanto a los umbrales que permiten establecer una mayor posibilidad de pérdida de inserción, se señalan 3×10^4 para *A. actinomycetemcomitans* y 6×10^5 para *P. gingivalis* (63,64).

• Toma de muestra. Tras la eliminación de la placa supragingival, habitualmente se efectúa con puntas de papel introducidas y mantenidas unos segundos en el surco gingival, también puede realizarse mediante raspado empleando curetas.

• Cultivo. Es el método de referencia para evaluar la sensibilidad a los antibióticos y conocer toda la microbiota subgingival. Por el contrario como sólo proliferan bacterias vivas hay que ser muy riguroso en el transporte, son necesarios múltiples medios selectivos para estudiar determinadas bacterias, diversas atmósferas para la incubación, los resultados finales por el lento crecimiento de algunos anaerobios pueden tardar más de una semana, algunos periodontopatógenos como *T. forsythensis* o los treponemas orales son difíciles de cultivar, etc. Todo ello hace que su aplicación rutinaria sea poco eficaz, y que de hecho, como comentábamos al hacer mención de los tipos de infecciones periodontales o a estudios de distintos tipos de periodontitis, los resultados mediante cultivo han podido inducir en el pasado a importantes errores.

• Métodos enzimáticos. Se basan en demostrar la existencia de una enzima trípica que hidroliza un sustrato, benzoil-D,L-arginina-naftilamida (BANA) originando un compuesto coloreado. La prueba daría positiva de forma inespecífica cuando exista *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis* y algunas especies de *Capnocytophaga*. Pese a sus limitaciones ha mostrado su utilidad como marcador de actividad microbiana y en determinados tipos de pacientes (65).

• Metabolitos bacterianos. Aunque aún queda mucho por dilucidar, parece que existe una relación entre el incremento de CVs y la severidad y actividad de las periodontitis (61).

• Métodos inmunológicos. Se basan en la detección de antígenos bacterianos usando anticuerpos conocidos. Se han empleado diversas técnicas como inmunofluorescencia directa o indirecta, citometría de flujo, ELISA, aglutinación con látex, etc. Aunque son test rápidos pueden proporcionar reacciones cruzadas y no es fácil obtener anticuerpos monoclonales específicos (66,67).

• Métodos moleculares. Entre ellos se encuentran las sondas de ADN y especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes. No sólo permiten detectar periodontopatógenos sino cuantificarlos (68). En el caso concreto de la PCR hay que considerar que es una técnica básica en el diagnóstico

microbiológico por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez; no requiere microorganismos vivos y permite detectar especies difícilmente cultivables. Es cierto, sin embargo, que con su único empleo no es posible realizar estudios de susceptibilidad *in vitro* salvo si se utilizan genes codificantes de resistencia.

Diagnóstico inmunológico

- Respuesta inmune. La detección de anticuerpos séricos y a nivel sulcular por diversas técnicas no permite establecer con seguridad, como se mencionó previamente, si es indicativa de protección o inactividad o bien de actividad. Parece ser que en las formas agresivas hay relación entre disminución y severidad del cuadro pero no en las de evolución crónica (34,35). En los PMN se han estudiado diversos factores que establecen su funcionalidad (69) y en los monocitos la respuesta ante los liposacáridos (70).

- Mediadores inflamatorios. Con desiguales resultados se han investigado diversos compuestos en el líquido gingival: IL-1, IL-6, TNF- α , PGE-2 (35), IL-4, IL-10, IL-2 y otros (71).

- Enzimas líticas en el surco gingival a consecuencia del proceso inflamatorio. Las más estudiadas han sido las metaloproteasas y entre ellas la colagenasa. Igualmente se han evaluado la elastasa, aspartatoaminotransferasa, catepsinas, glucuronidasa, dipeptidilpeptidasa, etc. En prácticamente todos los casos su incremento se relaciona con las pérdidas de inserción severa (35).

Polimorfismos genéticos. Ya se comentó que su significación en las enfermedades periodontales no está clara, en especial el correspondiente al más estudiado de IL-1, no justificándose su uso en la identificación de pacientes de riesgo de padecer enfermedad, ni debe servir para determinar el tratamiento, ni las características del mantenimiento periodontal.

ANTIMICROBIANOS EN PERIODONCIA

Mientras que en las gingivitis asociadas a placa suele ser suficiente el control mecánico de la misma, con el uso además, por ejemplo, de la clorhexidina, y sobre todo, educación sanitaria para la mejora de la higiene oral y, en su caso, corregir los factores locales y los que modifican la respuesta del hospedador (9), la actitud terapéutica ante las periodontitis es bien diferente. Aparte de corregir factores comportacionales y sobreañadidos, como en los procesos anteriores, se ha propuesto el uso de antisépticos locales, entre otros la ya señalada clorhexidina, y de antibióticos tópicos (p. ej.: tetraciclinas y metronidazol), los resultados obtenidos no parecen mejorar el simple alisado y raspado radicular, sobre todo en lo referido a estos últimos. Entre otras circunstancias adversas están el favorecer la resistencia de la microbiota subgingival. Su uso sólo podría ser beneficioso cuando se producen recaídas y/o ante la negativa del paciente a otras medidas de mantenimiento periodontal repetidas (72). La administración sistémica de antibióticos sí puede aportar una mejoría del estado clínico periodontal ya que a través del suero pueden acceder de manera fácil a las zonas más profundas del periodonto enfermo. Un ejemplo claro es lo que ocurre con las tetraciclinas que por vía general erradican *A. actinomycetemcomitans* y no cuando se administra por vía local. Además los antibióticos pueden eliminar periodontopatógenos de otras zonas de la cavidad oral que actúan como reservorios con el

consecuente efecto profiláctico. En un trabajo sobre el uso de estos fármacos por vía sistémica (73), los autores realizan una amplia revisión sobre el tema. En ella se analizan múltiples estudios realizados por numerosos profesionales e investigadores; sin embargo, existen multitud de variables entre las que destacan las clínicas, en relación al tipo de periodontitis, las microbiológicas como los estudios realizados por cultivo o biología molecular, las referidas a pautas de dosificación, las medidas periodontales asociadas como raspado, alisado o cirugía, etc. Como puede suponerse los resultados son tan dispares que no cabe establecer unas medidas universalmente aceptadas, tanto que podría hablarse de que cada individuo tiene su propio tratamiento. Parece claro que en muchos enfermos el simple raspado y alisado radicular no es suficiente para la eliminación de periodontopatógenos. Muchos de ellos están localizados en el tejido conectivo subepitelial (p. ej.: *A. actinomycetemcomitans*), otros penetran en células epiteliales (p. ej.: *P. gingivalis*, *T. forsythensis* o *T. denticola*) o determinados factores pueden impedir un desbridamiento óptimo (p. ej.: cemento alterado o depósitos duros subgingivales). La optimización de una terapéutica antibiótica rutinaria conociendo los periodontopatógenos implicados y sobre todo su sensibilidad *in vitro*, parece hoy en día una utopía; por ello, en la mayoría de los casos deben establecerse regímenes empíricos basados en estudios previos sobre eficacia de los antibióticos realizados por pruebas de laboratorio. Aun así, es muy diferente lo que ocurre *in vitro* con lo que acontece *in vivo*. En la revisión señalada (73) se indican como principales antibióticos de uso en periodoncia los siguientes: penicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, clindamicina, metronidazol, tetraciclinas, azitromicina, eritromicina, espiramicina, claritromicina, metronidazol + amoxicilina, metronidazol + amoxicilina/ácido clavulánico, metronidazol + espiramicina y hasta quinolonas. Desde el punto de vista microbiológico, todos ellos tienen ventajas e inconvenientes, y además los ensayos en los laboratorios varían mucho en el espectro de actividad obtenido según los centros los que se hayan efectuado. Analizando varios trabajos de revisión realizados en nuestro país (74-79) y en relación a los principales periodontopatógenos puede llegarse a las siguientes consideraciones.

A. actinomycetemcomitans

Tanto clindamicina como metronidazol carecen de actividad frente a este microorganismo (sin embargo, para este último se ha descrito un metabolito oxidativo en el hígado que es muy activo). Las tetraciclinas que, tienen además una importante acción colagenolítica, muestran tasas de resistencia por debajo del 5%. Aunque existen importantes controversias sobre su actividad *in vitro* (78), parece que las resistencias son prácticamente nulas a la asociación amoxicilina/ácido clavulánico (77). Los macrólidos muestran resistencias entre el 18% y el 90%. Se han señalado éxitos terapéuticos con quinolonas en regímenes de monoterapia, especialmente con ofloxacino (80).

P. nigrescens, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*.

La tasa de producción de betalactamasas se encuentra en torno al 40%, esto le confiere resistencia a penicilina y amoxicilina pero no a la asociación amoxicilina/ácido clavulánico que, por

otra parte, anularía la acción de otras enzimas libres en el surco gingival procedentes de otras bacterias. Los macrólidos pueden presentar entre un 30-50% de resistencias (menos para azitromicina, el compuesto de este grupo más activo sobre bacilos gramnegativos anaerobios estrictos). El 5-25% de las cepas son resistentes a clindamicina y menos del 5% a metronidazol que además difunde muy bien en el líquido crevicular.

Fusobacterium spp.

En los últimos años se ha detectado un incremento en la producción de betalactamasas (5-30%). Amoxicilina/ácido clavulánico, clindamicina y metronidazol muestran muy buena actividad con resistencias inferiores al 5%. Clindamicina al acumularse intracelularmente en los PMN incrementaría su persistencia en los tejidos inflamados. Frente a estas bacterias los macrólidos suelen ser poco activos.

T. denticola y *T. forsythensis*

Las dificultades para su cultivo no permite conocer bien su sensibilidad *in vitro*, si se sabe de su erradicación subgingival con metronidazol y amoxicilina/ácido clavulánico.

Peptostreptococcus micros

La especie más periodontopatógena del género es muy sensible a penicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, clindamicina y metronidazol, y algo menos a las tetraciclinas.

C. rectus

Los antibióticos de elección siguen siendo los macrólidos, aunque también suelen mostrar buena actividad los señalados para *P. micros*.

En resumen, desde el punto de vista microbiológico, amoxicilina/ácido clavulánico resulta ser la asociación más eficaz en el tratamiento de las periodontitis (probablemente sea aún mejor su comportamiento en su nueva presentación 1000/62,5 mg, 2 comprimidos cada 12 horas), siguiéndole metronidazol más amoxicilina, metronidazol y clindamicina. Ahora bien, la elección dependerá del factor individual y del tipo de periodontitis. En este último sentido, por ejemplo, Nogueroles y cols (9) consideran que en las formas crónicas no sería necesario su uso, siendo suficiente el control químico local, raspado, alisado radicular y en su caso cirugía periodontal. En el resto de las formas clínicas su empleo sería altamente recomendable, incluyendo además una monitorización de la microbiota subgingival especialmente por técnicas de biología molecular. En el caso de las enfermedades periodontales necrosantes (gingivitis y periodontitis), el tratamiento antibiótico puede ser urgente, especialmente en sujetos inmunodeprimidos. En estos casos metronidazol, amoxicilina/ácido clavulánico o clindamicina pueden ser útiles. Finalmente, queda por dilucidar de una forma fehaciente si la antibioterapia puede mejorar o prevenir las hipotéticas complicaciones de las periodontitis.

Periodontal diseases: microbiological considerations

LIÉBANA J, CASTILLO AM, ÁLVAREZ M. PERIODONTAL DISEASES: MICROBIOLOGICAL CONSIDERATIONS. MED ORAL PATOL ORAL CIR BUCAL 2004;9Suppl:S75-91.

ABSTRACT

The location of plaque-associated gingivitis at the gingival portion of the tooth plays an essential role in its genesis. However, at times local and other host response modifying factors also have an influence. The pathogeny of periodontitis is more complex. The microorganisms that comprise subgingival plaque are capable of acting directly on periodontal tissues or of modifying the host response, whereas the participation of the plaque *per se* (normal, decreased, or increased) is as decisive as the action of the bacteria themselves in the emergence of the disease. Different types of periodontitis are associated with specific microorganisms. The most periodontopathogenic are *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *T. forsythensis*. Periodontitis as a whole, represent the source of complications such as root caries, endoperiodontal processes and periodontal abscesses. They are associated with various illnesses such as atherosclerosis, diabetes, and respiratory infections, amongst others, as well as pathological oral halitosis. The different modalities of PCR are particularly important in the microbiological diagnosis of periodontitis, although on the negative side of things, it must be pointed out that *in vitro* sensitivity studies cannot be performed using this technique. First line antibiotic treatment of periodontitis includes amoxicillin/ clavulanic acid, metronidazole (associated or not with amoxicillin) and clindamycin.

Key words: Gingivitis, periodontitis, physiopathology, complications, diagnosis, antibiotics, PCR, biofilms

INTRODUCTION

Although there is no universally accepted consensus regarding classification (1), periodontal diseases are processes that affect dental support tissues. This revision focus exclusively on plaque-related syndromes and, of them, only their most relevant microbiological aspects will be pointed out. We are referring to clinical syndromes that, in addition to being closely related to the host response, include the direct involvement of microorganisms that create biofilms by colonizing the tooth surfaces of the gingival margin and gingival sulcus. This term denotes the microbial communities that associate with any surface that does not shed. Biofilms located in the mouth are known as plaque; they have their similarities and their differences depending upon the primary ecosystem within which they are established, as well as those located elsewhere. Periodontal diseases can be divided into two main categories; gingivitis is related to coronal plaque, or the smooth supragingival surfaces in the gingival area of the tooth and periodontitis is associated with subgingival plaque.

PLAQUE-ASSOCIATED GINGIVAL DISEASES

It is difficult to establish the quantitative composition of plaque and tartar located in the gingival area of the mature tooth; even more so when there are considerable differences based on the presence or absence of health conditions, simple gingivitis or associated periodontitis, which is not at all uncommon (2). More than 40 different bacterial species can be isolated (3). In general, the microbiota in plaque-elevated gingival conditions would reveal around 50% anaerobic bacteria (with a clear predominance of oral streptococci and *Actinomyces* spp.), strict anaerobic germs would represent up to 45% (in the initial stages, especially *Veillonella* spp.) and treponemas, up to 5%. As the plaque thickens, the anaerobic germs and treponemas would reach the figures cited and would be highly diversified, located in the areas having a lower oxygen reduction potential, and between the supra- and sub-gingival areas (4).

It can be stated that the bacteria that are typically found at the gingival level of the tooth, with a clear predominance of oral streptococci of up to 82%, coexist in equilibrium with the gum tissues. Plaque-related gingival diseases crop up when this balance is upset (Figure 1). The presence of non-specific plaque located at the gingival portion of the tooth is common to all of these illnesses and it is this plaque, along with tartar, that trigger the inflammatory process, with the same or different clinical characteristics, depending on what has upset the afore-mentioned balance. In principle, the rest of the oral mucosa and remaining periodontal tissues are unaffected (5). The following classification can be established based upon these causes (6): a) gingivitis without factors that favour its appearance, aetiologically related to plaque and calculus resulting from a lack of proper hygiene, usually affects the entire population at some point during their lifetime to a greater or lesser degree; b) gingivitis with local factors that promote its appearance, in which, in addition to

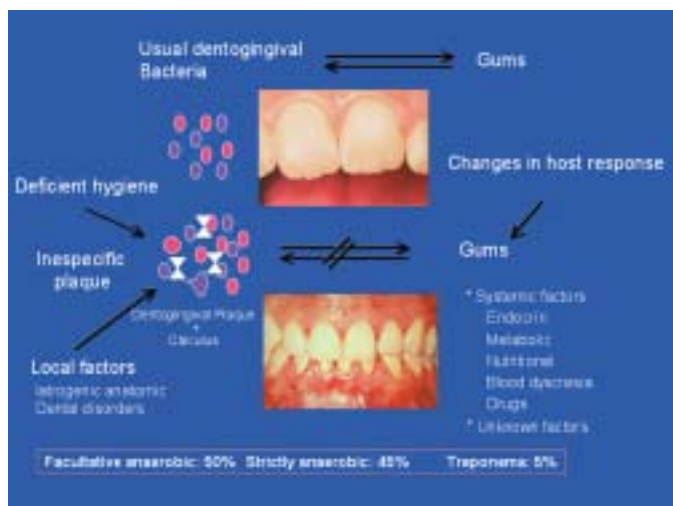


Fig. 1. Dental plaque-associated gingival disease.

plaque and calculus, dental anatomic alterations are present, such as dental crowding, or iatrogenic causes due to obturation and defective restorations, or orthodontal apparatus that favour the accumulation of plaque and impede its elimination; c) gum diseases associated with plaque that modify the host response; in these cases, other very different systemic factors are present in addition to the microbial factor and are usually accompanied by gingival enlargements. Such is the case of physiological endocrine phenomena (puberty, menstrual cycle, or pregnancy), pathological endocrine factors (particularly diabetes mellitus), nutritional (such as lack of vitamin C), blood dyscrasias (for example, certain types of leukaemias) and certain medications (oral contraceptives, some anti-epileptic drugs, immunosuppressants, and certain calcium antagonists), and d) plaque-related gum diseases with unknown factors; these cases can only be classified as idiopathic.

PERIODONTITIS

Concept

Inflammatory diseases that lead to the destruction of the dental support system are grouped under this term. When alveolar bone is affected, tooth stability and chewing are altered and this leads to manifest disability. Periodontitis may follow an episodic course, appear in progressive stages (starting with an initial stage, moving on to an advanced stage), it may be chronic or aggressive and can be localized or generalized (7). As in the case of gingivitis, we will only study the more relevant microbiological aspects of the plaque-related illnesses affecting the periodontia, without making specific mention of the systemic implications of these structures or other types of deformities.

Subgingival Plaque

Subgingival plaque is located in the virtual space of the gingival sulcus with a very low degree of colonization in healthy periodontia; however, the amount and diversity of microorganisms increase in the presence of disease, developing a biofilm at this level and turning the virtual space into a true pocket, which leads to the destruction of alveolar bone. This biofilm is characterized by the fact that it adopts a different structure from that located above the gum or at the level of the tooth root and that only adheres to the dental surface. Subgingival plaque develops following the classical scheme of microbial colonization, succession, and associations described by Socransky and cols. (3) and later modified somewhat by Socransky and Haffajee (4) and in which we have introduced small changes as reflected in Figure 2. Figure 2 shows how the first microorganisms to colonise the sulcus come from the neighbouring biofilm found in the gingival margin (groups 6, 5 and 4), followed by the secondary colonisers (group 3) that will act as a bridge with the tertiary microorganisms (group 2) that will be joined by the quaternary organisms (group 1). Both Groups 2 and 1 will predominate in the later stages. Groups 6, 5 and 4, which make up a genuine biofilm, adhere mainly to the tooth, whereas groups 3, 2 and 1 are more specifically involved in mutual interactions and adhesion to the epithelium. Because the enormous, original study was carried out in adults (13,321 samples of subgingival plaques

taken from the mesial aspect of each tooth in 185 individuals), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b would be found in low numbers if at all. These pathogens would have to be substituted or associated with Group I bacteria had young individuals been included. This would be the only explanation for the clear prevalence of Group 1 in aggressive periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola*, in the chronic forms.

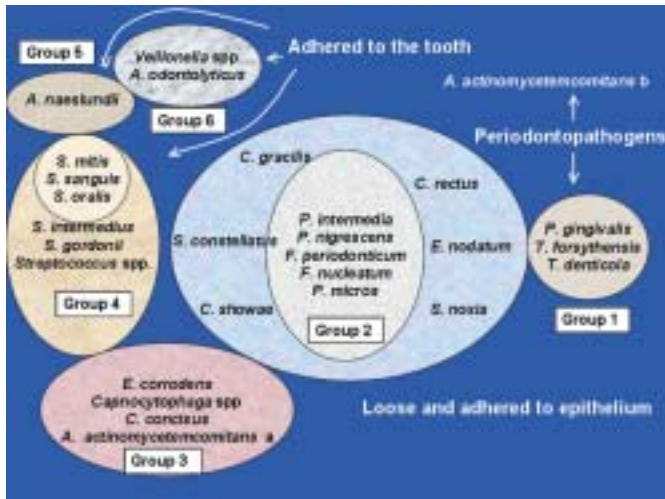


Fig. 2. Development of subgingival plaque.

Types of Periodontal Infections

Figure 3, modified from Van Winkelhoff and cols. (8), shows that two types of periodontal infections can be considered: those that are the result of resident microorganisms and those caused by exogenous microorganisms (at present, the origin of the so-called "exogenous" microorganisms has come under debate, since, had modern molecular biology techniques been used, they would have been detected as endogenous microorganisms, albeit present in small amounts; even so, we believe that this classification is not entirely obsolete). In the first case, the microbiota usually found in the oral cavity in a compromised host will cause an opportunistic infection or, if local conditions are modified, will lead to overgrowth. In both of these cases, causality would be related to ecological plaque. However, the microorganisms may be of exogenous origin, although, as we have also indicated, they are sometimes resident microorganisms that are present in very low numbers or are not usually found in the mouth, and provoke a full-blown infection, a carrier status or a secondary infection. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *T. forsythensis* are particularly periodontopathogenic and their association with periodontitis would be due to a relatively specific plaque.

The Relationship between Microorganisms and Periodontitis

Many studies have been carried out that examine this issue, with so many clinical and laboratory diagnosis-related variables (for example: diagnosis based on culture or molecular biology techniques) that what we state in this regard must be considered provisional and is in no way to be taken as the final word.

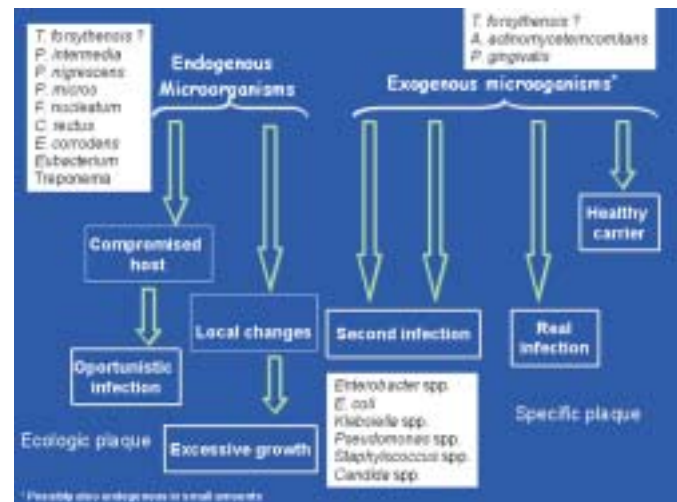


Fig. 3. Types of periodontal infections.

Schematically, it can be said that chronic periodontitis are clinically relevant starting at the age of 35 years, that they evolve slowly, that polymorphonuclear (PMN) leukocyte function is apparently normal and that a wide range of microorganisms are involved, such as *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythensis*, *Prevotella nigrescens*, and others (9). Aggressive periodontitis usually begin during childhood or in early adulthood, they progress rapidly, show a poorer response to treatment, are accompanied by a deficit in PMN function and the most prevalent microorganism is *A. actinomycetemcomitans* serotype b (10); however, recent studies also point to *Campylobacter rectus*, *T. forsythensis*, genotypes II and IV (11), and to *P. gingivalis* (12). Although the term "refractory periodontitis" should no longer be accepted (1, 6), it continues to be used to refer to the same situation and appears to be associated with *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, and other microorganisms (13, 14). Insofar as necrotising periodontal diseases are concerned (gingivitis and periodontitis), apart from various associated factors, they are related with microorganisms such as *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. denticola*, and *Fusobacterium nucleatum* (9).

Periodontitis Physiopathology

The classic hypothesis is that in order for periodontitis to appear, there must be a pre-existing gingivitis (15). If we follow the scheme elaborated by our group (9) (Figure 4), a series of subgingival plaque-related periodontopathogenic bacterial factors and other host-dependent factors intervene. Only in vitro evidence is available for many of these factors, making it difficult to truly ascertain what happens in vivo.

Periodontopathogenic Factors

Periodontopathogenic factors are classified as direct and indirect.

- **Direct Pathogenicity.** Direct pathogenicity is due to the action of structural and metabolic elements, exotoxins, exoenzymes and other products that are produced by the bacteria and exert direct influence on periodontal tissues. In this way they cause tissue lesions, cell death, decreased fibroblast proliferation, mi

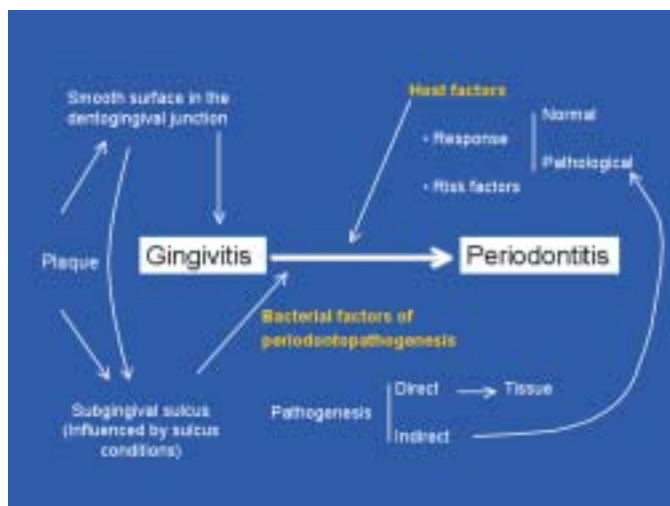


Fig. 4. Factors that influence the transition of gingivitis to periodontitis.

crobial progression, penetration into epithelial cells, increased apoptosis, cytotoxic phenomena, etc. (16-23) (Figure 5). Of these events, penetration into epithelial tissue is the most salient and is especially related to *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, and *F. nucleatum*, and in all likelihood, *T. forsythensis* and *T. denticola*. This epithelial penetration might be related to actin and other mechanisms and may determine cell death, the accumulation of phagocytes, the release of inflammatory factors (24) or tissue sensitisation, giving rise to hypersensitivity (25). A cytolethal descending toxin (CDT) has recently been described in *A. actinomycetemcomitans* that induces progressive cell expansion and eventual cytotoxicity (22). In addition, the induction of apoptosis in epithelial cells by *T. forsythensis* has also been pointed out (26) which, in this case, would lead to an accumulation of macrophages in order to eliminate these cells.

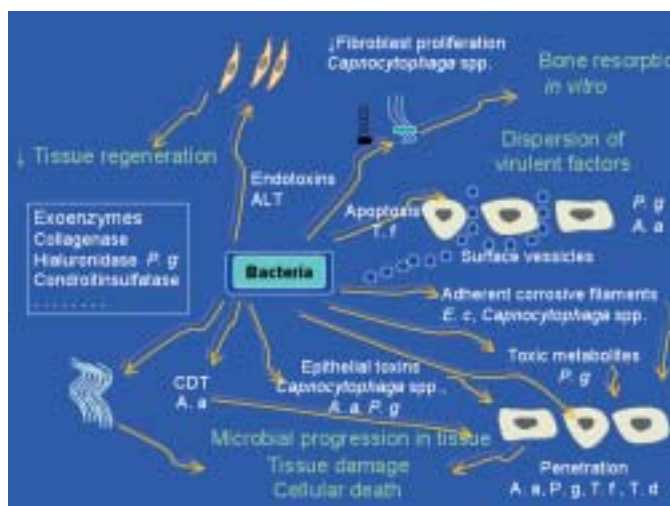


Fig. 5. Some examples of direct bacterial pathogenicity in the genesis of periodontitis. (for instance: *Porphyromonas gingivalis*; *A. a*: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; *T. f*: *Tannerella forsythensis*; *T. d*: *Treponema denticola*; *F. n*: *Fusobacterium nucleatum*; *P. i*: *Prevotella intermedia*; *E. c*: *Eikenella corrodens*).

• Indirect Pathogenicity. At times, indirect pathogenic factors decrease the host response, while at others they increase said response. In the first instance, indirect pathogenesis can interfere in phagocytosis by means of different mechanisms (18, 19, 21) (Figure 6); one of the most important of these mechanisms is the elaboration of a leukotoxin by *A. actinomycetemcomitans*, one of its main virulence factors (18, 27), especially when produced in large amounts (28) and that also appears to induce apoptosis in PMN leukocytes (29). There is a hypothesis that states that protease production by *P. gingivalis* and *P. intermedia* might destroy this leukotoxin and decrease the pathogenicity of *A. actinomycetemcomitans* (28). On the other hand, the microorganisms can interfere in the specific response by means of proteases that destroy immunoglobulins and complement factors, thereby provoking lymphotoxicity, activating T cell suppressants, inhibiting the proliferation of lymphocytes B,

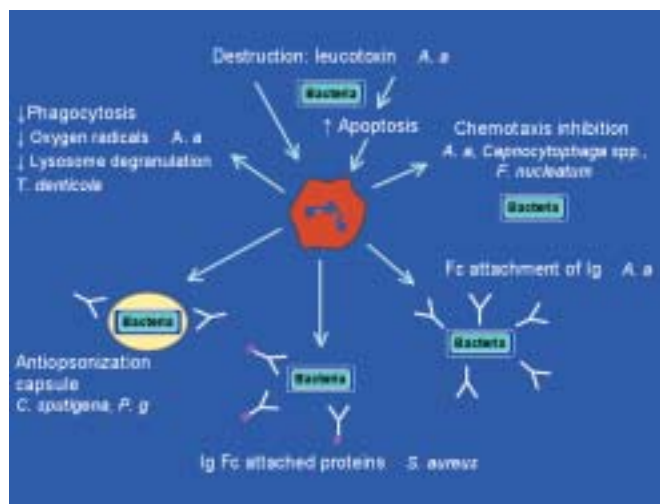


Fig. 6. Some examples of indirect bacterial pathogenicity in the genesis of periodontitis. Interference with phagocytosis. (*P. g*: *Porphyromonas gingivalis*; *A. a*: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*).

inducing their polyclonal activation, etc (18, 19, 21). At times, indirect pathogenicity translates into an increased host response, destroying regulating proteases. Thus, latent metal proteases and/ or the kallikrein/kinin system are activated or anti-inflammatory proteins are destroyed. In contrast, lipopolysaccharides (endotoxins) can induce macrophage activation and these, in turn, excrete lysosomic enzymes, NO, oxygen radicals, chemokines, cytokines, and prostaglandin E-2 (PGE-2) that contribute to inflammation and bone reabsorption (18, 19, 21, 30, 31) (Figure 7).

Host Factors (Figure 8)

The host response may be normal or pathologic. A pathological host response may be due to a specific hypersensitivity with the participation of T and B lymphocytes and neutralizing antibody production (32, 33) that activate the complement or, if they are IgE antibodies, mastocytes are activated. Elevation of subclass 2 IgG appears to be related to the degree of aggressiveness of the periodontitis (34), which does not seem to be the case with a chronic course of the illness (35). When T lymphocytes and

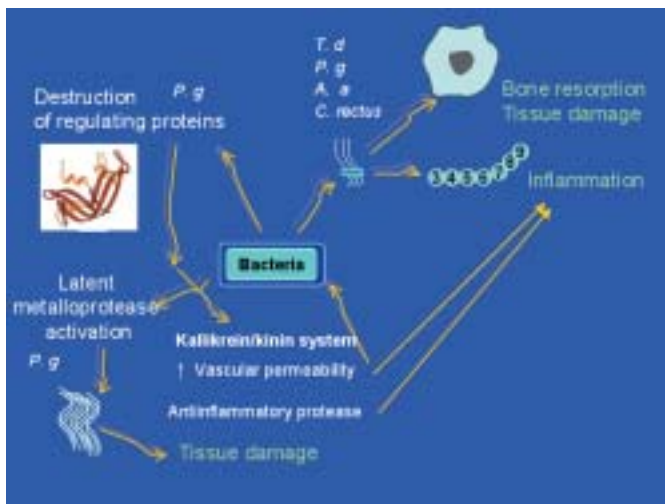


Fig. 7. Some examples of indirect bacterial pathogenicity in the genesis of periodontitis. Increased host response. (P. g: Porphyromonas gingivalis; A. a: Actinobacillus actinomycetemcomitans; T. d: Treponema denticola).

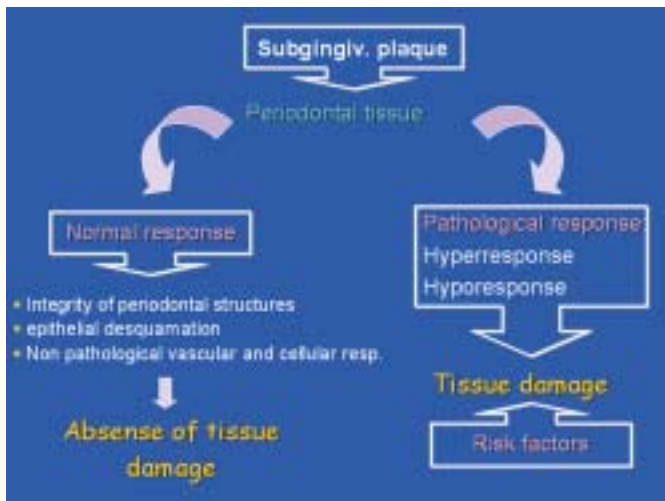


Fig. 8. Periodontal tissue response in the genesis of periodontitis.

macrophages (monocytes) are activated, a series of mediators such as cytokines, chemokines and PGE-2 are secreted that interact with different cells and contribute to the inflammatory process, tissue damage and bone destruction (36-39). This excessive response may also be non-specific and induced by endotoxins. These endotoxins interact with the macrophages and release chemokines, cytokines, PGE-2, lysosomal enzymes, oxygen and NO radicals as previously pointed out (40). Likewise, they are capable of activating the complement by an alternate pathway. In addition to the accumulation of inflammatory and non-inflammatory cells, they also degrade proteoglycans, by means of elastase and cathepsin B, whereas inflammatory mediators such as GMC-CSF reduce PMN apoptosis, thereby favouring increased levels of PMN leukocytes in the gingival sulcus (41). The host response may also be impaired, due to the microbial factors already discussed or intrinsically so as a result of a specific response (AIDS, immunosuppressant treatment,

etc.) or a non-specific response, that mainly affects PMNs; in these circumstances, the disease progresses more rapidly given the lack of bacterial control and increased aggressiveness of the disease entity (9).

In short, both the effect of the bacteria, as well as the uncontrolled host response determine the destructive events that take place in periodontal tissues and pocket formation. Periodontal pockets, in turn, foster a situation of low oxygen reduction potential and the development of anaerobic microorganisms.

Risk Factors Associated with the Pathogenesis of Periodontitis

Figure 9 presents some of these risk factors, categorised as behavioural, additional (local and systemic) and genetic. Certain hereditary deficits affecting the specific response and, above all, non-specific responses are included in the category of genetic risk factors (for instance: familial cyclic neutropenia) and certain polymorphisms, amongst them polymorphisms of interleukin 1 (IL-1), tumour necrosis factor- α (TNF- α), vitamin D receptor, interleukin 4 (IL-4) and others (42). The most widely studied is the polymorphism of IL-1 (43, 44); however, how this polymorphism correlates with the profile of periodontal disease is far from being fully elucidated (45).

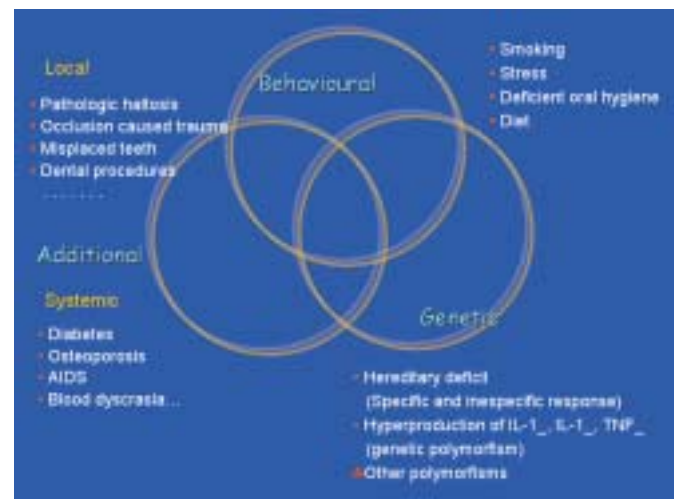


Fig. 9. Risk factors associated with pathogenesis of periodontitis. Periodontal diseases and pathological oral halitosis.

Periodontitis Complications

The group of classical endoperiapical lesions, i.e., root caries and periodontal abscesses, has grown in recent years with the addition of many others:

- Relationship with *Helicobacter pylori*, and hence, with processes such as gastritis and carcinoma of the stomach. The data that refer to a reservoir of this bacteria in the gingival sulcus in patients with periodontitis are contradictory (46, 47).
- Osteoporosis. Everything so far points to osteoporosis as a risk factor for periodontitis, more than for complications derived from periodontitis (48).
- Diabetes. The following has been established: a) it is related to periodontitis on an epidemiological level (49); b) there are increased levels of glycosilated haemoglobin in subjects with severe periodontitis (50) and it is reduced with debridement and

antibiotic therapy (51); c) there is an association with an increase of the humoral response against certain periodontopathogenic factors (52); and d) MO+ monocytes are somehow involved with the inflammation that destroys insulin-producing cells (see later in this paper). Despite all of this, new studies are needed to establish a clear relationship since, *a priori*, everything appears to indicate that diabetes is another risk factor for the development of periodontitis as a result of the decreased functionality of the PMN leukocytes, but with an increase of collagenase release, as a consequence of the typical diabetic microangiopathy (53) or because patients with periodontitis simply do a worse job of controlling their glycemia (54).

- Periodontitis-atherosclerosis (PAS). Although the epidemiological data are not consistent across the board, this association and the implications it has for myocardial infarcts and cerebrovascular accidents has been the object of much study. A series of clinical genetic risk factors have been pointed out: polymorphisms of IL-1 (55), common genetic characters, severe or uncontrolled periodontitis, loss of bone attachment measuring 3 mm or more, etc. (56). Several different pathogenic models have been proposed. One such model is based on the existence of hyperactive monocytes (MO+) that respond to the bacterial endotoxins in the gingival sulcus, producing abundant chemokines and cytokines that lead to an increase in lipids, a proliferation of endothelial cells, PMN attraction and, in short, a thickening of the vascular walls. Endotoxins are also capable of activating the complement through an alternative pathway. The same holds true for reactive protein-C, giving rise to a subluminal infiltrate of PMN. Likewise, MO+ can release factors that induce platelet aggregation (57). Receptors of a *P. gingivalis* antigen have been described on the platelet surface that determine platelet aggregation; they also determine *in vitro* endothelial invasive capacity of certain periodontopathogens and the presence of their DNA has been demonstrated in atheromatous plaques (58, 59), which would play a direct role in atherosclerosis, along with the previously described immune mechanism.

- Premature births and low birth weight infants. How this relates to periodontitis is not yet clear. The influence of periodontopathogens as triggers of an endometrial and placental inflammatory process has been indicated (60).

- Pathological oral halitosis. Pathological halitosis results from volatile compounds (VCs) of oral bacteria, which includes bacteria related to gingivitis and periodontitis, amongst others; these volatile compounds also promote the periodontal diseases themselves (61) (Figure 10).

- Other processes. The bacteria in periodontal pockets can be aspirated, upon which they enter the respiratory tract and cause pneumonia; in other cases, in association with the immune-inflammatory process, similar to other previously discussed complications, periodontitis can be related with chronic obstructive pulmonary diseases. The passage of periodontopathogens to the blood can lead to endocarditis and cerebral abscesses. These abscesses are seen in highly immunodepressed patients (59).

Laboratory Diagnosis

Laboratory tests should aid in answering a series of questions, such as: When does gingivitis become periodontitis? What rate of attachment loss will it present? What individuals are more

vulnerable? Has the disease been controlled by the treatment applied? What maintenance regime should be established? As things stand at present, we can say that despite the advances made in recent years, there is no such thing as a laboratory test procedure that can answer all these questions (62). Microbiological diagnosis should be aimed at detecting the periodontopathogenic bacteria and the immunological diagnosis must evaluate the host response and its consequences.

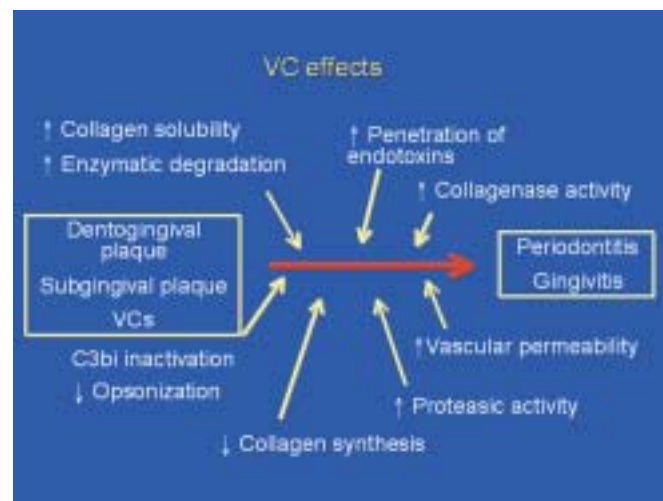


Fig. 10. Periodontal diseases and pathological oral halitosis.

Microbiological Diagnosis

Microbiological studies must not only evaluate the presence of periodontopathogens, but they must also quantify them. It would seem that this is a better predictor of the risk of bone loss than studies that merely examine prevalence. Site specificity is an important constraint; so that in order to be able to claim that a person is not infected with a 95% confidence interval, 25 areas that have been studied must test negative for *A. actinomycetemcomitans* and 6 and 3 areas for *P. gingivalis* and *T. forsythensis*, respectively. Samples must be extracted from pockets measuring more than 5 mm chosen at random. As regards threshold levels that are capable of establishing a greater probability of attachment loss, 3×10^4 has been indicated for *A. actinomycetemcomitans* and 6×10^5 for *P. gingivalis* (63, 64).

- Sample extraction. Once supragingival plaque has been removed, paper tips are generally introduced into the gingival sulcus and held there for a few seconds; samples can also be taken by means of curettage.

- Culture. Culture is the benchmark method for evaluating sensitivity to antibiotics and for determining the entire subgingival microbiota. On the other hand, since only live bacteria proliferate, we must be meticulous in transporting samples; multiple selective media are needed to study certain bacteria in particular, with different atmospheres for incubation; the results for certain anaerobes can take more than a week to obtain, given their slow rate of growth, and some periodontopathogens, such as *T. forsythensis* or oral treponemas are hard to culture, etc.

All of these considerations make routine application of culture technique unviable and, in fact, as previously commented in the discussion of the different types of periodontal infections or studies of different types of periodontitis, culture results in the past may have lead to important mistakes.

- **Enzymatic methods.** Enzyme methods are based on demonstrating the existence of a trypsin-like enzyme that hydrolyses a substrate, called, benzoyl-D, L-arginine-naphthylamide (BANA) creating a coloured compound. The test would be positive although not specific in the presence of *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis* and some *Capnocytophaga* species. Despite its limitations, it has proven its usefulness as a marker for microbial activity in certain types of patients (65).

- **Bacterial metabolites.** Although much has yet to be learned, it appears that there is a relationship between the increase of VCs and the severity of the periodontitis activity (61).

- **Immunological methods.** Immunological methods are based on the detection of bacterial antigens using known antibodies. Different techniques have been used, such as direct or indirect immunofluorescence, flow cytometry, ELISA, latex agglutination, etc. Although they are fast, they can give crossed reactions and it isn't easy to obtain specific monoclonal antibodies (66, 67).

- **Molecular methods.** DNA probes are included in this category, and more particularly, polymerase chain reaction (PCR) and its variants. They not only allow periodontopathogens to be detected, but they are also capable of quantifying them (68). In the specific case of PCR, it must be remembered that it is a basic technique in microbiological diagnostics, thanks to its high degree of sensitivity, specificity and the speed with which it can be performed; it does not require live microorganisms and it is capable of detecting species that are difficult to culture. It is true, however, that by itself, it is not possible to perform *in vitro* susceptibility studies unless encoding genes for resistance are used.

Immunological Diagnosis

- **Immune response.** As previously commented, it is not clear whether the detection of antibodies in serum or in the sulcus by means of different techniques is an indicator of protection, i.e. inactivity, or of active infection. It seems that in aggressive forms of periodontitis, there is a relationship between decreased antibody levels and symptom severity, but the same does not hold true for the chronic forms of the illness (34, 35). Different factors in PMN have been studied that establish their functionality (69) and lipopolysaccharide elicited secretory responses in monocytes have also been subject to analysis (70).

- **Inflammatory mediators.** Various compounds encountered in gingival fluid, such as IL-1, IL-6, TNF- α , PGE-2 (35), IL-4, IL-10, IL-2 and others (71) have been studied, albeit with discordant outcomes.

- **Lytic enzymes in the gingival sulcus** resulting from the inflammatory process. The most widely studied lytic enzymes are the metal proteases and amongst them, collagenase. Elastase, aspartate aminotransferase, cathepsins, glucuronidase, dipeptidyl peptidase, etc. have likewise been evaluated. In practically all the cases, increased levels of these enzymes can be correlated with severe loss of attachment (35).

Genetic polymorphisms. Mention has already been made of the fact that the relevance of genetic polymorphisms has not been fully elucidated as yet, particularly in case of the polymorphism corresponding to the most widely studied IL-1. Its use is therefore not warranted for the identification of patients at risk for diabetes, nor should it be used to determine treatment or periodontal maintenance measures.

ANTIMICROBIAL USE IN PERIODONTICS

Mechanical control is generally sufficient for plaque-associated gingivitis, with the addition of chlorhexidine and above all, health education to improve oral hygiene and, in those cases in which it is necessary, local factors and host response-modifying factors should be corrected (9). However, treatment attitude regarding periodontitis is quite a different matter. In addition to correcting behavioural and additional factors, as in the previously cited conditions, the use of local antiseptics amongst others, the already mentioned chlorhexidine, and topical application of antibiotics (for instance, tetracyclines and metronidazole) have also been proposed. The results obtained do not appear to represent an improvement over those achieved by means of simple root scaling and planing, particularly with respect to topical antibiotic use. Amongst other adverse circumstances, we can point to the promotion of resistance in the subgingival microbiota. Topical antibiotics can only be of benefit when there has been relapses and/ or the patient refuses to accept other repeated periodontal maintenance measures (72). Systemic administration of antibiotics can, however, improve the periodontal clinical status given that they can easily reach the deeper levels of the diseased periodontia by means of the bloodstream. A clear example of this is what is seen with tetracyclines that when systemically administered, are capable of eradicating *A. actinomycetemcomitans*, however, the same cannot be said of local application. Furthermore, antibiotics can eliminate periodontopathogens in other areas of the oral cavity that act as reservoirs with the resulting prophylactic effect. In a study of the systemic use of these drugs (73), the authors have conducted a broad review of the literature regarding this issue. Numerous studies carried out by clinicians and researchers were analysed; however, there is a host of variables to be contemplated, amongst them: clinical variables related to the type of periodontitis under study; microbiological factors, such as culture studies or molecular biology techniques; those that refer to dosage regimes; the associated periodontal measures such as scaling, planing or surgery, etc. As can be imagined, the results of these studies are so diverse as to make it impossible to establish universally accepted measures. Such is the case that we can state that every individual has his/ her own specific treatment. It is clear that for many patients, simple root scaling and planing does not suffice to eliminate periodontopathogens. Many of these microorganisms are located in the subepithelial connective tissue (p. e.g., *A. actinomycetemcomitans*); others penetrate the epithelial cells (for example, *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, or *T. denticola*) or certain factors may keep optimal debridement from being possible (for instance, altered dental cement or hard subgingival deposits). Optimisation of routine antibiotic treatment knowing the periodontopathogens involved and above all, knowing their *in vitro* sensitivity, is as yet a utopia; therefore, in

most cases, treatment regimes must be determined empirically based on prior efficacy studies of the antibiotics by means of laboratory testing. Even so, *in vitro* is very different from *in vivo*. In the afore-cited review (73), the following antibiotics are the main ones for use in periodontal disease: penicillin, amoxicillin, amoxicillin/ clavulanic acid, clindamycin, metronidazole, tetracyclines, azithromycin, erythromycin, spiramycin, clarithromycin, metronidazole + amoxicillin, metronidazole + amoxicillin/ clavulanic acid, metronidazole + spiramycin and even quinolones. From a microbiological perspective, all have advantages and disadvantages and in laboratory assays, the spectrum of activity varies widely depending on the centre at which the testing is performed. Based on an analysis of reviews of several works carried out in our country (74-79) and with respect to the most commonly encountered periodontopathogens, the following considerations can be made.

A. actinomycetemcomitans

Both clindamycin and metronidazole lack activity against this microorganism (although in the case of metronidazole, an oxidative metabolite in the liver has been described that is very active). Tetracyclines, in addition to having a significant collagenolytic action, have also shown resistance rates below 5%. Although much controversy exists with respect to the *in vitro* activity (78), it would seem that they present virtually no advantage whatsoever over the association of amoxicillin/ clavulanic acid (77). Macrolides have shown resistance rates of between 18% and 90%. Treatment successes have been pointed out using quinolones in stand-alone treatment, especially with ofloxacin (80).

P. nigrescens, P. intermedia, P. melaninogenica, P. gingivalis.

The rate of betalactamase production is situated at around 40%. This makes them resistant to penicillin and amoxicillin, but not to the association of amoxicillin/ clavulanic acid that, on the other hand, would prevent other free enzymes in the gingival sulcus derived from other bacteria from being active. Macrolides can present resistance rates of 30-50% (lower in the case of azithromycin, the most active compound in this group against strict anaerobic gram-negative bacilli). Between 5 and 25% of the strains are resistant to clindamycin and fewer than 5% are resistant to metronidazole, which is also easily dispersed throughout the crevicular fluid.

Fusobacterium spp.

Increased betalactamase production has been detected in recent years (5-30%). Amoxicillin/ clavulanic acid, clindamycin and metronidazole have proven to be highly active with resistance rates under 5%. Clindamycin, by accumulating at the intracellular level in PMN leukocytes, would prolong its presence in inflamed tissues. Macrolides tend to be relatively inactive against these bacteria.

T. denticola and T. forsythensis

The difficulties inherent in culturing these two pathogens make it impossible to fully understand their *in vitro* sensitivity, although we do know that they have been eradicated from subgingival

sites by metronidazole and amoxicillin/ clavulanic acid.

Peptostreptococcus micros

The most periodontopathogenic species of this genus is highly sensitive to penicillin, amoxicillin, amoxicillin/ clavulanic acid, clindamycin and metronidazole, and are somewhat less sensitive to tetracyclines.

C. rectus

The antibiotics of choice to eradicate *Campylobacter rectus* continue to be macrolides, although the drugs indicated for *P. micros* also show good activity.

In short, from a microbiological standpoint, amoxicillin/ clavulanic acid is the most effective association in the treatment of periodontitis (it will probably behave even better in its new 1000/ 62.5 mg formulation with a 2 tablet/ twice daily dosing scheme), followed by metronidazole plus amoxicillin, metronidazole and clindamycin. Now then, choice will depend on the individual factor and on the type of periodontitis. With regard to the periodontitis to be treated, Noguero and cols (9) for example, consider that antibiotics need not be used in chronic forms and that local chemical control, scaling, root planing, and, should it be necessary, periodontal surgery is sufficient. In the remaining clinical forms, the use of antibiotics would be highly advisable, including subgingival microbiota monitoring, especially by means of molecular biology techniques. In the case of necrotising periodontal diseases (gingivitis and periodontitis), antibiotic treatment may be urgent, particularly in the case of immunodepressed subjects. In these cases, metronidazole, amoxicillin/ clavulanic acid or clindamycin may be of use. Finally, we need to determine if antibiotic treatment can be improved or the hypothetical complications of periodontitis be prevented.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Armitage GC. Classifying periodontal diseases –a long-standing dilemma. *Periodontol* 2000 2002;30:9-23.
- Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27: 648-57.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-44.
- Socransky SS, Haffajee AD. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos y difíciles. *Periodontol* 2000 2003;3:12-55.
- Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol* 1999;4(1):7-19.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
- Slots J. Búsqueda del tratamiento periodontal eficaz, seguro y de bajo coste. *Periodontol* 2000 2002;3:9-11.
- Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000;1996;10:47-78.
- Noguero B, Liébana J, Sanz M, Herrera D, Mesa F. Microbiología periodontal y periimplantaria. En: Liébana J, ed. *Microbiología oral* 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002. p. 571-96.
- Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4: 39-53.
- Huang Y, Umeda M, Takeuchi Y, Ishizuka M, Yano-Higuchi K, Ishikawa I. Distribution of *Bacteroides forsythus* genotypes in a Japanese periodontitis population. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:208-14.
- Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata I, Arakawa S. Three case reports of

- aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *J Periodontol Res* 2002;37:324-32.
13. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, et al. Subgingival microbiota in healthy well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998;25:346-53.
 14. Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, et al. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss attachment in adolescents. *J Dent Res* 2004;83: 232-5.
 15. Bascones A. *Periodoncia clínica e implantología oral*, 2ª ed. Madrid: Ed. Avances; 2001. p. 107-64.
 16. Kinane DF, Podmore M, Murray MC, Hodge PJ, Ebersole J. Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontol 2000* 2001;26:54-91.
 17. Listgarten MA. Formation of dental plaque and other oral biofilm. En: Newman HN, William M, eds. *Dental plaque revisited*. Cardiff: Bioline; 1999. p. 87-210.
 18. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000* 1999;20:136-67.
 19. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000* 1999;20:168-238.
 20. Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol 2000* 2001;26:33-53.
 21. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000* 2003;32:24-35.
 22. Yamano R, Ohara M, Nishikubo S, Fujiwara T, Kawamoto T, Veno Y, et al. Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria. *J Clin Microbiol* 2003;41:1391-8.
 23. Lamont RJ, Yilmaz O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol 2000* 2002;30:61-9.
 24. Van Dyke TE. Neutrophil receptor modulation in the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 1984;6:452-4.
 25. Cutler CW, Jotwani R, Palucka KA, Davoust J, Bell D, Banchemreau J. Evidence and a novel hypothesis for the role of dendritic cells and *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *J Periodontol Res* 1999;34:406-12.
 26. Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I, Tsuchida N. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2000;68:4611-5.
 27. Haubek D, Westergaard J. Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. *Int J Paediatr Dent* 2004;14:41-8.
 28. Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:183-8.
 29. Korostoff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect Immun* 1998;66: 4474-83.
 30. Choi BK, Lee HJ, Kang JH, Jeong GJ, Min CK, Yoo YJ, et al. Induction of osteoclastogenesis and matrix metalloproteinase expression by the lipooligosaccharide of *Treponema denticola*. *Infect Immun* 2003;71:226-33.
 31. Nakamura T, Nitta H, Ishikawa I. Effect of low dose *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide pretreatment on cytokine production by human whole blood. *J Periodontol Res* 2004;39:129-35.
 32. Inagaki S, Ishihara K, Yasaki Y, Yamada S, Okuda K. Antibody responses of periodontitis patients to gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2003;74:1432-9.
 33. Yun LW, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Enhancement of Th2 pathways and direct activation of B cells by the gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Exp Immunol* 2003;134:295-302.
 34. Chung HY, Lu HC, Chen WL, Lu CT, Yang YH, Tsai CC. Immunoglobulin G profiles in different forms of periodontitis. *J Periodontol Res* 2003;38(5): 471-6.
 35. Bullón Fernández, P. Diagnóstico por el laboratorio de las enfermedades periodontales y periimplantarias. Diagnóstico de la periodontitis. *Av Odontostomatol* 2003;especial:105-17.
 36. Ruwanpura SM, Noguchi K, Ishikawa I. Prostaglandin E2 regulates interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-3 production in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2004;83:260-5.
 37. Ataoglu H, Alptekin NO, Haliloglu S, Gursel M, Ataoglu T, Serpek B, et al. Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:470-6.
 38. Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Sawamoto Y, Tanaka H et al. Differential cytokine induction by two types of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:121-3.
 39. Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2004;75:37-43.
 40. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis* 2002;8:254-60.
 41. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, et al. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2003;30:616-23.
 42. Schenkein HA. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontol 2000* 2002;30:79-90.
 43. Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, et al. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1999;70:418-30.
 44. Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:682-9.
 45. Greenstein G, Hart T. Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. A critical evaluation. *J Am Dent Assoc* 2002;133:452-9.
 46. Asikainen S, Chen C, Slots J. Absence of *Helicobacter pylori* in subgingival samples determined by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:318-20.
 47. Riggio MP, Lennon S. Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. *J Med Microbiol* 1999;48: 317-22.
 48. Wactawski-Wende J, Grossi SG, Trevisan M, Genco RJ, Tezal M, Dunford RG, et al. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *J Periodontol* 1996;67:1076-84.
 49. Moore PA, Weyant RJ, Mongelluzzo MB, Myers DE, Rossie K, Guggenheimer J, et al. Type 1 diabetes mellitus and oral health: assessment of periodontal disease. *J Periodontol* 1999;70:409-17.
 50. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998;3:30-9.
 51. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Zambon JJ, Cummins D, Genco RJ. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J Periodontol* 1996;67:1094-102.
 52. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* 1998;3:51-61.
 53. Takahashi K, Nishimura F, Kurihara M, Iwamoto Y, Takashiba S, Miyata T, et al. Subgingival microflora and antibody responses against periodontal bacteria of young Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. *J Int Acad Periodontol* 2001;3:104-11.
 54. Sastrowijoto SH, van der Velden U, van Steenberghe TJ, Hillemans P, Hart AA, Graaff J, et al. Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival microbiology in insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective study. *J Clin Periodontol* 1990;17:233-42.
 55. Hegle RA. The pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1996; 246:21-38.
 56. Offenbacher S, Madianos PN, Champagne CM, Southerland JH, Paquette DW, Williams RC, et al. Periodontitis-atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. *J Periodontol Res* 1999;34:346-52.
 57. Kinane DF. Periodontal diseases' contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms. *Ann Periodontol* 1998; 3:142-50.
 58. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000;71: 1554-60.
 59. García RI, Henshaw MM, Krall EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol 2000* 2001;25:21-36.
 60. Dasanayake AP. Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk factor for low birth weight. *Ann Periodontol* 1998;3:206-12.
 61. Menéndez M, Noguero B, Cuesta S, Gallego M, Tejerina JM, Sicilia A. Halitosis de origen periodontal: revisión. *Av Odontostomatol* 2003;especial: 87-104.
 62. Armitage GC; Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol* 2003;74:1237-47.
 63. Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. Microbial risk indicators for periodontal attachment loss. *J Periodontol Res* 1991; 26:293-6.
 64. Haffajee AD, Socransky SS, Dibart S, Kent RL Jr. Response to periodontal therapy in patients with high or low levels of *P.gingivalis*, *P. intermedia*, *P.*

- nigrescens and *B. forsythus*. *J Clin Periodontol* 1996;23:336-45.
65. Yucekcal-Tuncer B, Uygur C, Firatli E. Gingival crevicular fluid levels of aspartate amino transferase, sulfide ions and N-benzoyl-D,L-arginine-2-naphthylamide in diabetic patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;30:1053-60.
66. Lamster IB, Celenti RS, Jans HH, Fine JB, Grbic JT. Current status of tests for periodontal disease. *Adv Dent Res* 1993;7:182-90.
67. Snyder B, Ryerson CC, Corona H, Grogan EA, Reynolds HS, Contestable PB, et al. Analytical performance of an immunologic-based periodontal bacterial test for simultaneous detection and differentiation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia*. *J Periodontol* 1996;67:497-505.
68. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* 2003;38:518-24.
69. Bullón P, Pascual A, Fernández-Novoa MC, Borobio MV, Muniain MA, Camacho F. Late onset Papillon-Lefevre syndrome? A chromosomal, neutrophil function and microbiological study. *J Clin Periodontol* 1993;20:662-7.
70. Garrison SW, Nichols FC. LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but not IL-1 beta in patients with adult periodontitis. *J Periodontol Res* 1989;24:88-95.
71. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Modalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;30:1046-52.
72. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Antisépticos tópicos y antibióticos en la terapia inicial de la periodontitis del adulto: aspectos microbiológicos. *Periodontol* 2000 2002;28:72-90.
73. Slots J, Ting M. Utilización de antibióticos sistémicos en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Periodontol* 2000 2002;28:106-76.
74. Borobio MV. Sensibilidad a antimicrobianos de bacterias anaerobias causantes de infecciones en la cavidad bucal. *Av Odontostomatol* 1994;10:51-4.
75. Cañadas MF, De Mingo Y, Prieto J. Sensibilidad de bacterias anaerobias en infecciones bucales. *Av Odontostomatol* 1996;12:57-65.
76. Bullon P. Infecciones periodontales. *Av Odontostomatol* 1996;12:77-90.
77. Liñares J, Martín-Herrero JE. Bases farmacobiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y perimplantarias. *Av Odontostomatol* 2003;especial:23-33.
78. Liébana J, Castillo AM, García A. Mecanismos de acción y resistencia de los antibióticos. Aspectos microbianos de la antibioterapia en odontología. En: Liébana J, Bagan JV eds. *Terapéutica antimicrobiana en Odontostomatología*. Madrid: IMC; 1996. p. 99-152.
79. Falcao C, Moura A, Faria R, Bascones A. Antibioterapia en periodoncia. Situación actual. I. Antibióticos sistémicos. *Av Periodon Implantol* 2001;13:39-48.
80. Kleinfelder JV, Mueller RF, Dieter L. Fluorquinolones in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:202-7

Este trabajo ha sido subvenciado parcialmente por el proyecto FIS: PI-020997, y la European Regional Development Fund (ERDF).

This work has been partially subsidised by the FIS: PI-020997 Project, and the European Regional Development Fund (ERDF).