



ARTÍCULO CIENTÍFICO

Diagnóstico molecular de microorganismos periodontopatógenos en pacientes alcohólicos - fumadores con periodontitis crónica de la ciudad de Loja, Ecuador

Molecular diagnosis of microorganisms periodontopathogens in alcoholic - smoking patients with chronic periodontitis of the city of Loja, Ecuador

Diagnóstico molecular de microorganismos periodontopatogênicos em pacientes tabagistas com periodontite crônica na cidade de Loja, Equador

*Alexandra Johanna Aguilar Betancourt*¹; *Gustavo Tello*²; *Loidy Zamora Gutierrez*³; *Susana Patricia González Eras*⁴

RECIBIDO: 15/maz/2017 ACEPTADO: 19/abr/2018 PUBLICADO: 31/jul/2018

1. Odontóloga por la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Loja. Egresada del Postgrado de Rehabilitación Oral de la Universidad Central del Ecuador.
2. PhD en Odontopediatria por la Facultad de Odontología de la Universidad de São Paulo – Brasil; (FOUSP). Profesor-investigador coordinador de investigación del posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecuador.
3. Docente investigadora, Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja-Ecuador.
4. Odontóloga Especialista en Odontopediatria Universidad Central del Ecuador, Docente de la Carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Loja-Ecuador.

CORRESPONDENCIA

Alexandra Aguilar
Universidad Central del Ecuador,
Facultad de Odontología;
Av. America y Av. Universitaria
johalexa88@gmail.com



RESUMEN

Los pacientes alcohólicos y fumadores presentan mayor predisposición de desarrollar enfermedad periodontal. **Objetivo:** Determinar la presencia de los microorganismos periodontopatógenos: *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en pacientes alcohólicos fumadores con periodontitis crónica. **Materiales y métodos:** El universo fue de 31 pacientes de 18 y 62 años de edad de sexo masculino alcohólicos y/o fumadores en los cuales fueron excluidos aquellos que consumían algún tipo de droga, dando una muestra de 23 pacientes con bolsas periodontales \geq 6mm del Centro de Rehabilitación de la ciudad de Loja, Ecuador. Se realizó un examen periodontal completo y la toma de muestras en dos de los sitios más profundos de cada paciente. Las variables analizadas fueron: presencia de biofilm dental, sangrado al sondaje, profundidad al sondaje y nivel de inserción clínica. Los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5%. **Resultados:** La periodontitis crónica estuvo en el 52,1% de los pacientes de 18 a 30 años, siendo más susceptibles los alcohólicos de riesgo y fumadores leves. El 91,04 % de alcohólicos y fumadores se encuentran asociados con la presencia de biofilm dental ($p = 0,028$) y en el diagnóstico molecular el 41,18% de los pacientes presentan más de 3 microorganismos ($p = 0,039$). **Conclusión:** Se evidenció la presencia de los periodontopatógenos estudiados en pacientes alcohólicos fumadores con periodontitis crónica.

Palabras Claves: Periodoncia, Reacción en Cadena de la Polimerasa, *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

ABSTRACT

Alcoholic and smoking patients have a greater predisposition to develop periodontal disease. **Objective:** To determine the presence of microorganisms periodontopathogens: *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by Polymerase Chain Reaction (PCR), in alcoholic-smoking patients with chronic periodontitis. **Materials and methods:** The group was composed of 31 patients between the ages of 18 to 62-year-old, male alcoholics and/or smokers in which were excluded those who take some kind of drug, giving a sample of 23 patients with periodontal pockets \geq 6mm from the Center of Rehabilitation of the city of Loja, Ecuador. A full periodontal examination and the sample taking were in two of the most profound sites of each patient. The variables analyzed were: the presence of dental biofilm, bleeding on probing, probing depth and clinical attachment level. The data were analyzed with the Kruskal Wallis Test with a significance level of 5%. **Results:** The chronic periodontitis was in the 52.1% of the patients between the ages of 18 to 30 years old, is more susceptible in risky alcoholics-smokers and low smokers. The 91.04 % of alcoholics and smokers are associated with the presence of dental biofilm ($p = 0.028$) and in the molecular diagnosis the 41.18% of patients exhibit more than 3 microorganisms ($p = 0.039$). **Conclusion:** That observed presence of the periodontopathogens in alcoholic-smoking patients with chronic periodontitis.

Keywords: Periodontics, Polymerase Chain Reaction, *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

RESUMO

Os pacientes alcoólicos e fumantes apresentam uma possibilidade maior de desenvolver doença peridental. **Objetivo:** Determinar a presença do periodontopatógenos de microorganismos *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por meio da Reação em Cadeia de Polimerasa (PCR), em pacientes alcoólicos e fumantes com periodontite crônica. **Materiais e métodos:** O universo pertenceu a 31 pacientes de 18 e 62 anos de idade de sexo masculino alcoólicos e/ou fumantes nos quais foram excluídos aqueles que consumiram algum tipo de droga, tendo uma amostra de 23 pacientes com bolsas peridentais. 6mm do Centro de Reabilitação da cidade de Loja, Equador. Um exame periodontal completo e a amostragem foram realizados em dois locais profundamente localizados de cada paciente. As variáveis analisadas eram: presença de biofilm dental, sangrou ao sondaje, profundidade ao sondaje e nível de suplemento clínico. Os dados foram analisados com o teste de Kruskal Wallis com um nível de significância de 5%. **Resultados:** O periodontite crônico estava em 52,1% dos pacientes de 18 para 30 anos, enquanto sendo mais suscetível os alcoólicos de risco e fumantes ligeiros. 91,04% de alcoólicos e fumantes são associados com a presença de biofilm dental ($p = 0028$) e na diagnose 41,18% molecular dos pacientes apresenta mais de 3 microorganismos ($p = 0039$). **Conclusões:** A presença do periodontopatógenos foi comprovada nos pacientes alcoólicos e fumantes com periodontite crônico.

Palavras chave: Periodoncia, Reação em Cadeia de Polimerasa, *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.



INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es la inflamación más común de los tejidos de soporte y protección de los dientes, la cual es provocada por el biofilm dental y la respuesta inmune periodontal en un huésped susceptible creando su desequilibrio¹⁻⁴. La gingivitis como etapa inicial de esta enfermedad puede convertirse en una periodontitis más severa multifactorial y caracterizada por la formación de bolsas, la destrucción del hueso alveolar y la pérdida del nivel de inserción clínica^{1,2,5}. Entre los factores coadyuvantes de esta alteración tenemos el consumo de alcohol y tabaco, lo cual en la actualidad se consideran un problema de salud pública de creciente preocupación⁶⁻⁹. El abuso en este consumo afecta al individuo a nivel social, económico, psíquico, intelectual y particularmente a nivel de la salud bucal¹⁰⁻¹³.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió un informe sobre el consumo del alcohol, el cual indica que 2000 millones de personas en todo el mundo consumen alcohol y 76.3 millones tienen algunas complicaciones inducidas^{12,13}. El Ecuador, es una de las naciones que más alcohol ingiere con un índice de 7,2 % según informe del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) en el año 2012¹⁴, y mueren a causa del consumo del tabaco aproximadamente 4 mil personas al año^{15,16}. En la ciudad de Loja, el consumo del alcohol es del 20,86% y de tabaco es un 23%¹⁴.

El World Workshop del Clinical Periodontics, 1989¹⁷ fue descrito que los colonizadores primarios son principalmente bacterias Gram-positivas (cocos y bacilos) unidos a antígenos de las proteínas de la saliva. Transcurridas cuatro horas después de una profilaxis profesional, en la superficie dental del 60 al 90% se coloniza por bacterias del género *Streptococcus*, el resto son bacterias colonizadoras y formadoras de biofilm oral (*Actinomyces spp*, *Veillonella spp*, *Capnocytophaga spp*, *Haemophilus spp*, *Propionibacterium spp*). Después de siete días el género *Streptococcus* es el predominante y dos semanas posteriores abundan colonizadores secundarios (bacterias Gram-negativas como *Fusobacterium nuclea-*

INTRODUCTION

Periodontal disease is the most common inflammation of the tissues that support and protect the teeth, which is caused by the dental biofilm and the periodontal immune response in a susceptible host by creating imbalance¹⁻⁴. The gingivitis as initial stage of this disease can become a more severe periodontitis multifactorial and characterized by the formation of bags, the destruction of the alveolar bone and the loss of the clinical attachment level^{1,2,5}. Among the factors of this alteration we have the consumption of alcohol and tobacco, which today are considered a public health problem of increasing concern⁶⁻⁹. The abuse in this consumption affects the individual socially, economically, psychologically, intellectually, and particularly at the level of oral health⁹⁻¹³.

The World Health Organization (WHO) issued a report on the consumption of alcohol, which indicates that 2000 millions of people around the world consume alcohol and 76.3 million have some complications induced^{12,13}. Ecuador is one of the nations that more alcohol ingested at a rate of 7.2 % according to a report from the National Institute of Statistics and Census (INEC) in the year 2012¹⁴, and die as a result of tobacco consumption approximately 4 thousand people a year^{15,16}. In the city of Loja, the consumption of alcohol is of 20.86% and of tobacco is 23%¹⁴.

In the World Workshop on Clinical Periodontics, 1989¹⁷ was described that the colonists are mainly Gram-positive bacteria (cocci and bacilli) states to antigens of the proteins in the saliva. Four hours after a professional prophylaxis, in the dental surface 60 to 90% is colonized by bacteria of the genus *Streptococcus*, the rest are colonizing bacteria and oral biofilm-forming (*Actinomyces spp*, *Veillonella spp*, *Capnocytophaga spp*, *Haemophilus spp*, *Propionibacterium spp*). After seven days the genus *Streptococcus* is the predominant and two weeks later post-secondary colonizers abound (Gram-negative bacteria such as *Fusobacterium nucleatum*). It has been described



tum). Ha sido descrito que los agentes inductores de la enfermedad periodontal son las especies anaeróbicas (*Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Capnocytophaga spp* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)¹⁸.

El diagnóstico clínico y radiológico han sido durante mucho tiempo las técnicas más utilizadas para el tratamiento de los pacientes con Periodontitis Crónica (PC); la identificación microbiológica de bacterias cambiaría en gran escala la planificación y tratamiento, por lo cual, se hace necesario la incorporación de técnicas de diagnóstico más sensibles y específicas que nos permitan la identificación de las mismas¹⁹. Muchos autores para el diagnóstico de esta afección en la actualidad emplean la identificación de microorganismos periodontopatógenos mediante Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR), con el empleo de cebadores específicos^{20,21}.

El alcohol en la cavidad bucal produce efectos tóxicos directos sobre el tejido periodontal incrementándose las infecciones por la función defectuosa de los neutrófilos, ante la presencia de patógenos periodontales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Dentro de las manifestaciones clínicas en los alcohólicos están inflamación gingival de color rojo azulada, sangrado, bolsas periodontales, pérdida de inserción, reabsorción de hueso e incluso interfiere el metabolismo proteico y la cicatrización del tejido²².

En los fumadores aumenta el riesgo de enfermedad periodontal al alterar el equilibrio de las respuestas inmunitarias y los procesos de reparación tisular; sin embargo, este riesgo varía entre los fumadores, los cuales tienen de tres a seis veces más probabilidades de tener periodontitis que los no fumadores^{23,24}. Existe una relación en cuanto a dosis- efecto y tiempo de consumo de tabaco²⁵, es así que a partir de 10 cigarros/día, cada cigarrillo extra aumenta la recesión gingival en un 2,3%, la profundidad de bolsa en un 0,3%, los niveles de inserción en un 0,5%, así como la movilidad dental²⁶.

that the inductors of periodontal disease are the anaerobic species (*Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Capnocytophaga spp* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)¹⁸.

The clinical and radiological diagnosis have long been the most used techniques for the treatment of patients with chronic periodontitis (PC); the microbiological identification of bacteria could change largely planning and treatment, and therefore, it is necessary the incorporation of more sensitive and specific diagnostic techniques that will allow the identification of these¹⁹. Many authors, for the diagnosis of this condition currently used the identification of microorganisms periodontopathogens by the polymerase chain reaction (PCR), with the use of specific primers^{20,21}.

The alcohol in the oral cavity produces direct toxic effects on periodontal tissue increasing infections caused by the defective function of neutrophils in the presence of periodontal pathogens such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Within the clinical manifestations in alcoholics are bluish-red gingival inflammation, bleeding, periodontal pockets, insertion loss, bone resorption, and even interfere with the protein metabolism and healing of the tissue²².

In smokers, increases the risk of periodontal disease by altering the balance of immune responses and processes of tissue repair; however, this risk varies among smokers, which are three to six times more likely to have periodontitis than non-smokers^{23,24}. There is a relationship in terms of time and dose-effect of tobacco consumption²⁵, as from 10 cigarettes/day, each extra cigarette increases gingival recession in a 2.3%, the depth of the bag in a 0.3 per cent, the levels of insertion into a 0.5%, as well as the dental mobility²⁶.

Los alcohólicos y fumadores, presentan afectaciones en los tejidos de soporte de la cavidad bucal (encía, hueso y ligamento periodontal), ya que estos pacientes tienden a acumular una cantidad considerable de biofilm a nivel cervical en uno o más dientes, acompañado de sangrado gingival⁹.

En la etapa crónica la inflamación de la encía y el periodonto de soporte, afecta de forma significativa al tejido conectivo gingival, ligamento periodontal, cemento y hueso, con una progresión lenta a moderada con posibles periodos de avance rápido, lo que comúnmente ocurre en las personas con algún tipo de adicción^{9,19}.

Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio es determinar la presencia de los microorganismos periodontopatógenos: *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediante PCR en pacientes alcohólicos fumadores con periodontitis crónica con bolsas periodontales ≥ 6 mm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Nacional de Loja.

El universo estuvo formado por 31 pacientes de 18 y 62 años de edad de sexo masculino alcohólicos y/o fumadores en los cuales fueron excluidos aquellos que consumían algún tipo de droga, dando una muestra de 23 pacientes con bolsas periodontales ≥ 6 mm del Centro Comunidad Terapéutica Salvando al Adicto, de la ciudad de Loja, Ecuador, en el 2015.

Previo al examen clínico fue firmado el consentimiento informado y se impartió una charla educativa acerca de la enfermedad periodontal y cuidados para una buena salud bucal.

Fase clínica

La exploración periodontal se realizó con la sonda periodontal según los criterios de Botero, 2010²⁷ para obtener los valores establecidos en

The alcoholics and smokers, present affectations in the supporting tissues of the oral cavity (gums, bone and periodontal ligament), because these patients tend to accumulate a considerable amount of biofilm at the cervical level in one or more teeth, accompanied by gingival bleeding⁹.

In chronic stage, the inflammation of the gingiva and periodontium, significantly affect the gingival connective tissue, periodontal ligament, cement and bone, in a slow to moderate progression with possible periods of fast forward, which commonly occurs in people with any type of addiction^{9,19}.

Therefore, the aim of this study is to determine the presence of microorganisms periodontopathogens: *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by PCR in alcoholic patients with chronic periodontitis with periodontal pockets ≥ 6 mm.

METHODS AND MATERIALS

Experimental study was approved by the Research Ethics Committee of the National University of Loja.

The group was composed of 31 patients between 18 and 62 years of age, male alcoholics and/or smokers in which they were excluded those who take some kind of drug, giving a sample of 23 patients with periodontal pockets ≥ 6 mm from the Center Therapeutic Community Saving the Addict, of the city of Loja, Ecuador, in 2015.

Prior to clinical examination, the informed consent was signed and gave an educational lecture about the periodontal disease and care for good oral health.

Clinical Phase

Periodontal examination was performed with the periodontal probe according to the criteria of Botero, 2010²⁷ to obtain the values set out

el “Peridontal Screening and Recording” (PSR) y de esta manera determinar si los pacientes presentaron o no Periodontitis Crónica.

Una vez realizada la selección se realizó el periodontograma a los pacientes con PC utilizando la sonda Carolina del Norte siguiendo el modelo de la Universidad de California-Los Ángeles (UCLA)²⁸, de la misma manera el registro de la movilidad dentaria, supuración, sangrado al sondaje (SS), profundidad al sondaje (PS), nivel de inserción clínica (NIC) de cada diente²⁹; se aplicó el índice de biofilm de O’leary con la finalidad de evaluar la higiene de las superficies lisas, indicando el porcentaje de superficies lisas teñidas sobre el total de superficies dentarias presentes³⁰.

Los pacientes fueron clasificados a través de la Unidad de Bebida Estándar (UBE)³¹ al día. Cada UBE corresponde entre 8 y 13 gramos de alcohol puro. De acuerdo al grado de severidad del alcoholismo: 1: ligero (1-2 UBE), 2: moderado (3-6 UBE), 3: excesivo (7-8 UBE) y 4: de riesgo (9-12 UBE). Según el número de cigarrillos consumidos de manera diaria los pacientes se clasificaron como: a: no fumador (cero), b: leve (5 cigarrillos), c: moderado (5 – 10 cigarrillos) y d: severo (> 10 cigarrillos)³².

in the “Peridontal Screening and Recording (PSR) and, in this way, determine whether or not patients had chronic periodontitis.

Once the selection is made, the periodontogram (tooth diagram) was due to the patients with PC using the North Carolina probe following the University of California-Los Angeles model (UCLA)²⁸, in the same way, the registration of the tooth mobility, oozing, bleeding on probing (BOP), probing depth (PD), clinical attachment level (NIC) of each tooth²⁹; applied the index of biofilm O’Leary with the purpose of evaluating the hygiene of the smooth surfaces, indicating the percentage of taken smooth surfaces on the total number of dental surfaces present³⁰.

Patients were classified through the Standard Drink Unit (SDU)³¹ a day. Each SDU is between 8 and 13 grams of pure alcohol. According to the degree of severity of alcoholism: 1: Slight (1-2 SDU), 2: Moderate (3-6 SDU), 3: Excessive (7-8 SDU) and Risky (4:9-12 SDU). Depending on the number of cigarettes consumed on a daily basis, patients were classified as: a: Non-Smoker (zero), b: Low (5 cigarettes), c: Moderate (5 - 10 cigarettes) and d: Severe (> 10 cigarettes)³².

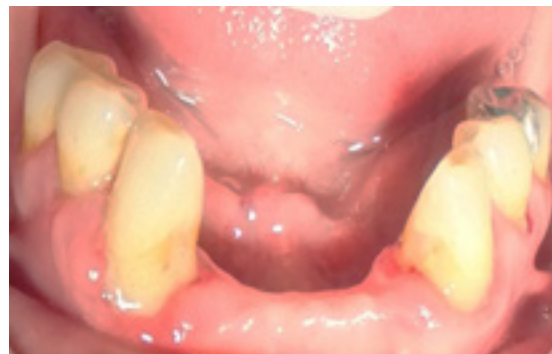


Figura 1 A y B. Periodontitis crónica de paciente alcohólico – fumador de 43 años de edad

Figure 1 A and B. Chronic Periodontitis of alcoholic patients - smoker of 43 years of age



Detección molecular de microorganismos periodontopatógenos

Para la toma de muestra se removió el biofilm supragingival con un hisopo y se introdujo por 20 segundos un cono de papel estéril No. 30 (ZIPPERER - VDW) en dos de los sitios (mesial, distal) más profundos en cada paciente; cada cono fue transferido a un tubo de Eppendorf estéril, el cual se rotuló con el número de historia clínica, número de pieza y fecha de la toma de la muestra; repitiendo este procedimiento a cada paciente²⁰.

Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, debidamente conservadas a 4°C. La prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), fue realizada según lo descrito por Mujica et al., 2010²⁰ para cada una de las cinco bacterias. Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 1 y 2% en dependencia del tamaño de la banda resultante³³. (figura 2, las muestras que resultaron positivas).

Molecular Detection of microorganisms periodontopathogens

Sample taking of supragingival biofilm was removed with a cotton swab and was introduced by 20 seconds a cone of sterile paper No. 30 (ZIPPERER - VDW) in two of the deeper sites (mesial, distal) in each patient; each cone was transferred to a sterile Eppendorf tube, which is labeled with the number of history, tooth number and date of the sample; by repeating this procedure for each patient²⁰.

The samples were transported to the laboratory of Molecular Biology Biotechnology Center at the National University of Loja, properly stored at 4°C. The Polymerase Chain Reaction Test (PCR), was performed as described by Mujica et al., 2010²⁰ for each of the five bacteria. The results were visualized on agarose gels at 1 and 2% depending on the size of the resulting band³³. (figure 2, samples that were positive).

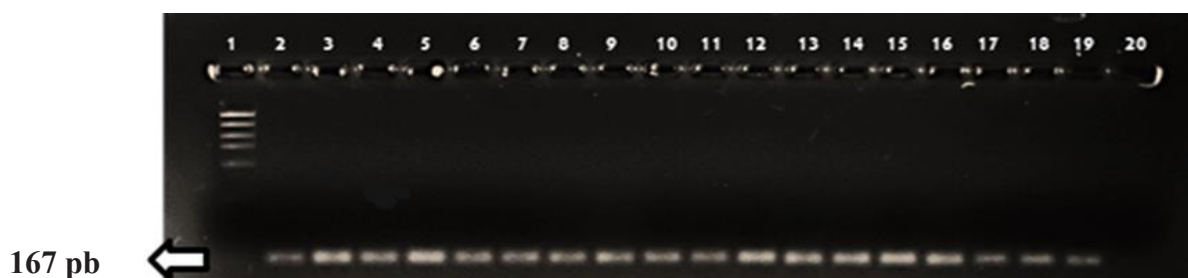


Figura 2. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Fn de 167 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica. Línea 1: marcador de peso molecular (MpM) 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2 - 18: muestras positivas de Fn. Línea 19: ADN DE Fn de control de referencia. Línea 20: control negativo de PCR

Figure 2. Verification of the PCR product in agarose gel of Fn of 167 pb detected in alcoholic-smoking patients with chronic periodontitis. Line 1: molecular weight marker (MpM) 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER - Invitrogen). Line 2 - 18: positive samples of Fn. Line 19: DNA OF Fn for reference monitoring. Line 20: Negative control of PCR

| CARACTERÍSTICA | Nº | (%) |
|---|----|---------|
| EDAD | | |
| 18 a 30 años | 12 | (52,1) |
| ≥ 31 años | 11 | (47,9) |
| NUMERO DE MICROORGANISMOS POR PACIENTE | | |
| 1 | 2 | (8,7) |
| 2 | 6 | (26,1) |
| 3 | 11 | (47,8) |
| 4 | 2 | (8,7) |
| 5 | 2 | (8,7) |
| TOTAL DE TIPO DE MICROORGANISMOS PRESENTES | | |
| Pg | 3 | (13,0) |
| Aa | 5 | (21,7) |
| Td | 13 | (56,5) |
| Tf | 21 | (91,1) |
| Fn | 23 | (100,0) |
| ALCOHÓLICOS | | |
| Ligero | 1 | (4,3) |
| Moderado | 5 | (21,7) |
| Excesivo | 4 | (17,4) |
| De Riesgo | 13 | (56,5) |
| FUMADORES | | |
| Leve | 15 | (65,2) |
| Moderado | 5 | (21,8) |
| Severo | 3 | (13,0) |

Tabla 1 Distribución del número y porcentaje de adultos alcohólicos - fumadores según edad, número y tipo de microorganismos

Los resultados del periodontograma completo se pueden observar en la tabla 2 y 3: con un promedio de 91,04% de presencia de biofilm dental ($p=0,028$). De los 3402 sitios examinados en 567 dientes evidenciamos que 166 de estos presentan bolsas periodontales ≥ 6 mm, presentando una media de 6,17 mm. Otro parámetro que nos indica la presencia de enfermedad periodontal es el SS en un 55,07%, el NIC es de 3,24 y de la PS de 2,89, indicándonos la presencia de periodontitis crónica en estos pacientes.

| CHARACTERISTICS | N | (%) |
|---|----|---------|
| AGE | | |
| 18 to 30 years old | 12 | (52,1) |
| ≥ 31 years | 11 | (47,9) |
| NUMBER OF MICROORGANISMS PER PATIENT | | |
| 1 | 2 | (8,7) |
| 2 | 6 | (26,1) |
| 3 | 11 | (47,8) |
| 4 | 2 | (8,7) |
| 5 | 2 | (8,7) |
| TOTAL OF MICRO-ORGANISMS | | |
| Pg | 3 | (13,0) |
| Aa | 5 | (21,7) |
| Td | 13 | (56,5) |
| Tf | 21 | (91,1) |
| Fn | 23 | (100,0) |
| ALCOHÓLICS | | |
| Slight | 1 | (4,3) |
| Moderate | 5 | (21,7) |
| Excessive | 4 | (17,4) |
| Risky | 13 | (56,5) |
| SMOKERS | | |
| Low | 15 | (65,2) |
| Moderate | 5 | (21,8) |
| Severe | 3 | (13,0) |

Table 1 Distribution of the number and percentage of adults alcoholics - smoking according to age, number and type of microorganisms

The results of the full periodontograma can be seen in table 2 and 3: with an average of 91.04% of the presence of dental biofilm ($p=0.028$). Of the 3402 sites examined in 567 teeth we show that 166 of these have periodontal pockets ≥ 6 mm, with an average of 6.17 mm. Another parameter that indicates the presence of periodontal disease is the SS in a 55,07%, the NIC is of 3.24 and 2.89 of the PS, indicating the presence of chronic periodontitis in these patients.



| CARACTERÍSTICA | No | MEDIA | (IC 95%) | | P |
|--------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|-------|
| ALCOHÓLICOS | | BIOFILM DENTAL | | | |
| Ligero | 1 | 100,0000 | | | 0,028 |
| Moderado | 5 | 92,5280 | 72,4693 | 112,5867 | |
| Excesivo | 4 | 93,5125 | 76,3302 | 110,6948 | |
| De Riesgo | 13 | 89,0169 | 79,6373 | 98,3965 | |
| Total | 23 | 91,0396 | 84,8868 | 97,1923 | |
| ALCOHÓLICOS | | SS | | | |
| Ligero | 1 | 13,1000 | | | 0,602 |
| Moderado | 5 | 56,4000 | 8,8499 | 103,9501 | |
| Excesivo | 4 | 59,4750 | 14,5722 | 104,3778 | |
| De Riesgo | 13 | 56,4154 | 36,2315 | 76,5993 | |
| Total | 23 | 55,0609 | 40,9235 | 69,1983 | |
| ALCOHÓLICOS | | NIC | | | |
| Ligero | 1 | 2,1000 | | | 0,221 |
| Moderado | 5 | 2,6400 | 1,9795 | 3,3005 | |
| Excesivo | 4 | 4,7000 | -,0096 | 9,4096 | |
| De Riesgo | 13 | 3,1000 | 2,6573 | 3,5427 | |
| Total | 23 | 3,2348 | 2,6113 | 3,8583 | |
| ALCOHÓLICOS | | PS | | | |
| Ligero | 1 | 2,1000 | | | 0,291 |
| Moderado | 5 | 2,6600 | 2,2335 | 3,0865 | |
| Excesivo | 4 | 3,7250 | 1,1351 | 6,3149 | |
| De Riesgo | 13 | 2,7692 | 2,4306 | 3,1078 | |
| Total | 23 | 2,8826 | 2,5132 | 3,2520 | |

SS: Sangrado al sondaje; PS: Profundidad al sondaje; NIC: Nivel de inserción clínica; IC: Intervalo de confianza; valores p: significancia estadística.

Tabla 2 Prueba de Kruskal-Wallis de las variables asociadas con el diagnóstico molecular de microorganismos en los pacientes alcohólicos

| CHARACTERISTICS | No | MEAN | (CI 95%) | | P |
|-------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|-------|
| ALCOHOLICS | | DENTAL BIOFILM | | | |
| Low | 1 | 100,0000 | | | 0,028 |
| Moderate | 5 | 92,5280 | 72,4693 | 112,5867 | |
| Excessive | 4 | 93,5125 | 76,3302 | 110,6948 | |
| Risky | 13 | 89,0169 | 79,6373 | 98,3965 | |
| Total | 23 | 91,0396 | 84,8868 | 97,1923 | |
| ALCOHOLICS | | BP | | | |
| Low | 1 | 13,1000 | | | 0,602 |
| Moderate | 5 | 56,4000 | 8,8499 | 103,9501 | |
| Excessive | 4 | 59,4750 | 14,5722 | 104,3778 | |
| Risky | 13 | 56,4154 | 36,2315 | 76,5993 | |
| Total | 23 | 55,0609 | 40,9235 | 69,1983 | |
| ALCOHOLICS | | CAL | | | |
| Low | 1 | 2,1000 | | | |

| | | | | | |
|-------------------|-----------|---------------|---------------|---------------|-------|
| Moderate | 5 | 2,6400 | 1,9795 | 3,3005 | 0,221 |
| Excessive | 4 | 4,7000 | -,0096 | 9,4096 | |
| Risky | 13 | 3,1000 | 2,6573 | 3,5427 | |
| Total | 23 | 3,2348 | 2,6113 | 3,8583 | |
| ALCOHOLICS | | PD | | | |
| Low | 1 | 2,1000 | . | . | 0,291 |
| Moderate | 5 | 2,6600 | 2,2335 | 3,0865 | |
| Excessive | 4 | 3,7250 | 1,1351 | 6,3149 | |
| Risky | 13 | 2,7692 | 2,4306 | 3,1078 | |
| Total | 23 | 2,8826 | 2,5132 | 3,2520 | |

BP: bleeding on probing; PD: Probing depth; CAL: clinical attachment level; CI, confidence interval; p values: statistical significance.

Table 2 Kruskal-Wallis Test of the variables associated with the molecular diagnosis of microorganisms in alcoholic patients

| CARACTERÍSTICA | No | MEDIA | (IC 95%) | | P |
|------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|-------|
| | | BIOFILM DENTAL | | | |
| FUMADORES | | | | | |
| No Fumador | 6 | 85,2833 | 65,5469 | 105,0198 | 0,028 |
| Leve | 15 | 94,1400 | 85,8665 | 102,4135 | |
| Moderado | 5 | 86,9900 | 65,9340 | 108,0460 | |
| Severo | 3 | 100,0000 | 100,0000 | 100,0000 | |
| Total | 23 | 91,0396 | 84,8868 | 97,1923 | |
| FUMADORES | | SS | | | |
| No Fumador | 6 | 64,1333 | 33,7112 | 94,5554 | 0,405 |
| Leve | 9 | 48,8000 | 23,9909 | 73,6091 | |
| Moderado | 5 | 30,4600 | 3,5064 | 57,4136 | |
| Severo | 3 | 96,7000 | 88,9512 | 104,4488 | |
| Total | 23 | 55,0609 | 40,9235 | 69,1983 | |
| FUMADORES | | NIC | | | |
| No Fumador | 6 | 2,8000 | 1,8022 | 3,7978 | 0,801 |
| Leve | 9 | 3,6444 | 2,0188 | 5,2701 | |
| Moderado | 5 | 2,9400 | 2,4387 | 3,4413 | |
| Severo | 3 | 3,3667 | 1,1126 | 5,6207 | |
| Total | 23 | 3,2348 | 2,6113 | 3,8583 | |
| FUMADORES | | PS | | | |
| No Fumador | 6 | 2,6500 | 1,8243 | 3,4757 | 0,815 |
| Leve | 9 | 3,1222 | 2,2153 | 4,0291 | |
| Moderado | 5 | 2,8000 | 2,4600 | 3,1400 | |
| Severo | 3 | 2,7667 | 1,3985 | 4,1348 | |
| Total | 23 | 2,8826 | 2,5132 | 3,2520 | |

SS: Sangrado al sondaje; PS: Profundidad al sondaje; NIC: Nivel de inserción clínica; IC: Intervalo de confianza; valores p: significancia estadística.

Tabla 3 Prueba de Kruskal-Wallis de las variables asociadas con el diagnóstico molecular de microorganismos en los pacientes fumadores

| CHARACTERISTICS | No | AVERAGE | (CI 95%) | | p |
|-----------------|-----------|----------------|----------------|----------------|-------|
| | | DENTAL BIOFILM | | | |
| SMOKERS | | | | | |
| Non-Smoker | 6 | 85,2833 | 65,5469 | 105,0198 | 0,028 |
| Low | 15 | 94,1400 | 85,8665 | 102,4135 | |
| Moderate | 5 | 86,9900 | 65,9340 | 108,0460 | |
| Severe | 3 | 100,0000 | 100,0000 | 100,0000 | |
| Total | 23 | 91,0396 | 84,8868 | 97,1923 | |
| SMOKERS | | | | | |
| | | BP | | | |
| Non-Smoker | 6 | 64,1333 | 33,7112 | 94,5554 | 0,405 |
| Low | 9 | 48,8000 | 23,9909 | 73,6091 | |
| Moderate | 5 | 30,4600 | 3,5064 | 57,4136 | |
| Severe | 3 | 96,7000 | 88,9512 | 104,4488 | |
| Total | 23 | 55,0609 | 40,9235 | 69,1983 | |
| SMOKERS | | | | | |
| | | CAL | | | |
| Non-Smoker | 6 | 2,8000 | 1,8022 | 3,7978 | 0,801 |
| Low | 9 | 3,6444 | 2,0188 | 5,2701 | |
| Moderate | 5 | 2,9400 | 2,4387 | 3,4413 | |
| Severe | 3 | 3,3667 | 1,1126 | 5,6207 | |
| Total | 23 | 3,2348 | 2,6113 | 3,8583 | |
| SMOKERS | | | | | |
| | | PD | | | |
| Non-Smoker | 6 | 2,6500 | 1,8243 | 3,4757 | 0,815 |
| Low | 9 | 3,1222 | 2,2153 | 4,0291 | |
| Moderate | 5 | 2,8000 | 2,4600 | 3,1400 | |
| Severe | 3 | 2,7667 | 1,3985 | 4,1348 | |
| Total | 23 | 2,8826 | 2,5132 | 3,2520 | |

BP: bleeding on probing; PD: Probing depth; CAL: clinical attachment level; CI, confidence interval; p values: statistical significance.

Table 3 Kruskal-Wallis Test of the variables associated with the molecular diagnosis of microorganisms in smokers

En los pacientes alcohólicos - fumadores el 41,18% presentan 3 microorganismos estableciendo una diferencia estadísticamente significativa (p = 0,039). (tabla 4)

| CARACTERÍSTICA | PACIENTES ALCOHÓLICOS FUMADORES | | PROMEDIO PS ≥ 6 | | | |
|----------------|---------------------------------|---------------|-----------------|--------------|---------------|-------|
| | Nº | % | MEDIA | (IC 95%) | | p |
| 1 | 1 | 5,88 | 0,3000 | . | . | 0,039 |
| 2 | 6 | 35,29 | 0,5167 | ,1887 | ,8446 | |
| 3 | 7 | 41,18 | 3,0636 | ,0647 | 5,7925 | |
| 4 | 2 | 11,77 | 3,6500 | -26,2096 | 33,5096 | |
| 5 | 1 | 5,88 | 3,6000 | . | . | |
| Total | 17 | 100,00 | 2,2565 | ,6109 | 3,1538 | |

Tabla 4 Prueba de Kruskal-Wallis de la Reacción de Cadena de Polimerasa para el Diagnóstico molecular de microorganismos en pacientes alcohólicos-fumadores

In alcoholic patients - smoking the 41.18% present 3 micro-organisms by establishing a statistically significant difference ($p = 0.039$). (table 4)

| CHARACTERISTICS | ALCOHOLICS-SMOKING PATIENTS | | MEAN PS ≥ 6 | | | |
|-----------------|-----------------------------|---------------|------------------|----------|---------|---|
| | N° | % | MEAN | (CI 95%) | | p |
| 1 | 1 | 5,88 | 0,3000 | . | . | |
| 2 | 6 | 35,29 | 0,5167 | ,1887 | ,8446 | |
| 3 | 7 | 41,18 | 3,0636 | ,0647 | 5,7925 | |
| 4 | 2 | 11,77 | 3,6500 | -26,2096 | 33,5096 | |
| 5 | 1 | 5,88 | 3,6000 | . | . | |
| Total | 17 | 100,00 | 2,2565 | ,6109 | 3,1538 | |

Table 4 Kruskal-Wallis Test of the Polymerase Chain Reaction for the molecular diagnosis of microorganisms in alcoholic - smoking patients.

DISCUSIÓN

En la actualidad la periodontitis es considerada una enfermedad multifactorial e infecciosa, produciendo alteración en los tejidos de soporte de las piezas dentales del huésped^{2,30}. Mujica et al., 2010²⁰; Botero et al., 2015²⁹ y Tonetti & Claffey, 2005³⁴ mencionan que en los pacientes alcohólicos fumadores su sistema inmune es más susceptible a la colonización de periodontopatógenos.

El bacilo Gram-negativo alargado y anaerobio llamado *Fusobacterium nucleatum*, es la bacteria principal del proceso de colonización bacteriana descritas por Socransky et al., 1998³⁵ permitiendo la unión de los principales patógenos periodontales del grupo rojo (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*) y el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Los estudios demuestran que la periodontitis crónica es diagnosticada mediante parámetros clínicos como biofilm dental, SS, PS, NIC y bolsas periodontales³⁶⁻³⁹, los mismos que son analizados por Ardila et al., 2014³⁹, en pacientes con periodontitis crónica no alcohólicos ni fumadores y en el presente estudio fueron considerados estos mismos criterios pero en pacientes alcohólicos – fumadores.

Heitz et al., 2009⁴⁰ describen los factores de riesgo que posee la periodontitis, dentro de ellos está el tabaquismo. La nicotina induce la secreción de epinefrina, esto conlleva a la disminución de la

DISCUSSION

Nowadays, periodontitis is considered a multifactorial and infectious disease, producing alteration in the tissues that support the teeth of the host^{2,30}. Mujica et al., 2010²⁰; Botero et al., 2015²⁹ and Tonetti & Claffey 2005³⁴, mention that in alcoholic-smoking patients their immune system is more susceptible to the colonization of the periodontopathogens.

The Gram-negative and anaerobic bacillus called *Fusobacterium nucleatum*, is the main bacteria in the bacterial colonization process described by Socransky et al., 1998³⁵ allowing the union of the major periodontal pathogens of the red group (*P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola*) and the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Studies show that chronic periodontitis is diagnosed by clinical parameters such as dental biofilm, SS, PS, NIC, and periodontal pockets³⁶⁻³⁹, which are analyzed by Ardila et al., 2014³⁹, in patients with chronic periodontitis not alcoholics, nor smokers and in the present study were considered these same criteria but in alcoholic – smoking patients.

Heitz et al., 2009⁴⁰ describe the risk factors that periodontitis have, within them is smoking. The nicotine induces the secretion of epinephrine,

microcirculación gingival, alteración de la susceptibilidad tisular de los linfocitos T, alteración de la quimiotaxis y actividad fagocítica de los polimorfonucleares (PMN); lo cual en el presente estudio se corrobora con el sangrado al sondaje en los pacientes con alto consumo de tabaco. Así como Karasneh et al., 2017⁴¹, manifiestan que el fumar cigarrillos aumenta el riesgo de destrucción periodontal y el desarrollo de periodontitis crónica al afectarse el perfil bacteriano subgingival de estos pacientes; con la reducción de las bacterias beneficiosas y el aumento de las bacterias periodontopatógenas, lo cual fue observado en el presente estudio pero en pacientes alcohólicos – fumadores.

Priyanka et al., 2017⁸, indican el aumento del riesgo de caries dental, profundidad de la bolsa de 4 a 8mm y lesiones en la mucosa en los pacientes dependientes del alcohol, siendo mayor la prevalencia de periodontitis en los sujetos dependientes del alcohol en comparación con aquellos que no eran alcohólicos, estos datos se relacionan con el presente estudio, donde los alcohólicos de riesgo son más propensos a desarrollar periodontitis crónica con más de tres microorganismos en las bolsas periodontales de ≥ 6 mm.

Boutaga et al., 2007³³, manifiestan que la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en tiempo real es muy sensible para detectar y cuantificar patógenos bacterianos, Watanabe et al., 1996⁴², Lin et al., 1997⁴³ y Meurman et al., en 1997⁴⁴, diagnostican la enfermedad periodontal a partir de la técnica de PCR, mencionando que este método es rápido, relativamente simple e identifica periodontopatógenos aún en bajo número y no requiere células vivas, siendo un índice de la alta sensibilidad y especificidad. Darveau et al., 2012⁴⁵ mencionan que *T. denticola* y *T. forsythia* son las bacterias más difíciles de cultivar y las más frecuentes en pacientes alcohólicos fumadores, razón por la cual fue utilizada la PCR en el estudio.

Darby et al., 2000⁴⁶ evaluaron a 24 pacientes que acudieron al Hospital dental y encontraron a Tf en mayor cantidad, seguida de Td, Pg y Aa, concordando con los resultados encontrados en el presente estudio, mientras que Mombelli et al., 2002⁴⁷, mencionan que Aa es un parámetro claro de periodontitis agresiva, en la presente

this leads to the decline of the gingival microcirculation, alteration of gingival tissue susceptibility of T lymphocytes, alteration of the chemotaxis and phagocytic activity of the polymorphonuclear (PMN), which in the present study is corroborated with bleeding on probing in patients with high consumption of tobacco. As well as Karasneh et al., 2017⁴¹, manifest that the cigarette smoking increases the risk of periodontal destruction and the development of chronic periodontitis through affecting the subgingival bacterial profile of these patients; with the reduction of the beneficial bacteria and the increase of periodontopathogenic bacteria, which was observed in the present study but in alcoholic patients – smoking.

Priyanka et al., 2017⁸, indicate an increased risk of dental caries, depth of the bag of 4 to 8mm and lesions of the mucosa in the alcohol-dependent patients, with a greater prevalence of periodontitis in alcohol dependent subjects compared with those who were not alcoholics, these data relate to the present study, where alcoholics are more likely to develop chronic periodontitis with more than three microorganisms in periodontal pockets of ≥ 6 mm.

Boutaga et al., 2007³³, stated that the Polymerase Chain Reaction technique (PCR) in real time is very sensitive for detecting and quantifying bacterial pathogens, Watanabe et al., 1996⁴², Lin et al., 1997⁴³ and Meurman et al., in 1997⁴⁴, diagnose periodontal disease from the PCR technique, mentioning that this method is fast, relatively simple and identifies periodontopathogens even in low number and does not require living cells, being an index of the high sensitivity and specificity. Darveau et al., 2012⁴⁵ mentions that *T. denticola* and *T. forsythia* bacteria are more difficult to grow and the most frequent in alcoholic - smoking patients, for which reason the PCR was used in the study.

Darby et al., 2000⁴⁶ evaluate 24 patients who came to the Dental Hospital and found the Tf in greater quantity, followed by Td, Pg and Aa, agreeing with the results found in the present study, while Mombelli et al., 2002⁴⁷, mention that Aa is a clear parameter of aggressive periodontitis, in the present



investigación se corrobora que los pacientes alcohólicos-fumadores tienen su sistema inmune-presentaron Aa, por lo que, estos pacientes más susceptibles a desarrollar enfermedad periodontal agresiva.

CONCLUSIONES

El PCR evidenció la presencia de todos los periodontopatógenos estudiados en los pacientes alcohólicos - fumadores con periodontitis crónica presentando más de tres microorganismos, por lo cual se considera una herramienta adecuada para el diagnóstico de la enfermedad periodontal.

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja y al Dr. Mauricio Bittner Ortega, Coordinador Académico del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad Andrés Bello de Chile, por su aporte en la donación de ADN de los microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. Ashouri Moghaddam A, Radafshar G, Jahandideh Y, Kakaei N. Clinical Evaluation of Effects of Local Application of Aloe vera Gel as an Adjunct to Scaling and Root Planning in Patients with Chronic Periodontitis. *Journal of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences*. 2017; 18(3):165-72.
2. Simsek Ozek N, Zeller I, Renaud DE, Gümüş P, Nizam N, Severcan F, Buduneli N, Scott DA. Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. *Journal of Dental Research*. 2016; 95(13):1472-78.
3. Pamuk F, Lütüoğlu M, Aydoğdu A, Koyuncuoglu CZ, Cifcibasi E, Badur OS. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of transforming growth factor- beta 1, tissue

investigation it was confirmed that alcoholic patients-smokers have in their immune system presented Aa, so these patients are more susceptible to develop aggressive periodontal disease.

CONCLUSIONS

The PCR revealed the presence of all of the periodontopathogens studied in alcoholic - smoking patients with chronic periodontitis, presenting more than three microorganisms, which is considered a suitable tool for the diagnosis of periodontal disease.

ACKNOWLEDGEMENT

To the support of the Biotechnology Center at the National University of Loja and the Dr. Mauricio Bittner Ortega, Academic Coordinator of the Laboratory of Oral Microbiology and Biotechnology of the Andrés Bello University of Chile, for his contribution in the donation of DNA of the microorganisms.

- plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 in smoking and non-smoking chronic periodontitis patients: A split-mouth, randomized control study. *Journal Periodontal Research*. 2017;52(5):872-82.
4. Onabolu O, Donos N, Tu YK, Darbar U, Nibali L. Periodontal progression based on radiographic records: An observational study in chronic and aggressive periodontitis. *Journal of dentistry*. 2015;43(6):673-82.
5. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontology*. 1999;4(1):1-6.
6. Wagner MC, Haas AN, Oppermann RV, Rosing CK, Albandar JM, Susin C. Effect of Alcohol Consumption on Clinical Attachment Loss Progression in an Urban Population From South Brazil: a 5-Years Longitudinal Study. *Journal of Periodontology*. 2017;88(12):1271-80.



7. Lee M, Choi YH, Sagong J, Yu S, Kim Y, Lee D, Kim S. The interactive association of smoking and drinking levels with presence of periodontitis in South Korean adults. *BMC Oral Health*. 2016;25;16(1):80.
8. Priyanka K, Sudhir KM, Reddy VCS, Kumar RK, Srinivasulu G. Impact of Alcohol Dependency on Oral Health – A Cross-sectional Comparative Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017;11(6):ZC43-ZC46.
9. Manicone PF, Tarli C, Mirijello A, Raffaelli L, Vassallo GA, Antonelli M, Rando MM, Mosoni C, Cossari A, Lavorgna L, Caputo F, D'Addona A, Gasbarrini A, Addolorato G. Dental health in patients affected by alcohol use disorders: a cross-sectional study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2017;21(22):5021-27.
10. WHO. Report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention. Geneva: World Health Organization, 2017: 282-84.
11. WHO. Global status report on alcohol and health, 2014. Luxembourg: World Health Organization, 2014; 27-31.
12. WHO. [Internet]. Alcohol; 2015 [Actualizado Enero 2015; citado diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/es/>
13. WHO. Global status report on alcohol and health. Country profiles. Ecuador, 2014. Luxembourg: World Health Organization, 2014. [Actualizado 2014; citado diciembre 2017]. Disponible en: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/profiles/ecu.pdf?ua=1
14. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2011- 2013. Ministerio de Salud Pública (MSP), Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC).
15. WHO. Report on the global tobacco epidemic, 2017. Country profiles. Ecuador, 2017. Geneva: World Health Organization, 2017. [Actualizado 2017; citado diciembre 2017]. Disponible en: http://www.who.int/entity/tobacco/surveillance/policy/country_profile/ecu.pdf?ua=1
16. WHO. [Internet]. Tabaco; 2017 [Actualizado Mayo 2017; citado diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/es/>
17. The American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: The American Academy of Periodontology. 1989:123-124.
18. Socransky S, Haffajee. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38(1):135-87.
19. Bazzano G, Parodi R, Tabares S, Sembaj A. Evaluación de la terapia mecánica periodontal en bolsas profundas: Respuesta clínica y bacteriológica. *Revista Clinica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2012;5(3):122-26.
20. Mujica TC, Castillo-Ruiz M, Daille LK, Fuentevilla IA, Bittner M. Co-detección de patógenos periodontales en pacientes chilenos. *Revista Clinica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2010;3(3); 118-22.
21. Frías LM, Uria V; Carasol M. Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal. *Científica dental*. 2009;6(2):93-101.
22. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The Effect of Alcohol Consumption on Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*. 2001;72(2):183-9.
23. Ebersole JL, Steffen MJ, Thomas MV, Al-Sabbagh M. Smoking related cotinine levels and host responses in chronic periodontitis. *Journal of periodontal Research*, 2014;49(5):642-51.
24. Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*. 2004;92(1):1-8.
25. Mullally BH, Linden GJ. Molar furcation involvement associated with cigarette smoking in periodontal referrals. *Journal of Clinical Periodontology*, 1996;23(7):658-61.



26. Bascones A. Placa dental, cálculo y otros factores dentales. *Periodoncia Clínica e Implantología Oral*. Vol 1, 4ta ed. Lexus; 2014.
27. Botero JE, Bedoya E. Determinantes de diagnóstico periodontal. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2010;3(2):94-9.
28. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. *Periodontología clínica de Carranza*. Vol 1 y 2. 11va ed. Mexico: Mc Graw-Hill. Interamericana; 2014.
29. Botero JE, Rösing CK, Duque A, Jaramillo A, Contreras A. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. *Periodontology* 2000. 2015;67(1):34-57.
30. Chen H, Peng S, Dai L, Zou Q, Yi B, Yang X, Ma ZS. Oral microbial community assembly under the influence of periodontitis. *Plos One*. 2017;12(8):e0182259.
31. Ochoa Mangado E. Consumo de alcohol y salud laboral: Revisión y líneas de actuación. *Medicina y Seguridad del trabajo*. 2011;57(1):173-87.
32. Londoño C, Rodríguez I, Cantiva C. Questionnaire to Classify the Level of Tobacco Consumption in Young People, *Diversitas: Perspectivas en Psicología*. 2011;7(2), 281-91.
33. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of Subgingival Bacterial Sampling With Oral Lavage for Detection and Quantification of Periodontal Pathogens by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Periodontology*. 2007;78(1):79-86.
34. Tonetti MS, Claffey N; European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *Journal Clinical Periodontology*. 2005;32(6):210-13.
35. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal Clinical Periodontology*. 1998;25(2):134-44.
36. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *Journal of Periodontology*. 1999;70(1):13-29.
37. Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, Gamonal J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *Journal Periodontology*. 2005;76(2):289-94.
38. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *Journal of Dental Research*. 2009;88(11):982-90.
39. Ardila Medina CM, Alzate J, Guzman IC. Correlación de bacilos entéricos gram-negativos con parámetros clínicos y demográficos de pacientes con periodontitis crónica. *Avances en periodoncia e implantología oral*. 2014;26(2):77-82.
40. Heitz-Mayfield LJ, Huynh-Ba G. History of treated periodontitis and smoking as risks for implant therapy. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2009;24(1):39-68
41. Karasneh JA, Al Habashneh RA, Marzouka NA, Thornhill MH. Effect of cigarette smoking on subgingival bacteria in healthy subjects and patients with chronic periodontitis. *BMC Oral Health*. 2017;17(1):64.
42. Watanabe K, Frommel TO. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. *Journal Clinical Periodontology*. 1996;23(3 Pt 1):212-9.



43. Lin CY, Wong MY, Jeng JH, Chang WK, Kuo MY. Rapid and specific detection of leukotoxine sequences of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets by the polimerase chain reaction. *Journal of the Formosan Medical Association*. 1994;93(4):289-93.
44. Meurman JH, Wahlfors J, Korhonen A, Alakuijala P, Väisänen P, Torkko H, Jänne J. Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival dental plaque with the aid of a rapid PCR method. *Journal of Dental Research*. 1997;76(7):1376-80.
45. Darveau RP, Hajishengallis G, Curtis MA. *Porphyromonas gingivalis* as a Potential Community Activist for Disease. *Journal of Dental Research*. 2012; 91(9):816-20.
46. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Periodontology*. 2000;27(6):417-24.
47. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Local antibiotic therapy guide by microbiological diagnosis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2002;29(8):743-49

CITA SUGERIDA

Aguilar AB; Tello G; Zamora LG; Gonzalez SE. Diagnóstico molecular de microorganismos periodontopatógenos en pacientes alcohólicos - fumadores con periodontitis crónica de la ciudad de Loja, Ecuador. *Odontología*. 2018; 20(1): 33-49.