



UNIVERSITAT INTERNACIONAL
DE CATALUNYA



HOSPITAL GENERAL
DE L'HOSPITALET

**“Relaciones clínicas, histológicas y microbiológicas
entre la aterosclerosis y la periodontitis crónica”**

**“Clinical, histological and microbiological
associations between atherosclerosis and chronic
periodontitis”**

TESIS DOCTORAL
Opción a Mención Europea
Enero 2010

Doctoranda: Deborah Violant Holz
Director: Dr. Josep Clotet Erra

“Clinical, histological and microbiological associations
between atherosclerosis and chronic periodontitis”

DOCTORAL THESIS

European Mention

February 2010



UNIVERSITAT
INTERNACIONAL
DE CATALUNYA

Universitat Internacional de Catalunya

Dental School

Ph student: Deborah Violant Holz (Dep. of Periodontics)

Director: Ph Dr Josep Clotet (Dep. of Basic Sciences)

Co-director: Ph Dr. Antonio Santos (Dep. of Periodontics)



HOSPITAL GENERAL
DE L'HOSPITALET

Hospital General de l'Hospitalet

Co-director: Dr. Oriol Lapiedra (Cardiovascular Unit)

ABSTRACT:

Background and Objective: A relationship between some systemic diseases and periodontitis has been described. Several studies have reported a link between periodontal disease and atherosclerosis. This study aimed (i) to support the link between the two diseases by evaluating the statistically significant simultaneous detection of five putative periodontopathogens (*A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* and *P. gingivalis*) in periodontal pockets and carotid atheromatous plaques, and (ii) to analyze the risk factors associated to atherosclerosis and/or periodontitis in the study population.

Materials and Methods: A complete periodontal and medical examination was conducted on 31 patients scheduled for carotid endarterectomy. Subgingival samples and atheromatous plaques were microbiologically analyzed using nested polymerase chain reaction to improve the bacterial threshold detection level in atheroma. Histological analysis of atheromatous plaques was also performed.

Results: All subgingival and atheroma samples were positive to at least one of the five target periodontopathogens. *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *F. nucleatum* established a statistically significant relationship between the concomitant presence of bacteria in atheroma and periodontal pockets. A strong link was demonstrated between increased glucose serum levels and the presence of *P. intermedia* in atheroma. High lymphocytes serum levels were also strongly related to the detection of the five target periodontopathogens in atheroma.

Conclusion: The concomitant presence of *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, and *T. forsythia* in the subgingival plaque and atheroma samples suggests that these bacteria might play a role in the development of atherosclerosis. Serum glucose levels could be responsible for the colonization of periodontopathogens in atheromatous plaques and the progression of cardiovascular disease. Atherosclerosis and periodontitis might be strongly linked by a direct and an indirect pathogenic pathway.

MAIN TEXT OF THE ORIGINAL ARTICLE:

INTRODUCTION:

Chronic periodontitis is a highly prevalent inflammatory disease (1, 2) caused by the subgingival accumulation of bacterial species, predominantly Gram-negative anaerobic bacteria (3). The pathogenesis of this disease is characterized by a chronic destruction of the dental support tissues, which may lead to tooth loss if periodontal treatment is not performed.

Several authors (4-6) have reported that chronic periodontitis may play an important role in the development of certain systemic diseases. Periodontitis has even been linked to cardiovascular disease (7-11), respiratory diseases (12), diabetes mellitus (13,14), preterm low-weight births (15,16), hyperlipidemia (17,18) and osteoporosis (19) as an independent risk factor. Moreover, periodontitis has been linked to atherosclerosis (20-31), a highly prevalent inflammatory vascular disease, responsible for 30% of worldwide mortality (32). There are several hypotheses that might explain the association between periodontitis and atherosclerosis, but given the difficulty to design adequate human models and the high number of common risk factors, there is no conclusive scientific evidence.

The possible association between periodontitis and atherosclerosis may arise from a direct or an indirect pathogenic link (33,34). Although a direct link between periodontitis and atherosclerosis has not yet been established, some studies (20-31) have demonstrated the presence of some periodontal disease-associated bacteria in atheroma plaques. In addition, a direct pathogenic pathway has also been described, due to the increased systemic inflammatory mediators in response to periodontal bacterial attack, which could be responsible for the development of the atherosclerotic process (35). An indirect relationship between periodontitis and atherosclerosis has established since the two diseases share risk factor such as smoking, diabetes mellitus, lifestyle and lipids (33).

As stated before, several studies on patients undergoing endarterectomy (20-31) have detected Gram-negative periodontopathogens in atheroma plaques, but only a few of them (21, 23, 28, 29, 30, 31) have evaluated their simultaneous presence in the

atheroma and the periodontal pocket. Although some periodontopathogens have been detected in the two locations, the findings have not always provided substantial statistically significant evidence to demonstrate this association. In addition, several biomolecular diagnostic methods, with different threshold detection levels, have been used and none of the literature appears to have taken into account the role of common risk factors in the development of the two diseases.

This experimental study aimed (i) to assess the statistically significant detection of five putative periodontal pathogens (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Tannerella forsythia*) simultaneously in periodontal pockets and carotid atheromas, in order to support the direct pathogenic pathway between periodontitis and atherosclerosis, and (ii) to analyze the risk factors associated to atherosclerosis and/or periodontitis in the study population.

MATERIAL AND METHODS:

Patients and clinical samples:

Thirty-one patients between 51 and 83 years (mean age 73 years) with carotid stenosis requiring endarterectomy were enrolled in this study. Before surgery, a complete medical and periodontal exploration, including a total of 40 taxa, was conducted. Before taking subgingival samples, supragingival plaque was removed with sterile curettes. Subgingival samples were obtained by inserting a sterile paper point for 10 seconds into the deepest periodontal pocket of each quadrant. A total of four paper points samples were obtained from each patient and were placed together in a sterile test tube and frozen at -70°C until microbiological analysis.

After vascular surgery, the atheromatous plaques were divided in two portions in sterilized conditions. One portion was sent directly to the anatomopathological laboratory for histological analysis and the second portion was frozen at -70°C until microbiological analysis.

The study protocol was authorized by the Ethics Committee of the Hospital General de l'Hospitalet de Llobregat (Barcelona, Spain), and was conducted in accordance with the Helsinki Declaration. All patients provided written informed consent.

Subgingival bacterial identification:

DNA from subgingival samples was isolated in boiling water (10 min, 95°C) (36), quantified and tested with human X chromosome specific-primers. Once the integrity of the extracted DNA was tested, approximately 175 ng of genomic DNA was added to the standard PCR mixture in a volume of 50 µl. A 20 pb sequence of the 16S ribosomal DNA of the five selected periodontopathogens (*A.a*, *P.g*, *F.n*, *T.f* and *P.i*) was amplified using primers described by Ashimoto *et al* (37). The amplification was performed for 27 cycles with an annealing temperature of 61°C (for *T.f* and *A.a*) or 64°C (for *P.g*, *F.n* and *P.i*). The threshold sensitivity of the PCR system was x10 cells/µl sample. Positive (pure culture) and negative controls (PCR mixture without DNA) for each PCR were included.

Carotid atheroma bacterial identification:

A phenol-chloroform method (38) was used for atheroma DNA purification. Due to the low bacterial load expected, nested PCR was used to enhance the bacterial threshold level detection for the five periodontopathogens described above. "Nested PCR" is a procedure that involves two sets of primers used in two successive runs. The second set is intended to amplify a secondary target within the first run product (39). The first PCR run was achieved as described above for the subgingival bacterial identification. For the second PCR run, 10 µl of the first PCR DNA product were added to a total volume of 50 µl. Internal primer sequences of nearly 20 bp were obtained from GenBank and designed using BLAST (NCBI) and MyRDP (Table 1). The annealing temperature was first calculated with NetPrimer. Then, the final optimal PCR conditions were experimentally determined for each target bacteria. The second amplification was performed for 30 cycles with an annealing temperature of 50°C (*T. forsythia*) or 55°C (for the other target bacteria). An internal standard was used to semi-quantify the sensibility level of the nested PCR system, which detected ~ 3000 cells/mg of tissue. Positive and negative controls for each PCR were included.

Histological analysis of atheroma plaques:

The atheroma samples were immersed in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. The number of fields (x400) infiltrated with inflammatory cells and cells counts/field was analyzed. The local inflammatory infiltrate was considered "acute" when >50% of the total inflammatory cells were PMN neutrophils, and "chronic" when predominant cells (>50%) were lymphocytes (40).

Statistical analysis:

Frequency analysis was used to evaluate the prevalence of detection of each periodontalpathogen in periodontal pockets and atheroma plaques, and the simultaneous detection of each bacterium in the two locations.

Path analysis was applied in order to evaluate the statistical significance of the association between the simultaneous detection in atheroma and periodontal pockets, as well as their correlation between medical taxa analyzed (*pvalue* <0.1). The statistical significance obtained in the path analysis allowed us to measure the strength of association between the two compared variables. (41).

RESULTS:

Analysis of study subjects and clinical data:

Table 2 shows the mean values of the registered medical, periodontal and histological data, including the health condition values. All patients (n=31; 11 women and 20 men, mean age 73 years) had a low socioeconomical level and a sedentary lifestyle (low frequency and intensity of activity); 32.25% of patients had never smoked, 51.61% were ex-smokers and 16.14% were smokers (>10 cig/day). The mean Body Mass Index (BMI) in women was 30.42 (ranging between 24.89 and 35.1) and in men 28.09 (ranging between 21.45 and 35.43), suggesting that our female study population was chiefly obese. In addition, 79.31% of the total population suffered from *diabetes mellitus* and 86.2% from arterial hypertension.

All dentate subjects were affected by generalized chronic periodontitis and presented at least 6 sites with ≥ 6 mm pocket depth. Thirteen patients received periodontal treatment one year prior to our exploration. Most of the population brushed their teeth once a day (80.5%) and only 9.67% practiced interproximal hygiene. The mean gingival bleeding index (BI) (42) was 60.33% (ranging between 7.14% and 100%) (normal values $\leq 20\%$).

The mean glucose, triglycerides, HDL and LDL cholesterol serum values measured 7.23, 2.06, 1.17 and 2.91 mmol/L respectively. Fibrinogen serum values were 2.99g/L. Leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils serum mean cell counts were 8.86, 5.75, 2.16, 0.69, 0.21 and 0.037 cells x 10^9 /L respectively.

The histological analysis confirmed that all atheroma plaques presented crystallized cholesterol deposits. The mean area of the atheroma samples measured 120.54mm² and the mean inflammatory infiltrated area 1.99mm². The most frequent local inflammatory pattern in atheromatous plaques was “acute” (74.18%), where PMN lymphocytes were most prevalent. Conversely, frequency of the chronic inflammatory pattern,

characterized by leucocytic predominance, was lower (25.8%) (Figure 1a and 1b shows an example of each local inflammatory pattern).

Analysis of amplified 16S rDNA in subgingival and atheroma plaques:

All subgingival and atheroma samples were positive in the PCR assays in at least one of the five target periodontal pathogens. The microbiological analysis of subgingival samples revealed *F. nucleatum* as the most frequent bacterium in periodontal pockets (90.32%), followed by *T. forsythia* (83.87%) and *P. gingivalis* (64.51%). *A. actinomycetemcomitans* and *P. intermedia* were also detected in periodontal pockets, although less frequently (6.45% and 3.22% respectively) (Fig.2). The results of nested PCR assays from the atheroma samples showed a high presence of *A. actinomycetemcomitans* (80.64%), *P. gingivalis* (70.96%), *T. forsythia* (51.61%) and *F. nucleatum* (61.29%). *P. intermedia* was also detected in atheroma plaques but in a lower percentage (22.58%) (Fig.3).

A frequency analysis was used to evaluate the associations between bacteria in periodontal pockets and atheromas. Figure 4 shows the frequency of simultaneous detection of periodontopathogens in the atheroma and periodontal pockets. *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *F. nucleatum* showed a close association between their concomitant detection in the two locations. We detected *P. gingivalis* in atheroma and periodontal pockets in 15 of the 22 cases that were positive in the atheroma (48.39%); *T. forsythia* in 12 of 16 (38.71%); and *F. nucleatum* in 16 of 19 (51.61%). A link was also established between the absence of *P. intermedia* and *A. actinomycetemcomitans* in the periodontal pocket and atheroma in 23 out of 24 (74.19%) and 6 out of 6 (19.34%) cases respectively. The path analysis showed that detection of 16S rDNA of *T. forsythia* and *F. nucleatum* in carotid atheroma plaque samples significantly correlated with the colonization of these organisms in subgingival sites (p -value <0.1). While the frequency of simultaneous detection for *P. gingivalis* was higher than that of other bacteria analyzed, results were not statistically significant.

Path analysis for periodontopathogens in atheroma showed a close association between increased serum glucose levels (>6.1 mmol/L) and tryglicerides (>1.7 mmol/L) and the presence of *P. intermedia* (p -value <0.1), *T. forsythia* and *F. nucleatum* in atheroma. Increased lymphocytes and BI values shared a close relationship

with the presence of the five target periodontopathogens in atheroma (*p-value* <0.1). Table 3 shows a schematic view of the path analysis.

Discussion:

The American Academy of Periodontology and the American Academy of Cardiology have claimed there is sufficient scientific evidence (33) to consider that periodontitis can influence the development of cardiovascular diseases. However, the association remains controversial, because the two diseases share common risk factors (i.e. smoking, diabetes mellitus, BMI, lifestyle, sex, age, etc.) that might act as “*confounding factors*”. For ethical and methodological motives, it is difficult to control the confounding factors and to justify the level of association between the two diseases. Given this limitation, the present study aimed to ascertain the direct and indirect link between periodontitis and atherosclerosis.

Comparison of studies

As demonstrated in several studies (39, 43, 37, 44) conventional and nested PCR technique are valid molecular methods for detecting bacteria. Although the PCR system provides high detection sensitivity, we were unable to detect periodontopathogens on the atheroma plaques by conventional PCR amplification (*data not shown*). These negative findings could be explained by the low bacterial load contained in the atheroma samples and by the amount of bacteria that are lost in the extraction process. Possibly, this might also explain why other authors have obtained negative results using the same method (21,28,29). Consequently, a nested PCR with a second set of internal primers of each bacterium was applied to the microbiological analysis of atheroma samples. With this molecular diagnostic method, we established a threshold level detection of ~3000 cell/mg tissue and were able to detect the five target periodontopathogens in atheroma plaques (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum*). Nested PCR has a low range of false positive and negative results due to the slight possibility that any of the unwanted PCR products (primer dimers, hairpins and alternative primer target sequences) contain binding sites for both the new primers (44).

Little literature (28-30) has reported the detection threshold diagnostic level, which could lead to false negative results and inaccurate conclusions. Our threshold detection level is similar to those obtained by other authors, allowing us to compare our findings

with those in the literature. Table 3 shows the published studies that have analyzed simultaneously the microbiota in periodontal pockets and atheroma plaques, in order to support a direct link between the two pathologies. Some studies have detected bacterial DNA only in subgingival samples using PCR as a diagnostic method.

A.a has been described as the most frequently detected bacteria in periodontal pockets, yet most studies corroborate the findings in this study, where *A.a* and *P.i* were the least frequent bacteria in periodontal pockets. These findings may possibly be due to the population characteristics, since *A.a* is most related to aggressive periodontitis and *P.i* to hormonal alterations.

Contrary to the results obtained in subgingival samples, atheroma plaques showed *A.a* as the most frequent bacterium, followed by *P.g*, *F.n*, *T.f* and *P.i*. This result partially differs from Zaremba *et al* (30) who found that *A.a* was the least frequent pathogen in atheroma. This apparent contradiction could be explained by the methodology used, and by the differences in the detection threshold sensibility.

Is there a direct link between atherosclerosis and periodontitis?

The direct link between atherosclerosis and periodontitis is reinforced by the simultaneous detection of periodontopathogens in two separated anatomical locations, namely, vascular endothelium and periodontal pocket; but also by the increased systemic inflammatory mediators in response to periodontal bacterial attack, which could be responsible for the vascular endothelial lesion.

In accordance with Ishihara *et al* (31), we detected a high percentage of patients (45%) with a simultaneous presence of *P. gingivalis* in periodontal pockets and atheroma plaques. Moreover, our results shows a high frequency of detection of *F.nucleatum* and *T.forsythia* in the periodontal pocket and the atheroma with a statistically significant relationship ($p < 0.1$). Only six previously published studies (21, 23, 28-31) have attempted to identify simultaneous presence of some periodontopathogens in subgingival and atheroma samples (see Table 4). As mentioned above, three studies (21, 28, 29) found no periodontopathogens in atheroma samples by conventional PCR amplification. Padilla *et al* (23) and Zaremba *et al* (30) only identified the simultaneous presence of some bacteria in subgingival plaque and atheroma, but with no statistical significance. More recent findings (31) demonstrated

the presence of *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* and *T.forsythia* in the two locations, but only *P. gingivalis* showed a statistically significant correlation.

Our results support the hypothesis that atheroma colonization is not only restricted to *P. gingivalis*, but also can be infected by other periodontopathogens. It should also be taken into account that a quantitative method of detection would be more likely to predict the origin and effect of the bacteria on the endothelial lesion. Moreover, given the higher proportions of *A.a*, *P.g* and *P.i* in atheroma, the oral cavity might act as a bacterial reservoir once the periodontopathogen has colonized the vascular endothelium.

Is there an indirect link between atherosclerosis and periodontitis?

The indirect link between atherosclerosis and periodontitis is based on the common risk factors that share the two diseases and the endothelial response to the inflammatory mediators produced by periodontal disease. The strong association between high serum glucose levels and *P.intermedia* in atheroma found in our study leads to the hypothesis that an environment rich in glucose might help the metabolism of this oral bacteria and their persistence in the vascular endothelium. The pathogenic mechanisms of *P. intermedia* are not fully understood, but several studies have demonstrated a bidirectional link between *diabetes mellitus* and gestational *diabetes mellitus* and periodontitis [13,14, 45-47). Thus, high glucose serum levels might influence the metabolism and pathogenic mechanism of some periodontopathogens. These metabolic changes may affect the microbiota and, above all, *P. intermedia* (48).

One further important finding of our study was the strong relationship between elevated lymphocytes serum levels and high BI with the detection of the five target periodontopathogens in atheroma. This link was not demonstrated with other acute phase cells, such as neutrophils. These results concur with Zaremba *et al* (30), who observed higher BI in patients with bacteria in atheroma and no differences in neutrophils. Furthermore, the acute inflammatory pattern was most prevalent in the atheroma biopsies, suggesting a local active inflammatory process in the atheroma plaques. On the basis of our findings, we support the hypothesis that the persistence of a chronic inflammation produced by a non controlled periodontitis might have a negative effect on the intravascular endothelium and the development of atherosclerosis due to the recurrent input of inflammatory biomarkers (49). Hence, no conclusion could be drawn and more research is needed to confirm our results.

Taken together, the present study does not explain the theory of bacterial spread to the blood, but it supports the hypothesis that periodontopathogens could enter the bloodstream and play a direct and indirect role in the progression of stenotic artery plaque lesions.

We hypothesize, in agreement with Epstein (50), that the bacterial load in subgingival periodontal pockets might act as a reservoir for the microbiological environment in the atheroma and might influence the development of atherosclerosis, and, particularly the load of *F. nucleatum*, *T. forsythia* and *P. gingivalis*. In addition, the predominant presence of *A. actinomycetemcomitans*, an anaerobic facultative pathogen, and the high frequency of *P. intermedia* in the atheroma, seems to be unrelated to the bacterial load in the subgingival pocket, but once they have colonized the vascular endothelium, these bacteria are able to remain there for a long time, perhaps aided by high serum glucose levels.

Although the evidence of the relationship between the microbiota of periodontal pockets and atheroma plaques, the role of each periodontal pathogen or group of periodontal pathogens in the development of the disease is unknown, so further studies are indeed needed in that field.

TABLES and FIGURES:

Table 1. Primers and annealing temperatures of analyzed periodontal bacteria.

Periodontal bacteria		Primer pairs (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Position (pb)	Source
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	INT	atgccaaactgacgttaa aaacccatctcgagttctcttc	61	478 -1034 (557)	a
	EXT	gtgcgaaagcg tggggagca cttcggatgtcaagagtagg	55	769 – 998 (230)	b
<i>P. gingivalis</i>	INT	aggcagctt gccatactg ctgtagcaactaccgatgt	64	729 -1132 (405)	a
	EXT	gcgtgggtatcaaacaggat gggttgcgctcgttatggca	55	732 – 1075 (344)	b
<i>P. intermedia</i>	INT	cgtggaccaagattcatcg atacgttgcgtgcactca	64	172 - 638 (575)	a
	EXT	ggatggggatgcgtctgatt agtccgccagttcgcgctgc	55	196 – 257 (62)	b
<i>F. nucleatum</i>	INT	gatgaacgctgacagaatgc tcacgtgcacacagaattgctg	64	27 - 400 (392)	a
	EXT	acgggtgagtaacgcgtaaa ccccttgggcccgatcacc	55	89 – 364 (276)	b
<i>T. forsythia</i>	INT	tacaggggaataaaatgagatacg acgtcatcccaaccttctc	61	404 -1149 (746)	b
	EXT	tgtatatttgcattgacc acagcttacgccggcagtc	50	428 - 1108 (681)	b

First column shows the five analyzed periodontal bacteria. Primer pairs are represented in the second column. Primers used in the first and the second PCR-run are expressed as INT and EXT respectively. Annealing temperatures for each PCR and bacteria are represented in third column; and position and weight of the amplified sequence is described in the fourth column. In the last column, “a” corresponds to primers described by Ashimoto *et al* (37); and “b” to primers designed by the authors

Table 2. Baseline clinical, periodontal and histological characteristics of the subject group ($n=31$).

General data	Mean & SD
Age (years)	73 \pm 7
Females (%)	31
Weight (Kg)	74 \pm 11
Body Mass Index (females)	30.42 \pm 5.5
Systolic pressure (mmHg)	156 \pm 20
Diastolic pressure (mmHg)	80 \pm 12
Diabetes mellitus (%)	79.31
Smoking	
Smokers and ex-smokers (%)	67.75
Smokers >10 years (%)	52
Smokers > 10 cigarettes/day (%)	52
Periodontal examination	
Mean Bleeding Index	60.33
Toothbrush once a day (%)	80.5
Interproximal hygiene (%)	9.67 \pm 0.3
Use of mouthwash (%)	36 \pm 1
Biochemistry	
Triglycerides (mmol/L)	2.06 \pm 1.3
Cholesterol (mmol/L)	5.38 \pm 1.1
HDL Cholesterol (mmol/L)	1.17 \pm 0.3
LDL Cholesterol (mmol/L)	2.91 \pm 0.6
Fibrinogen (g/L)	2.99 \pm 0.4
Leucocytes (cells $\times 10^9$ /L)	8.86 \pm 2.7
Neutrophils (cells $\times 10^9$ /L)	5.75 \pm 2.6
Lymphocytes (cells $\times 10^9$ /L)	2.16 \pm 0.7
Monocytes (cells $\times 10^9$ /L)	0.69 \pm 0.3
Eosynophils (cells $\times 10^9$ /L)	0.21 \pm 0.2
Basophiles (cells $\times 10^9$ /L)	0.04 \pm 0.01
Srm Glucose (mmol/L)	7.23 \pm 2.2
Histology	
Atheroma plaque length (mm)	15.41 \pm 4.5
Atheroma diameter (mm)	7.77 \pm 2.8
Inflammatory area (mm ²)	1.99 \pm 2.0
Atheromas with subacute inflammatory pattern (%)	54.83

SD, standard deviation

Table 3. Path analysis of data related to periodontopathogens detection in atheroma.

CLINICAL DATA	PERIODONTOPATHOGENS DEECETED IN ATHEROMA				
	<i>P.intermedia</i>	<i>P.gingivalis</i>	<i>T.forsythia</i>	<i>F.nucleatum</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Srm Glucose (> 6.1 mmol/L)	++	--	+	--	--
Tryglicerids (>1.7 mmol/L)	++	+	+	+	--
HDL Cholesterol (≤0.90 mmol/L)	++	++	++	++	+
Lymphocytes (> cells 4.5 x10 ⁹ /L)	++	++	++	++	++
BI (> 20%)	++	++	++	++	++
++ Positive association ($p < 0.1$), -- Negative association ($p < 0.1$), + Non statistically significant association Values in healthy conditions expressed in brackets.					

Table 4. Studies assessing simultaneous identification of periodontopathogens in atheroma plaques and periodontal pockets.

AUTHORS	Medical data	Periodontal data	Bacterial simultaneous detection in atheroma AND periodontal pocket	Method
Ishihara et al, 2004 (38)		<i>PD</i>	<i>P.g., A.a, T.f, C.r, T.d</i>	1
Cairo et al, 2004 (39)		<i>PD, Rx</i>		1
Padilla et al, 2006 (40)		<i>PD, Rx, BI</i>	<i>A.a</i>	2
Romano et al, 2007 (41)	<i>DM, HT, ECV, T</i>	<i>PD</i>		1
Aimetti et al, 2007 (42)			<i>A. a, P.g P.i T.d T.f</i>	1
Zaremba et al, 2007 (43)	<i>WCC</i>	<i>PD, BI</i>	<i>P.g, A.a, F.n, P.i, E.c, C.r, T.f, T.d</i>	3
Violant et al	<i>PD, BI, HTA, DM, ECV, TH, WCC and other 33 taxa</i>		<i>F.n, P.g, T.f, A.a, P.i,</i>	4

T.f: T. forsythia, P.g: P. gingivalis, A.a: A. actinomycetemcomitans, P.i: P. intermedia, F.n: F. nucleatum, T.d: T. denticola, C.r: C. rectus, E.c: E. corrodens, P.n: P. nigrescens

1: PCR, 2: Culture & PCR, 3: DNA hybridation, 4: nested PCR

PD: periodontal probing; Rx: radiography; BI: bleeding index; HT: arterial hypertension, ECV: past Cardiovascular disease; T: Tobacco; WCC: White Cell Count

Results demonstrating a statistically significant correlation in the two locations are expressed in bold

LEGENDS TO FIGURES:

Figure 1a-b. Histological images of atheromatous plaques with optical microscope (x400).

These images show an example of two local inflammatory patterns found in the histological analysis. The atheromatous tissue was immersed in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. Fig. 1.a shows an acute inflammatory pattern. PMN neutrophiles (PMN) are the most frequently observed cells in the study area. Fig. 1.b corresponds to a chronic inflammatory pattern. Lymphocytes (L) are the most frequent cells observed in the study area.

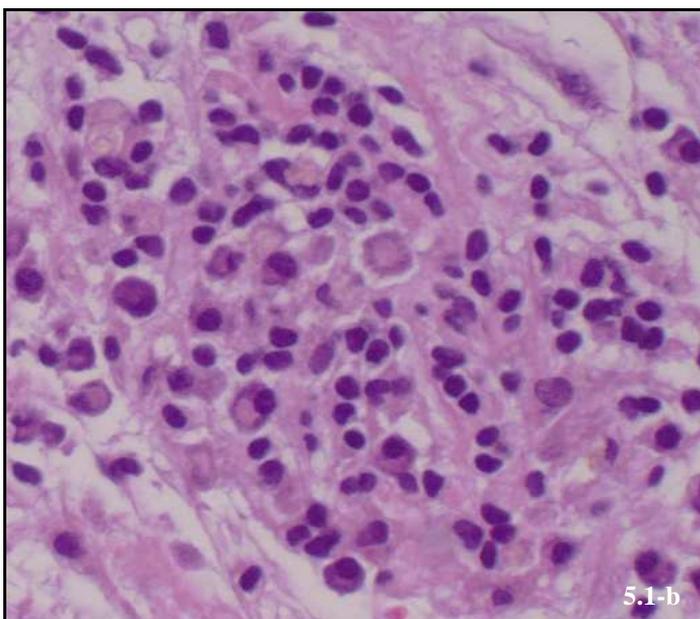
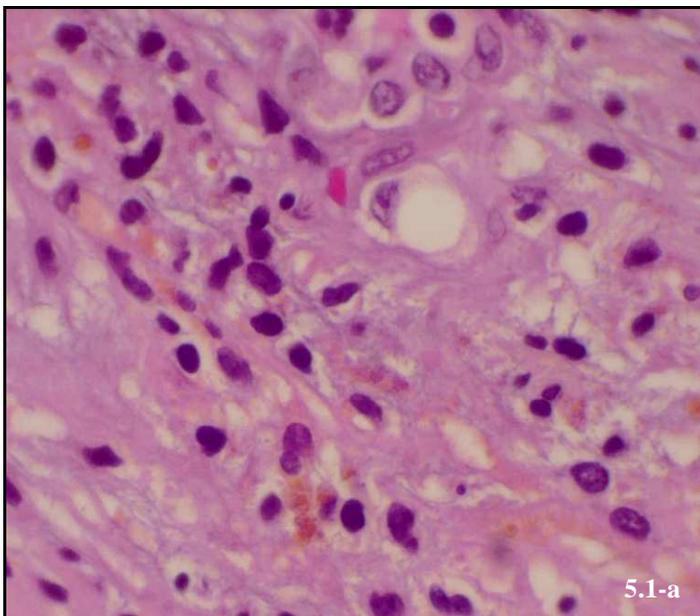


Figure 2. Frequency of patients with periodontopathoges in periodontal pockets.

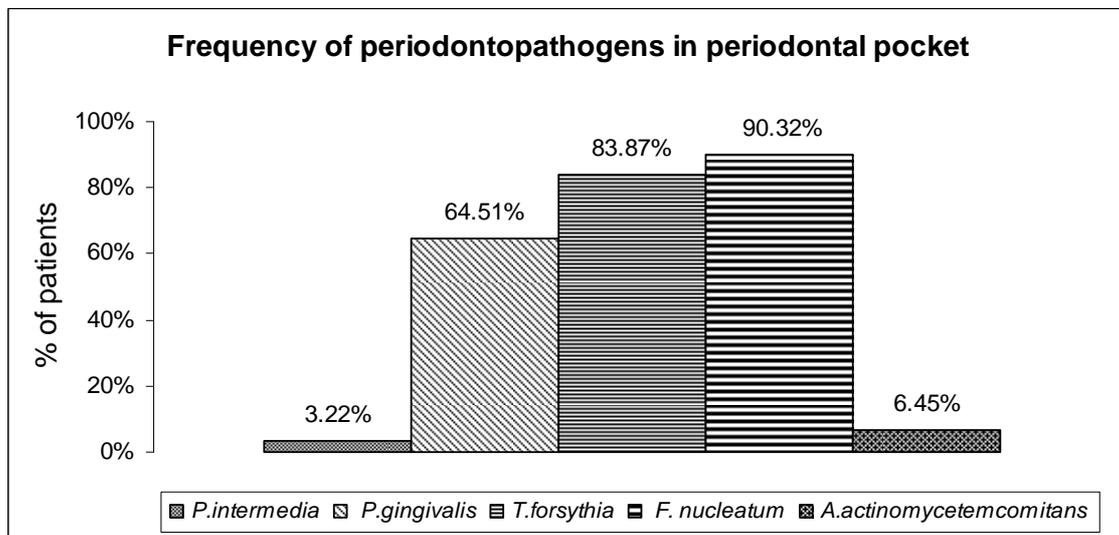


Figure 3. Frequency of patients with periodontopathoges in atheroma plaques.

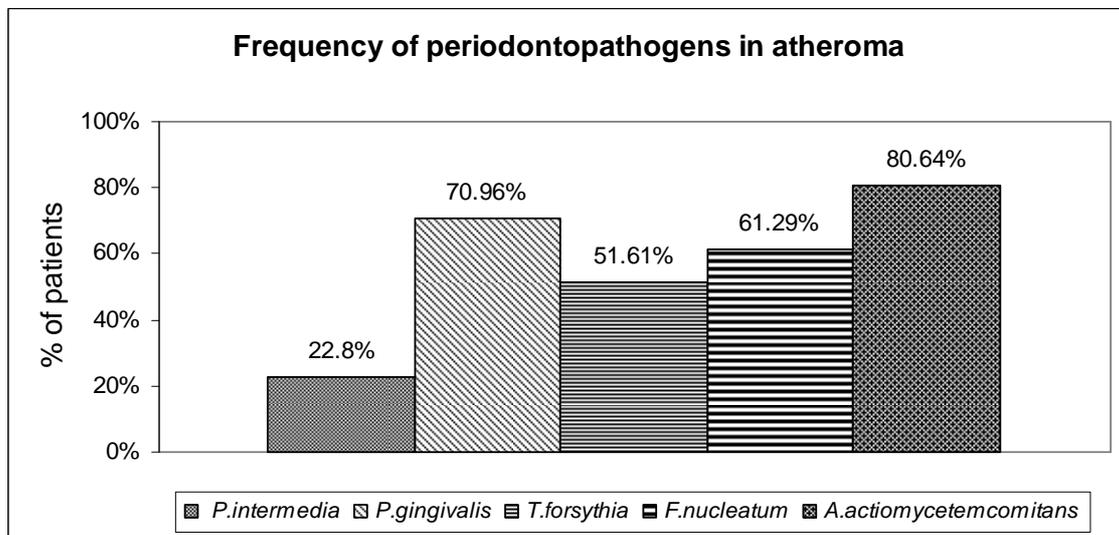


Figure 4. Frequency of simultaneous detection of periodontopathogens in both locations.

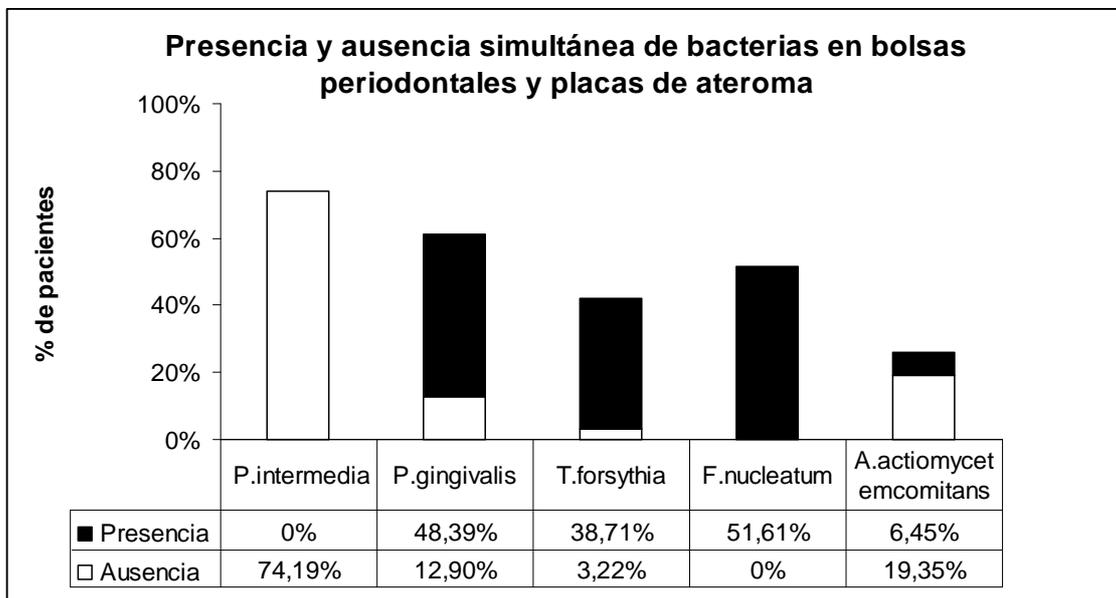
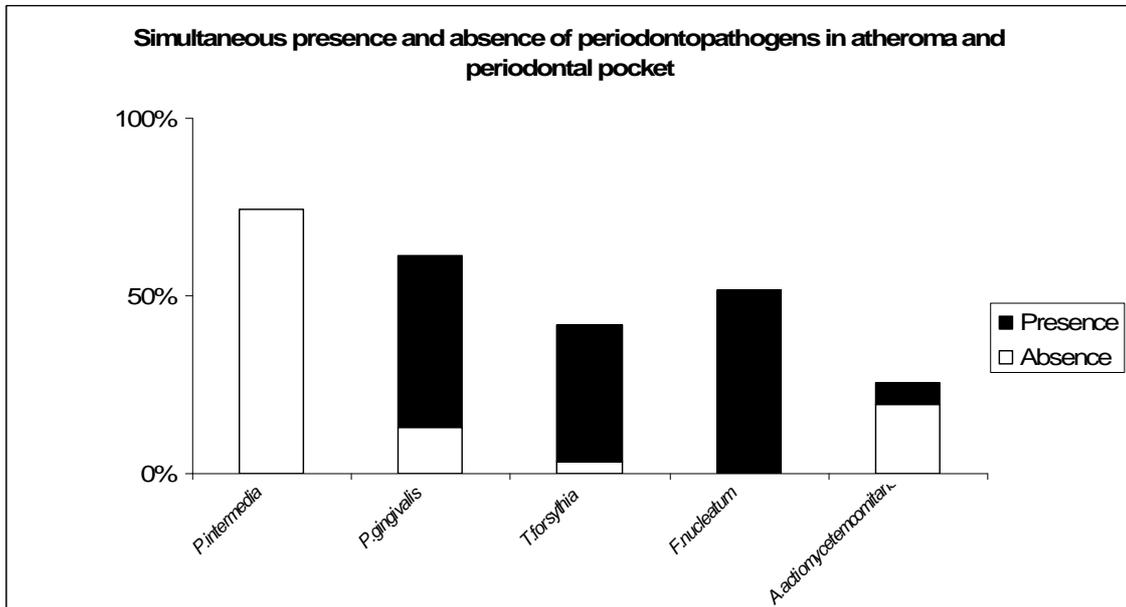
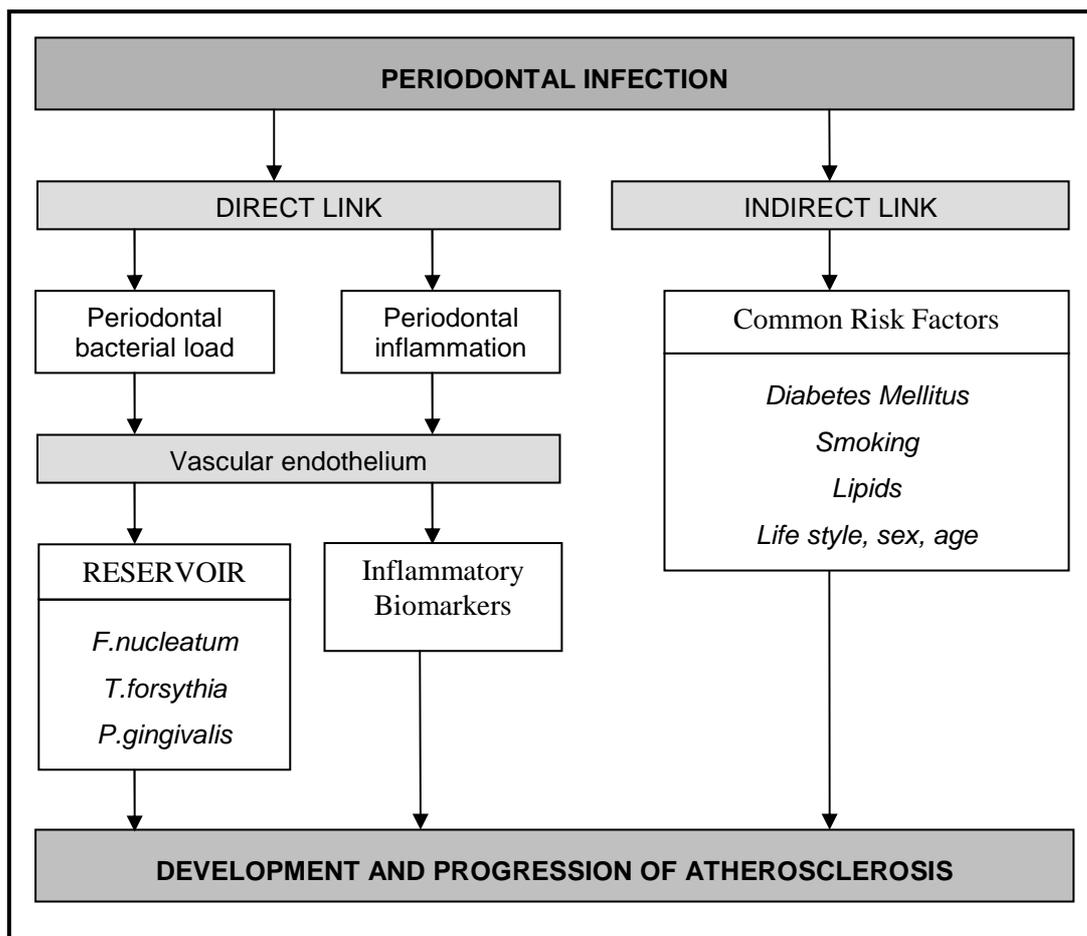


Figure 5 A proposed experimental model of pathogenic pathway of atherosclerosis and periodontitis

A high bacterial load in periodontal pocket aids directly to the development of atheroma plaque. Once these bacteria have colonized the vascular endothelium, inflammatory mediators are stimulated locally in the atheroma plaque. Otherwise, colonization of *F. nucleatum*, *T. Forsythia* and *P. gingivalis* in the atheroma plaque might act as a reservoir and have an important association with atherosclerosis. In addition, chronic periodontitis stimulates release of inflammatory mediators and atheroma development will be stimulated. Both mechanisms could help the development of atheromatous process directly. In addition, common risk factors link atherosclerosis and periodontitis through an indirect link and probably, high glucose serum levels might help *P. gingivalis* growth, once this bacteria have colonized atheroma plaque.



REFERENCES:

1. Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal disease in Europe. *Periodontol* 2000;29:104-21.
2. Irfan UM, Dawson DV, Bissada NF. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. *J Int Acad Periodontol* 2001;3(1):14-21.
3. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial aetiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63:322-31.
4. Amar S, Han X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. *Med Sci Monit* 2003;9(12):RA291-299.
5. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol and Infect* 2007;13(s4):3-10.
6. Madianos P, Offenbacher S, Beck J, Williams R (1999). The concept of “Risk” and the Emerging Discipline of periodontal Medicine. *J Contemp Dent Pract* 1:1-18.
7. D’Aiuto F, Ready D, Tonetti MS. Periodontal disease and C-reactive protein associated cardiovascular risk. *J Periodontol Res* 2004; 39:236-241.
8. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ and De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol* 2001;72(9):1221-1227.
9. Kinane DF. Periodontal disease’s contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms. *Ann Periodontol* 1998;3(1):142-50.
10. Mattila K, Asikainen S, Wolf J, Jousimies-Somer H, Valtonen V, Nieminen M. Age, dental infections, and coronary heart disease. *J Dent Res* 2000;79:756-60.
11. Emingil G, Buduneli E, Aliyev A, Akili A, Atilla G. Association between periodontal disease and acute myocardial infarction. *J Periodontol* 2000;71:1882-6.

12. Scannapieco FA, Wang B, Shiau HJ. Oral bacteria and respiratory infection: Effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell proinflammatory cytokine production. *Ann Periodontol* 2001;6:78-86.
13. Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG et al. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *J Periodontol* 1996;67:1085-1893.
14. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann WG, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, Nauck M, Kocher T. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2009 Sep;36(9):765-74.
15. Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS et al. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *JADA* 2001;132:875-880.
16. Cruz SS, Costa MD, Gomes-Filho IS, Rezende EJ, Barreto ML, Dos Santos CA, Vianna MI, Passos JS, Cerqueira EM. Contribution of periodontal disease in pregnant women as a risk factor for low birth weight. *Community Dent Oral Epidemiol* 2009 Aug 20. In press.
17. Cutler C, Schinedling E, Nunn M, Jotwani R, Kim B, Nares S et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol* 1999;70:1429-1434.
18. Goodson JM, Groppo D, Halem S, Carpino E. Is obesity an oral bacterial disease? *J Dent Res* 2009 Jun;88(6):519-23.
19. Weynat RJ, Pearlstein ME, Churak AP et al. The association between osteopenia and periodontal attachment loss in older women. *J Periodontol* 1999;70:982-991.
20. Meurman JH, Sanz M, Janket S. Oral Health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(6):403-13.
21. Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, Oggioni MR, Pratesi C, Pini Prato GP, Pozzi G. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. *J Periodont Res* 2004;39:442-446.

22. Fiehn NE, Larsen T, Christensen N, Holmstrup P, Schroeder T. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol* 2005;76:731-736.
23. Padilla C, Lobos O, Hubert E, González C, Matus S, Pereira M, Hasbun S, Descouvieres C. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2006;41:350-353.
24. Haraszthy V, Zambon J, Trevisan M, Genco R. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000 71:1554-1560.
25. Okuda K, Ishihara K, Nakagawa T, Hirayama A, Inayama Y, Okuda K. Detection of *T.denticola* in atherosclerotic lesions. *J Clin Microbiol* 2001;39:1114-1117.
26. Taylor-Robinson D, Aduse-Opoku J, Sayed P, Slaney JM, Thomas BJ, Curtis MA. Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* 2002;21:755-757.
27. Mastragelopolus N, Haraszthy VI, Zambon JJ, Zafiroopoulos GG. Detection of periodontal pathogenic microorganisms in atheromatous plaque. Preliminary results. *Chirurg* 2002;73:585-591.
28. Romano F, Barbui A, Aimetti M (2007) Periodontal pathogens in periodontal pockets and in carotid atheromatous plaques. *Minerva Stomatol* 56:169-179.
29. Aimetti M, Romano F, Nessi F (2007) Microbiological analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 78:1718-1723.
30. Zaremba M, Górska R, Suwalski P, Kowalski J (2007) Evaluation of the incidence of periodontitis -associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol*78:322-327.
31. Ishihara K, Nabuchi A, Ito R, Miyachi K, Kuramitsu HK, Okuda K (2004) Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in

carotid coronary stenotic artery plaques and in dental plaque samples. *J Clin Microbiol* 42:1313-1315.

32. World Health Organization. The world health report 2007: a safer future. Global Public Health Security in the first 21st Century. Geneva:WHO,2007:1.
33. Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, Offenbacher S, Ridker PM, Van Dyke TE, Roberts WC. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editor's Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Periodontol* 2009;80:1021-32.
34. Offenbacher S, Madianos P, Champagne C, Southerland J, Paquette D, Williams R et al. Periodontitis-atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. *J Periodont Res* 1999;34:146-52.
35. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandines in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000 1997;14:112-143.
36. Adserías MJ, Clotet J (2007) Detección molecular de periodontopatogenos [Tesis doctoral], Universitat Internacional de Catalunya.
37. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J (1996) Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11: 266-273.
38. Gaydos CH, Quinn Th. and Eiden JJ. Identification of Chlamydia pneumoniae by DNA Amplification of the 16S rRNA Gene. *J Clin Micro* 1992;30:796-800.
39. Roper C, Elhassan I, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, Satti G, Theander T and Arnot D. Detection of very low level Plasmodium falciparum infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:325-331.

40. Stevens A, Lowe J. Texto y Atlas de Anatomía patológica. ISBN: 84-8174-135-3. Spanish Ed.. Pg 52-57.
41. Shipley B (1999) Testing causal explanations in organismal biology: causation, correlation and structural equation modeling. *Oikos* 86: 374-382.
42. Loe H (1967) The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 38:610 (supplement).
43. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20 (suppl 2):S304-S307.
44. Hochreiter W, Duncan J and Schaeffer (2000). Evaluation of the bacterial flora of the prostate using a 16rRNA gene based polymerase chain reaction. *J Urol* 163:127-130.
45. Thorstensson H, Dahlén G, Hugoson A. Some suspected periodontopathogens and serum antibody response in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol* 1995;22:449-458.
46. Novak KF, Taylor GW, Dawson DR, Ferguson JE 2nd, Novak MJ. Periodontitis and gestacional diabetic mellitus: exploring the link in NHANES III. *J Public Health Dent* 2006;66:163-168.
47. Friedlander AH, Chaudhuri G, Altman L. A past medical history of gestacional diabetes: its medical significance and its dental implications. [Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod](#) 2007;103:157-163.
48. Bahrani-Mougeot FK, Thornhill M, Sasser H, Marriott I, Brennan MT, Papagerakis S, Coleman S, Fox PC, Lockhart PB. Systemic host immunoinflammatory response to dental extractions and periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(4):534-41.
49. Tonetti MS. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J Clin Periodontol* 2009;36:15-19.
50. Epstein SF. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course. *Circ Res* 2002;90:2-4.

“Relaciones clínicas, histológicas y microbiológicas
entre la aterosclerosis y la periodontitis crónica”

TESIS DOCTORAL
Opción a Mención Europea
Octubre 2009



UNIVERSITAT
INTERNACIONAL
DE CATALUNYA

Universitat Internacional de Catalunya

Facultad de Odontología

Doctoranda: Deborah Violant Holz (Dto. de Periodoncia)

Director: Dr. Josep Clotet Erra (Dto. de Ciencias Básicas)

Co-director: Dr. Antonio Santos (Dto. de Periodoncia)



HOSPITAL GENERAL
DE L'HOSPITALET

Hospital General de l'Hospitalet

Co-directores: Dr. Oriol Lapiedra (Unidad Cardiovascular)

AGRADECIMIENTOS

...todo empezó con una idea y con mucha ilusión para llevarla a cabo.

...pero pronto me dí cuenta que sin la ayuda de otras muchas personas, no hubiera sido posible realizar este trabajo de investigación. Por eso quiero dar las gracias...

Al Dr. Josep Clotet y al Dr. Oriol Lapiedra, por creer en el proyecto, por todo el tiempo que me habéis dedicado y por todo lo que me habéis enseñado.

Al Dr. Antonio Santos y al Dr. Camacho por vuestras aportaciones y sugerencias.

A mis padres, por la confianza, esperanza y el amor infinito que me habéis dado.

A mis hermanos y amigos, en especial a Iolanda, Claudia, Daniel, Florian, Jorge, Marta y Chus, simplemente por estar ahí, a mi lado.

A las "chicas de Labo", Esther, Patricia y Tania (alias "Paca"), por los cafés entre experimentos y por la compañía en el Laboratorio los sábados y domingos.

A todos vosotros, gracias.

Deborah Violant

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	35
1.1 Introducción	37
1.2 Justificación	39
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo general.....	45
2.2 Objetivos específicos	45
3. HIPÓTESIS.....	46
3.1 Hipótesis nula o de trabajo general	48
3.2 Hipótesis alternativa general	48
3.3 Hipótesis alternativas específicas	48
4. FUNDAMENTOS.....	50
4.1 Enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis.....	52
4.1.1 Generalidades.....	52
4.1.2 Datos epidemiológicos.....	52
4.1.3 Factores de riesgo.....	53
4.1.4 Factores de riesgo genéticos:	53
4.1.5 Factores de riesgo ambientales:	54
4.1.6 Proceso fisiopatológico de la aterosclerosis	55
4.2 Enfermedad periodontal.....	57
4.2.1 Generalidades y fisiopatología	57
4.2.2 Datos epidemiológicos	58
4.3 Relación entre la periodontitis y la aterosclerosis.....	58
4.3.1 Vía directa	59
4.3.2 Vía indirecta	58
4.3.3 Estudios en humanos que han analizado la presencia de periodontopatógenos únicamente en placas de ateroma.....	62
4.3.4 Estudios en humanos que han analizado la presencia de periodontopatógenos en placas de ateroma y bolsas periodontales.....	64
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
5.1 Recogida de datos y muestras clínicas	69
5.2 Criterios de inclusión y exclusión	75

5.3 Elección de las bacterias de estudio	75
5.4 Identificación bacteriana de las muestras subgingivales	- 76 -
5.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa. Generalidades.....	- 76 -
5.4.2 Reactivos para la PCR	- 77 -
5.4.3 Fases de la PCR convencional.....	- 77 -
5.4.4 Doble PCR o nested PCR. Generalidades	- 79 -
5.4.5 Procesamiento de las muestras subgingivales y placas de ateroma	- 81 -
5.5 Identificación bacteriana de las placas de ateroma	- 84 -
5.5.1Diseño de los cebadores internos.....	- 86 -
5.5.2 Determinación de estabilidad del cebador y temperaturas de <i>annealing</i>	- 86 -
5.6 Análisis histopatológico de las placas de ateroma.....	- 87 -
5.7 Análisis estadístico.....	- 89 -
6. RESULTADOS	- 92 -
6.1 Análisis de la población de estudio	- 94 -
6.2 Análisis histopatológico de las placas de ateroma.....	- 96 -
6.3 Análisis del rDNA 16S amplificado de las muestras subgingivales y las placas de ateroma:	- 98 -
7. DISCUSIÓN.....	108
8. CONCLUSIONES.....	122
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
10. ANEXOS.....	90
Anexo 1: Carta de aprobación del CEIC de referencia	
Anexo 2: Hoja de información para el paciente	
Anexo 3: Consentimiento Informado	
Anexo 4: Hoja de recogida de datos médicos y periodontales	
Anexo 5: Periodontograma	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A.a: Aggregatibacter actinomycetemcomitans
ACV: accidentes cerebrovasculares
APA: Asociación Americana de Periodoncia
AT: aterosclerosis
BI: *Bleeding Index*/ índice de sangrado
CI: cardiopatía isquémica
CRP: Proteína C Reactiva
DNA: ácido desoxirribonucleico
ECV: enfermedades cardiovasculares
EXT: cebador externo
F.n: Fusobacterium nucleatum
HGH: Hospital General de l'Hospitalet
HLD: *High Density Lipid* / lipoproteínas de alta densidad
hs-CRP: Proteína C Reactiva de alta sensibilidad
IAM: infarto agudo de miocárdio
IL: interleuquina
IMC: Índice de Masa Corporal
INT: cebador interno
LDL: *Low Density Lipid* / lipoproteínas de baja densidad
LPS: lipopolisacáridos
MyRDP: My Ribosomal Database Project
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
OMS: Organización Mundial de la Salud
oxi-LDL: lipoproteínas oxidadas de baja densidad
P.g: Porphyromonas gingivalis
P.i: Prevotella intermedia
pb: pares de bases
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF: factores de crecimiento de plaquetas
PMN: polimorfonucleados
RNA: Ácido Ribonucleico
T.f: Tannerella forsythia
TEA: tromboendarterectomía
TNF: *Tumor Necrosis Factor* / Factor de Necrosis Tumoral
UIC: Universitat Internacional de Catalunya
VLDL: *Very Low Density Lipid* / lipoproteínas de muy baja densidad

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La periodontitis crónica es una enfermedad inflamatoria oral de alta prevalencia entre la población mundial adulta (1, 2). Está causada por la acumulación subgingival de determinadas especies bacterianas, predominantemente Gram negativas anaerobias. La patogénesis de esta enfermedad se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos periodontales de soporte del diente, lo cual puede llegar a conducir a la pérdida dental, en caso de no ser instaurada una terapia periodontal adecuada. Además de la etiología primaria de naturaleza infecciosa de la periodontitis, existen una serie de factores agravantes o secundarios que pueden influir negativamente en la progresión y respuesta al tratamiento de la enfermedad periodontal, como pueden ser el tabaco o la *diabetes mellitus*, entre otros.

Varias revisiones exhaustivas de la literatura (3-5) exponen estudios clínicos y epidemiológicos que han sugerido que las infecciones crónicas, como sería en el caso de la periodontitis crónica del adulto (según la última clasificación de la Asociación Americana de Periodoncia (6)), pueden desempeñar un papel determinante en el desarrollo de ciertas enfermedades sistémicas. Tanto es así, que la enfermedad periodontal ha sido asociada como factor de riesgo a ciertas enfermedades cardiovasculares (ECV) (7-11), respiratorias (12), *diabetes mellitus* (13, 14) nacimientos prematuros y de bajo peso (15, 16), hiperlipidemia (17, 18), artritis y osteoporosis (19). Es decir, que la presencia de una periodontitis puede tener un efecto negativo sobre la evolución de una enfermedad sistémica de base instaurada.

Centrándonos en las ECV, el último informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2007 (1) presenta a este grupo de patologías como responsables del 30% de las muertes de la población mundial adulta, situándolas como la principal causa de muerte en países desarrollados y tercera en los países en vías de desarrollo.

Las ECV engloban una gran variedad de alteraciones cardíacas y circulatorias, tanto del sistema arterial como venoso (20). De todas ellas, la cardiopatía isquémica (CI) es la patología más interesante para nosotros, debido a su posible relación con la

enfermedad periodontal, ya que el proceso fisiopatológico de esta alteración vascular incluye la presencia de una inflamación crónica de bajo grado, como sería la producida por la periodontitis crónica (9, 11, 20, 21). En más del 90% de los casos de CI, la aterosclerosis (AT) es la responsable de la obstrucción de las arterias coronarias (20), por lo que podría considerarse a la AT como el principal factor etiológico de la CI.

La AT es una enfermedad crónica que afecta a las arterias de mediano y gran calibre, produciendo su progresivo estrechamiento debido a la acumulación de depósitos lipídicos y al engrosamiento de la capa íntima vascular (endotelio) en respuesta a la inflamación crónica (22). Cuando la AT afecta a las arterias coronarias, puede llegar a haber una irrigación deficiente del corazón, facilitando así la aparición de la angina de pecho e infarto de miocardio (20, 22). El desarrollo de la AT puede deberse a distintos factores de riesgo genéticos y ambientales, como la edad, el sexo y la dieta, entre otros. Además, algunos estudios (23-25) han demostrado que ciertas infecciones virales y bacterianas pueden contribuir al desarrollo de eventos tromboembólicos en individuos susceptibles, y por este motivo se ha apuntado hacia una posible relación inflamación-infección como factor predisponente frente a la aterosclerosis.

En la literatura científica se han planteado diversas hipótesis que pueden dar una explicación a la relación que existe entre la periodontitis y la evolución desfavorable de la AT, pero hasta la fecha no existe una evidencia científica que dé una respuesta satisfactoria a este fenómeno. El último Consenso de la Academia Americana de Periodoncia y la Academia Americana de Cardiología (26) establece que hay suficiente evidencia científica para asegurar una relación entre ambas patologías, pero no para explicar los mecanismos fisiopatológicos responsables de dichas asociaciones. Ambas patologías podrían estar relacionadas a través de una "vía directa" debido al efecto sistémico producido por la liberación de mediadores inflamatorios en respuesta a la infección periodontal o como respuesta al ataque bacteriano o sus productos metabólicos sobre el endotelio vascular; o bien a través de una "vía indirecta" debido a que ambas patologías comparten factores de riesgo como el tabaco o la *diabetes mellitus* (27). Para poder demostrar una asociación entre ambas patologías a través de una vía indirecta, los estudios deberían poder controlar todos los factores de riesgo que comparten ambas patologías; por otro lado, la detección de patógenos de origen periodontal en placas de ateroma reforzaría la hipótesis de una relación directa.

Varios estudios (28-36) han querido demostrar una relación directa entre periodontitis y aterosclerosis mediante la detección de bacterias periodontopatógenas en las placas de ateroma. Para ello, se han aplicado técnicas de laboratorio tan diversas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cultivos bacterianos, seroinmunología e hibridación de DNA-DNA, llegándose a conclusiones muy diversas. Sin embargo, sólo algunos de los estudios publicados (33, 34, 36) han analizado la detección simultánea de algunas bacterias periodontopatógenas en las bolsas periodontales y las placas de ateroma, no obteniendo en todos los casos resultados positivos y/o estadísticamente significativos.

1.2 Justificación

Debido a la gran prevalencia de la aterosclerosis y de la enfermedad periodontal en nuestra sociedad y a la gran inversión económica que debe hacer el Sistema Sanitario en el tratamiento de las enfermedades crónicas y de las discapacidades que de ellas se derivan, es conveniente realizar estudios que ayuden a confirmar las posibles relaciones entre ambas patologías. Además, hay que tener en cuenta que si hubiera una relación entre ambas patologías, la terapia de elección sería combinada y se deberían dar las recomendaciones al respecto a nuestros pacientes.

Hasta la fecha, se han realizado algunos estudios para establecer posibles relaciones directas e indirectas entre la aterosclerosis y la enfermedad periodontal, pero la disparidad de los resultados obtenidos no permite, por el momento, poder establecer una evidencia científica sobre dichas relaciones. Las diferencias en los resultados se deben principalmente a que:

- la mayoría de los estudios publicados dentro de esta línea de investigación no especifican la sensibilidad de detección bacteriana en las placas de ateroma. Este dato debe ser considerado para poder justificar posibles resultados falsos negativos obtenidos en estudios publicados previamente.
- Las poblaciones de estudio tienen gran variabilidad geográfica, diferentes grupos de edad, diferente tamaño muestral y diferentes

métodos diagnósticos de la periodontitis. Estas diferencias pueden dar lugar a conclusiones diferentes entre los estudios publicados.

- Muchos de los estudios publicados no presentan resultados estadísticamente significativos y, debido a variaciones metodológicas, los resultados no son concluyentes.
- En la mayoría de estudios, únicamente se tiene en cuenta la detección bacteriana en las placas de ateroma, y sólo algunos tienen como objetivo la detección bacteriana simultánea en las bolsas periodontales y las placas de ateroma. Además hay que añadir que muy pocos estudios han recogido datos médicos y periodontales de la población de estudios, los cuales podrían reforzar la asociación a través de una vía indirecta.
- Los métodos diagnósticos moleculares y los resultados obtenidos en la literatura previa son variables y presentan contradicciones.
- Ninguno de los estudios encontrados en la literatura que tenga como objeto el análisis de las relaciones entre la aterosclerosis y la periodontitis, bien sea a través de una vía directa o indirecta, tiene en cuenta el análisis inflamatorio local de la placa de ateroma mediante histologías.

Por razones éticas, es difícil elaborar diseños de estudio longitudinales prospectivos de caso control que nos permitan demostrar relaciones de causalidad entre ambas patologías. Sin embargo, el diseño de este trabajo permite reforzar las relaciones directas e indirectas establecidas entre la periodontitis y la aterosclerosis en una población del Sur de Europa, teniendo en cuenta las limitaciones y contradicciones de los estudios publicados anteriormente.

En el Trabajo de Suficiencia Investigadora, defendido en la Universitat Internacional de Catalunya (UIC) (St.Cugat del Vallès-Barcelona, España) el día 12 de Junio de 2008 y realizado por el mismo grupo de investigación que la presente Tesis Doctoral, se presentó la metodología de extracción y amplificación de ADN genómico a partir de biopsias de placas de ateroma de arterias carotídeas humanas mediante una variación de la PCR convencional, la doble PCR o *nested* PCR. Esta técnica, a pesar de estar descrita ya en la literatura, no se había utilizado con anterioridad en estudios de

identificación de patógenos periodontales en placas de ateroma. Es una técnica muy útil cuando se sospecha que la carga bacteriana de una muestra es muy baja, debido a su alto nivel de sensibilidad de detección. Se validó el método mediante el diseño de cebadores específicos para las cinco bacterias de estudio (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Tannerella forsythia*) y se comprobó la eficacia y sensibilidad del sistema de la *nested* PCR a partir de cultivos bacterianos puros.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las discrepancias en la metodología empleada y los resultados obtenidos en los estudios publicados previamente al inicio de este trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

2.1 Objetivo general

Determinar en una población del Sur de Europa si existen nuevas relaciones clínicas, microbiológicas e histológicas que refuercen la hipótesis de asociación entre la aterosclerosis y la periodontitis crónica a través de una vía directa y/o indirecta.

2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un método diagnóstico molecular válido para el análisis microbiológico de muestras con baja carga bacteriana y establecer la sensibilidad mínima de detección del sistema, con el objetivo de disminuir posibles resultados falsos negativos.

- Reforzar la hipótesis de relación directa entre la aterosclerosis y la periodontitis, mediante la detección de patógenos periodontales en la cavidad oral y en las placas de ateroma de los mismos pacientes, teniendo en cuenta la significancia estadística ($pvalor \geq 0.1$).

- Reforzar la hipótesis de relación indirecta entre la aterosclerosis y la periodontitis crónica, analizando el nivel de asociación entre los factores de riesgo de ambas patologías y teniendo en cuenta la significancia estadística ($pvalor \geq 0.1$).

- Comparar los resultados obtenidos en nuestra población de estudio con los obtenidos en otras localizaciones geográficas.

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis nula o de trabajo general

No existen nuevas asociaciones entre la aterosclerosis y la periodontitis crónica a través de una vía directa ni indirecta.

3.2 Hipótesis alternativa general

Existen nuevas asociaciones entre la aterosclerosis y la periodontitis crónica, a través de una vía directa, indirecta o ambas.

3.3 Hipótesis alternativas específicas

- Nuestro sistema de PCR (*nested* PCR) es un método válido para la detección de patógenos periodontales en placas de ateroma y es capaz de establecer un nivel mínimo de detección bacteriana.
- Existen nuevas relaciones directas estadísticamente significativas entre la periodontitis y la aterosclerosis.
- Existen nuevas relaciones indirectas estadísticamente significativas entre la periodontitis y la aterosclerosis.
- Existen diferencias en nuestra población de estudio respecto a otras localizaciones geográficas.

4. FUNDAMENTOS

4.1 Enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis

4.1.1 Generalidades

Los infartos de miocardio y los accidentes cerebrovasculares son enfermedades vasculares agudas debidas, principalmente, a la formación de depósitos de grasa o “placas de ateroma” en las paredes internas de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón y el cerebro (37). El estrechamiento progresivo de la luz vascular a lo largo de la vida hará disminuir el aporte de oxígeno hacia los órganos vitales, produciendo secuelas irreversibles o incluso la muerte.

La aterosclerosis (AT) se debe a cambios en la pared interna (o endotelio) de las arterias, resultado de la acción crónica de determinados factores de riesgo genéticos y ambientales, como la edad, el sexo, el tabaquismo, la hipertensión arterial, la falta de actividad física, la *diabetes mellitus* y la dislipemia (20). Pueden transcurrir varios años hasta que los trastornos metabólicos que contribuyen a la formación de la placa de ateroma lleguen a dar sintomatología clínica. Sin embargo, la presencia prolongada de los factores de riesgo hace que la formación aterosclerótica crezca y adquiera una estructura propicia a la inestabilidad, dando como último resultado la muerte súbita o el infarto cardíaco o cerebral (20, 38, 39).

4.1.2 Datos epidemiológicos

Según la OMS (1), las ECV son actualmente la principal causa de muerte en el mundo. Se calcula que en el año 2007 murieron 17.5 millones de personas por esta causa, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas a nivel mundial; 7.6 millones de esas muertes se debieron a la cardiopatía coronaria y 5.7 a los AVC. La CI es una de las principales causas de muerte a partir de los 40 años en hombres y de los 64 años en mujeres (40). Se presenta en 4:1000 hombres de 35 a 44 años y la prevalencia aumenta progresivamente hasta alcanzar una proporción de 20:1000 de 55 a 64 años (40), causando el 70% de los fallecimientos a partir de los 75 años.

Aunque en las últimas décadas ha habido un descenso del 4.5% de la mortalidad cardiovascular, gracias a un mayor control de algunos de los factores de riesgo, se calcula que en el año 2015 morirán cerca de 20 millones de personas por ECV debido al aumento progresivo de la obesidad (1, 20).

4.1.3 Factores de riesgo

Según la literatura publicada, los factores de riesgo descritos para las ECV son válidos también para la aterosclerosis (26) y se dividen en dos grupos: los factores de riesgo genéticos y los ambientales (20, 40). Dentro de los factores de riesgo genéticos destaca el aumento de algunos mediadores de la inflamación, como las citoquinas, el fibrinógeno y la proteína C reactiva (CRP). Los factores de riesgo ambientales que ejercen un papel más importante son la presencia de *diabetes mellitus*, la hipercolesterolemia y obesidad, el hábito tabáquico y la hipertensión arterial.

A continuación se detalla cómo estos factores de riesgo afectan en la instauración y progresión de la aterosclerosis:

- **Factores de riesgo genéticos:**

La presencia de ciertos marcadores genéticos confiere un alto nivel de probabilidad de sufrir una determinada enfermedad. La búsqueda de factores genéticos que predispongan a la aterosclerosis no está bien definida, ya que el efecto de un polimorfismo está asociado, en la mayoría de los casos, a la presencia de factores ambientales, lo cual hace que haya una gran heterogeneidad en las poblaciones estudiadas y que no se pueda llegar a conclusiones convincentes por el momento (20). Sin embargo, existen evidencias clínicas y experimentales (41-45) que han demostrado el papel que juega la inflamación tanto en la instauración como en la progresión de la placa de ateroma. Los resultados de estos estudios aportan claramente el concepto de que la inflamación está involucrada en todas y cada una de las etapas y

procesos de la evolución de la AT. Por otra parte, la inflamación y la coagulación sanguínea son reacciones en cadena en las que intervienen un gran número de proteínas, algunas de las cuales interactúan entre sí, formando un nexo entre ambos procesos que hacen que sean interdependientes (43). Las células endoteliales pueden ser estimuladas por citoquinas liberadas durante un proceso inflamatorio, como la IL-1, IL-6 y el TNF- α (20). Tanto estas células estimuladas, como las células inflamatorias activadas, pueden producir sustancias procoagulantes. A su vez, la trombina generada durante la coagulación puede estimular la inflamación (20). Por tanto, se puede producir un círculo vicioso en el que la inflamación estimula la coagulación y viceversa. Además, el fibrinógeno y la CRP son marcadores de la inflamación que pueden predecir sucesos cardiovasculares y están asociados, en mayor o menor medida, a la progresión aterotrombótica subclínica (41).

Además, hay que tener en cuenta que algunas enfermedades metabólicas de origen genético también influyen en la aterosclerosis. La hipercolesterolemia familiar afecta a la progresión de la aterosclerosis (46, 47) debido a la activación del marcador selectina-P y de la CRP de alta sensibilidad (*hs-CRP*). Otro ejemplo es la *diabetes mellitus* tipo I, donde las alteraciones metabólicas inducen una alteración vascular que predispone a esta población de pacientes a sufrir aterosclerosis (48). El papel aterogénico lo llevan a cabo los productos avanzados de la glicación, capaces de oxidar las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y causar cambios en el colágeno de la capa íntima de las arterias. Esto hace que aumente la adhesividad celular a la pared vascular, lo que promueve la inflamación y la agregación plaquetaria.

- **Factores de riesgo ambientales:**

En el caso de las dietas hipercolesterolémicas, la formación y crecimiento de la placa ateromatosa se debe a la acumulación de lípidos en la pared vascular. Los niveles elevados de lipoproteínas oxidadas de baja densidad (oxi-LDL) muestran mayores concentraciones plasmáticas de factor

tisular (20). El hábito tabáquico también ejerce un efecto negativo sobre la evolución de la aterosclerosis, ya que los productos tóxicos del tabaco alteran las funciones antitrombóticas y fibrinolíticas de la sangre y de la pared vascular, promueven la agregación plaquetaria y vasoconstricción e inhiben la síntesis de óxido nítrico (20). Además, los tóxicos derivados del tabaco, aumentan los niveles de fibrinógeno, influyendo en la viscosidad de la sangre y la hemostasis, predisponiendo todas estas alteraciones a la aterosclerosis (48).

La hipertensión arterial tiene numerosas causas, pero una vez instaurada, produce alteraciones hemoreológicas, anomalías en la función plaquetaria, coagulación, fibrinólisis y alteración en el endotelio vascular (49). Estas alteraciones pueden conducir al desarrollo y progresión de la placa ateromatosa.

Los factores de riesgo ambientales (dieta malsana, inactividad física y consumo de tabaco) son responsables de aproximadamente un 80% de los casos de aterosclerosis (20). Sin embargo, se ha observado a través de estudios epidemiológicos, que existe un subgrupo de la población que, aun no teniendo factores de riesgo conocidos, padecen aterosclerosis (20, 37). La existencia de este grupo poblacional libre de factores de riesgo clásicamente asociados con la aterosclerosis es lo que ha impulsado a la realización de este trabajo, con el objetivo de poder dar una explicación de las causas etiopatogénicas de este subgrupo poblacional.

4.1.4 Proceso fisiopatológico de la aterosclerosis

Según la progresión de la placa aterosclerótica, se distinguen cuatro fases de la enfermedad (44): estría adiposa, placa aterosclerótica, placa fibrosa y lesión complicada.

La disfunción endotelial es el origen de la enfermedad aterosclerótica y se produce como consecuencia de la acción de algunos de los factores de riesgo sobre el

endotelio, alterando la hemostasis vascular y generando una respuesta inflamatoria con la consecuente expresión de moléculas de adhesión, citoquinas y factores quimiotácticos que promueven la migración de leucocitos hacia el espacio subendotelial (20,44).

Las LDL (*Low Density Lipid*) y VLDL (*Very Low Density Lipid*) son las principales lipoproteínas transportadoras de colesterol en lesiones ateromatosas y su oxidación y glucosilación promueven el fenómeno aterosclerótico mediante complejos mecanismos inflamatorios e inmunológicos, que incluyen la formación de CRP (50-52). Los monocitos son reclutados por las moléculas de adhesión en la superficie endotelial y una vez en la íntima se transforman en macrófagos, listos para unirse por endocitosis a las lipoproteínas oxidadas y transformarse en células espumosas, las cuales conforman la *estría adiposa*. Las células espumosas incluidas en la estría adiposa secretan moléculas quimioatrayentes de monocitos, además de factores de crecimiento de plaquetas (PDGF), que estimulan la migración, el crecimiento miocítico y la distrofia extracelular, así como la liberación de sustancias prooxidantes que oxidan aún más las LDL. Los factores de crecimiento y citoquinas que liberan las células espumosas, estimulan la migración de células musculares lisas desde la capa media hacia la íntima, las cuales producen fibras de colágeno que posteriormente cubrirán la estría adiposa para conformar la *placa fibrosa*, la cual tiende a sufrir una calcificación distrófica. Una vez establecida la placa fibrosa, ya se empieza a producir oclusión de la luz vascular, por lo que pueden aparecer manifestaciones clínicas isquémicas o no, dependiendo del establecimiento de una circulación colateral al vaso afectado y de la aparición de situaciones hiperdemandantes del paciente.

Las placas fibrosas más avanzadas, denominadas “lesiones complicadas”, muestran degeneración fibrocalcificada con lípidos intra y extracelulares, calcio, tejido fibroso, desechos necróticos y sangre extravasa (38). La inestabilidad de la placa de ateroma está determinada por la probabilidad de sufrir eventos tales como: calcificación, debilitamiento fisura o rotura de la pared, hemorragia, ulceración y trombosis; pero factores sistémicos tales como infección, inflamación, autoinmunidad o influencia genética también son importantes (38, 39, 53).

Otros elementos interesantes asociados a la inestabilidad y progresión de la placa ateromatosa son los factores inflamatorios e infecciosos (54, 55). Marcadores inflamatorios sistémicos como la CRP y la IL-6 han sido asociados a futuros eventos cardiovasculares (56). De hecho, la elevación de la CRP está definitivamente asociada

con la disfunción endotelial y progresión de la AT, sensibilizando a las células endoteliales a su destrucción por las células citotóxicas CD4+ (41). Es en este punto donde la periodontitis podría jugar un papel determinante en la evolución de la placa ateromatosa.

4.2 Enfermedad periodontal

4.2.1 Generalidades y fisiopatología

La etiología primaria de la enfermedad periodontal son las bacterias y, más específicamente, las bacterias anaerobias Gram negativas (57). La cavidad oral puede llegar a albergar más de setecientas especies bacterianas (58) que se agrupan formando “complejos bacterianos” o “*clusters*” (59) por sucesión bacteriana en función de la maduración de la placa bacteriana.

Las comunidades bacterianas están adheridas a superficies orgánicas e inorgánicas y comunicadas entre sí por canales de agua que permiten el intercambio de metabolitos y señales (60). A esta estructura organizada de los complejos bacterianos se le conoce como “*biofilm* bacteriano”. Los *biofilms* confieren a las diferentes comunidades bacterianas mayor resistencia a los antibióticos y antisépticos y les permiten adaptarse a los pequeños cambios del ecosistema, protegiéndolas ante otras especies competidoras y contra mecanismos de defensa del huésped (60).

Clínicamente, la presencia de bacterias periodontopatógenas y sus productos de deshecho estimulan la secreción de mediadores de la inflamación, iniciándose así una respuesta inflamatoria que se manifiesta con edema, enrojecimiento y hemorragia al sondaje. Las reacciones de defensa del huésped pueden llegar a dañar el tejido conectivo e inducir una reabsorción ósea, característica propia de la periodontitis (61).

4.2.2 Datos epidemiológicos

La enfermedad periodontal, junto con la caries, es la enfermedad más prevalente en el ser humano, afectando a un porcentaje elevado tanto de la población adulta como joven (2, 62).

En Europa un 37% de la población presenta sondajes entre 4 y 5mm y un 14% presenta sondajes >5mm (2). En España aproximadamente el 45% de los jóvenes menores de 15 años presenta algún signo de enfermedad periodontal, siendo mayoritariamente gingivitis. El 25% de los adultos jóvenes presenta periodontitis en alguno de sus diferentes grados y el 11% presenta gingivitis. En los adultos, las proporciones de gingivitis y periodontitis aumentan hasta el 44% (63).

4.3 Relación entre la periodontitis y la aterosclerosis

Se cree que hay dos procesos principales por los que la enfermedad periodontal y la aterosclerosis puedan estar relacionadas. Uno es por el efecto local de los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) sobre el endotelio vascular, los cuales aumentan en última instancia los niveles de fibrinógeno y mediadores inflamatorios; lo cual afecta negativamente a la evolución de la aterosclerosis (9, 65-68); y el otro, debido a que ambas patologías comparten factores de riesgo que pueden actuar de manera sinérgica sobre la evolución de la aterosclerosis. El primer proceso recibe el nombre de “*vía directa*” y el segundo de “*vía indirecta*”.

4.3.1 Vía indirecta

Tanto la periodontitis como la aterosclerosis son enfermedades inflamatorias crónicas multifactoriales y, además, comparten factores de riesgo como la edad, el sexo, el hábito tabáquico, la *diabetes mellitus* (mal controlada) y la dieta, por lo que podrían coexistir como un complejo o síndrome (11, 21, 64).

4.3.2 Vía directa

El grupo de Nieminen (11) sugiere que la asociación entre la periodontitis y la CI podría deberse al efecto de las bacterias sobre las células que participan en la patogenia de la AT y trombosis arterial. Estas bacterias o sus endotoxinas, como los LPS, pueden alterar la integridad del endotelio vascular, producir una hiperplasia de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos mayores, pudiendo cursar con una degeneración grasa de la misma y favorecer la liberación de citoquinas como la IL-1, IL-6 y el TNF- α y de CRP. Estos mediadores inflamatorios pueden favorecer el desarrollo y la evolución de la aterosclerosis (9), así como producir la coagulación intravascular debido a que alteran la función plaquetaria, la coagulación sanguínea y el metabolismo de los lípidos, facilitando así la hiperlipidemia (69).

Además, hay que remarcar que algunos marcadores sistémicos de la inflamación, como la CRP, niveles aumentados de leucocitos, fibrinógeno, moléculas de adhesión celular y citoquinas proinflamatorias, son predictores de las ECV (41, 70). La mayor parte de la destrucción ósea observada en la periodontitis es causada por mediadores inflamatorios del huésped (IL-1, TNF- α) en respuesta al ataque bacteriano y sus metabolitos (57, 61). De esta manera, se cree que el aumento de citoquinas proinflamatorias encontrado en sangre inducido por la periodontitis podría jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedades y condiciones sistémicas.

En la Figura 4.1 se puede observar de manera esquemática cómo se relaciona de manera directa e indirecta la enfermedad periodontal con distintas enfermedades y condiciones sistémicas.

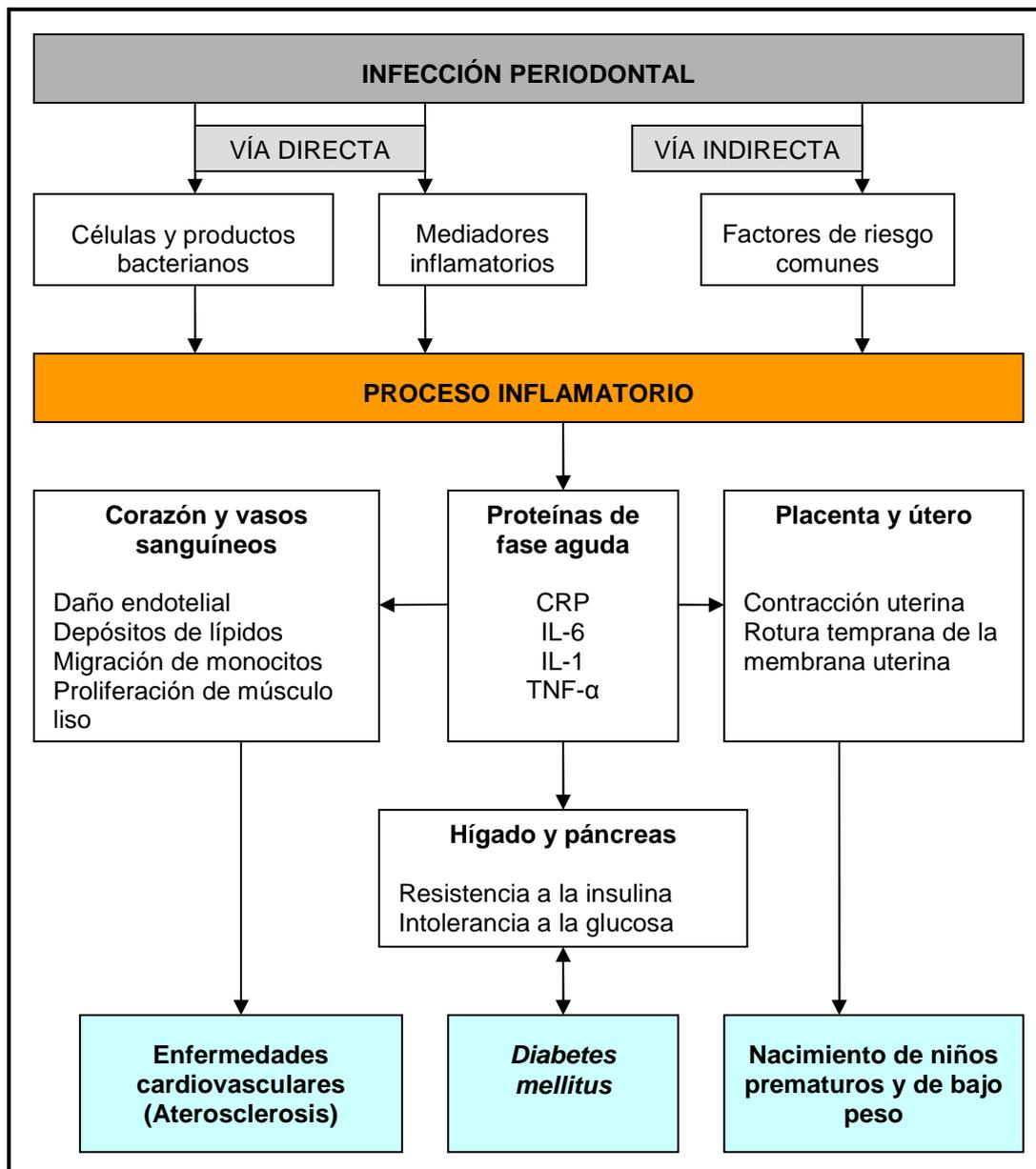


Figura 4.1 Efecto de la enfermedad periodontal sobre algunos órganos y enfermedades sistémicas (27).

La presencia de una infección periodontal crónica puede afectar a otros órganos a distancia a través de una vía directa (células bacterianas y productos bacterianos) o indirecta (mediadores de la inflamación). Las bacterias y sus productos metabólicos, así como la respuesta inflamatoria local en respuesta a la infección periodontal desencadenan un proceso inflamatorio sistémico que afectará negativamente en la evolución de otras patologías sistémicas instauradas.

La literatura (10, 11, 23, 71) muestra que hay suficiente evidencia científica para relacionar la enfermedad periodontal con las ECV, pero sin embargo, otros autores (8, 9) afirman que no existen suficientes estudios controlados para constatar que las enfermedades sistémicas y la CI, excepto la endocarditis bacteriana, estén relacionados con la periodontitis; y, que si la hubiera, ésta sería muy leve. Hay que tener en cuenta que en todo estudio clínico, en el cual se pretenda evaluar el efecto causal que tiene una variable sobre una determinada enfermedad, es necesario controlar todos los factores de riesgo. La enfermedad periodontal y las ECV comparten muchos factores de riesgo que pueden sesgar los resultados de los estudios y originar falsas relaciones de causalidad.

Desde el establecimiento de una asociación fuerte entre *Cl. pneumoniae* y moderada entre *Helicobacter pylori* y las ECV (72-74), y debido a la detección de periodontopatógenos en las placas de ateroma de pacientes intervenidos quirúrgicamente de tromboendarterectomía, se ha incrementado el interés por investigar la relación entre la aterosclerosis y diversas patologías infecciosas como desencadenantes de la misma. Se ha demostrado que para que un agente infeccioso desempeñe un papel aterogénico, se requiere la presencia de una infección activa crónica de bajo grado (75).

Saikku y cols, (74) encontraron asociación entre IAM y presencia de anticuerpos contra *Cl. pneumoniae*. Desde entonces, se han realizado diferentes estudios clínicos, microbiológicos, epidemiológicos e *in vitro*, con modelos animales y en humanos para aclarar las asociaciones entre las ECV y las infecciones.

Entre las infecciones crónicas que se han relacionado con un mayor riesgo de ECV se encuentran las producidas por *Citomegalovirus*, *H.pylori* y *Cl.pneumoniae* (72, 74). La asociación entre *Cl.pneumoniae* y ECV es muy fuerte y es sobre la que se han llevado a cabo más estudios, no siendo tan clara esta asociación con *H.pylori* y *Citomegalovirus* (76). La asociación entre bacterias periodontopatógenas aún no está clara (75, 76) debido a la dificultad de los diseños de estudio para ajustar los factores de riesgo comunes de ambas patologías. En la Tabla 4.1 se puede ver de manera esquemática el grado de evidencia científica, basándose en los criterios de causalidad de Bradford Hill (77), entre la asociación de diversos agentes infecciosos y la ECV.

Grado de asociación entre agentes infecciosos y las ECV					
Agente Infeccioso	Evidencia epidemiológica	Evidencia patológica	Plausibilidad Biológica	Evidencia en animales	Evidencia Clínica
<i>Ch. pneumoniae</i>					
<i>Citomegalovirus</i>					
<i>H. pylori</i>					
Periodopatógenos					
evidencia científica fuerte		evidencia científica moderada		evidencia científica insuficiente	

Tabla 4.1 Grado de asociación entre diferentes agentes infecciosos y la enfermedad cardiovascular (76).

Existe suficiente evidencia científica para establecer una asociación causal entre Chlamydia pneumoniae y las ECV. En el caso de Citomegalovirus y las infecciones periodontales la asociación con las ECV es moderada y se requieren más estudios clínicos para confirmar las relaciones causales. Helicobacter pylori guarda una relación causal débil y se requieren más estudios tanto in vitro como clínicos.

La detección del microorganismo o de sus antígenos o del ácido nucleico en la placa de ateroma es otro método para establecer una asociación entre dos entidades, pero sin que necesariamente sea ésta una relación de causalidad (78), aunque, desafortunadamente, los métodos utilizados para los estudios microbiológicos de la AT no distinguen si la infección está activa o no. En este sentido, se han realizado varios estudios para analizar la asociación entre la aterosclerosis y la periodontitis, los cuales se detallan a continuación:

4.3.3 Estudios en humanos que han analizado la presencia de periodontopatógenos únicamente en placas de ateroma

Okuda y cols (2001) (29) examinaron 26 lesiones ateroscleróticas y 14 arterias aorta de cadáveres. Mediante PCR detectaron *T.denticola* en el 23.1% de las placas de ateroma y la bacteria no fue detectada en ninguna de las arterias sanas.

Haraszthy y cols (2000) (28) analizaron 50 placas de ateroma mediante la técnica de PCR. Mediante un kit de extracción de ADN obtuvieron entre 30 y 100ng de material genético de cada biopsia y utilizaron cebadores específicos para la detección de *A.a*, *T.f*, *P.g* y *P.i*. A pesar de que no se detallan los resultados de las placas ateromatosas, comentan que la mayoría de las muestras contenían depósitos adiposos circunferenciales y centros calcificados. El 44% de las placas fue positivo para al menos uno de los cuatro periodontopatógenos analizados, siendo *T.f* el más frecuente (30%).

Mastragelopolus y cols (2002) (31) detectaron en 34 placas de ateroma la presencia de *P.g*, *P.i*, *A.a* y *T.f* mediante la técnica de PCR e hibridación de ADN de las muestras positivas. El 59% de los especímenes fue positivo para al menos una bacteria mediante PCR y el 32.4% fue positivo mediante hibridación de ADN.

Taylor-Robinson y cols (2002) (31) identificaron *A.a* y *P.i*, pero no *T.d*, *P.g* ni *T.f* y Stelzel y cols (2002) (32) detectaron *P.g*, pero no *A.a* en placas de ateroma.

Fiehn y cols (2005) (35) analizaron 72 placas de ateroma femorales. Realizaron un cultivo de la muestra y posteriormente amplificaron el ADN bacteriano mediante PCR para la detección de *P.g*, *P.i*, *P.n*, *C.r*, *A.a*, *T.f* y streptococci. Ninguna de las placas analizadas fue positiva en el cultivo, indicando que no se pudieron aislar especies bacterianas viables, sin embargo se pudo detectar ADN de *P.n*, *P.i* y *P.g* mediante PCR.

Cabe destacar que estos estudios sugieren una relación entre la aterosclerosis y la periodontitis, pero no se pueden establecer conclusiones fiables debido a que no se ha analizado la detección simultánea de los patógenos periodontales en las bolsas subgingivales y las placas de ateroma. A partir de las limitaciones que presentaban estos diseños experimentales, los estudios que se realizaron posteriormente tuvieron en cuenta la detección simultánea de patógenos periodontales en ambas localizaciones.

4.3.4 Estudios que han analizado la presencia de periodontopatógenos en placas de ateroma y bolsas periodontales en humanos

El presente trabajo se inició en el año 2006, por lo que cabe destacar que previamente al inicio de este trabajo únicamente se recogen en la literatura tres estudios diseñados para establecer posibles relaciones entre la aterosclerosis y la periodontitis, los cuales se resumen a continuación:

Cairo y cols (2004) (34) analizaron 40 placas de ateroma carotídeas de 12 pacientes 19 dentados y 21 edéntulos para detectar mediante la técnica de PCR *A.a*, *F.n*, *P.g*, *P.i* y *T.f*. En la placa subgingival (n=19) la bacteria más frecuente fue *T.f* (79%), seguida de *F.n* (63%), *P.i* (53%), *P.g* (37%) y *A.a* (5%). Mediante la técnica empleada, no detectaron ninguna de las bacterias en las placas de ateroma.

Ishihara y cols (2004) (33) analizaron las placas de ateroma de 51 pacientes intervenidos quirúrgicamente. A estos pacientes se les realizó un exploración periodontal 1 semana previa a la cirugía de TEA carotídea. Detectaron *P.gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *T. denticola* y *C. rectus* en el 21.6, 23.3, 5.9, 23.5, y 15.7% de las placas de ateroma, respectivamente. Los porcentajes de detección de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *T. denticola* fueron 41.2, 64.7, y 37.3%, respectivamente. La detección simultánea de *P.g* se dio en 91% de los pacientes, en el caso de *A.a* se dio en el 16.6%, *T.f* en 66.6%, *T.d* en el 70% y *C.r* en 80% de los pacientes.

Padilla y cols (2006) (36) analizaron la placa subgingival y las placas de ateroma de 12 pacientes con periodontitis crónica. Primero cultivaron las muestras y posteriormente las analizaron mediante técnica de PCR para la detección *A.a*, *P.g*, *T.f*, *P.i*. En nueve muestras subgingivales se observó una asociación entre dos o tres especies bacterianas (*P.g*, *A.a* y *T.f*), siendo *P.g* la bacteria más frecuente. En dos placas de ateroma se llegó a detectar *A.a*.

Debido al escaso número de estudios publicados que tengan en cuenta la detección simultánea de bacterias periodontales en placas de ateroma y bolsas subgingivales y que los resultados no muestran conclusiones claras, se hizo patente la necesidad de realizar un estudio que aportara mayor evidencia a las posibles relaciones entre la aterosclerosis y la periodontitis, teniendo en cuenta objetos de análisis que no se habían tenido en cuenta en trabajos publicados anteriormente, como el establecimiento de la sensibilidad de detección mínima del sistema de diagnóstico molecular y el análisis detallado de la población de estudio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Recogida de datos y muestras clínicas

Este trabajo ha sido realizado en la Facultad de Odontología de la Universitat Internacional de Catalunya (UIC) (Departamento de Ciencias Básicas y Departamento de Periodoncia) y en colaboración con el Hospital General de l'Hospitalet (Unidad Cardiovascular y Unidad de Anatomía Patológica). Fue aprobado y autorizado por el Comité de Ética de Investigaciones Clínicas del Hospital General de l'Hospitalet (HGH) y fue realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki (79) (Ver Anexo 1).

La coordinación de los diferentes Departamentos fue de suma importancia para garantizar la recogida, transporte y almacenaje de las muestras en las mejores condiciones. Tras una serie de reuniones y una prueba piloto, se estableció un protocolo de recogida y almacenaje de datos y muestras clínicas.

Todas las intervenciones quirúrgicas de TEA carotídea tenían lugar por la mañana y durante la semana laboral. Cada vez que se programaba un paciente para ser intervenido, el Jefe de Servicio de la Unidad de Cirugía Cardiovascular del HGH se ponía en contacto vía correo electrónico con la responsable del estudio e informaba al paciente de manera oral de la existencia del estudio (Ver Anexo 2). Un día antes de la intervención, la responsable del estudio acudía al hospital e informaba al paciente de manera oral y escrita de las características del estudio. Si el paciente aceptaba su participación voluntaria en el estudio, procedía a firmar el Consentimiento Informado (Ver Anexo 3).

Una vez el paciente hubo firmado el Consentimiento Informado, se procedía a rellenar un cuestionario de salud general específicamente diseñado para este estudio. En este cuestionario se recogían datos de variables propias de la enfermedad periodontal, de la enfermedad cardiovascular y de los factores comunes entre ambas enfermedades (Ver anexo 4). Además estos datos eran completados con los resultados de la última analítica de sangre realizada al paciente antes de la intervención. A continuación se expone el listado de variables médicas y bioquímicas recogidas:

Variables médicas y de salud general:

1. Edad
2. Sexo
3. Nivel Socioeconómico
4. Índice de masa corporal
5. Frecuencia de la actividad física
6. Intensidad de la actividad física
7. cantidad de cigarrillos al día
8. duración del hábito
9. Antecedentes de ECV
10. *Diabetes mellitas*
11. Otras enfermedades sistémicas
12. Tensión arterial sistólica
13. Tensión arterial diastólica
14. Medicación

Variables bioquímicas a partir del hemograma:

15. Glucosa en suero mmol/L
16. Triglicéridos mmol/L
17. Colesterol HDL mmol/L
18. Colesterol LDL mmol/L
19. Fibrinógeno g/L
20. Leucocitos cél $\times 10^9/L$
21. Neutrófilos cél $\times 10^9/L$
22. Linfocitos cél $\times 10^9/L$
23. Monocitos cél $\times 10^9/L$
24. Eosinófilos cél $\times 10^9/L$
25. Basófilos cél $\times 10^9/L$

Posteriormente se procedía a la exploración oral y periodontal del paciente y se registraban los datos en un periodontograma (Ver Anexo 5). El diagnóstico periodontal se realizó siguiendo la clasificación recomendada por la Academia Americana de Periodoncia (APA, 1999) (6). Se consideraba que un paciente era fumador cuando fumaba >10 cigarrillos/día. A continuación se muestran las variables periodontales y de salud oral recogidas en los pacientes de estudio.

Variables periodontales y de salud oral:

26. Periodontograma completo
27. Extensión de la enfermedad periodontal
28. Severidad de la enfermedad periodontal
29. Última visita al odontólogo
30. Último tratamiento periodontal
31. Índice de sangrado gingival
32. Hábitos de higiene oral

Una vez realizado el diagnóstico periodontal, se elegían las bolsas periodontales para recoger una muestra representativa de placa bacteriana subgingival. De cada paciente se escogían cuatro bolsas periodontales, siendo cada una de ellas la bolsa más profunda de cada cuadrante. Antes de tomar las muestras subgingivales, se eliminaba la placa bacteriana supragingival con curetas. La placa bacteriana subgingival se obtuvo insertando puntas estériles de papel del nº 30 durante 10 segundos en la bolsa periodontal más profunda de cada cuadrante. Posteriormente se guardaban las cuatro puntas en un tubo estéril de plástico y se transportaban al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la UIC, donde se almacenaban a -70°C hasta su análisis microbiológico. En la Figura 5.1 se puede observar la toma de una muestra de placa subgingival con puntas de papel



Figura 5.1. Toma de una muestra de placa subgingival con puntas de papel.

Una vez se habían escogido las bolsas periodontales candidatas para recoger la muestra subgingival, se realizaba un aislamiento relativo del diente mediante un rollo de algodón y se insertaba un punta de papel estéril con unas pinzas estériles. Se dejaba de punta durante 10 seg y posteriormente se insertaba en un tubo de plástico estéril herméticamente cerrado. (Aunque en la imagen se observan dos puntas de papel dentro de la bolsa periodontal, en el estudio se introdujo una).

Durante la intervención quirúrgica y bajo condiciones de esterilidad, se dividía la placa de ateroma en dos partes (parte "A" y "B") y se introducía cada parte en un tubo falcon estéril debidamente etiquetado (nombre, apellidos, nº de historia del paciente y fecha de la intervención).

Mediante un sistema de transporte interno del Hospital se enviaba en 3 minutos una de las partes de la placa de ateroma al Laboratorio de Anatomía Patológica para su posterior análisis histológico y la otra parte se almacenaba a -20°C en el HGH durante un plazo máximo de 1 mes hasta su transporte al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la UIC, donde se almacenaba a -70°C hasta su análisis microbiológico. El transporte desde el HGH hasta la UIC se realizaba en una cámara de frío con nieve carbónica precintada en un tiempo máximo de 90 minutos.

A continuación se expone el listado de variables recogidas a partir de las histologías de las placas de ateroma:

Variables histológicas:

33. Longitud de la biopsia
34. Diámetro de la biopsia
35. Área de la biopsia
36. Área de la inflamación
37. N° de focos inflamatorios (x40 aumentos)
38. N° de campos de cada foco inflamatorio (x400 aumentos)
39. Tipo de inflamación (x400 aumentos)
40. Depósitos de calcio calcificados

Material necesario para la recogida, transporte y almacenaje de cada muestra:

- 1 bisturí estéril
- 2 tubos falcon estériles debidamente etiquetados
- 2 tubos de caucho (para el transporte interno de las muestras desde el quirófano hasta los Laboratorios)
- Congelador -20°C (HGH)
- Contenedor aislante
- 2 placas de frío a -70°C / nieve carbónica
- Congelador -70°C (UIC)

En la Figura 5.2 puede observarse de manera esquemática el protocolo de recogida de datos y almacenamiento de las muestras hasta su análisis microbiológico e histológico.

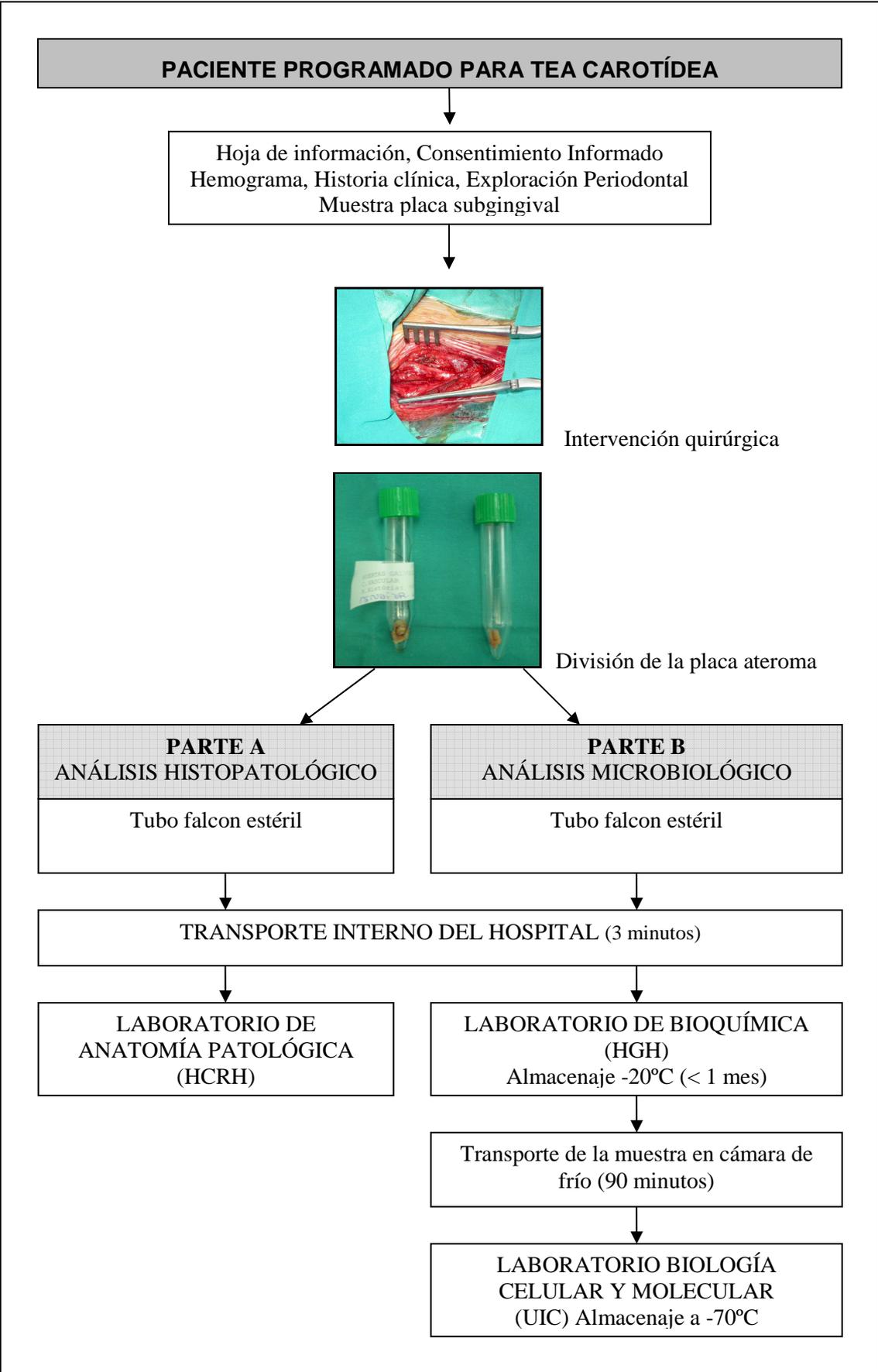


Figura 5.2 Esquema del protocolo de recogida, transporte y almacenaje de muestras.

5.2 Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes dentados e intervenidos de tromboendarterectomía carotídea (TEA carotídea) y ausencia de patologías de origen infeccioso diferentes a periodontitis. Fueron excluidos del estudio los pacientes totalmente desdentados o de los cuales faltasen datos clínicos o alguna de las muestras clínicas.

5.3 Elección de las bacterias de estudio

Se eligió una batería de cinco bacterias de asociación fuerte y moderada con la periodontitis, según los complejos descritos por Socransky (59) (Ver Figura 5.3). Las cinco especies bacterianas escogidas para este estudio fueron:

1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a)
2. *Porphyromonas gingivalis* (P.g)
3. *Prevotella intermedia* (P.i)
4. *Fusobacterium nucleatum* (F.n)
5. *Tannerella forsythia* (T.f)

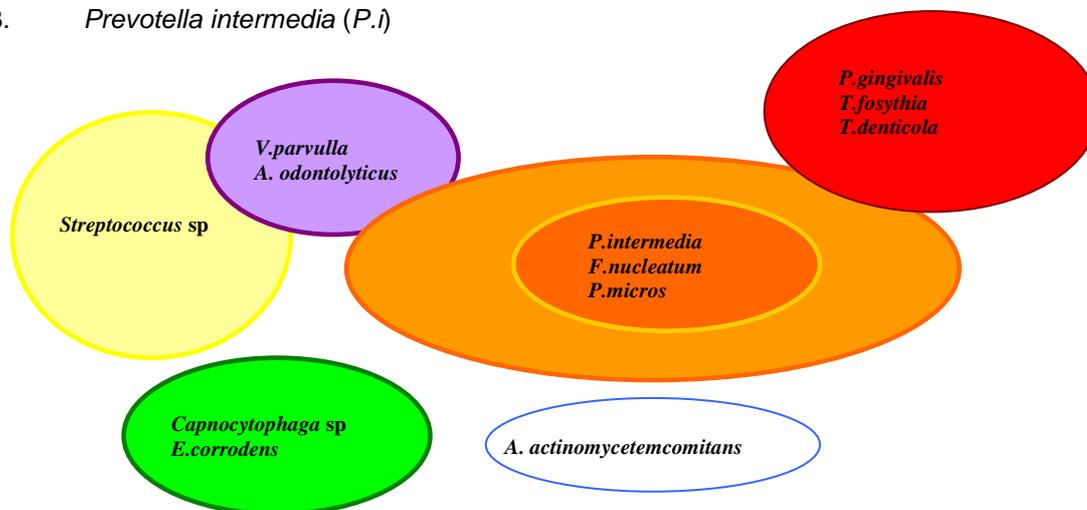


Figura 5.3 Diagrama de los complejos bacterianos en un biofilm oral (59).

Amarillo: especies de *Streptococcus* orales, con capacidad para coagregar entre especies del mismo género.

Púrpura: *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula* (único gram-negativo y anaerobio entre los colonizadores primarios).

Azul: todas las especies de *Actinomyces* excepto *A. viscosus*.

Verde: bacilos gram-negativos anaerobios facultativos.

Naranja: complejo puente. Primeros colonizadores secundarios. Todos anaerobios y mayormente gram-negativos (excepto *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus micros* y *Eubacterium nodatum*, que son gram-positivos). Inicia la etapa de remodelación de la placa supragingival. Asociación moderada con periodontitis.

Rojo: anaerobios más fuertemente asociados con periodontitis.

5.4 Identificación bacteriana de las muestras subgingivales

El método empleado para la detección de patógenos en muestras de placas de ateroma se validó previamente durante la primera fase del estudio y se presentó públicamente como Trabajo de Suficiencia Investigadora en la Universitat Internacional de Catalunya, el día 12 de junio de 2008 (para más información ver Trabajo de Suficiencia Investigadora (79)).

A continuación se presenta un resumen de las características metodológicas más relevantes del sistema de PCR de una reacción y de doble reacción (o *nested* PCR).

5.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa. Generalidades

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido el método que ha demostrado mayor especificidad y sensibilidad en la identificación de microorganismos a partir de una muestra subgingival (80-84). La sensibilidad de esta técnica es elevada, pudiendo realizar una identificación bacteriana partiendo de muestras con un bajo número de células bacterianas (85). El objetivo de la PCR es la obtención *in vitro* de un gran número de copias de un determinado fragmento de DNA original o "molde", partiendo de un mínimo de copias del fragmento, para poder ser visualizadas y analizadas posteriormente. Para visualizar la amplificación del ADN, se carga la muestra en un gel de agarosa con bromuro de etidio que separa por tamaños los productos de la PCR gracias a un campo eléctrico. Mediante un marcador de peso molecular conocido, podremos evaluar el tamaño obtenido de cada banda.

Esta técnica se basa en la capacidad natural de la enzima DNA polimerasa para replicar hebras de DNA, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar la doble hélice de DNA y dejar que la DNA polimerasa se una para volver a replicar el fragmento. Actualmente se emplean DNAs polimerasas termoestables extraídas de microorganismos adaptados a vivir a altas temperaturas (95°C), como la Taq polimerasa, de la bacteria *Thermus aquaticus*.

El proceso de PCR en el laboratorio tiene lugar en un aparato automatizado, llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción en cada uno de los ciclos.

5.4.2 Reactivos para la PCR

Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs): sustrato para polimerizar nuevo DNA.

Cebadores (“primers”): dos oligonucleótidos de 18-24 bases complementarios a los dos extremos del fragmento de DNA a amplificar. Los cebadores se diseñan de tal modo que presentan unas temperaturas de annealing (temperatura a la que se da la unión de los cebadores a la cadena de DNA molde) situadas entre 55-65°C. La temperatura de annealing resulta clave para la efectividad de la PCR, debe ser determinada empíricamente y similar para los dos cebadores.

Magnesio: suele emplearse el cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Se une a los deoxinucleótidos para formar unos complejos que serán reconocidos por la polimerasa.

Solución tampón: mantiene el pH y concentración iónicas adecuadas para el funcionamiento de la ADN polimerasa.

ADN polimerasa: Enzima que cataliza la reacción de amplificación del DNA.

5.4.3 Fases de la PCR convencional

1. **Fase de DESNATURALIZACIÓN:** consiste en llevar la reacción a 95°C, durante 1 minuto para permitir que las dos cadenas de DNA molde se separen o desnaturalicen.
2. **Fase de ANNEALING:** Durante esta fase se da la hibridación de los cebadores al DNA molde. Es necesario bajar la temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos. La temperatura de annealing debe optimizarse empíricamente y es probablemente el factor más crítico para obtener una elevada especificidad en la reacción en cadena de la polimerasa.
3. **Fase de EXTENSIÓN:** consiste en la unión de nucleótidos libres complementarios a los de la cadena molde de ADN delimitada por los cebadores en dirección 5'→3', gracias a la DNA polimerasa. Esta fase tiene lugar a 72°C, temperatura a la cual la DNA polimerasa tiene máxima, dependiendo también de la longitud del fragmento a amplificar.
4. **Fase de ELONGACIÓN FINAL:** etapa única a 72°C tras el último ciclo de la PCR.

Ver esquema de la reacción en a Figura 5.4

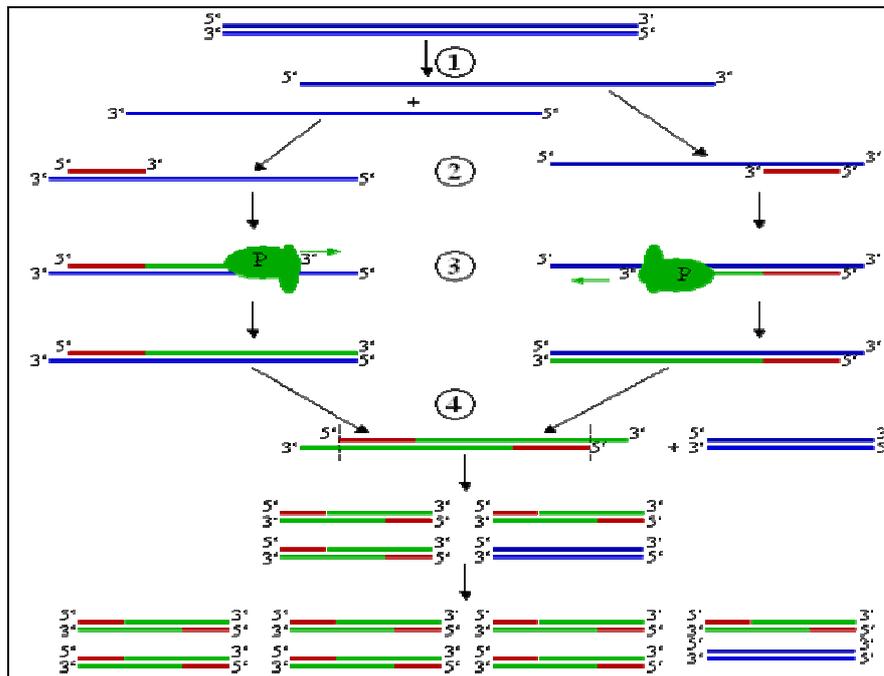


Figura 5.4 Esquema de la reacción exponencial de la PCR (86).

Fase 1: Desnaturalización. **Fase 2:** Anneling. **Fase 3:** Extensión. **Fase 4:** Elongación final

La reacción de PCR consiste en la sucesión de un número determinado de ciclos (normalmente entre 30 y 35) divididos en tres etapas repetitivas, las cuales están precedidas por una fase única de desnaturalización y una fase única de elongación final.

Para la identificación de especies bacterianas mediante PCR es muy útil amplificar el gen de 16S RNA (87). Este gen codifica la subunidad S del ribosoma, está presente en todas las especies bacterianas y a su vez se encuentra altamente conservado entre las distintas especies (88). También contiene ciertas secuencias que son específicas para cada organismo. Cada célula bacteriana contiene varias copias del gen 16S, y esta característica es de gran utilidad cuando se analizan muestras que contienen pocas células bacterianas. Sin embargo, en algunas muestras clínicas, la carga bacteriana es muy baja y el sistema de PCR convencional descrito anteriormente no permite detectar el gen o la secuencia escogida. En estos casos, existe una técnica alternativa que aumenta la sensibilidad de detección del sistema. Esta técnica recibe el nombre de "doble PCR" o "nested PCR" (89).

5.4.4 Doble PCR o *nested* PCR

La doble PCR o "*nested* PCR" sigue de manera general el mismo principio que la PCR convencional, teniendo como principal diferencia la utilización de dos parejas de cebadores para la amplificación del segmento del gen elegido, en vez de un único par. En la Figura 5.5 puede observarse un esquema de las diferentes fases de las reacciones.

La *nested* PCR consiste en dos reacciones de varios ciclos cada una. En la primera reacción se utiliza una pareja de cebadores (*forward* y *reverse*) de unos 20pb, llamados "cebadores externos". En la segunda reacción se utiliza otra pareja de cebadores situados entre los cebadores externos, llamados "cebadores internos" que amplificará de nuevo una secuencia del gen amplificado en la primera reacción.

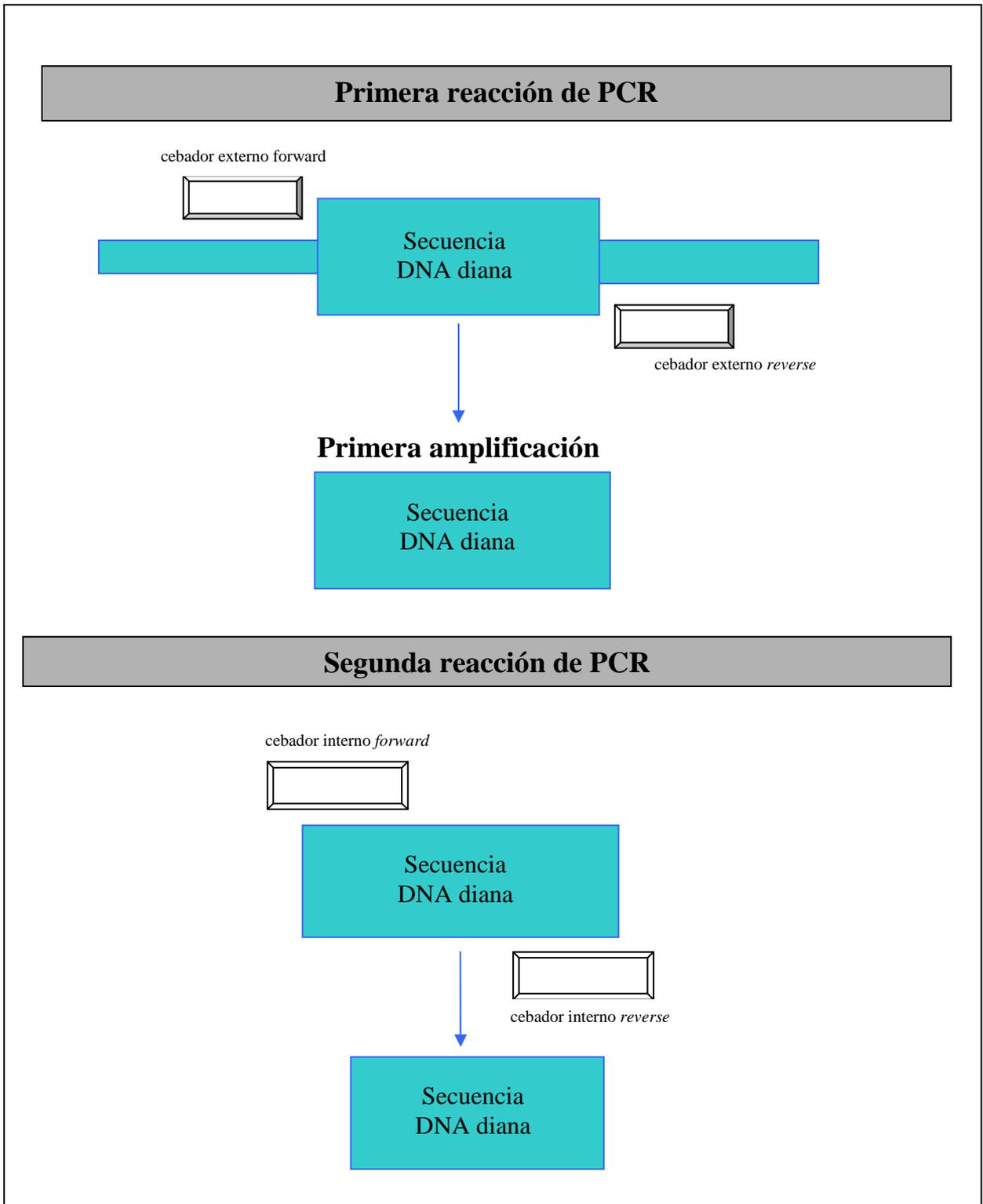


Figura 5.5 Esquema de las fases de la doble PCR o nested PCR.

La "nested PCR" consiste en dos reacciones de PCR, utilizando dos pares de cebadores distintos para cada una de las reacciones (cebadores externos e internos). Los cebadores internos de la segunda reacción son complementarios a los extremos de la secuencia amplificada en la primera reacción mediante cebadores externos. Al final del proceso se consigue la amplificación del fragmento diana a partir de un número inicial de copias muy bajo.

5.4.5 Procesamiento de las muestras subgingivales y placas de ateroma

El ADN de las muestras subgingivales se aisló mediante agua hirviendo (100µl, 95°C, 10 min). Este protocolo de extracción de ADN fue validado en trabajos realizados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la UIC (90). Posteriormente, se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotometría (Pharmacia®) por triplicado y se comprobó su integridad mediante cebadores específicos para el cromosoma X humano (35 ciclos, *temperatura de annealing* 61°C). En la Figura 5.6 se muestra la imagen de un gel de agarosa 2% donde se visualiza una banda compatible con el Cromosoma X humano a partir de una muestra de placa subgingival tomada con puntas de papel estériles.

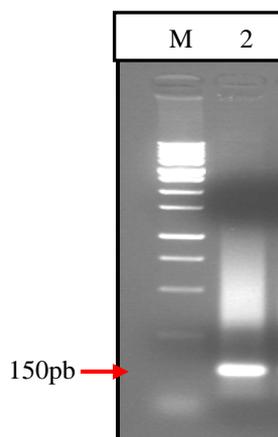


Figura 5.6 Detección del Cromosoma X a partir de una muestra subgingival.

Carril M: marcador 1Kb DNA ladder.

Carril 2: banda de 150pb compatible con el cromosoma X humano.

Una vez realizada la extracción de DNA genómico a partir de las puntas de papel y de haber comprobado su integridad, se añadieron aproximadamente 175 ng de DNA genómico a la solución *standard* de PCR en un volumen total de 50 µl. Se amplificó una secuencia del gen 16S utilizando los cebadores diseñados por Ashimoto y cols (84) para *A.a*, *P.g*, *P.i* y *F.n*. Los cebadores para *T.f* fueron diseñados por la autora en el Laboratorio de Biología de la UIC (79) Todos los cebadores fueron comprobados experimentalmente en nuestro laboratorio y además se estableció la sensibilidad de detección del sistema para cada una de las bacterias de estudio, siendo del orden de 10 células (Ver Figura 5.7).

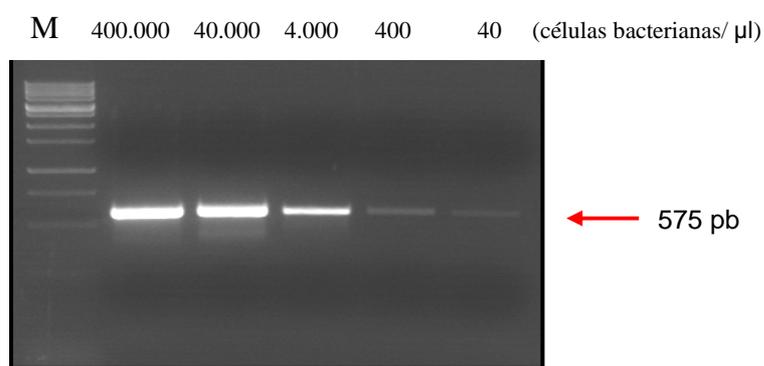


Figura 5.7 Ejemplo de detección semicuantitativa para *P. intermedia*.

*La sensibilidad mínima del sistema para *P.i* fue de 40 células/ μl.*

Carril M: Marcador 1 Kb DNA ladder

Carril 2 al 6: banda compatible con *P. intermedia* (575pb) a diferentes concentraciones.

A continuación se presenta una tabla (Tabla 5.1) donde se pueden apreciar las secuencias genéticas de los cebadores empleados en este trabajo, la longitud de la secuencia del gen 16S amplificada, las temperaturas de *annealing* y la sensibilidad mínima de detección del sistema de PCR para cada una de las bacterias de estudio:

ESPECIE BACTERIANA	Secuencia de los cebadores	Segmento amplificado (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Sensibilidad mínima de detección (cél/ μl)
<i>P. gingivalis</i>	aggcagcttgccatactgcg actgttagcacctaccgatgt	729 -1132 (405)	64	30
<i>P. intermedia</i>	tttggtgggagtaaagcgg tcaacatctctgtatctgctg	172 - 638 (575)		40
<i>F. nucleatum</i>	agagtttgatcctggctcag tcatcgtgcacacagaattgctg	27 - 400 (392)		30
<i>T. forsythia</i>	tacaggggaataaaaatgagatacg acgtcatcccaaccttctc	404 -1149 (746)	61	90
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	atgccaaacttgacgttaaat aaacctatctcgagttcttctc	478 -1034 (557)		20

Tabla 5.1 Características experimentales de los cebadores empleados para las cinco bacterias de estudio.

*En esta tabla se muestran las secuencias genéticas de los cebadores forward y reverse, peso molecular (pb) del segmento amplificado del gen 16S, temperaturas de annealing y sensibilidad mínima de detección para las bacterias *P.g*, *P.i*, *F.n*, *T.f* y *A.a* a partir de muestras subgingivales.*

La amplificación de la secuencia escogida del gen 16S se realizó en un termociclador (MiniCycler-MJ Research®) durante 35 ciclos a una temperatura de annealing de 61°C (para *T.forsythia* y *A.actinomycetemcomitans*) y 64°C (para *P.gingivalis*, *F.nucleatum* y *P.intermedia*). Como control negativo se utilizó solución de PCR sin ADN y como control positivo se utilizó ADN bacteriano a partir de cultivo puro de cada una de las bacterias. Posteriormente se cargó el producto de la PCR en un gel de agarosa al 2 y se sometió a un campo eléctrico (110v) durante 50 minutos. Se utilizó marcador DNA ladder de 1Kb (GeneCraft®).

Materiales utilizados para las PCRs de las muestras subgingivales:

1. Reactivos para un volumen final de 50 µl:
 - 35 µl H₂O apirógena
 - 5µl solución tampón 10x (sin MgCl₂) (GeneCraft®)
 - 5µl dNTP's 2.5 mM
 - 2.5 µl MgCl₂ 50mM (GeneCraft®)
 - 0,5 µl cebador *forward* (5'→3')
 - 0,5 µl cebador *reverse* (3'→5')
 - 1 µl muestra clínica
 - 0.5 µl Taq polimerasa 5µ/µl 500u (GeneCraft®)
2. Termociclador MyniCycler (MJ Research®)
3. Gel de agarosa al 2%
 - 3g Agarosa D-1 Baja EEO (Pronadisa®)
 - 150ml 1x TAE
 - 7.5 µl bromuro de etidio
4. 5 µl marcador DNA *ladder* 1Kb (GeneCraft®)

5.5 Identificación bacteriana de las placas de ateroma

El ADN de las placas de ateroma se extrajo mediante un método modificado de fenol-cloroformo basado en Gaydos y cols (91). En trabajos anteriores realizados anteriormente en el Laboratorio de Biología de la UIC se comprobó la validez de este método (79) y se estableció una pérdida del orden de 10 células/ μ l durante el proceso de extracción de ADN.

Material necesario para la extracción de ADN genómico:

1. DNA Buffer (Tris-EDTA)
2. Agua apirógena 100ml
3. Proteinasa K (10mg/ml)
4. SDS 10%
5. Fenol
6. 3 M acetato sódico (pH 5.2)
7. Etanol 70%
8. Cloroformo alcohol isoamílico (24:1)
9. TE pH 7,5

Posteriormente se cuantificó la concentración del DNA genómico mediante análisis de absorbancia (Pharmacia®), con programa específico para su fin (260nm para cuantificar el ADN genómico y a 280nm para cuantificar las proteínas contaminantes). Se calculó el cociente de absorbancia para determinar la pureza de la muestra. Se diluyeron 10 μ l de muestra en 1ml de agua. Se utilizó el agua como control y las muestras se pusieron en cubetas de cuarzo para su análisis. Todas las muestras se analizaron por triplicado y posteriormente se calculó el valor medio. El rendimiento (μ g ADN /mg tejido) nos permitió deducir que el procedimiento de extracción fue repetitivo y por lo tanto, válido.

Se comprobó la integridad del DNA mediante la amplificación del cromosoma X humano (35 ciclos, 61°C) y se visualizó en un gel de agarosa 2% (110v, 50min). Como control positivo se utilizó el cromosoma X a partir de placa subgingival. En la Figura 5.8

se puede visualizar una banda compatible para el cromosoma X (150pb) de una placa de ateroma para un volumen final de 50 μ l. La concentración ideal de trabajo establecida fue de 5 μ l.

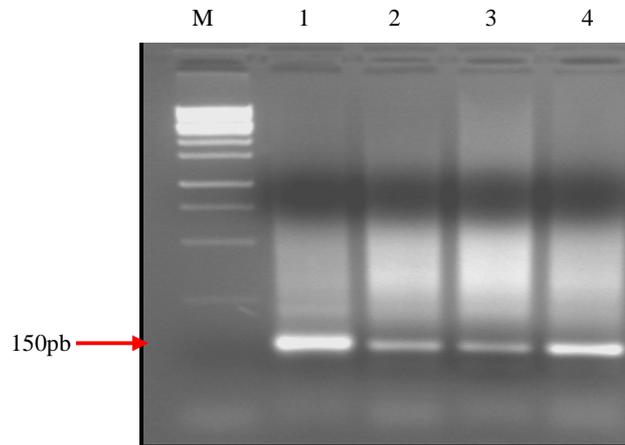


Figura 5.8 Detección del Cromosoma X a partir de una muestra de placa ateroma.

Carril M: Marcador 1Kb *DNA ladder*

Carril 1: Control positivo, 1 μ l de ADN de muestra subgingival

Carril 2: 0. 5 μ l de ADN (placa ateroma), **Carril 3:** 1 μ l de ADN

Carril 4: 5 μ l de DN

Debido a que la carga bacteriana contenida en las placas de ateroma era baja, debíamos utilizar un sistema de detección de patógenos mediante PCR que aumentase la sensibilidad del sistema. En el Trabajo de Investigación previo, se estableció que el sistema que ofrecía mayor sensibilidad de detección de bacterias en placas de ateroma fue la *nested* PCR con 27+30 ciclos utilizando cebadores internos y externos, siendo capaz de detectar las bacterias en las placas de ateroma a una concentración mínima del orden de 10³ cél/ μ l.

En la *nested* PCR 27+30, se utilizaron cebadores externos en la primera reacción de 27 ciclos y cebadores internos en la segunda reacción de 30 ciclos, los cuales fueron diseñados y comprobados en nuestro laboratorio. A continuación se presenta un resumen de cómo se diseñaron los cebadores internos para el análisis de las placas de ateroma y las temperaturas de *annealing* utilizadas en la reacción de PCR y comprobadas experimentalmente.

5.5.1 Diseño de los cebadores internos

Mediante la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (92) obtuvimos la secuencia completa del gen 16S de las bacterias de estudio. Localizamos las secuencias homólogas existentes entre estas especies y las secuencias cebadoras diseñadas por Ashimoto y cols., (84). Posteriormente, escogimos dos secuencias de 20pb de longitud dentro de la región delimitada por los cebadores externos y para comprobar el grado de especificidad de los nuevos cebadores, los enfrentamos *in silico* contra todas las secuencias genómicas conocidas hasta el momento (*non redundant*) y recogidas en la base de datos NCBI (92) y *My Ribosomal Database Project* (MyRDP) (93).

En caso que un par de cebadores coincidiera con más de un genoma, se descartaba y se rediseñaba

5.5.2 Determinación de la estabilidad del cebador y temperaturas de **annealing**:

Procuramos que los cebadores internos diseñados no formasen parte de las regiones homólogas, fuesen ricas en adenina y timina en el extremo 5' y en guanina y citosina en el extremo 3', para poder conferir mayor estabilidad a la molécula y evitar la formación de dímeros u otras estructuras por complementariedad de bases.

Para ajustar y estandarizar las temperaturas de annealing, sometimos cada una de las secuencias correspondientes a los cebadores internos al programa NetPrimer (94). Las parejas de cebadores para cada bacteria se daban como válidas cuando el "rating" (parámetro que evalúa la estabilidad de la molécula) superaba el 70% y cuando el rango de temperaturas de annealing propuestas por el programa era entre 55°C y 70°C. Experimentalmente, se estandarizó la temperatura de annealing a 55°C para todos los cebadores internos diseñados y se comprobó que éstos funcionasen correctamente.

A continuación se presenta una tabla (Tabla 5.2) donde se muestran las características de los cebadores externos (EXT) e internos (INT) utilizados en la *nested* PCR para la detección de bacterias en placas de ateroma, junto con sus temperaturas de *annealing*, el peso molecular del segmento del gen 16S amplificado y la fuente del diseño de los cebadores.

Patógenos periodontales	Pares de cebadores (5'→3')		Temperatura de annealing (°C)	Posición (pb)	Fuente
<i>A. actynomicetemcomitans</i>	EXT	atgccaaactgacgttaaataa aaacccatctcgagttctcttc	61	478 -1034 (557)	a
	INT	gtgcgaaagcg tggggagca ctcggatgtcaagagtagg	55	769 – 998 (230)	b
<i>P. gingivalis</i>	EXT	aggcagctt gccatactgcg ctgtagcaactaccgatgt	64	729 -1132 (405)	a
	INT	gcgtgggtatcaaacaggat gggttgcgctcgttatggca	55	732 – 1075 (344)	b
<i>P. intermedia</i>	EXT	cgtggaccaagattcatcg atacgttgcgtgcactca	64	172 - 638 (575)	a
	INT	ggatggggatgcgtctgatt agtccgccagttcgcgctgc	55	196 – 257 (62)	b
<i>F. nucleatum</i>	EXT	gatgaacgctgacagaatgc tcatcgtgcacacagaattgctg	64	27 - 400 (392)	a
	INT	acgggtgagtaacgcgtaaa ccccttggccgatcacc	55	89 – 364 (276)	b
<i>T. forsythia</i>	EXT	tacaggggaataaaatgagatacg acgtcatccaacctcctc	61	404 -1149 (746)	b
	INT	tgattttattgcatgtacc acagcttacgccggcagtc	50	428 - 1108 (681)	b

Tabla 5.2 Cebadores externos (EXT) e internos (INT) para amplificar un segmento del gen 16S de las bacterias de estudio a partir de muestras de placa de ateroma.

Se detallan las secuencias genéticas de los cebadores, las temperaturas de annealing y el peso molecular de la secuencia amplificada, así como la fuente de origen del diseño de los cebadores (a: Ashimoto y cols (84); b: presente trabajo).

5.6 Análisis histopatológico de las placas de ateroma

La preparación de las muestras para su visualización con microscopía óptica se realizó en el Laboratorio de Anatomía Patológica del HGH.

La inclusión de las placas de ateroma en parafina, los cortes histológicos con microtomo y las posteriores tinciones con hematoxilina y eosina se realizaron siguiendo los protocolos estándar.

Se visualizaron las muestras con microscopio óptico (Olympus 460) a 400 aumentos (4x100). De cada placa de ateroma se identificaba el número de focos inflamatorios presentes en la preparación y se contabilizaba el número de campos a 400 aumentos que ocupaba cada foco inflamatorio. Posteriormente se contaban los leucocitos

y linfocitos presentes en un campo de cada uno de los focos localizados y se procedía a calcular la media de cada uno de los tipos celulares. Este análisis de las biopsias permitió clasificar el patrón inflamatorio en dos grados, según las características de las células presentes. La inflamación era “aguda” cuando el infiltrado inflamatorio estaba compuesto mayoritariamente (>50%) por neutrófilos polimorfonucleados (PMN) y “crónico” cuando la célula predominante (> 50%) eran linfocitos (95).

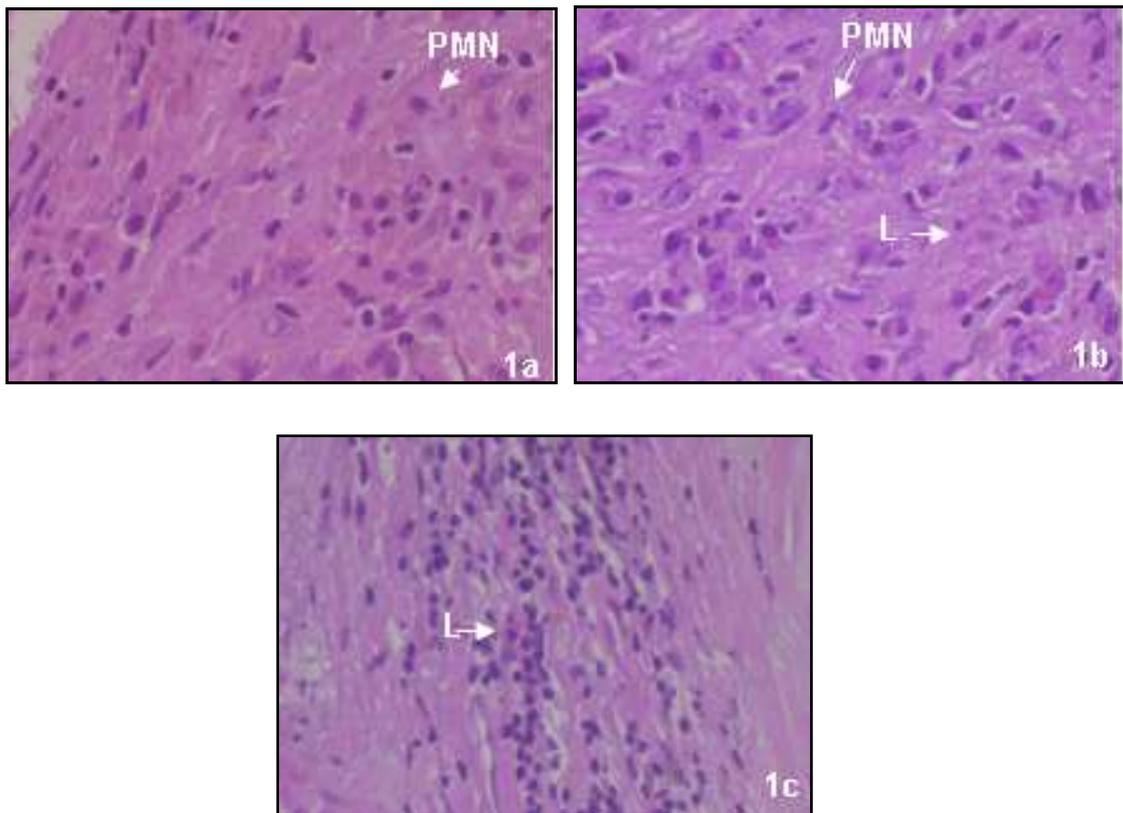


Figura 5.7 1a-1c. Ejemplos de los dos patrones inflamatorios locales encontrados en las placas de ateroma.

El tejido ateromatoso fue incluido en parafina y teñido con hematoxilina y eosina.

Fig. 1.a y Fig. 1.b : muestran un patrón inflamatorio agudo. Los neutrófilos polimorfonucleados (PMN) son las células inflamatorias observadas mayoritariamente en el área de estudio. En la Fig 1.b se pueden observar linfocitos, además de las células PMN.

Fig. 1.c corresponde a un patrón inflamatorio crónico. Los linfocitos son las células predominantes en el área de estudio.

5.7 Análisis estadístico

Se evaluaron las características de la población mediante el cálculo de los valores medios de cada variable y su desviación estándar. Posteriormente se compararon los valores medios de la población de estudio con los valores en condiciones normales de salud.

Una vez realizado el análisis descriptivo de la población, se calculó mediante un análisis de frecuencia, la prevalencia de cada una de las cinco bacterias de estudio en las bolsas periodontales y en las placas de ateroma, expresado en términos de porcentaje. Una vez analizada la prevalencia de cada bacteria en las dos localizaciones, se aplicó un análisis de frecuencia teniendo en cuenta la detección simultánea de cada bacteria en las dos localizaciones de cada uno de los pacientes de estudio.

Posteriormente se realizó un análisis de complejos o “análisis de *cluster*” con el objetivo de analizar el efecto que cada una de las variables recogidas ejercía sobre el resto de variables de la población. Este análisis es muy útil cuando se han recogido una gran cantidad de variables y se quiere evaluar cuáles pueden estar asociadas entre sí, sin tener en cuenta la significancia estadística. Permite hacer un *screening* de las variables independientes que ejercen mayor fuerza sobre la variable dependiente de interés, que en nuestro caso es la detección de las bacterias en las placas de ateroma. Se estableció un nivel mínimo de asociación del 60%. La asociación se consideraba “fuerte” si la similitud entre las variables era de ≤ 10 ($\geq 90\%$ de asociación), “moderada” si la similitud estaba comprendida entre 11 y 30 (70-89% de asociación) y “leve” si la similitud era de >30 ($\leq 69\%$ de asociación).

Una vez establecido qué variables podían tener una relación entre sí, se aplicó la prueba estadística de análisis de asociaciones o “*path analysis*” para evaluar el grado de asociación entre las diferentes variables, considerando la significancia estadística como medidor de la fuerza de asociación ($p\text{valor} < 0.1$) (96). Mediante esta prueba estadística se relacionan dos variables entre sí con el objetivo de analizar si existe una correlación estadísticamente significativa y, por tanto, una relación de causalidad. Hay que tener en cuenta que este estudio no ha sido diseñado para establecer relaciones de causalidad en sí mismas, pero sí podemos analizar las tendencias de correlación y

discriminar entre casualidad y causalidad de las relaciones mediante la significancia estadística de la relación (*p*valor <0.1)

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de la población de estudio

De una muestra total de 36 pacientes, se tuvieron que excluir 5 pacientes, debido a que cuatro de ellos eran edéntulos totales y a uno no se le pudo realizar la exploración periodontal, quedando finalmente un tamaño muestral total de 31 pacientes.

En la Tabla 6.1 se pueden observar los valores medios de las variables recogidas en la población de estudio, donde también se expresan los valores de referencia en condiciones normales o de salud. Todos los pacientes que formaron parte del estudio (n=31; 11 mujeres y 20 hombres, media de edad 73 años) tenían un nivel socioeconómico bajo y un estilo de vida sedentario (baja frecuencia e intensidad de actividad física). El 32.25% de los pacientes eran no fumadores, el 51.61% eran exfumadores y el 16.14% fumadores (>10 cigarrillos/día). El Índice de Masa Corporal (IMC) (medida de asociación entre el peso (Kg) y el cuadrado de la talla (m²) de un individuo para saber si el paciente tiene obesidad o sobrepeso) alcanzó en las mujeres un valor medio de 30.42 (rango: 24.89-35.1) y en los hombres de 28.09 (rango: 21.45-35.43). Según la Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación, se considera “sobrepeso” valores >25 y obesidad cuando son >30. En nuestra población, las mujeres mostraron de valores medios correspondientes a obesidad y en el caso de los hombres, la media tenía sobrepeso.

El 79.31% de los pacientes eran diabéticos, mostrando valores medios de glucosa de 7.23 mmol/L, y por lo tanto aumentados. Además, el 86.2% de la población sufría hipertensión arterial (15-8 mmHg). Los valores medios de fibrinógeno, triglicéridos y colesterol (HDL y LDL) en sangre se comprendían dentro del intervalo de normalidad, siendo de 2.99 g/L, 2.06, 1.17 y 2.91 mmol/L, respectivamente. El valor medio de células inflamatorias en sangre de leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos también se comprendían dentro de los valores de normalidad, siendo de 8.86, 5.75, 2.16, 0.69, 0.21 y 0.037 cél x 10⁹ /L, respectivamente.

Referente al diagnóstico periodontal, todos los pacientes de estudio padecían periodontitis crónica generalizada moderada y avanzada y presentaban por lo menos 6 dientes con bolsas periodontales ≥6mm de profundidad. 13 pacientes recibieron tratamiento periodontal de fase higiénica (tartrectomía o raspado y alisado radicular) por

lo menos un año previo a nuestra exploración. La mayoría de la población (80.5%) sólo se cepillaba los dientes una vez al día y únicamente el 9.67% practicaba hábitos de higiene oral interproximal. El valor medio del índice de sangrado (BI) (97) mostró valores aumentados del 60.33% (rango= 7.14-100%), considerándose valores normales aquellos <20%.

Datos médicos generales	Media & SD
Edad (años)	73 ±7
Mujeres (%)	31
Peso (Kg)	74 ±11
Índice de masa corporal (mujeres)	30.42 ±5.5
Índice de masa corporal (hombres)	28.9 ±6.5
Presión sistólica (mmHg)	156 ±20
Presión diastólica (mmHg)	80 ±12
Pacientes con <i>diabetes mellitus</i> (%)	79.31
Tabaco	
No fumadores (%)	32.25
Fumadores y ex-fumadores (%)	67.75
Fumadores >10 años (%)	52
Fumadores > 10 cigarrillos/día (%)	52
Exploración periodontal	
Índice Gingival	60.33
Cepillado (% 1 vez al día)	80.5
Higiene interproximal (%)	9.67 ±0.3
Uso de colutorio (%)	36 ±1
Bioquímica	
Triglicéridos (mmol/L) (0.45-1.70 mmol/L)*	2.06 ±1.3
Colesterol (mmol/L) (≤ 5.2 mmol/L)*	5.38 ±1.1
HDL Colesterol (mmol/L) (> 0.90 mmol/L)*	1.17 ±0.3
LDL Colesterol (mmol/L) (< 3.40 mmol/L)*	2.91 ±0.6
Fibrinógeno (g/L) (2.00-5.00)*	2.99 ±0.4
Leucocitos (cellsx10 ⁹ /L) (4.00-11.00 x10 ⁹ /L)*	8.86 ±2.7
Neutrófilos (cellsx10 ⁹ /L) (2.50-7.50x10 ⁹ /L)*	5.75 ±2.6
Linfocitos (cellsx10 ⁹ /L) (1.50-4.50x10 ⁹ /L)*	2.16 ±0.7
Monocitos (cellsx10 ⁹ /L) (0.2-0.8x10 ⁹ /L)*	0.69 ±0.3
Eosinófilos (cellsx10 ⁹ /L) (0.05-0.5x10 ⁹ /L)*	0.21 ±0.2
Basófilos (cellsx10 ⁹ /L) (<0.15x10 ⁹ /L)*	0.04 ±0.01
Glucose en sangre (mmol/L) (3.9-6.1 mmol/L)*	7.23 ±2.2
Histología	
Longitud de la placa de ateroma (mm)	15.41 ±4.5
Diámetros de la placa de ateroma (mm)	7.77 ±2.8
Área inflamatoria (mm ²)	1.99 ±2.0
Ateromas con patrón inflamatorio agudo (%)	74.18
Ateromas con patrón inflamatorio crónico (%)	25.8

Tabla 6.1 Valor medio de las variables de estudio recogidas en la población.

En la tabla se muestran los valores medios de cada una de las variables médicas, periodontales bioquímicas e histológicas y (*) los valores en condiciones normales o de salud (n=31).

6.2 Análisis histopatológico de las placas de ateroma

El análisis histopatológico de las biopsias reveló que todas las placas de ateroma presentaron depósitos de colesterol cristalizados. En la Figura 6.1 se puede observar una imagen histológica de un depósito de colesterol calcificado incluido en una placa de ateroma de uno de los pacientes de estudio.

El análisis de las características generales de las histologías de las placas de ateroma reveló que median 120.54mm^2 de área media y, del total de éste área, 1.99mm^2 estaba ocupado por células inflamatorias. Los datos de las características de las histologías se pueden observar de manera esquematizada en la Tabla 6.1, presentada anteriormente. El análisis del infiltrado inflamatorio de las histologías reveló que el 74.18% de las placas de ateroma mostraron un patrón inflamatorio “agudo” con la presencia predominante de neutrófilos PMN. El patrón inflamatorio “crónico”, caracterizado por la presencia predominante de linfocitos, fue menos frecuente (25.8%) (Véase Tabla 6.1). En la Figura 6.2 (a,b) se puede observar un ejemplo de cada uno de los patrones inflamatorios (agudo y crónico) observados en las placas de ateroma.

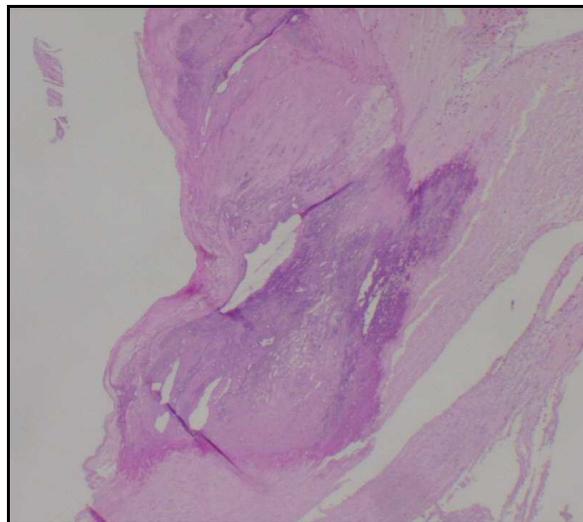


Figura 6.1 Ejemplo de imagen histológica de calcificación de cristales de colesterol en una placa de ateroma.

Imagen de microscopía óptica (x40 aumentos).

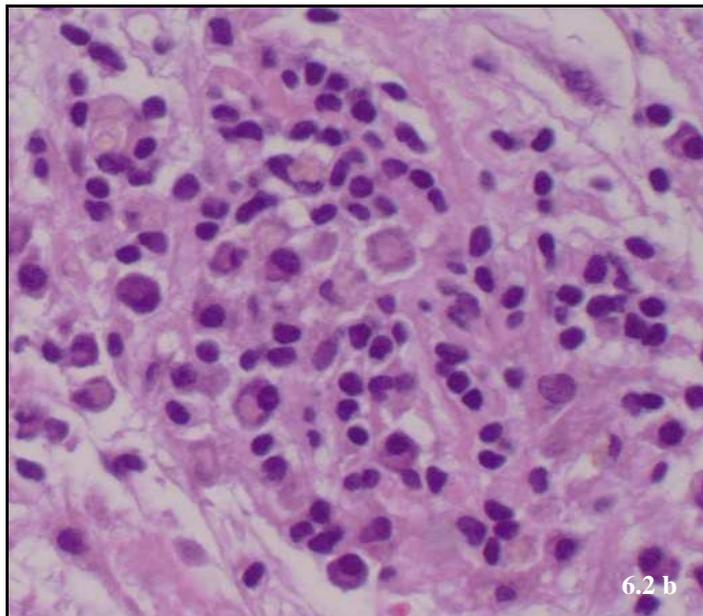
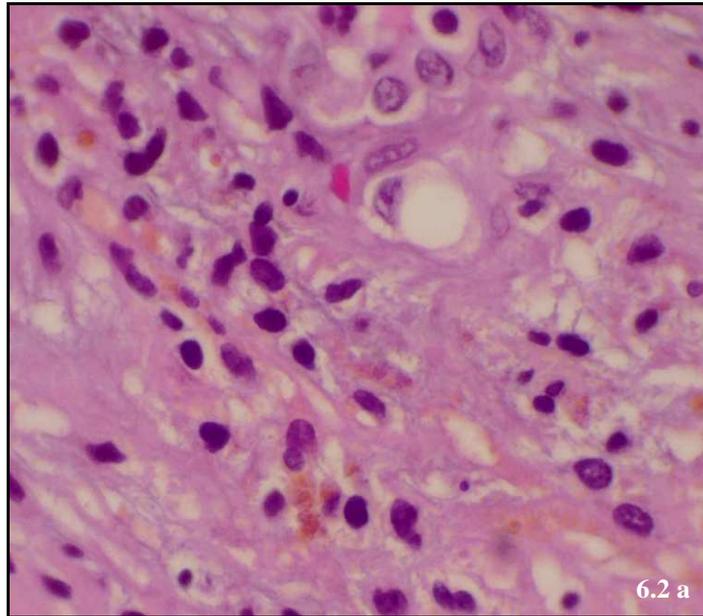


Figura 6.2 (a,b). *Imágenes histológicas de las placas de ateroma con microscopía óptica.*
(x400 aumentos)

La Figura a corresponde a una inflamación aguda, donde la célula predominante es el neutrófilo PMN. La Figura c corresponde a un infiltrado inflamatorio crónico, donde la célula predominante es el linfocito.

6.3 Análisis del rDNA 16S amplificado de las muestras subgingivales y las placas de ateroma:

Mediante PCR convencional para las muestras subgingivales y *nested* PCR para las placas de ateroma, todas las muestras subgingivales y de las placas de ateroma fueron positivas para al menos uno de los cinco periodontopatógenos analizados. Teniendo en cuenta que la sensibilidad mínima de detección para las muestras de placa subgingival era del orden de 10 células, el análisis molecular reveló que *F.nucleatum* era la especie bacteriana que más frecuentemente colonizaba las bolsas periodontales. En el 90.32% de los pacientes se detectó *F.n*, *T.forsythia* en el 83.87% y *P.gingivalis* en el 64.51%. *A.actinomycetemcomitans* y *P.intermedia* también se llegaron a detectar en las bolsas periodontales pero en un porcentaje más bajo (6.45% y 3.22%, respectivamente). En la Figura 6.3 se puede observar un diagrama de barras que refleja el porcentaje de pacientes positivos para cada una de las bacterias de estudio en las muestras de placa subgingival.

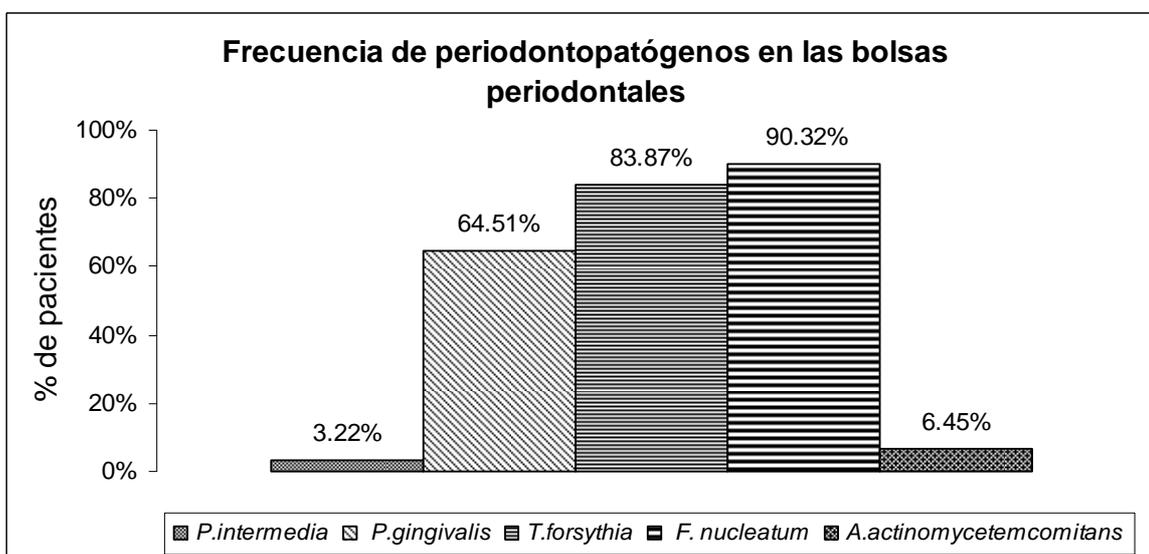


Figure 6.3 Frecuencia de pacientes con bacterias patógenas en las bolsas periodontales.

En este diagrama de barras se muestra la prevalencia de las cinco bacterias de estudio en las bolsas subgingivales de la población analizada. Se puede observar que *F. nucleatum* fue la bacteria más predominante en las bolsas periodontales. *T.forsythia* y *P.gingivalis* también mostraron una alta prevalencia, a diferencia de *A.actinomycetemcomitans* y *P.intermedia*, las cuales sólo fueron detectadas en un bajo porcentaje de la población.

Una vez se obtuvieron los resultados del análisis microbiológico de las muestras de placa subgingival, se procedió al análisis de las placas de ateroma mediante *nested* PCR. Los resultados del análisis de las placas de ateroma reveló que *A. actinomycetemcomitans* era la bacteria predominante en esta localización, teniendo en cuenta que el sistema de PCR era capaz de detectar concentraciones mínimas del orden de 10^3 células. El 80.64% de las placas de ateroma fue positivo para *A.a*, el 70.96% para *P.gingivalis*, el 51.61% para *T.forsythia* y *F.nucleatum* en el 61.29%. *P.intermedia* también se llegó a detectar, aunque en un porcentaje más bajo (22.8%). En la Figura 6.4 se pueden ver representados mediante un diagrama de barras los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las muestras de placa de ateroma de los pacientes de estudio.

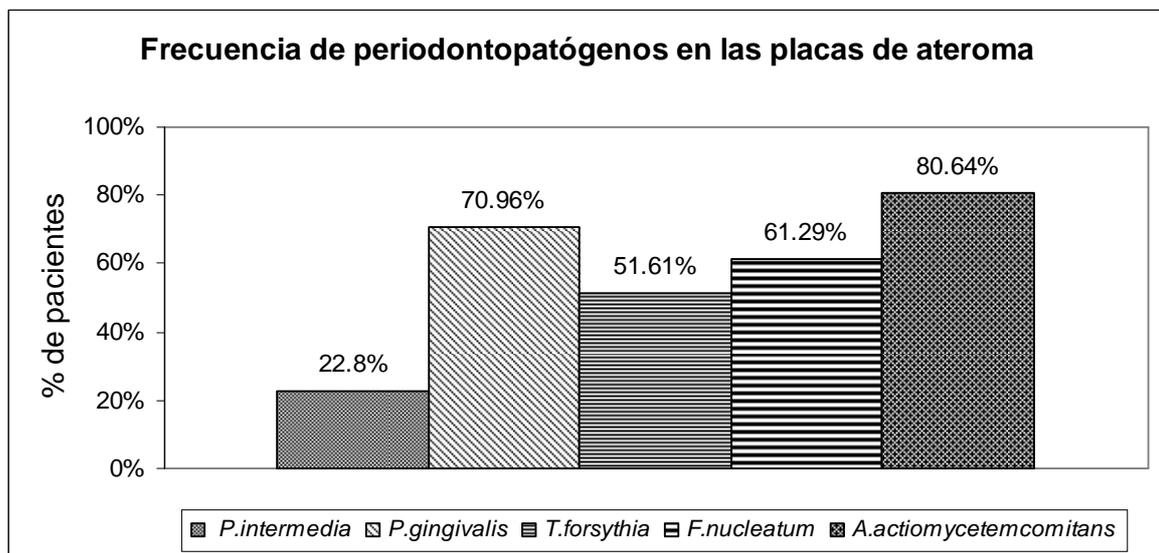


Figure 6.4 Frecuencia de pacientes con periodontopatógenos en las placas de ateroma.

Esta figura muestra la prevalencia de periodontopatógenos encontrados en las placas de ateroma de la población de estudio. Tal como muestra el diagrama de barras, la mayoría de los pacientes presentaba *A. actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis* en las placas de ateroma. *T. forsythia* y *F. nucleatum* también se encontraron en proporciones relativamente altas y *P.intermedia* se encontró en menor proporción.

Una vez se había analizado la prevalencia de las bacterias en las dos localizaciones por separado, era interesante analizar el porcentaje de pacientes que presentaban cada una de las bacterias en ambas localizaciones simultáneamente (bolsa periodontal y placa de ateroma). Mediante este análisis se pretendía reforzar la hipótesis de la asociación directa entre la aterosclerosis y la periodontitis. En la Figura 6.5 se

representan los resultados del análisis de frecuencia mediante un diagrama de barras, donde podemos observar que *P.gingivalis*, *T.forsythia* y *F.nucleatum* mostraron los porcentajes más elevados de detección simultánea en ambas localizaciones. *P.gingivalis* fue detectada en ambas localizaciones en el 48.39% de la muestra (n=31), *T.forsythia* en el 38.71% de los pacientes y *F.nucleatum* en el 51.61%. También se estableció una relación entre la ausencia de *P.intermedia* y *A.actinomycescomitans* en ambas localizaciones. En el 74.19% de los pacientes donde no se detectó *P.intermedia* en las placas de ateroma, tampoco se detectó en las bolsas periodontales y en el 19.34% de los pacientes donde no se detectó *A.actinomycescomitans*, tampoco se detectó en la boca.

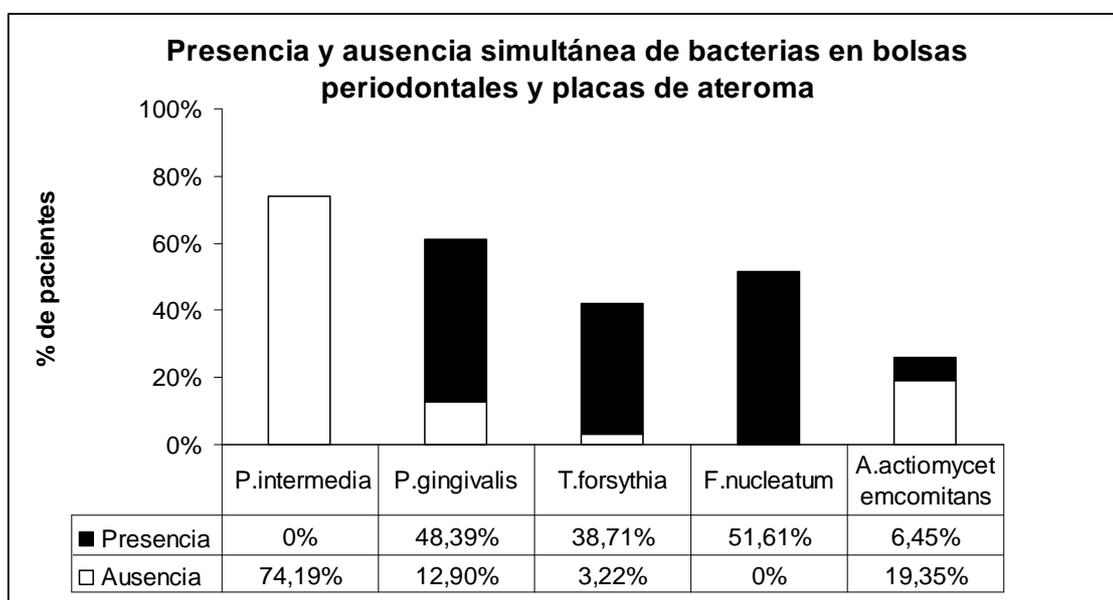


Figure 6.5 Frecuencia de detección simultánea de periodontopatógenos en las bolsas periodontales y las placas de ateroma en un mismo paciente.

Esta figura muestra la detección y ausencia simultánea de los periodontopatógenos analizados en las bolsas subgingivales y las placas de ateroma de la población de estudio. Las barras blancas reflejan la ausencia de las bacterias en las placas de ateroma y en las bolsas periodontales; y las barras negras muestran la presencia simultánea de las bacterias en ambas localizaciones.

Como se puede observar en el diagrama, la presencia de *F. nucleatum* en las bolsas periodontales está altamente asociada con su detección en las placas de ateroma. En el caso de *P.intermedia* esta asociación se cumple de manera inversa, ya que la ausencia en una localización implica la ausencia en la otra. *T. forsythia* y *P. gingivalis* también se detectaron simultáneamente en un porcentaje elevado de la población de estudio, y en el caso de *A.actinomycescomitans* parece haber una tendencia a la ausencia simultánea en ambas localizaciones de la bacteria.

El análisis de la relación entre la microflora oral con la vascular reforzaba la hipótesis de una relación por vía directa entre la periodontitis y la aterosclerosis, sin embargo, este análisis no permitía estudiar la hipótesis de relación entre ambas patologías a través de una vía indirecta. Para ello, era necesario evaluar si existía una relación entre las variables recogidas en la población y la presencia de bacterias periodontopatógenas en las placas de ateroma. Debido al elevado número de variables recogidas (n=40), tanto de carácter médico como propias de la enfermedad periodontal, era necesario aplicar un “análisis de *cluster*”, el cual nos permitía detectar de manera rápida el grado de asociación entre las variables.

Estableciendo un nivel mínimo de asociación del 60%, se formó un dendograma con 6 complejos diferentes, los cuales mostraron diferentes asociaciones interesantes entre las variables. En la Figura 6.6 se muestra el dendograma con los complejos formados en el análisis de clúster, donde se reflejan los seis complejos formados, bajo el criterio de un mínimo del 60% de similitud entre las asociaciones, quedando excluidas aquellas asociaciones que tienen un valor de similitud >40, o dicho de otra manera una asociación <60%.

El “complejo A” mostró una asociación fuerte entre la presencia de *A.a* en ateroma y *T.f* en las bolsas periodontales, indicando que la presencia de *T.f* en las bolsas periodontales podía favorecer la permanencia de *A.a* en las placas de ateroma, una vez las han colonizado. Asimismo, se detectó una asociación fuerte entre la presencia simultánea de *F.n* y *P.g* en la placa de ateroma, requiriendo cada una de estas bacterias la presencia de la otra para permanecer en la placa de ateroma.

El “complejo C” mostró una asociación fuerte entre la presencia de *P.i* en la placa de ateroma y niveles aumentados de glucosa en sangre, y una asociación moderada entre esta combinación y la presencia de *A.a* y *P.i* en la bolsa periodontal. Este resultado es interesante en cuanto que sugiere una asociación entre un ambiente rico en glucosa y la presencia dominante de ciertas bacterias. El “complejo D” mostró una asociación moderada entre la presencia de *P.g* en la bolsa periodontal y valores aumentados de ciertos parámetros asociados con la aterosclerosis, como el IMC, LDL e hipertensión arterial.

Finalmente, el “complejo E” estableció una asociación fuerte entre la presencia de *T.f* en las bolsas periodontales y el tabaco. Como se discutirá más adelante, esta asociación sirvió de control del análisis, puesto que existen múltiples publicaciones que han demostrado dicha asociación.

SIMILITUD

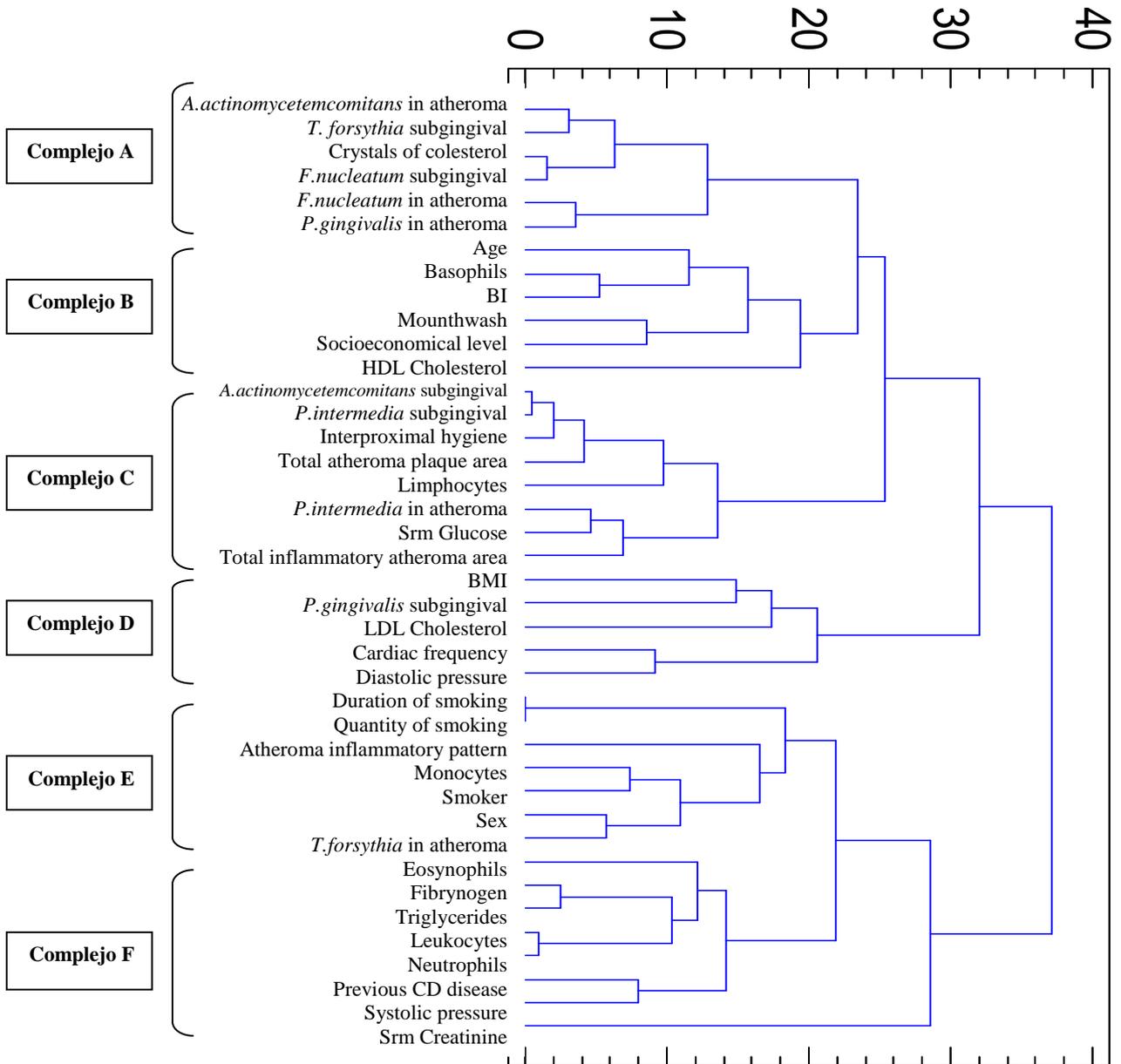


Figura 6.6 Dendrograma de análisis de cluster de las 40 variables de estudio de la población.

En el dendrograma se observa que se han formado 6 complejos (A-F) con diferentes grados de asociación entre las variables recogidas. Las asociaciones comprendidas entre una similitud de 0 a 10 se consideraron "fuertes", entre 11 y 30 "moderadas" y por encima de 30 "débiles".

Una vez detectadas las asociaciones más importantes entre las variables de estudio, se requería analizar la significancia estadística de dichas asociaciones. Para ello, se aplicó la prueba estadística de “*path analysis*” o análisis de asociaciones, mediante la cual podemos establecer relaciones de causalidad entre dos variables en función del p valor obtenido. El *path* análisis mostró una estrecha relación entre la detección de *T.f* y *F.n* en las placas de ateroma y la colonización de estas bacterias en las bolsas periodontales (*p*valor <0.1). (Ver Tabla 6.2). Aunque la frecuencia de detección simultánea de *P.g* en las bolsas periodontales y en las placas de ateroma fue más elevada que en el caso de otras bacterias, el *path* análisis no mostró una relación estadísticamente significativa.

		<i>Bacterias detectadas en placas de ateroma</i>				
		<i>P.i</i>	<i>P.g</i>	<i>T.f</i>	<i>F.n</i>	<i>A. a</i>
<i>Bacterias detectadas en bolsas periodontales</i>	<i>P.intermedia</i>	--	--	--	--	--
	<i>P.gingivalis</i>	--	+	--	--	--
	<i>T.forsythia</i>	--	--	++	--	--
	<i>F. nucleatum</i>	--	--	++	--	--
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	--	--	--	--	--
++ Asociación positiva (<i>p</i> <0.1), -- Asociación negativa (<i>p</i> <0.1), + Asociación positiva (<i>p</i> >0.1)						

Tabla 6.2. *Path* análisis para evaluar el grado de asociación entre las bacterias detectada en las placas de ateroma y las bolsas periodontales de los mismos pacientes.

En esta tabla se muestran las relaciones entre las bacterias encontradas en las bolsas subgingivales y en las placas de ateroma de los mismos pacientes. Mediante el análisis estadístico de causalidad o *path* análisis, es posible establecer si las relaciones encontradas son estadísticamente significativas o no. En color verde (++) se muestran las relaciones estadísticamente significativas positivas, es decir, las relaciones en que la detección simultánea son *p*valor <0.1. En naranja (--) aquellos casos en que la ausencia de una bacteria en ambas localizaciones es estadísticamente significativa y en blanco (+) cuando existe una tendencia a haber una detección simultánea de la bacteria, pero sin suficiente significancia estadística para confirmar el resultado.

Se demostró una estrecha fuerte entre la detección de *T.f* y *F.n* en las placas de ateroma y la colonización de estas bacterias en las bolsas periodontales (*p*valor <0.1). *P.g* mostró una tendencia hacia una relación positiva, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos. El resto de bacterias no mostraron asociaciones entre la detección simultánea.

El *path* análisis también demostró una relación positiva (*pvalor* <0.1) entre la presencia de valores aumentados de glucosa (> 6.1 mmol/L) y triglicéridos (>1.7 mmol/L) en sangre y la detección de *P.intermedia* en las placas de ateroma.

Asimismo, se estableció una relación (*pvalor* <0.1) entre la ausencia de *P.g*, *F.n* y *A.a* en las placas de ateroma y valores anormales de glucosa en sangre. La ausencia de *A.a* en las placas de ateroma también se relacionó con valores normales de triglicéridos en sangre (*pvalor* <0.1). Los resultados del análisis estadístico también mostraron una tendencia hacia una relación positiva entre la presencia de *P.g*, *T.f* y *F.n* en las placas de ateroma y un aumento de los valores aumentados de triglicéridos, sin embargo los resultados no fueron estadísticamente significativos. También se demostró una estrecha relación entre niveles aumentados de linfocitos y de BI y la detección de las cinco bacterias de estudio en las placas de ateroma (*pvalor* <0.1).

PATÓGENOS PERIODONTALES DETECTADOS EN PLACAS DE ATEROMA					
PARÁMETROS MÉDICOS	<i>P.intermedia</i>	<i>P.gingivalis</i>	<i>T.forsythia</i>	<i>F.nucleatum</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Glucosa en sangre (>6.1 mmol/L)	++	--	+	--	--
Triglicéridos (>1.7 mmol/L)	++	+	+	+	--
HDL Colesterol (≤0.90 mmol/L)	++	++	++	++	+
Linfocitos (>4.5 cél.x10 ⁹ /L)	++	++	++	++	++
Índice de sangrado (>20%)	++	++	++	++	++

++ Asociación positiva (*p*valor <0.1), **--** Asociación negativa (*p*valor <0.1), **+** Asociación positiva estadísticamente no significativa
 Los valores en condiciones de salud están expresados entre paréntesis.

Tabla 6.2. Path analysis de los parámetros médicos relacionados con la detección de bacterias en las placas de ateroma.

La presencia de *P.i* en las placas de ateroma mostró una relación positiva estadísticamente significativa con todos los parámetros médicos representados en la tabla. En el caso de *P.g*, *T.f* y *F.n* se demostró una relación positiva estadísticamente significativa con niveles aumentados de HDL, linfocitos y el índice de sangrado gingival. *A.a* mostró una relación positiva y significativa con niveles aumentados de linfocitos y el índice de sangrado gingival. La ausencia de *P.g*, *F.n* y *A.a* en las placas de ateroma estuvo relacionada con niveles aumentados de glucosa y en el caso de *A.a* también con niveles aumentados de triglicéridos.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo ha tenido como objetivo principal aportar nuevas pruebas de la asociación entre la periodontitis crónica y la aterosclerosis a través de la vía directa e indirecta. A pesar de que ambas patologías comparten una serie de factores de riesgo (como el tabaco, la *diabetes mellitus*, el índice de masa corporal, el estilo de vida, la edad y el sexo) que pueden actuar como sesgo y originar una asociación causal falsa, la Academia Americana de Periodoncia, conjuntamente con la Academia Americana de Cardiología (26), considera que existen suficientes evidencias científicas (10, 21, 99) que avalan que la periodontitis puede influir en la progresión de las enfermedades cardiovasculares.

La estrategia utilizada ha sido la detección simultánea de periodontopatógenos en las bolsas subgingivales y las placas de ateroma de los mismos pacientes y el análisis de las relaciones entre los parámetros clínicos de la población de estudio y la microflora de las placas de ateroma carotídeas. El diseño de este trabajo ha tenido en cuenta la recogida de datos detallada de la población de estudio y el desarrollo de un método diagnóstico molecular validado y controlado, pudiendo aportar unos datos más fiables que refuercen las vías de asociación, tanto directa como indirecta, entre ambas patologías. Además, se han recogido histologías del tejido ateromatoso, con el fin de analizar el componente inflamatorio local y relacionarlo con los parámetros de salud general y microbiológicos encontrados.

Hay que tener en cuenta, que al inicio de esta investigación, únicamente habían sido publicados tres estudios que analizaban la detección simultánea de periodontopatógenos en bolsas subgingivales y placas de ateroma (33, 34, 36), aunque sin resultados concluyentes. El interés de este tema de investigación y la falta de resultados firmes, impulsó a la realización de otros trabajos (100-102) que se publicaron durante la realización de la presente Tesis Doctoral. Las principales diferencias de este estudio, en relación a los publicados por otros grupos, residen en el método molecular de detección bacteriana empleado y en la recogida detallada de un total de 40 variables médicas y periodontales de la población de estudio.

Aspectos metodológicos:

Uno de los puntos más críticos en la metodología de diagnóstico molecular es la cuantificación de la carga bacteriana de las muestras biológicas y el establecimiento de la sensibilidad mínima de detección de la técnica empleada. Como ya se ha demostrado en otros estudios (84,87-89), tanto la PCR convencional como la *nested* PCR o doble PCR son métodos moleculares válidos para la detección bacteriana a partir de muestras biológicas humanas. Sin embargo, la *nested* PCR es un sistema muy sensible capaz de llegar a detectar cantidades muy pequeñas de DNA bacteriano. A pesar de ser un sistema muy sensible, también tiene una alta especificidad debido a la baja probabilidad de amplificar productos bacterianos no deseados (dímeros, *hairpins* y secuencias diana alternativas) (89). Esto confiere al sistema de PCR un bajo rango de falsos positivos y negativos y por lo tanto lo convierte en un sistema de diagnóstico molecular de elección para este estudio.

Mediante la PCR convencional (de una reacción), en este estudio se ha establecido una sensibilidad de detección bacteriana a partir de muestras de placa subgingival del orden de 10 células, sin embargo, mediante PCR convencional, no ha sido posible detectar bacterias periodontopatógenas en las placas de ateroma. Los resultados negativos de detección bacteriana pueden ser debidos principalmente a la presencia de una carga bacteriana baja en las placas de ateroma asociada además a la pérdida bacteriana inherente al proceso de extracción de ADN a partir de las muestras biológicas. Este fue el motivo que nos impulsó a desarrollar un método que mejorase el nivel de sensibilidad del sistema y que fuera capaz de detectar concentraciones muy bajas de carga bacteriana. Mediante el uso de la *nested* PCR, utilizando dos pares de cebadores específicos (externo e interno) para cada bacteria de estudio y para cada reacción de PCR, pudimos establecer un nivel mínimo de detección de ~3000 cél/mg de tejido y pudimos ser capaces de detectar las cinco bacterias de estudio en las placas de ateroma (*P.gingivalis*, *T.forsythia*, *P.intermedia*, *A. actinimycetemcomitans* and *F. nucleatum*), cumpliendo así uno de los objetivos planteados inicialmente. No todos los estudios publicados donde se realiza la detección de bacterias en placas de ateroma y bolsas periodontales tienen en cuenta la sensibilidad mínima de detección del sistema, y esto puede dar lugar sin duda a la presentación de resultados y conclusiones erróneas. Por ejemplo, los resultados negativos de detección bacteriana en placas de ateroma

obtenidos por otros autores (101, 34, 102) encuentren una explicación en el método utilizado y no en la ausencia de las bacterias en las muestras. Sin embargo, hay algunos autores que sí reportan este dato, como por ejemplo, Zaremba y cols (100), los cuales establecen una sensibilidad mínima de detección de 10^3 células bacterianas en las placas de ateroma, dato que coincide con nuestros resultados y el grupo de Romano y Aimetti (101) obtuvieron un nivel de sensibilidad de 10^2 células bacterianas. La similitud de la sensibilidad de nuestro sistema avala la calidad de nuestros resultados y permitirá poder comparar de manera más rigurosa los resultados obtenidos por ambos grupos.

En la Tabla 7.1 se puede observar un cuadro comparativo de los estudios publicados hasta la fecha que han querido reforzar la hipótesis de la vía directa entre la enfermedad periodontal y la aterosclerosis. De estos seis estudios publicados, tres de ellos (101, 34, 102) no detectaron ADN bacteriano en las placas de ateroma utilizando PCR como método diagnóstico molecular, habiendo detectado varias de las bacterias de estudio en las muestras subgingivales.

Autores	N=	Exploración		Muestra biológica	Método diagnóstico
		Médica	Periodontal	Detección simultánea en ateroma y bolsa periodontal	
Ishihara y cols, 2004 (33)	51		Sondaje antes cirugía	<i>T.d</i> , <i>P.g</i> , <i>T.f</i> , <i>C.r</i> , <i>A.a</i>	1
Cairo y cols, 2004 (34)	40		Sondaje antes cirugía, RX		1
Padilla y cols, 2006 (36)	12		Sondaje antes cirugía, BI, Rx	<i>A.a</i>	2
Zaremba y cols, 2007 (100)	20	%neutrófilos, nºcélulas blancas	BI, sondaje antes cirugía	<i>P.g</i> , <i>T.d</i> , <i>T.f</i> , <i>F.n</i> , <i>C.r</i> , <i>P.i</i> , <i>E.c</i> , <i>A.a</i>	3
Romano y cols, 2007 (101)	18	Tabaco, HTA, DM, ECV	Sondaje antes cirugía		1
Aimetti y cols, 2007 (102)	33			<i>T.f</i> , <i>P.g</i> , <i>T.d</i> , <i>P.i</i> , <i>A.a</i>	2
Los autores (2009)	31		Sondaje antes cirugía, cuestionario médico, hemograma, hisología	<i>F.n</i> , <i>T.f</i> , <i>P.g</i> , <i>P.i</i> , <i>A.a</i>	4

T.f: *T. forsythia*, *P.g*: *P. gingivalis*, *A.a*: *A. actinomycetemcomitans*, *P.i*: *P. intermedia*, *F.n*: *F. nucleatum*, *T.d*: *T. denticola*, *C.r*: *C. rectus*, *E.c*: *E. corrodens*, *P.n*: *P. nigrescens*

Los resultados que han mostrado ser estadísticamente significativos están marcados en **negrita**.

Método diagnóstico 1: PCR, 2: Cultivo y PCR, 3: hibridación de DNA, 4: *nested* PCR

Tabla 7.1 Estudios que analizan la detección simultánea de periodontopatógenos en las bolsas periodontales y placas de ateroma de los mismos pacientes.

Primera columna: se observan por orden cronológico los grupos de investigación que han realizado los estudios. **Segunda columna:** tamaño muestral de cada uno de los estudios. **Tercera columna:** variables médicas y/o periodontales recogidas de la población de estudio. **Cuarta y quinta columna:** periodontopatógenos detectados simultáneamente en las placas de ateroma y bolsas periodontales. **Sexta columna:** método diagnóstico empleado para el análisis molecular.

Análisis de la población bacteriana en bolsas periodontales y placas de ateroma

Respecto a las frecuencias de bacterias encontradas en las bolsas periodontales de nuestra población, las más predominantes fueron *F.n*, *T.f* y *P.g* y las menos frecuentes fueron *A.a* y *P.i*. Algunos autores presentan *A.a* como la bacteria de mayor prevalencia en las bolsas periodontales (34), contradiciendo los resultados aportados por este trabajo. Sin embargo, la frecuencia de *A.a* detectada es similar a las presentadas por la mayoría de autores (33, 36, 100, 101, 102). Por otra parte, cabe remarcar que la baja presencia de *A.a* y *P.i* en las bolsas periodontales puede deberse a las características de la población de estudio. Todos los pacientes de nuestra población tenían periodontitis crónica y *A.a* es una bacteria que según estudios de cohortes y experimentales (103, 104) está más asociado a la periodontitis agresiva localizada y *P.i* a mujeres, sobretodo embarazadas, debido a su posible asociación a cambios hormonales (105).

En el caso de los resultados obtenidos en las muestras de placas de ateroma, la bacteria más frecuente ha sido *A.a*, seguida por *P.g*, *F.n*, *T.f* y *P.i*. Este resultado difiere parcialmente de los obtenidos por Zaremba y cols (100), quienes observaron que las bacterias predominantes en las placas de ateroma fueron *P.g*, *T.f* y *F.n*, siendo la menos frecuente *A.a*. Esta aparente contradicción puede explicarse por la metodología empleada por el grupo de Zaremba y cols y la sensibilidad de detección que establecieron concretamente para *A.a*, la cual también mostró ser la menos frecuente en las bolsas periodontales de sus pacientes de estudio.

¿Podemos explicar la asociación entre la aterosclerosis y la periodontitis a través de una vía directa?

La simultaneidad de la presencia de una determinada bacteria en dos localizaciones tan alejadas como son la boca y la arteria carótida es un resultado que refuerza la hipótesis de la vía directa. Aunque con menos fuerza, la ausencia simultánea en ambas localizaciones también refuerza dicha hipótesis. En nuestro estudio encontramos un alto porcentaje de simultaneidad de *F.n*, *T.f* y *P.g*. y un bajo porcentaje en el caso de *P.i* y *A.a*. Los resultados fueron estadísticamente significativos para *T.f* y

F.n (p valor ≥ 0.1) y no para *P.g*, a pesar de la alta frecuencia de esta bacteria encontrada en ambas localizaciones. Es la primera vez que se describe un resultado estadísticamente significativo entre la presencia de *F.n* y *T.f* en bolsas periodontales y placas de ateroma, por lo que desde este trabajo se propone a estas dos bacterias como elementos clave en la asociación de la vía directa.

Comparando los porcentajes de bacterias encontrados en cada localización, los resultados esperados serían que en las bolsas periodontales fueran mayores a los obtenidos en las placas de ateroma, ya que el nicho primario de las bacterias periodontopatógenas es la cavidad oral. Sin embargo, nuestros resultados muestran que las proporciones de *A.a*, *P.g* y *P.i*, en la placa de ateroma fueron más elevadas que las encontradas en las bolsas periodontales. Estos resultados no esperados para estas tres bacterias nos plantean tres posibles hipótesis que den una explicación razonable: *diferencias en el método de análisis, producción de una bacteriemia* durante el proceso de sondaje o existencia de un *reservorio bacteriano*.

Hipótesis de método de análisis diferente. Por “diferencias en el método de análisis” se entiende a la variación de la técnica de PCR empleada para la detección molecular en placas de ateroma respecto a las bolsas periodontales. Los niveles de sensibilidad entre ambas localizaciones diferían en 10^2 células, aunque hay que tener en cuenta que, en caso de que el método fuera una limitación, las proporciones de las cinco bacterias de estudio hubieran diferido de manera proporcional entre ambas localizaciones, y no sólo en el caso de *A.a*, *P.g* y *P.i*.

Hipótesis de bacteriemia. Al haber realizado la exploración periodontal previa a la extirpación de la placa de ateroma, existe la posibilidad de que se produjera una bacteriemia benigna. Sin embargo, existen estudios que demuestran que este efecto es cuantitativamente muy bajo (106, 107). Además hay que tener en cuenta que de haberse producido una bacteriemia, los porcentajes de bacterias encontrados en las placas de ateroma deberían ser más bajos en relación a los encontrados en las bolsas periodontales.

Hipótesis de reservorio. Entendemos como “reservorio” a una localización donde hay una determinada carga bacteriana, la cual condiciona la presencia de bacterias en otra localización alejada de la primera. Parece que la carga bacteriana de *T.f*, *P.g* y *F.n* en las bolsas periodontales puede actuar como reservorio de la colonización en las placas de ateroma, es decir, que una vez estas bacterias han colonizado las

placas de ateroma, requieren de un *input* continuo procedente de las bolsas periodontales para persistir en las placas ateromatosas. De hecho, Epstein (112) ya lanzó esta hipótesis pero sin concretar las especies bacterianas. En el caso de *A.a* y *P.i*, además de ser bacterias que no están asociadas de manera directa con la periodontitis crónica (103, 104) y que pueden estar influidas por la localización geográfica de la población, puede ser que sus mecanismos patogénicos sean más agresivos y una vez colonizan a placa de ateroma, no requieran de la presencia de un reservorio en las bolsas periodontales para permanecer en la placa de ateroma. Esta especulación, compatible con los resultados presentados en este Tesis Doctoral, necesitaría de experimentos bien diseñados para ser confirmada con propiedad.

En términos generales, comparando los resultados obtenidos en nuestra población de estudio (n=31) con los obtenidos en otras poblaciones, observamos que sigue patrones similares. Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos por Ishihara y cols (33) y Zaremba y cols (100), ya que detectamos las mismas bacterias analizadas tanto en las bolsas periodontales como en las placas de ateroma. Cairo y cols (34), sólo pudieron demostrar una simultaneidad bacteriana en ambas localizaciones en el caso de *A.a*. Sin embargo, nuestros resultados difieren del resto de autores en cuanto a la significancia estadística reportada en el caso de *F.nucleatum*, y *T.forsythia* en ambas localizaciones ($p < 0.1$). Padilla y cols (36) y Zaremba y cols (100) identificaron simultáneamente en ambas localizaciones todas o algunas de las bacterias que analizaron, pero sin demostrar una asociación estadísticamente significativa. Ishihara y cols (33), demostraron la presencia simultánea de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* y *T.forsythia* en ambas localizaciones, sin embargo sólo *P.gingivalis* mostró una relación estadísticamente significativa.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro estudio soportan la idea de que la colonización bacteriana en las placas de ateroma puede estar condicionada por un reservorio localizado en las bolsas periodontales y que no está restringida únicamente a *P.gingivalis*, como propone Ishihara y cols (33), sino que también depende de la colonización periodontal de *F.n* y *T.f*.

¿Se puede establecer una relación a través de una vía indirecta?

La periodontitis y la aterosclerosis podrían estar relacionadas a través de una vía indirecta debido a que comparten factores de riesgo que afectan de manera negativa sobre ambas patologías.

Una novedad aportada por este trabajo es la detección fuerte asociación entre los niveles de glucosa en sangre y la presencia de *P.intermedia* ($p < 0.1$) en las placas de ateroma. Dicha asociación, nos induce a hipotetizar que un entorno rico en glucosa puede ayudar a que esta bacteria de origen oral pueda persistir fácilmente en el endotelio vascular. No existen estudios previos que corroboren esta hipótesis, pero diversos trabajos (13, 108, 109) han demostrado una relación bidireccional entre la periodontitis y la *diabetes mellitus*. Por otro lado, estudios de referencia (109, 110) han demostrado que las mujeres embarazadas con diabetes gestacional tienen mayor riesgo a desarrollar periodontitis que las mujeres sin diabetes gestacional, además *P.intermedia* está frecuentemente asociado a cambios hormonales. Así pues, existen evidencias indirectas que concentraciones elevadas de glucosa en sangre pueden influir en el metabolismo y los mecanismos patogénicos de algunas bacterias de origen oral.

Otro hallazgo importante de este estudio fue la fuerte asociación entre la detección de las cinco bacterias de estudio en las placas de ateroma y la presencia de valores aumentados de índice de sangrado gingival y de linfocitos en sangre. Hay que tener en cuenta, que el sangrado al sondaje es el signo patogneumónico de inflamación gingival y que el patrón inflamatorio que se encontró más frecuentemente en las placas de ateroma de nuestra población fue el “agudo”, indicando la presencia de una reacción local inflamatoria en las placas de ateroma. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Zaremba y cols (100), quienes encontraron valores de índice de sangrado al sondaje en pacientes con bacterias en las placas de ateroma y no hallaron diferencias en los niveles de neutrófilos en sangre. Estos resultados refuerzan la hipótesis de la vía indirecta por la que la presencia de una inflamación crónica de bajo grado pero persistente producida por la presencia de una periodontitis no controlada, puede tener un efecto negativo, a distancia, sobre el endotelio vascular y sobre el desarrollo de la aterosclerosis, debido al ataque recurrente de mediadores inflamatorios sistémicos (111, 112), creando una respuesta aguda a nivel local que favorece el crecimiento de la placa de ateroma. Si embargo, no se pueden tomar conclusiones al respecto y es necesario confirmar estas hipótesis con mayor número de estudios diseñados con este fin.

Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos, este refuerza ambas hipótesis de vía directa e indirecta debido a la detección simultánea de DNA bacteriano en las placas de ateroma y bolsas periodontales y a la relación entre la detección bacteriana y el componente inflamatorio. Por otra parte, este estudio permite hipotetizar el siguiente modelo de patogenia: la carga periodontal de *F.nucleatum*, *T.forsythia* y *P.gingivalis* puede actuar de reservorio para el ambiente microbiológico de las placas de ateroma, influyendo en el desarrollo de la aterosclerosis. Además, es posible que una vez *A.actinomycetemcomitans* y *P.intermedia* han colonizado el endotelio vascular, serían capaces de persistir allá durante un largo periodo de tiempo, quizás ayudadas por la persistencia de niveles elevados de glucosa.

El modelo de patogenia entre la aterosclerosis y la periodontitis presentado a continuación (Figura 7.1) pretende ser un resumen de las hipótesis aportadas por esta Tesis Doctoral.

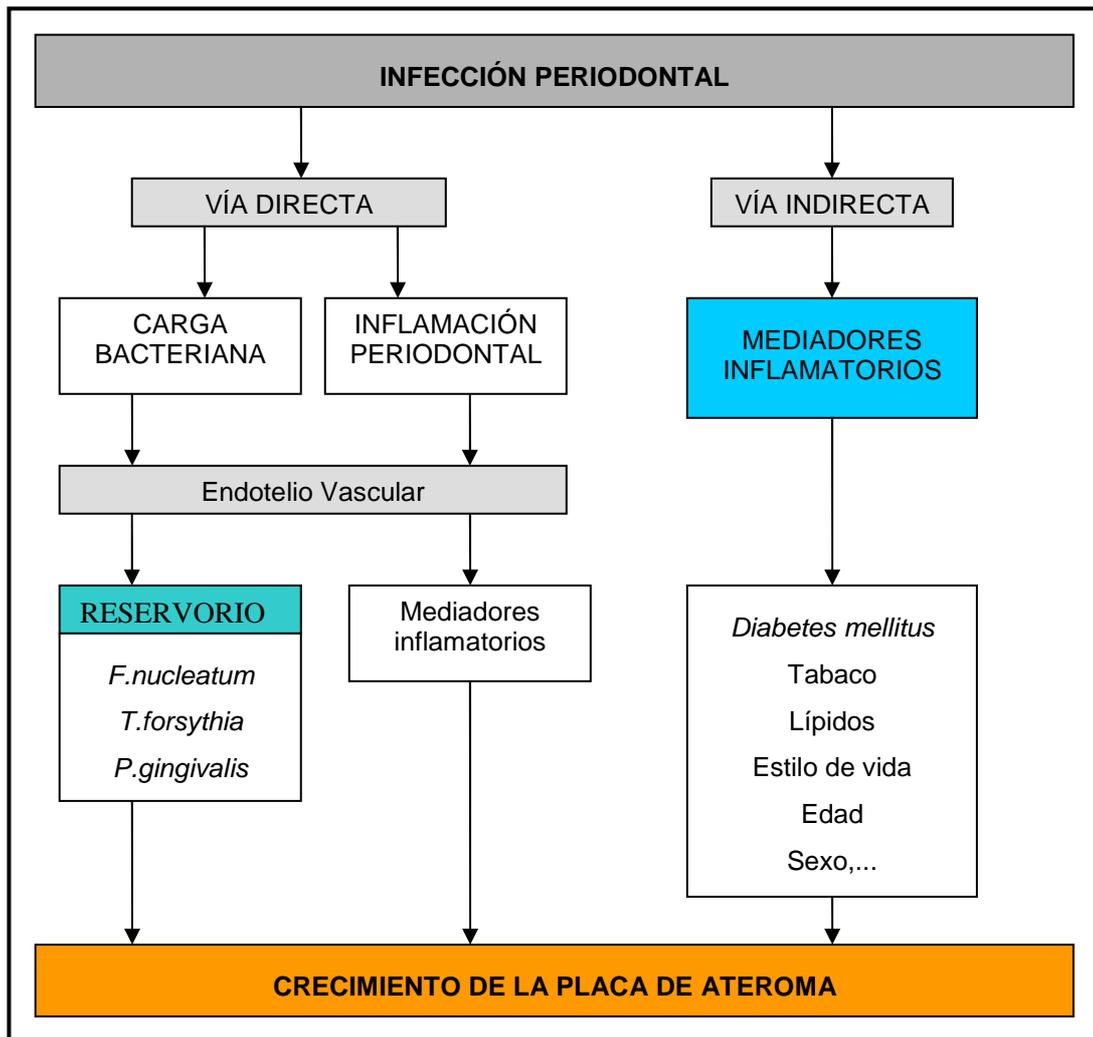


Figura 7.1 Modelo experimental de asociación entre la aterosclerosis y la periodontitis.

La presencia de una carga bacteriana elevada de *F. nucleatum* y *T. forsythia* en las bolsas periodontales favorece el crecimiento de la placa de ateroma a través de la vía directa, ya que una vez estas bacterias han colonizado la placa de ateroma, permanecen allí, estimulando factores inflamatorios locales.

La inflamación crónica a nivel del periodonto estimula la liberación de mediadores inflamatorios al torrente sanguíneo, favoreciendo así el crecimiento de la placa de ateroma a través de la vía indirecta.

Una concentración de glucosa elevada en sangre (glucemia) favorece el crecimiento de *P.gingivalis* en la placa de ateroma, una vez esta bacteria ha colonizado a distancia.

8. CONCLUSIONES

Con los objetivos planteados y los resultados obtenidos en este estudio podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. El método de diagnóstico molecular de *nested* PCR es un método válido para el análisis microbiológico de las placas de ateroma, ya que ofrece un nivel de sensibilidad que permite detectar bajas cargas bacterianas del orden de 10^3 células bacterianas, disminuyendo así el número de resultados falsos negativos.
2. La detección simultánea de DNA bacteriano de *Pg*, *Tf*, *P.i*, *F.n* y *A.a* en placas de ateroma y bolsas periodontales de los mismos pacientes refuerza la hipótesis de una relación a través de una vía directa entre la periodontitis y la aterosclerosis.
3. Existe una fuerte relación entre la presencia de *F.n* y *T.f* en bolsas periodontales y placas de ateroma. Parece que estas dos bacterias pueden tener un papel clave en la progresión de la aterosclerosis.
4. Existe una relación moderada o fuerte entre valores aumentados de linfocitos, índice de sangrado, triglicéridos, y colesterol HDL con la detección de bacterias periodontopatógenas en las placas de ateroma. Estos resultados refuerzan la hipótesis de asociación entre la aterosclerosis y la periodontitis a través de una vía indirecta.
5. Existe una fuerte asociación entre valores aumentados de glucosa en sangre y la detección de *P.i* en las placas de ateroma.
6. Los resultados obtenidos en nuestra población de estudio son parecidos a los obtenidos en otras poblaciones con periodontitis crónica y de otras localizaciones geográficas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. The world health report 2007: a safer future. Global Public Health Security in the first 21st Century. Geneva:WHO,2007:1.
2. Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal disease in Europe. *Periodontol 2000* 2002;29:104-21.
3. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol and Infect* 2007;13(s4):3-10.
4. Ebersole JL, Cappelli D, Mott G, Kesavalu L, Holt S, Singer R. Systemic manifestations of periodontitis in the non-human primate. *J Periodontol Res* 1999;34:358-62.
5. Madianos P, Offenbacher S, Beck J, Williams R (1999). The concept of "Risk" and the Emerging Discipline of periodontal Medicine. *J Contemp Dent Pract* 1:1-18.
6. Armitage GC. Classifying periodontal diseases- a long –standing dilemma. *Periodontol 2000*. 2002; 30: 9-23.
7. Loesche W, Schork A, Terpenning M, Chen Y, Dominguez L, Grossman N. Assessing the relationship between dental disease and coronary heart disease in elderly U.S veterans: *J Am Dent Assoc* 1998;129:301-11.
8. Seymour R, Steele J. Is there a link between periodontal disease and coronary heart disease? *Br Dent J* 1998;184:33-8.
9. Kinane DF. Periodontal disease's contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms. *Ann Periodontol* 1998;3(1):142-50.
10. Emingil G, Buduneli E, Aliyev A, Akili A, Atilla G. Association between periodontal disease and cute myocardial infarction. *J Periodontol* 2000;71:1882-6.
11. Mattila K, Asikainen S, Wolf J, Jousimies-Somer H, Valtonen V, Nieminen M. Age, dental infections, and coronary heart disease. *J Dent Res* 2000;79:756-60.
12. Scannapieco FA, Wang B, Shiau HJ. Oral bacteria and respiratory infection: Effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell proinflammatory cytokine production. *Ann Periodontol* 2001;6:78-86.

13. Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG et al. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *J Periodontol* 1996;67:1085-1893.
14. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann WG, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, Nauck M, Kocher T. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 2009 Sep;36(9):765-74.
15. Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS et al. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *JADA* 2001;132:875-880.
16. Cruz SS, Costa MD, Gomes-Filho IS, Rezende EJ, Barreto ML, Dos Santos CA, Vianna MI, Passos JS, Cerqueira EM. Contribution of periodontal disease in pregnant women as a risk factor for low birth weight. *Community Dent Oral Epidemiol* 2009 Aug 20. *In press*.
17. Cutler C, Schinedling E, Nunn M, Jotwani R, Kim B, Nares S et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol* 1999;70:1429-1434.
18. Goodson JM, Groppo D, Halem S, Carpino E. Is obesity an oral bacterial disease? *J Dent Res* 2009 Jun;88(6):519-23.
19. Weynat RJ, Pearlstein ME, Churak AP et al. The association between osteopenia and periodontal attachment loss in older women. *J Periodontol* 1999;70:982-991.
20. España F, Vicente V y cols. XLVII Reunión nacional de la AEHH y XXI Congreso Nacional de la SETH. *Haematologica* (Ed. española 2005;90(Suppl 1): 293-318.
21. Beck J, Offenbacher S. Oral health systemic disease: periodontitis and cardiovascular disease. *J Dent Educ* 1998: 62:859-70.
22. Lowe G. Etiopathogenesis of cardiovascular disease: hemostasis, thrombosis and vascular medicine: *Ann Periodontol* 1998;3, 121-6.
23. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ and De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol* 2001;72(9):1221-1227.

24. Fridlender ZG, Khamaisi M, Leitersdorf E. Association between cytomegalovirus infection and venous thromboembolism. *Am J Med Sci*. 2007 Aug;334(2):111-4.
25. Micieli E, Dentali F, Giola M, Grossi P, Venco A, Ageno W. Venous and arterial thrombosis in patients with HIV infection. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007 Apr;18(3):259-63.
26. Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, Offenbacher S, Ridker PM, Van Dyke TE, Roberts WC. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editor's Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J Periodontol* 2009;80:1021-32.
27. Amar S, Han X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. *Med Sci Monit* 2003;9(12):RA291-299.
28. Haraszthy V, Zambon J, Trevisan M, Genco R. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000 71:1554-1560.
29. Okuda K, Ishihara K, Nakagawa T, Hirayama A, Inayama Y, Okuda K. Detection of *T.denticola* in atherosclerotic lesions. *J Clin Microbiol* 2001;39:1114-1117.
30. Taylor-Robinson D, Aduse-Opoku J, Sayed P, Slaney JM, Thomas BJ, Curtis MA. Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* 2002;21:755-757.
31. Mastragelopolus N, Haraszthy VI, Zambon JJ, Zafiropoulos GG. Detection of periodontal pathogenic microorganisms in atheromatous plaque. Preliminary results. *Chirurg* 2002;73:585-591.
32. Stelzel M, Conrads J, Pankuweit S, Miash B, Vogt S, Moosdorf R et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in aortic tissue by PCR. *J Periodontol* 2002;73:868-870.
33. Ishihara K, Nabuchi A, Ito R, Miyachi K, Kuramitsu HK, Okuda K. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in carotid coronary stenotic artery plaques and in dental plaque samples. *J Clin Microbiol* 2004;42:1313-1315.

34. Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, Oggioni MR, Pratesi C, Pini Prato GP, Pozzi G. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. *J Periodont Res* 2004;39:442-446.
35. Fiehn NE, Larsen T, Christensen N, Holmstrup P, Schroeder T. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol* 2005;76:731-736.
36. Padilla C, Lobos O, Hubert E, González C, Matus S, Pereira M, Hasbun S, Descouvieres C. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2006;41:350-353.
37. Ortega L, Fernández J, Durán G. Enfermedad coronaria aguda: consideraciones diagnósticas y terapéuticas actuales. *Resumed* 2001;14(4):162-75.
38. Klein LW. Clinical implication and mechanisms of plaque rupture in the acute coronary syndromes. *Am Heart Hosp J* 2005;3(4):249-55.
39. Rossi A, Franceschini L, Fusaro M, Cicoira M, Eleas AA, Golia G et al. Carotid atherosclerotic plaque instability in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2005.
40. Kannel WB. The Framingham Study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *J Genet Specif Med* 2002;5(2):27-37.
41. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW. Markers of Inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Diseases Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
42. D'Aiuto F, Ready D, Tonetti MS. Periodontal disease and C-reactive protein associated cardiovascular risk. *J Periodontol Res* 2004; 39:236-241.
43. Ross R. Atherosclerosis and inflammatory disease. *N Engl Med* 1999;340:115-26.
44. Simón A, Castro A, Kaski JC. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* 2001;54: 211-7.

45. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Hafner G, Meyer J. The role of inflammation and infection in the acute coronary syndrome. *Herz* 2001;26(1):9-18.
46. Beckman JA, Creager MA, Libby P. 2002 May 15;287(19):2570-81. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management.
47. Guardamagna O, Abello F, Saracco P, Baracco V, Rolfo E, Pirro M. Atherosclerosis. 2009 Jun 11. Endothelial activation, inflammation and premature atherosclerosis in children with familial dyslipidemia.
48. Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J, Badimon JJ. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 2003 Feb 25;107(7):973-7.
49. Lip GY, Blann AD, Jones AF, Lip PL, Beevers DG. Relation of endothelium, thrombogenesis, and hemorheology in systemic hypertension to ethnicity and left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol*. 1997 Dec 15;80(12):1566-71.
50. Johnson JL, Baker AH, Oka K, Chan L, Newby AC, Jackson CL et al. Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation* 2006;113(20):2435-44.
51. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:13-8.
52. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high risk plaque: part 1: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(6):937-54.
53. Rao DS, Goldin JG, Fishbein MC. Determinants of plaque instability in atherosclerotic vascular disease. *Cardiovasc Pathol* 2005;14(6):285-93.
54. Mattila KJ, Valtonen VV, Nieminen MS, Asikainen S. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke. *Clin Infect Dis* 1998; 26:719-734.
55. Gayet A, Baril L, Orfila J. The relationship between Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Presse Med* 2001;30(36):1792-801.

56. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Hafner G, Meyer J. The role of inflammation and infection in the acute coronary syndrome. *Herz* 2001;26(1):9-18.
57. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63:322-31.
58. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183:3770-83.
59. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr.RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
60. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; 28: 12-55.
61. Listgarten MA. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *J Periodontal Res* 1987;22:172-178.
62. Irfan UM, Dawson DV, Bissada NF. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. *J Int Acad Periodontol* 2001;3(1):14-21.
63. Llodra JC, Bravo M and Cortés FJ. Encuesta de Salud Oral en España (2000). *RCOE*; 2002; 7:19-63.
64. Offenbacher S, Medianos P, Champagne C, Southerland J, Paquette D, Williams R et al. Periodontitis-atherosclerosis syndrome: an expanded model of pathogenesis. *J Periodont Res* 1999;34:146-52
65. Geismar K, Stoltze K, Sigurd B, Gyntelberg F and Holmstrup P. Periodontal Disease and coronary Heart Disease. *J Periodontol* 2006;77(9): 1547-54.
66. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandines in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1997;14:112-143.
67. Kornmann KC, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: Assembling the players. *Periodontol 2000* 1997;14:33-53.
68. Ide M, Jagdev D, Coward P, Crook m, Barclay R, and Wilson R. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating

levels of endotoxin, C-reactive protein , tumor necrosis factor- α , and interleukin-6. *J Peirodontol* 2004; 75(3): 420-428.

69. Katz J, Chaushu G, Sharabi Y. On the association between Hypercolesterolemia, cardiovascular disease and severe periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001;28:865-8.
70. Koenig W. Heart disease and the inflammatory response. *BMJ* 2000;321(7255):187-8.
71. Joshipura KJ, Rimm EB, Douglas CW, Trichopoulos D, Ascherio A and Willett WC. Poor Oral Health and coronary heart disease. *J Dent Res* 1996;75:1631-36.
72. Chiu B, Viira E, Tucker W, Fong IW. Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus and Herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1997;96:2144-8.
73. Patel P, Mendall M, Carrington D, Strachan D et al. Association of Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *Br Med J* 1995;311:711-4.
74. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2983-6.
75. Meurman JH, Sanz M, Janket S. Oral Health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(6):403-13.
76. Fong I.W Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. *JADA* 2002;(133):7s-13s.
77. Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1965;58:295-300.
78. Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, Derouen TA. Examining the link between coronary heart disease and the elimination of chronic dental infections. *JADA* 2001;132:883-89.
79. Violant D, Clotet J (Junio 2008). Detección de patógenos periodontales en placas de ateroma carotídeas humanas [Trabajo de suficiencia investigadora], Universitat Internacional de Catalunya.
80. Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compendium* 1994;S684-688.

81. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* 1997;23(7):433-8.
82. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2004; 34: 49-56.
83. Conrads G. DNA probes and primers in dental practice. *Clin Infect Dis* 2002;35 (Suppl 1):S72-7.
84. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J (1996) Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11: 266-273.
85. Watanabe K, Frommel TO. Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans and Treponema denticola detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. *J Clin Periodont* 1996;23:212-219.
86. http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa.
87. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20 (suppl 2):S304-S307.
88. Schmidt T, Relman DA. Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences. *Methods Enzymol* 1994;235:205-222. (cit. en Ashimoto et al. 1996).
89. Roper C, Elhassan I, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, Satti G, Theander T and Arnot D. Detection of very low level Plasmodium falciparum infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54:325-331.
90. Adserías MJ, Clotet J (2007) Detección molecular de periodontopatogenos [Tesis doctoral], Universitat Internacional de Catalunya.

91. Gaydos CH, Quinn Th. and Eiden JJ. Identification of Chlamydia pneumoniae by DNA Amplification of the 16S rRNA Gene. *J Clin Micro* 1992;**30**:796-800.
92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>
93. <http://rdp.cme.msu.edu/>
94. <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>
95. Stevens A, Lowe J. Texto y Atlas de Anatomía patológica. ISBN: 84-8174-135-3. edición española. Pág 52-57.
96. Shipley B (1999) Testing causal explanations in organismal biology: causation, correlation and structural equation modeling. *Oikos* **86**: 374-382.
97. Löe H (1967) The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* **38**:610 (supplement).
98. Amabile N, Susini G, Pettenati-Soubayroux I, et al. Severity of periodontal disease correlates to inflammatory systemic status and independently predicts the presence and angiographic extent of stable coronary artery disease. *J Intern Med* 2008;**263**:644-652.
99. Mattila K, Vesanen M, Valtonen V, Nieminen M, Palosuo T, Rasi V, Asikainen S. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. *BMC Infect Dis* 2002 Dec 10;**2**:30.
100. Zaremba M, Górska R, Suwalski P, Kowalski J. Evaluation of the incidence of periodontitis -associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol* 2007;**78**:322-327.
101. Romano F, Barbui A, Aimetti M. Periodontal pathogens in periodontal pockets and in carotid atheromatous plaques. *Minerva Stomatol* 2007;**56**:169-179.
102. Aimetti M, Romano F, Nessi F. Microbiological analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2007;**78**:1718-1723.
103. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;**36**(9):739-49.
104. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and

its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24(4):299-303.

105. Gürsoy M, Haraldsson G, Hyvönen M, Sorsa T, Pajukanta R, Könönen E. Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(4):299-303.
106. Kinane DF, Riggio MP, Walker KF, MacKenzie D, Shearer B. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol* 2005;32(7):708-13.
107. Bahrani-Mougeot FK, Thornhill M, Sasser H, Marriott I, Brennan MT, Papagerakis S, Coleman S, Fox PC, Lockhart PB. Systemic host immuno-inflammatory response to dental extractions and periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(4):534-41.
108. Thorstensson H, Dahlén G, Hugoson A. Some suspected periodontopathogens and serum antibody response in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol* 1995;22:449-458.
109. Novak KF, Taylor GW, Dawson DR, Ferguson JE 2nd, Novak MJ. Periodontitis and gestational diabetic mellitus: exploring the link in NHANES III. *J Public Health Dent* 2006;66:163-168.
110. Friedlander AH, Chaudhuri G, Altman L. A past medical history of gestational diabetes: its medical significance and its dental implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:157-163.
111. Tonetti MS. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J Clin Periodontol* 2009;36:15-19.
112. Epstein SF. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course. *Circ Res* 2002;90:2-4.

10. ANEXOS



Av. Josep Molins, 29-41
08906 L'Hospitalet de Llobregat
Tel. 93 333 00 97
fax 93 552 05 27

La Comisión de Investigación del Consorci Sanitari Integral hace constar que el proyecto titulado **“Evaluación clínica, microbiológica e histológica de la asociación entre la aterosclerosis y la enfermedad periodontal”**, presentado por la doctoranda Deborah Violant Holz (Universitat Internacional de Catalunya) y dirigido por el Dr. Oriol Lapidra (Servicio de Cirugía Vascular, Hospital General de l'Hospitalet), se considera viable bajo las condiciones estipuladas en la memoria del mismo.



MMMB

Dra. Montserrat Martín-Baranera
Presidente de la Comisión de Investigación

L'Hospitalet de Llobregat, 16 de abril de 2008

Anexo2. Hoja de información para el paciente

Mediante este estudio se quiere evaluar si los pacientes que han de ser sometidos a cirugía vascular por aterosclerosis tienen una mayor predisposición a la enfermedad periodontal y en su caso, si existe alguna relación entre su enfermedad sistémica y enfermedad periodontal.

Los pacientes que quieran formar parte de este estudio de manera voluntaria deberán permitir al investigador que firma al final de este documento que:

- Realice un cuestionario de salud general y dental
- Que tome una muestra de la placa bacteriana de su boca para poderla analizar
- Que analice microbiológicamente e histológicamente la placa de ateroma extraída.
- Que acceda a los datos de la analítica de sangre realizada antes y después de la cirugía vascular.

La recogida de datos y procedimientos médicos que se requieren para realizar este estudio no suponen ningún acto médico añadido ni riesgo para el paciente.

Se garantiza la total confidencialidad de los datos.

La persona que forme parte del estudio lo hace de manera totalmente voluntaria.

Se informará al paciente de cualquier dato que a ella le corresponda si así lo desea.

Para resolver cualquier duda, puede llamar a la Clínica Universitaria Odontológica de la Universidad Internacional de Cataluña (93-5042030) y pregunte por Deborah Violant. Deje su número de teléfono y motivo de la llamada; me pondré en contacto con usted lo más brevemente posible.

Agradecemos su colaboración.

Investigadora secundaria:
Deborah Violant Holz

Paciente:

Anexo 3. Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,....., con
D.N.I:.....

Con residencia en la calle:.....

Y nº de teléfono:....., he sido informado de manera oral y escrita de las características del estudio que lleva por título:

“Evaluación clínica, microbiológica e histológica de la asociación entre la aterosclerosis y la enfermedad periodontal”.

Entiendo que participo de manera voluntaria en este estudio y que no estoy sometido a ningún riesgo añadido al que la propia cirugía prescrita por mi médico supone.

Doy permiso para que el investigador principal tome una muestra de placa bacteriana de mi boca y pueda analizarla, juntamente con la placa de ateroma que será extraída por mi cirujano responsable.

Asimismo doy permiso para que el investigador principal tenga acceso a los datos derivados del análisis de sangre y de la placa de ateroma.

Firma del paciente:

Firma de investigador:

Anexo 4. Hoja de recogida de datos médicos y periodontales

FECHA					
Nº HISTORIA					
APELLIDOS					
NOMBRE					
EDAD (años)	<30	31-40	41-50	51-60	>60
SEXO	mujer			hombre	
Nivel Socioeconómico	Bajo		Moderado	Alto	
Hábitos de Higiene Oral	Frecuencia del cepillado				
	Colutorio			SÍ	NO
	Interdental			SÍ	NO
PESO					
ALTURA					
I.M.C (índice masa corporal)					
ACTIVIDAD FÍSICA	NUNCA		EVENTUAL	REGULAR	
	LEVE		MODERADA	INTENSA	
FUMADOR	NO	SÍ		EX-FUMADOR ¿Años?	
Nº Cigarrillos/día	<10		>10		
¿Hace cuánto fuma?	<5	5-10		>10	
OTRAS ENFERMEDADES SISTÉMICA	NO			SÍ	
				Diabetes Mellitas	Sí No
				Hiperlipidemia	Sí No
				Insuficiencia renal	Sí No
				Hipertensión	Sí No
				Otras	Sí No
MEDICACIÓN	NO			SÍ	
¿Última dosis?				AINE's	Sí No
				INMUNOSUPRESORES	Sí No
				ANTIBIÓTICOS (*)	Sí No
				Otros	Sí No
(*) última toma	<3 meses		> 3 meses		
ANTECEDENTES DE ECV	NO			SÍ	
				IAM	Sí No
				ATERECTOMÍA	Sí No
				OTROS	Sí No

¿HA RECIBIDO TRATAMIENTO PERIODONTAL	NO		SÍ	
TIPO DE TRATAMIENTO	Tartrectomía		Sí	No
	Raspado y alisado radicular		Sí	No
	Cirugía periodontal		Sí	No
	Mantenimiento		Sí	No
ÚLTIMA VISITA AL DENTISTA	<1 AÑO	1-5 AÑOS	5-10 AÑOS	>10 AÑOS
EXPLORACIÓN PERIODONTAL				
Nº dientes remanentes				
Diagnóstico	sano	gingivitis	periodontitis	
Extensión	localizada		generalizada	
Gravedad	leve	moderada	severa	
Tipo	crónica	agresiva	Asociada a enf. Sistémica	
EXPLORACIÓN RADIOGRÁFICA				
Pérdida ósea	ausente		presente	
Extensión	localizada		generalizada	
Gravedad	leve	moderada	severa	
Patrón	horizontal	vertical	combinado	
TOMA DE MUESTRA PLACA DENTAL				
Eco-Doppler				
Rx Tórax				
Presión sistólica				

Anexo 5. Periodontograma

Paciente: _____
 Historia N°: _____

P.P.A.R.A	I.S.		I.S.		I.S.		N. insercion	I.P.	I.P.	I.P.	Encia Adherida	Afectacion de Furcas	Movilidad	Pronostico
	V	L	V	L	V	L								
18	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
17	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
16	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
15	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
14	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
13	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
12	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
11	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
21	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
22	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
23	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
24	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
25	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
26	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
27	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
28	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
Ph	B	B	I	I	B	B	III	B	I	III	III	B	I	III
48	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
47	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
46	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
45	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
44	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
43	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
42	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
41	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
31	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
32	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
33	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
34	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
35	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
36	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
37	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
38	<input type="checkbox"/>		X	X	X									
FECHA	/	/	/	/	/	/								

