

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA



TESIS DOCTORAL

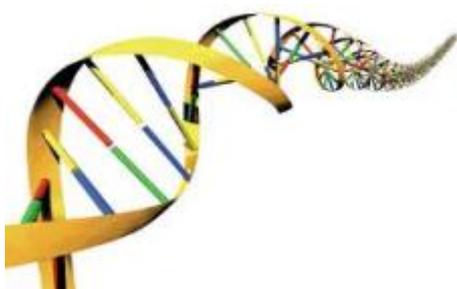
Para optar el Título de Doctor en Odontología

**MASA Y DENSIDAD ÓSEA EN ORTOPANTOMOGRAFIAS DE
PACIENTES PERIODONTALES. VALORACIÓN DEL
POLIMORFISMO GENÉTICO DEL RECEPTOR DE VITAMINA D.**

Nizar Souki Yordi

Granada, Julio de 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Nizar Souki Yordi
D.L.: GR 481-2012
ISBN: 978-84-694-6666-7



ÍNDICES

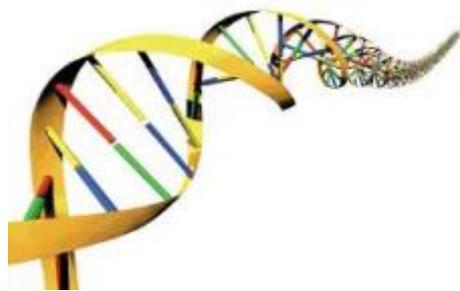
Índice de Contenido

| | | |
|----------|--|----|
| 1.0 | RESUMEN | 2 |
| 1.1 | INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.2 | OBJETIVOS | 2 |
| 1.3 | MATERIALES Y MÉTODOS | 3 |
| 1.4 | RESULTADOS..... | 4 |
| 1.5 | CONCLUSIONES | 4 |
| 2.0 | INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2.1 | DENSITOMETRIA ÓSEA..... | 7 |
| 2.2 | INDICES MORFOMÉTRICOS. | 7 |
| 2.3 | RADIOLOGÍA DIGITAL. | 11 |
| 2.3.1. | CARACTERÍSTICAS RADIOLOGÍA DIGITAL..... | 11 |
| 2.4 | ENFERMEDAD PERIODONTAL. | 13 |
| 2.4.1. | CLASIFICACION DE LAS PERIODONTITIS. | 14 |
| 2.4.2. | EPIDEMIOLOGIA. | 15 |
| 2.4.3. | ETIOPATOGENIA..... | 16 |
| 2.4.3.1. | BACTERIAS SUBGINIGIVALES..... | 17 |
| 2.4.4 | TEJIDOS PERIODONTALES Y SISTEMA INMUNITARIO. | 18 |
| 2.4.4.1. | RESPUESTA INMUNE EN LA PERIODONTITIS..... | 18 |
| 2.4.4.2. | PATOGÉNESIS PERIODONTALES Y RECEPTORES TIPO TOLL..... | 23 |
| 2.4.4.3. | OSTEOINMUNOLOGÍA DE LOS TEJIDOS PERIODONTALES..... | 27 |
| 2.4.5. | FACTORES AMBIENTALES ADQUIRIDOS. | 30 |
| 2.4.6. | PREDISPOSICIÓN GENÉTICA. | 31 |
| 2.4.6.1. | VARIABILIDAD GENÉTICA..... | 34 |
| 2.5 | LA VITAMINA D Y EL GEN VDR..... | 36 |
| 2.5.1. | ESTRUCTURA DE LA PROTEINA VDR..... | 36 |
| 2.5.2. | ESTRUCTURA DEL GEN VDR. | 37 |
| 2.5.2.1. | VARIANTES DEL GEN VDR..... | 38 |
| 2.5.2.2. | POLIMORFISMO DE LA REGIÓN 5'UTR..... | 38 |
| 2.5.2.3. | POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN CODIFICANTE..... | 39 |
| 2.5.2.4. | POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN 3'UTR..... | 39 |
| 2.6 | POLIMORFISMO DE RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR) Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL | 40 |

| | | |
|-----|--|----|
| 3.0 | JUSTIFICACIÓN: | 44 |
| 4.0 | OBJETIVOS: | 46 |
| 5.0 | DISCUSIÓN: | 48 |
| 5.1 | DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DEL NIVEL DE HUESO ALVEOLAR CON LAS VARIABLES DE DENSIDAD OPTICA E INDICE MORFOMETRICO. | 48 |
| 5.2 | DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL RECEPTOR DE VITAMINA D Y SU COMPARACION CON EL RESTO DE VARIABLES. | 52 |
| 6.0 | CONCLUSIONES: | 55 |
| 7.0 | PERSPECTIVAS | 57 |
| 8.0 | REFERENCIAS | 59 |
| 9.0 | ANEXO DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS | 81 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. TRAZADO PARA OBTENER EL ÍNDICE CORTICAL MANDIBULAR | 8 |
| FIGURA 2. MÉTODO DE BENSON Y COLS. 1991. CLASIFICACIÓN DEL ICM SEGÚN KLEMETTI..... | 10 |
| FIGURA 3. MÉTODO DE TAGUCHI Y COLS. 1995 | 11 |
| FIGURA 4. MECANISMO PATOGENICO DE LA PERIODONTITIS. TOMADO DE MESA Y COLS. CURRENT IMMUNOLOGY REVIEWS 2011; 7: 83-91. | 17 |
| FIGURA 5. BIOPSIAS GINGIVALES | 19 |
| FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS RECEPTORS TOLL-LIKE HUMANOS Y LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN TLR: TOLL-LIKE RECEPTOR. | 25 |
| FIGURA 7. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE VITAMINA D | 37 |
| FIGURA 8. LOCALIZACIÓN DEL GENOMA, GENES VECINOS Y ESTRUCTURA DEL GEN VDR | 37 |
| FIGURA 9. ESTRUCTURA DEL GEN VDR Y POLIMORFISMOS CONOCIDOS..... | 38 |



1.-RESUMEN

1.0 RESUMEN

1.1 Introducción

Las radiografías panorámicas, representan una herramienta de diagnóstico importante en la práctica dental. Tanto la calidad ósea como la cantidad ósea, pueden ser evaluadas en la mandíbula a través de las radiografías panorámicas. La evaluación de la cantidad de hueso de la mandíbula se realiza de manera cotidiana para la detección del diagnóstico de la enfermedad periodontal. Generalmente la cantidad ósea mandibular, es menos frecuente evaluarla, aunque representaría un valor de muchísima importancia como ayuda en el diagnóstico de las enfermedades óseas como la osteoporosis o de identificar individuos con mayor riesgo de pérdida ósea alveolar. La mandíbula representa una zona del cuerpo altamente sensible a las alteraciones en la densidad de masa ósea corporal. Para valorar la calidad ósea en radiografías panorámicas, se han realizado una serie de métodos, para la determinación de la masa ósea mandibular a expensas de radiografías orales que han desarrollado unos índices radiomorfométricos cuyos autores afirman que se correlacionan con la masa ósea corporal. La calidad ósea difiere entre individuos y esta puede ser evaluada a través de diferentes tipos de radiografías. se han descrito un grupo de índices basados en la medición manual de estructuras anatómicas que se correlacionan con la masa ósea corporal.

Para valorar la calidad ósea en radiografías panorámicas, se han descrito un grupo de índices basados en la medición manual de estructuras anatómicas.

La vitamina D representa un papel muy importante en el metabolismo óseo, incluyendo la absorción de calcio y la pérdida ósea. También ha sido demostrada que juega un papel muy importante en otras alteraciones metabólicas tal como aquellas que involucran la respuesta del sistema inmunológico y del cáncer. El gen del receptor de la vitamina D (VDR) representa efectos profundos en el metabolismo mineral y la densidad mineral ósea. Si el polimorfismo del gen (VDR) influye en el nivel o en la función del VDR, este pudiese tener un papel determinado en la patogénesis de la enfermedad periodontal y de las enfermedades sistémicas que afectan el tejido óseo.

1.2 Objetivos

- 1°. Cuantificar el nivel de hueso alveolar (cantidad de masa ósea) en ortopantomografías digitales mediante un programa informático de análisis digital de imagen y compararlo con la densidad óptica ósea (calidad ósea) determinada en dos zonas específicas mandibulares, en hueso alveolar y hueso basal.
- 2°. Comparar el nivel de hueso alveolar con el ancho cortical mandibular medido en la zona propuesta por Taguchi (índice de Taguchi).
- 3°. Determinar la influencia del tabaco, como factor de riesgo ambiental de periodontitis, sobre el nivel de masa ósea y densidad ósea alveolar, en ortopantomografías digitales.
- 4°. Determinar a través del método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, enzima de restricción BSML, el polimorfismo del receptor genético de vitamina D en los pacientes con y sin afectación periodontal.
- 5°. Demostrar si el proceso de destrucción periodontal se asocia a un determinado estatus de masa o densidad ósea mandibular.

1.3 Materiales y Métodos

Se analizaron 1609 ortopantomografías realizadas en la Facultad de Odontología de la Univ. de Granada (España) hechas en el año 2008. Se incluyeron en el estudio Rx de pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre los 21 años y menos de 50 años. Se excluyeron del estudio las radiografías en las que no se visualizaron los agujeros mentonianos, las corticales mandibulares, o la unión cemento-adamantina por caries u obturaciones en los dientes estudio, las que presentaban algún artefacto o defecto en su revelado o fijado, aquellas de pacientes que en su historial médico presentaran alguna patología del metabolismo óseo o que estuviesen recibiendo tratamientos para la osteoporosis (estrógenos, hormonas, calcio, calcitonina, vitamina D, fluoruros o bifosfanatos) y las Rx con menos de seis dientes o edéntulos mandibulares. Tras aplicar estos criterios, se seleccionaron 319 ortopantomografías. Los criterios de inclusión fueron: pacientes de ambos sexos, con edades hasta los 45 años (se quiso anular el efecto de la menopausia sobre la masa ósea en las mujeres por encima de esta edad). La variable tabaco se categorizó en no fumador, fumador de menos de 10 cigarrillos, fumador entre 10 y 20 y fumador de más de 20 cigarrillos. Las radiografías digitalizadas fueron capturadas mediante un programa informático

realizándose el estudio solamente en mandíbula por ser la zona menos afectada por superposición de estructuras. Además de la edad y sexo, analizamos el índice cortical mandibular, la densidad óptica ósea alveolar y basal, y el nivel de hueso alveolar. En 72 pacientes se obtuvieron muestras nucleadas obtenidas de células epiteliales de la mucosa yugal, determinando por PCR el genotipo VDR (enzima endonucleasa de restricción BsmI).

1.4 Resultados

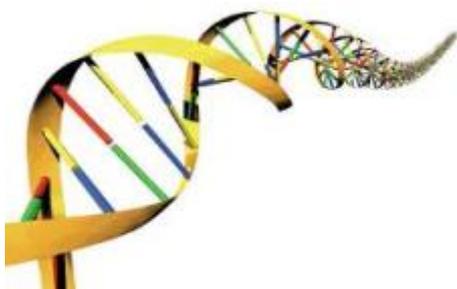
El nivel de hueso alveolar no se relacionó con el ancho cortical mandibular (Taguchi's index) ($p=0.575$) ni con la densidad óptica ósea alveolar ($p=0.478$) ni con la densidad óptica ósea basal ($p=0.060$). Ambas densidades óseas, estaban fuertemente asociadas con el ancho cortical mandibular ($p=0.005$ y $p=0.009$, respectivamente). El nivel de hueso alveolar tampoco se asoció con la expresión del polimorfismo del gen VDR ($p=0.575$). La pérdida de hueso fue mayor en fumadores que en no fumadores ($p=0.035$) y el índice de anchura cortical mandibular fue más alto en hombres ($p=0.04$), en el grupo de mayor edad ($p=0.032$), y en aquellos con más dientes ($p=0.01$). El análisis multivariante confirmó la ausencia de asociación entre aquellas variables y la pérdida de hueso alveolar.

1.5 Conclusiones

- 1.- El nivel de hueso alveolar (cantidad ósea) mostró una relación NO significativa con la densidad ósea mandibular (calidad ósea) medida en radiografías panorámicas digitales, mediante la determinación de los niveles de gris en hueso alveolar y hueso basal.
- 2.- El nivel de hueso alveolar NO se asoció con el ancho cortical mandibular medido en la zona propuesta por Taguchi. Ambas asociaciones se refieren a población caucásica de mujeres premenopáusicas y hombres por debajo de los 50 años.
- 3.- La pérdida de hueso alveolar fue mayor en los fumadores que en los no fumadores, mientras que los valores de densidad óptica no se relacionaron con el consumo de tabaco.

4.- La expresión genética del gen del receptor de la vitamina D (enzima de restricción BsmI) determinada por PCR, NO se asoció con el nivel de hueso en la cresta ósea alveolar en dicha población.

5.- Los resultados de este estudio sugieren que la destrucción ósea en la periodontitis es un proceso inflamatorio local independiente del estatus óseo.



2.-INTRODUCCIÓN

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 DENSITOMETRIA ÓSEA.

Recientemente ha habido un interés más amplio en el diagnóstico y los signos de la osteoporosis, siendo esta, una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja densidad de masa ósea (DMO) y la alteración de su microarquitectura, que conlleva a producir fragilidad ósea y consecuentemente, un mayor incremento de riesgo de fractura^{1,2,3}, además de la persistencia de la pérdida ósea⁴, esta patología, presenta una serie de alteraciones que pueden estar asociados a manifestaciones orales como reabsorción ósea, pérdida dentaria⁵, enfermedad periodontal⁶ y pérdida ósea oral⁷.

En medicina existen numerosas técnicas para medir el contenido mineral del hueso, entre ellas, la radiomorfometría, radiodensitometría, el análisis cuantitativo del trabeculado óseo, sustracción digital, absorciometría por fotones y tomografía computarizada cuantitativa, basada en la medición de los perfiles de atenuación de radiaciones contenidos en un corte axial del paciente⁸.

Todas ellas son técnicas válidas pero a la vez costosas, requieren de la utilización de aparatología compleja, técnicos y/o personal especializado para su realización, no todas pueden aplicarse para determinaciones en estructuras orales y además, no están disponibles en las consultas dentales.

Varios lugares del cuerpo muestran una alta susceptibilidad en la disminución de la densidad de hueso. La mandíbula se ha identificado como uno de estos lugares siendo estudiada para este fin a través de radiografías convencionales como las periapicales o las panorámicas⁹.

2.2 INDICES MORFOMÉTRICOS.

Actualmente, Las radiografías panorámicas son usadas extensamente en la práctica dental para el diagnóstico de diferentes patologías. La valoración radiográfica de la calidad ósea, representa un papel importante en la planificación de tratamientos, como en la colocación de implantes y como método no invasivo en la identificación de pacientes con osteoporosis. Con objeto de poder determinar la masa ósea a expensas de ortopantomografías, se han desarrollado unos índices

radiomorfométricos, publicados en la literatura, basados en la medición manual de estructuras anatómicas y cuyos resultados, según sus autores, se correlacionan con los de las técnicas antes citadas^{10,11,12,13,14}. Uno de los más simples es el Índice Cortical Mandibular (ICM)¹⁵.

Este índice, mide la apariencia del borde inferior de la cortical mandibular distal al foramen mentoniano. (Fig. 1):

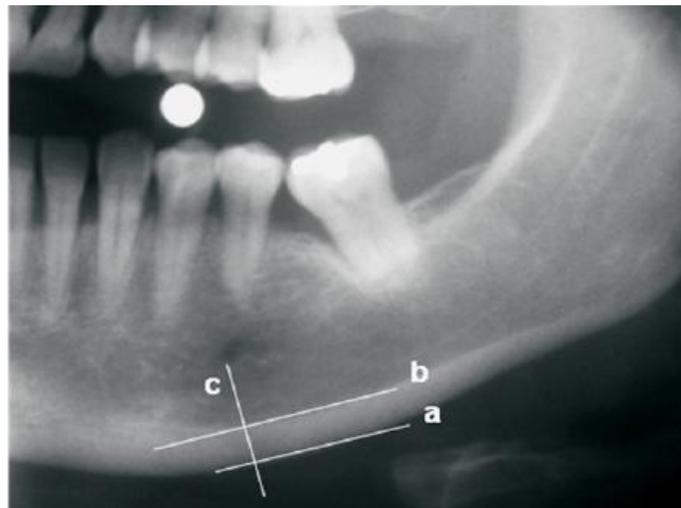


Figura 1. Trazado para obtener el índice cortical mandibular. a. Línea tangencial al borde inferior de la mandíbula, b Línea paralela a la anterior, la cual contacto el borde superior de la cortical mandibular, c. Línea vertical que desciende paralela al borde inferior del agujero mentoniano e intercepta perpendicularmente las anteriores

Otros investigadores han medido en radiografías panorámicas, el grosor del borde cortical inferior del cuerpo de la mandíbula en diferentes regiones (cortes del menton^{20,21}, antegonial²² y gonial¹⁰).

Algunos investigadores han sugerido que el ICM de las radiografías panorámicas originalmente usado por Klemetti y cols. en 1994,¹⁴ puede estar asociado a la DMO^{19,23,24} a la calidad de la cortical mandibular ósea²⁵ y la DMO del esqueleto de manera generalizada.

Bollen y cols.²⁶ y Persson y cols.²⁷ demostraron que el ICM puede ser usado para predecir con mayor precisión el incremento en las fracturas producidas por la osteoporosis. Taguchi y cols.²⁸ recientemente han demostrado que el ICM sirve

también para identificar a las mujeres que pueden presentar un riesgo de padecer aterosclerosis o osteoporosis y/o ambas entidades. Estos hechos implican y comprometen al dentista por su capacidad de visualización y diagnóstico de identificar personas asintomáticas con osteoporosis, aterosclerosis o ambas, atendidos en las consultas dentales.

Estudios en Finlandia²⁰, Japón,^{17, 29,30} Estados Unidos^{31, 26} Polonia³² y el Reino Unido^{33, 34} ofrecen diferentes opiniones sobre la utilidad de las mediciones de la cortical mandibular inferior en las radiografías panorámicas, para identificar la disminución esquelética de DMO en las mujeres.

Un estudio reciente de caso-control en los Estados Unidos sugiere que la cortical mandibular inferior en las Rx panorámicas es más delgadas en sujetos con fracturas osteoporóticas en comparación con pacientes controles²⁶. Devlin y Horner determinaron que un grosor de la anchura cortical mandibular de 3 mm, representa el límite más apropiado compatible con una densitometría ósea normal en la mujer³³.

Lee y cols. sugieren que la medición cuidadosa en la anchura cortical mandibular en la ortopantomografías, pueden contribuir de manera eficaz en la identificación de las mujeres postmenopáusicas con bajo nivel esquelético de densidad mineral ósea²⁹.

Bras y cols.¹⁰ introdujeron la medida del grosor de la cortical mandibular a nivel del ángulo de la mandíbula, pero esta localización proporciona una imagen radiológica poco fiable en este tipo de estudios por la frecuente superposición de zonas aéreas, así como por una posible magnificación horizontal en la radiografía panorámica, siguiendo los criterios de la radiografía panorámica rotacional.

Yang y cols.¹¹ usaron como medida el ancho de la cortical mandibular en la región comprendida entre premolares y molares. Una medición útil porque esta zona está menos influenciada por la superposición de estructuras, por la magnificación vertical o por errores del operador, además la altura de la cortical mandibular en esta zona es muy estable. El problema se ocasiona en los pacientes edéntulos donde perdemos la referencia para la medición.

Benson y cols.¹² proponen, el índice panorámico mandibular, usando el foramen mentoniano como referencia, cuya localización anatómica es relativamente fija. Consiste en el cociente entre dos medidas, ancho cortical mandibular y distancia más corta perpendicular entre el margen inferior del foramen y el borde inferior de la

mandíbula.

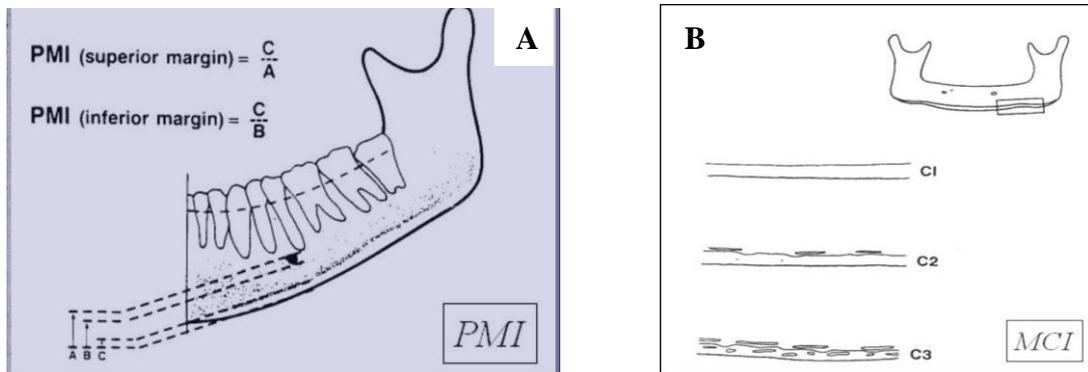


Figura 2.

A: Método de Benson y cols. 1991.

B: Clasificación del ICM según Klemetti:

C1: el margen endostial de la cortical es regular y puntiagudo en ambas partes.

C2: el margen endostial muestra defectos semilunares (reabsorción lagunar) y se asemeja de formar residuos corticales endostiales (una a tres capas) en uno o ambas partes

C3: las capas de cortical forman residuos endostiales abundantes y es muy porosa.

Dicha clasificación ha sido empleada en diferentes estudios ¹⁶⁻¹⁹.

Taguchi y cols.¹³ introducen la medición del ancho cortical mandibular trazando una vertical al centro del foramen, que cortase ambas corticales. Dichos resultados se correlacionan con los valores de masa ósea corporal obtenidos mediante tomografía computarizada cuantitativa, prueba considerada como *gold standard* en este tipo de determinaciones³⁵.

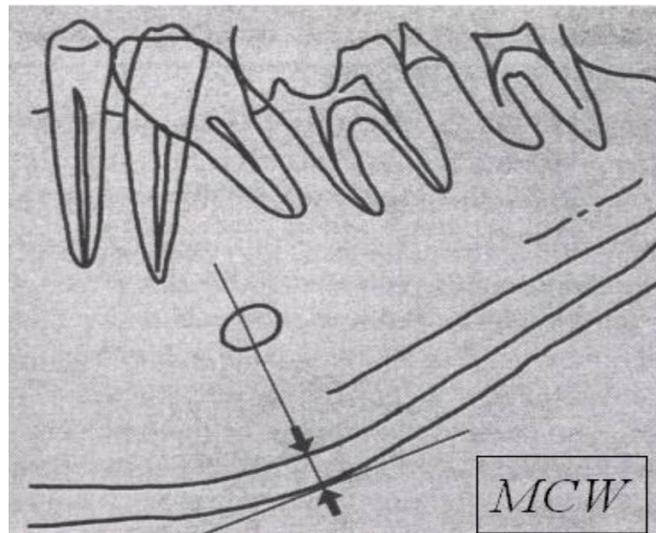


Figura 3. Método de Taguchi y cols. 1995

2.3 RADIOLOGÍA DIGITAL.

El uso de la tecnología digital de análisis de imagen, aplicada tanto a la radiología como a imágenes clínicas, es una realidad cada vez más frecuente en odontología, nuestro grupo viene empleando dicha técnica en la valoración clínica de los agrandamientos gingivales secundarios a fármacos y en la cuantificación del epitelio en lesiones orales a partir de cortes histológicos ^{36,37}.

2.3.1. CARACTERÍSTICAS RADIOLOGÍA DIGITAL.

Las características- ventajas de la radiología digital, quedan expuestas a continuación:

- Permite la visualización de radiografías sin usar productos químicos.
- Una reducción de la radiación como mínimo a la mitad. Es beneficioso para el paciente, beneficia a la imagen de la clínica.
- Simplifica el almacenamiento de las radiografías. Menor probabilidad de pérdidas, archivado incorrecto o destrucción.
- Se pueden realizar copias de seguridad y almacenarlas en lugar seguro.
- Tienen valor como prueba en caso de pleito, ya que la fecha y hora a la que han sido tomadas queda impresa automáticamente y no se puede cambiar.
- No se deterioran con el paso del tiempo.
- Interpretación y uso de las imágenes asistido por ordenador: Se puede corregir el

desenfoco producido por la vibración del filamento dentro del tubo RX. Se pueden corregir las infra-sub exposiciones.

- Permite mediciones más fáciles y precisas.
- Facilita la distribución de las imágenes. Las imágenes se pueden imprimir o adjuntar en documentos de texto. Se pueden enviar a otros profesionales para consulta usando correo electrónico.
- Se integra en la clínica informatizada del futuro.

En definitiva la radiología digital oral, reduce costos minimizando la necesidad de repeticiones y de espacio de archivo, al eliminar prácticamente película y productos químicos. Mejorar la productividad del servicio al minimizar la gestión manual de placas, lo cual implica muchas horas de trabajo, acelerar la disponibilidad de imágenes y mejorar la calidad de la imagen. Brindar una excelente eficiencia respecto de la dosis de radiación y aumenta la seguridad en la protección de datos. Como inconvenientes, requiere una inversión inicial, requiere aprendizaje de nuevas tecnologías, los sensores son de mayor rigidez que la placa radiográfica tradicional.

La utilización de programas informáticos de análisis de imagen, ha permitido a los investigadores obtener valoraciones densitométricas del hueso alveolar, basal, periimplantario y descubrimiento de caries, mediante la cuantificación de la mineralización de la masa ósea ³⁶.

Los métodos basados en dicha tecnología evitan el revelado, facilitan el almacenaje, mejoran el diagnóstico y la educación del paciente, y quizás la ventaja más importante, reducen en un 90% la radiación que recibe el mismo, posibilitando la realización de estudios longitudinales. Entre las funciones que nos permiten realizar estos *software* de radiología digital, está la medición de densidades ópticas óseas, basado en la medición precisa de la escala de grises (entre 0 y 255 tonos de gris). Los resultados de la medición la pueden presentar de tres formas, como información estadística numérica, como un histograma que muestra la distribución de la densidad y como un perfil de la misma. (Digora[®], Dent-a-View[®], Trophy-Window[®])

Consideramos dicha técnica un método útil, económica, automática y no invasiva que permite conocer de una manera muy sencilla la densidad ósea óptica mandibular y solventa los problemas que plantean las técnicas radiométricas en un doble sentido, por un lado la precisión, Benson¹² y Taguchi¹³ sobre radiografías analógicas emplean

diversos artilugios manuales como reglas milimétricas, lupas o calibradores para obtener sus medidas, nosotros, sobre radiografías después de ser digitalizadas (menor magnificación), obtenemos de manera automática el resultado densitométrico basado en la escala de grises, en segundo lugar, la rapidez - sencillez, una vez capturada la imagen por el programa informático, el resultado se obtiene en segundos o décimas de segundos.

2.4 ENFERMEDAD PERIODONTAL.

La periodontitis crónica, representa la mayor causa de pérdida dentaria, por delante de la caries, después de los 40 años ³⁸.

Es una infección crónica por bacterias específicas capaces de producir una reabsorción del tejido de soporte óseo que rodea a los dientes a través de un proceso inflamatorio complejo ^{39,40}.

Además, factores de riesgo genético y ambiental son necesarios para hacer al individuo susceptible de desarrollar la enfermedad ⁴⁰.

La pérdida progresiva de inserción clínica, de hueso alveolar y tejido conectivo, con formación de una bolsa periodontal hasta la caída del diente, es en definitiva la consecuencia de la periodontitis ⁴¹. Estudios epidemiológicos transversales indican que aproximadamente el 10-15% de la población adulta sufre una "periodontitis avanzada" mientras que el 80% tiene una "periodontitis moderada" y el 10% de la población es periodontalmente sana ⁴².

Aunque se haya documentado el decisivo papel de la placa bacteriana en la iniciación y en el mantenimiento de la gingivitis, estudios de asociación demostraron la estrecha relación entre la presencia de la placa bacteriana y el desarrollo de la periodontitis, hay un mayor número de microorganismos patógenos que pueden aislarse en las lesiones periodontales en comparación con aquellos aislados en las localizaciones sanas ⁴³⁻⁴⁸.

Los efectos dañinos sobre los tejidos y la gravedad de estos efectos están regulados por una compleja interacción entre el parásito y huésped. Las enfermedades periodontales engloban a dos grupos de patologías bien diferenciadas, las gingivitis y

las periodontitis. En estas patologías existe una estrecha relación topográfica entre depósitos bacterianos existentes sobre la superficie radicular y un infiltrado de células inflamatorias en los tejidos periodontales.¹⁸ La diferencia entre ambos grupos de patologías está en la destrucción de la inserción periodontal que ocurre en la periodontitis, y como consecuencia se puede llegar a producir la pérdida del diente. De hecho, las periodontitis son la principal causa de pérdida dentaria en pacientes mayores de 35- 40 años²⁵.

2.4.1. CLASIFICACION DE LAS PERIODONTITIS.

Las periodontitis no son una entidad única y homogénea, sino que son una familia de enfermedades estrechamente relacionadas en las que puede variar la etiología, la historia natural y la respuesta al tratamiento⁴⁹.

Los últimos años se ha estado utilizando la clasificación consensuada en el “World Workshop in Clinical Periodontics” de 1989 y el “Workshop Europeo en Periodoncia”^{50, 51} clasificaciones, como la existencia de demasiadas categorías, ausencia de un componente gingival, énfasis inapropiado en la edad de inicio y tasa de progresión y, por último, en unos criterios de clasificación no demasiado claros⁴¹. Tras varios cambios, la actual clasificación data de 1999⁴¹.

La idea fundamental de esta clasificación, diferenciándose de las anteriores, es que se elimina cualquier dato concerniente a la edad y a la progresión de la enfermedad. A todos los casos en los que no existe una destrucción agresiva de los tejidos periodontales, independientemente de la edad, se les agrupa simplemente como “Periodontitis crónica”, complementando el nombre con “generalizada” o “localizada” en función de la extensión de la afectación. Por otro lado, las formas de enfermedad periodontal claramente destructivas pasan a denominarse “Periodontitis agresivas”, subclasificándose a su vez en “generalizada” o “localizada”. De esta manera, en este último apartado, se incluyen la mayoría de los casos de lo que antes se conocía como periodontitis prepuberal y juvenil, excepto aquellas agrupadas a periodontitis asociadas a enfermedades sistémicas. Existen algunos casos de la antigua periodontitis del adulto que, debido a su elevada tasa de destrucción, se incluyen también en este grupo⁴¹.

Las clasificaciones irán evolucionando y cambiando a medida que conozcamos más sobre las infecciones periodontales. Por ejemplo, la designación de periodontitis crónica puede estar abarcando multitud de infecciones polimicrobianas y poligenéticas que se irán descifrando en los próximos años⁵².

2.4.2. EPIDEMIOLOGIA.

En Estados Unidos, la prevalencia de periodontitis crónica (definida como tener uno o más dientes con pérdida de inserción y sondaje ≥ 3 mm), entre personas mayores de 30 años y con más de 6 dientes, es de aproximadamente un 35%, incluyendo un 3,1% que padece periodontitis avanzada, el 9,5% periodontitis moderada y un 21,8% periodontitis inicial.⁵³ La prevalencia de periodontitis avanzada en europeos es baja⁵⁴.

La proporción de europeos entre 35-44 años con bolsas iniciales (3,5-5,5 mm) oscilaba entre 13-54%; en Europa del Este, la media era de 45% y para la Europa Occidental era del 36%. La proporción de adultos con bolsas profundas ($>5,5$ mm) es menor del 10% en Europa Occidental y entre un 30-40% en algunos países de la Europa del Este⁵⁴.

De acuerdo con los datos de la última encuesta de Salud Oral en España (2005) utilizando el Índice Periodontal Comunitario, la prevalencia de procesos periodontales presenta significación estadística para la variable sexo en el grupo de 35-44 años (mejor estado periodontal en sexo femenino, $p < 0.05$). En términos generales, salvo alguna excepción, ni el nivel social, ni el tipo geográfico, ni el país de nacimiento intervienen en la prevalencia de procesos periodontales en ninguna de las cohortes etareas estudiadas. En relación al número de sextantes afectados, en los grupos de 35-44 años y en el de 65-74 años, se observa una mayor afectación promedio de sextantes en los varones con respecto a las mujeres ($p < 0.05$) y una relación clara con el nivel social (medias mayores de sextantes con patología periodontal en niveles sociales bajos). Ello tiene una gran repercusión en términos de salud pública ya que por una parte se trata de un proceso muy prevalente (aunque en estadios iniciales, que es imprescindible interceptar a tiempo). Vuelve a reafirmarse que tan sólo una mínima parte de la población desarrolla formas más severas de procesos periodontales cuya prevalencia podemos situar entre el 4-11% en la actualidad⁵⁵.

2.4.3. ETIOPATOGENIA.

Un grupo de bacterias Gram-negativas, anaerobias o microaerofílicas, organizadas en un biofilm, son el factor etiológico de las periodontitis, son las causantes del inicio y perpetuación de la infección. Pero otros factores del hospedador, la herencia, el tabaco y otros factores de riesgo pueden determinar si la enfermedad ocurre, o la severidad de la misma, por encima de las bacterias. La periodontitis requiere la presencia de bacterias específicas para su desarrollo y progresión, Además los factores genéticos juegan un papel determinante en la respuesta del huésped y relatan una variación significativa en la severidad clínica ⁵⁶ de hecho, menos del 20% de la variabilidad en la expresión de las periodontitis puede ser explicado por los niveles de bacterias específicas. ^{40,57} Por todo esto, se dice que las periodontitis son enfermedades multifactoriales y/o probabilísticas, ya que el inicio, la manifestación y progresión de la infección va a estar influenciada por diferentes factores ⁵⁸.

Resumiendo lo anterior, el concepto actual de la etiología multifactorial de las enfermedades periodontales establece que éstas son producidas por una interacción de un agente microbiano único o múltiple considerado como el factor etiológico primario necesario pero no suficiente, un huésped más o menos susceptible y unos factores ambientales que influyen sobre ambos. ⁵⁹

Tanto la respuesta inflamatoria, inmune y la destrucción tisular están influenciadas por factores de riesgo genéticos, medioambientales y adquiridos ⁶⁰. En la figura 4, puede observarse el mecanismo patogénico de la periodontitis conocido hasta la fecha y desencadenado por las bacterias periodontopatógenas.

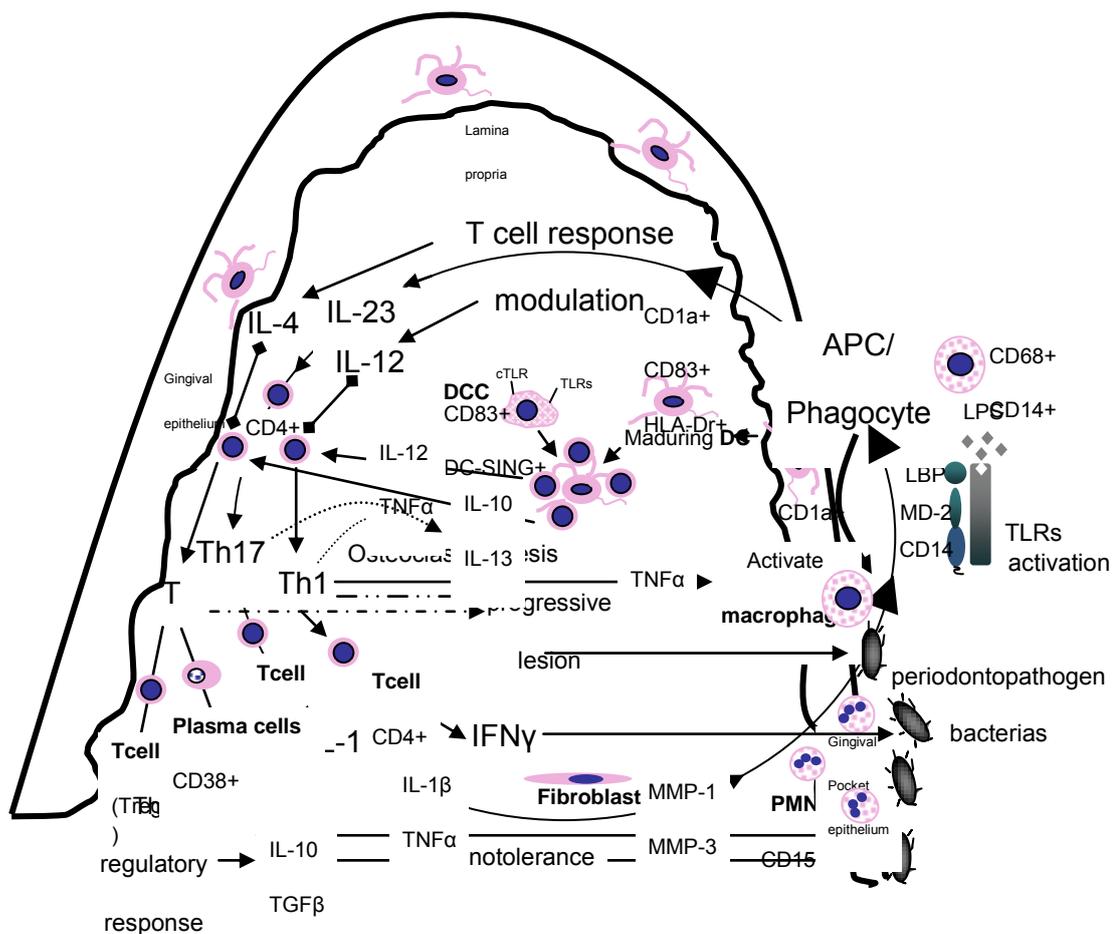


Figura 4. Mecanismo patológico de la periodontitis. Tomado de Mesa y cols. Current immunology reviews 2011; 7: 83-91.

2.4.3.1. BACTERIAS SUBGINGIVALES.

Durante la década de 1970 y 1980, se hicieron grandes esfuerzos por clarificar la naturaleza infecciosa de las periodontitis determinando que el factor etiológico de las periodontitis es un grupo de bacterias, predominantemente Gram-negativas, anaeróbicas o microaerofílicas que colonizan el área subgingival; en la década de 1990, se ha concluido que, aunque las bacterias son esenciales, no son suficientes para que se pueda desarrollar la enfermedad ⁵⁹.

En 1996, en el Taller Mundial sobre Periodontitis (“World Workshop”), se concluyó que la mayoría de las periodontitis estaban asociadas a tres bacterias: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* (anteriormente denominado

Bacteroides forsythus) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (antes *Actinobacillus actinomycetemcomitans*)⁶¹.

Recientemente, distintos virus como citomegalovirus, virus Epstein-Barr, papilomavirus y virus del herpes simple, se han estudiado por su posible asociación con el desarrollo de las periodontitis, y probablemente participen modificando la respuesta del hospedador a la microbiota subgingival.⁶²⁻⁶⁵

En el apartado de patógenos periodontales y receptores tipo Toll de esta memoria, describimos nuevos conocimientos de estos agentes etiológicos.

2.4.4 TEJIDOS PERIODONTALES Y SISTEMA INMUNITARIO.

2.4.4.1. RESPUESTA INMUNE EN LA PERIODONTITIS.

El sistema inmune de la mucosa gingival debe de reconocer y eliminar patógenos mientras que tolera comensales. Esta capacidad para discriminar es sin duda la propiedad más importante del sistema inmune y esencial para mantener la homeostasis⁶⁶.

La población linfocitaria y mielomonocítica del tejido gingival constituyen la primera línea de defensa frente a la flora de la cavidad oral⁶⁷.

La inmunidad de las mucosas se caracteriza por la presencia de subpoblaciones de linfocitos B y T maduros en el epitelio gingival, la producción de IgA secretora salivar, las células dendríticas presentadoras de antígenos (células de Langerhans) entre los queratinocitos y en el corión submucoso, pequeñas cantidades de macrófagos a nivel del conectivo subgingival, así como polimorfonucleares neutrófilos en fase de exocitosis hacia el surco gingival⁶⁸.

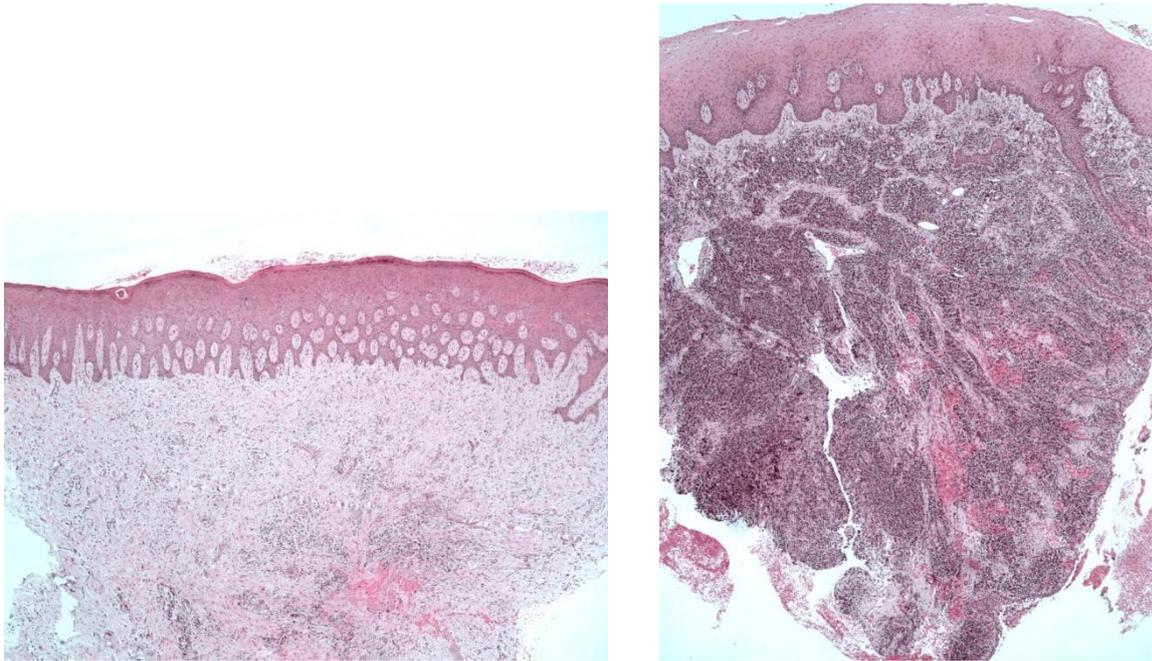


Figura 5. Biopsias gingivales de A) paciente sin periodontitis mostrando escaso infiltrado inflamatorio crónico y B) paciente con periodontitis crónica del adulto mostrando un intenso infiltrado inflamatorio en la mayor parte de la lamina propia.(hematoxilina-eosina x 4).

Casi todos los linfocitos periféricos se originan del timo y expresan el receptor $\alpha\beta$ de linfocitos T (TCR $\alpha\beta$), mientras que los independientes del timo, expresan el receptor $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$). Lundqvist y cols. Demostraron la presencia de células efectoras T constituidas por linfocitos en el tejido gingival que expresan receptor TCR $\gamma\delta$ y contienen gránulos citotóxicos⁶⁷.

El epitelio de unión, por su especial estructura y por la colaboración entre sus células, constituye un potente sistema de control microbiano⁶⁹.

Se ha comparado al epitelio de unión con el de las criptas de la amígdala, actuando como un epitelio reticular de reconocimiento inmunitario local⁷⁰.

El número de desmosomas y uniones en hendidura que unen las células del epitelio de unión son escasos, y los espacios intercelulares son amplios, lo que facilita el tránsito del infiltrado leucocitario y la difusión de antígenos desde el surco gingival hacia la lámina propia.

La lámina propia gingival está muy vascularizada, la acumulación y la migración de leucocitos a la misma están determinados por la expresión de moléculas de

adhesión (integrinas y moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas) así, los queratinocitos del epitelio gingival, y las células del epitelio de unión expresan de forma constitutiva CD54 (molécula 1 de adhesión intercelular [ICAM-1]) mientras que los endotelios capilares de la lámina propia, expresan además CD62 (molécula 1 de adhesión de células endoteliales [ELAM-1])⁷¹.

Los capilares que expresan CD54 y CD62 se encuentran vinculados topográficamente con el infiltrado inflamatorio⁷².

Se considera que la expresión gradual de CD54 dentro del epitelio de unión, es una importante vía de señalización para los neutrófilos hacia el surco gingival^{73,74}.

En la encía sana, alrededor de 30.000 neutrófilos por minuto, migran desde los vasos en la lámina propia a través del epitelio de unión hacia el surco gingival.⁷⁵

Alteraciones genéticas en las moléculas de adhesión en neutrófilos, en particular de CD18 (beta integrina), dan lugar a una deficiencia en la adhesión de los leucocitos (deficiencia tipo 1 y 2), que están relacionadas con formas de periodontitis agresiva⁷⁶.

La respuesta de inmunoglobulinas en el tejido periodontal incluye la acción de la IgA a nivel superficial de las mucosas y los niveles de IgG sistémica. Una respuesta humoral adecuada de inmunoglobulinas sintetizadas por los linfocitos B, es protectora frente a las bacterias. Las altas concentraciones de IgG2 en suero en la periodontitis agresiva son útiles para localizar la destrucción periodontal⁷⁷ y al contrario, bajas concentraciones de anticuerpos frente a proteínas y polisacáridos bacterianos de *Tannerella forsythensis*, *P. gingivalis* y *Staphylococcus aureus*, podría estar relacionada con el fracaso precoz de los implantes dentales⁷⁸.

Las células dendríticas (DC) regulan la inmunidad/tolerancia en respuesta a las bacterias orales. Las DC se distinguen por marcadores específicos, localizaciones anatómicas y distintas aunque superpuestas funciones. Las DC maduras (CD1a, CD83 HLA-Dr positivos) detectan, captan y presentan los antígenos que infiltran las mucosas activando el sistema inmunitario adaptativo. Los principales estudios de células de Langerhans / CD inmaduras en la mucosa oral/encía humana están resumidos por Cutler and Jotwani⁷⁹.

Se han detectado DC precursoras en sangre (Myeloid, DC1 and Plasmocytoid, DC2) y dos tipos de DC en tejidos periféricos (piel y mucosas), las células de Langerhans en epidermis y epitelio mucoso y las células dendríticas intersticiales en la dermis y en lámina propia. Funcionalmente, los precursores de los monocitos las células dendríticas mieloides tienden a favorecer una respuesta de tipo Th1, y por lo tanto fueron llamados "DC1". Sin embargo DC1 puede polarizar las respuestas efectoras hacia Th1 o Th2, dependiendo del tipo de endotoxina o lipopolisacárido estimulante. Los precursores de las células dendríticas plasmacitoides tienden a favorecer una respuesta Th2, y por lo tanto fueron llamados "DC2. DC2, se activa en presencia de IL-3 y el ligando de CD40, madurando en las células dendríticas-2, que se caracterizan por presentar altos niveles de expresión de los principales productos del complejo de histocompatibilidad y de moléculas co-estimulantes, y una tendencia a inducir respuestas Th2 efectoras. En el caso de las células dendríticas mieloides, su capacidad para suprimir la respuesta inmune, depende en gran medida del resto de células inmaduras. Los aumentos en los niveles circulantes de las células mieloides maduros dendríticas, se ha propuesto como medida para romper la tolerancia a la flora comensales. En contraste con las células dendríticas mieloides, células dendríticas plasmocitoides, cuando maduran bajo ciertas condiciones, pueden conducir a diferenciación de las células T-reguladoras⁷⁹.

Señales moleculares regulan el tráfico de células dendríticas a nivel de las mucosas, la expresión de citocinas denominadas proteínas inflamatorias de macrófagos 3 α (MIP-3 α) y 3 β (MIP3 β) y sus respectivos receptores CCR-6 y CCR-7, intervienen en la interiorización de células dendríticas hacia los tejidos y la salida hacia regiones ricas en linfocitos T de los ganglios linfáticos^{80,81}.

Las DC maduras expresan in vitro, concentraciones elevadas del receptor CCR-7 y bajas de CCR-6 (21). Estudios recientes en humanos demuestran que CCR-6 y MIP-3 β se expresan en los tejidos periodontales inflamados y pueden tener un papel regulador importante en la migración específica de linfocitos y DC. Un fallo en la maduración de las DC puede ocasionar una inmunosupresión o tolerancia inmunitaria, en este sentido, el lipopolisacárido (LPS) de *P. gingivalis* favorece

una inmunosupresión al inducir una escasa maduración dendrítica y una respuesta de tipo Th2 tanto in vitro⁸², como in vivo⁸³.

Uno de los principales precursores de las células de Langerhans son los monocitos que acuden hacia las localizaciones infectadas reclutados por quimiocinas como la quimiocina regulada y activada por el timo (TARC) y la quimiocina derivada de macrófagos (MDC) secretadas por linfocitos T y DC. Las DC inmaduras que son activadas localmente por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) p.e. LPS, secretan a su vez quimiocinas que atraen a otras células inflamatorias como, linfocitos T activos, células NK, y más células dendríticas.

Células dendríticas dérmicas contribuyen al pool de reserva de células CD83 + (células dendríticas maduras) en la lámina propia de pacientes con periodontitis crónicas del adulto^{84,85} y, además, estas células maduras CD83 + dendríticas forman complejos inmunes CD4 + células T en los focos orales linfoides⁸⁵.

Dependiendo de su localización y estado de diferenciación en los tejidos, las células dendríticas, las células de Langerhans y los macrófagos están especializados para capturar microorganismos específicos por la expresión de grupos distintos de receptores de lectina tipo C (CLR)^{86,87}.

Los receptores de lectina tipo C consisten en receptores transmembrana tipo I y II. Receptores de lectina tipo C funcionan principalmente para interactuar con los hidratos de carbono de un amplio grupo de microorganismos, e internalizar estos patógenos para el procesamiento y presentación de antígeno. En consecuencia, los receptores de lectina tipo C, contienen dominios de reconocimiento por la unión a azúcares (por ejemplo, la manosa, fucosa, galactosa, y β -glucanos) y las proteínas glicosiladas.

Se ha afirmado que los organismos patógenos que interactúan con receptores CLR tipo DC-SIGN, originan infecciones crónicas que duran toda la vida, la elevada expresión de este tipo de receptores observada en la lámina propia gingival en la periodontitis crónica, depende de citocinas de tipo Th2 como la IL-10.

El LPS de *P. gingivalis* induce la liberación de IL-10 en las DC dendríticas y favorece una respuesta efectora de tipo Th2 in vivo⁸³.

En la actualidad, sigue sin estar aclarado completamente el papel de los receptores CLR en la captación de antígenos de microorganismo orales.

El paradigma Th1/Th2 ha ofrecido un marco conceptual productivo para la investigación de la patogénesis de la periodontitis. Sin embargo, como en muchas otras enfermedades inflamatorias, el papel de las células T en la periodontitis no fácilmente se ajustan a este modelo. Una nueva subpoblación de células CD4 + células T fue descubierto recientemente, denominado "Th17", y basado en la secreción de la citoquina proinflamatoria IL -17. Este hecho, explica muchas de las discrepancias en el modelo clásico Th1/Th2, y ha sido la identificación de células Th17 lo que obliga a un nuevo examen de la periodontitis en el nuevo contexto⁸⁹.

Th17 es activado por diferentes citocinas y factores de transcripción (IL-6, IL21, IL23, TGFβ, STAT-3, RORα y RORγt), e inhibido por otros (IL-4, IFN, IL-2, IL27, IL-10, STAT-5 y Foxp3)⁹⁰. IL-1 estimula la diferenciación de Th17, citoquina muy elevada en la inflamación periodontal⁹⁰.

2.4.4.2. PATÓGENOS PERIODONTALES Y RECEPTORES TIPO TOLL.

Desde la década de los 90, se ha relacionado el biofilm subgingival, que contiene complejos integrados por *Porphyromona gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola*, con la profundidad de sondaje y el sangrado a la exploración en las periodontitis⁹¹.

Esta relación se ha considerado de causa-efecto, sin embargo, los agentes patógenos que inician la periodontitis han recibido el nombre de periodontopatógenos basándose en un abordaje de “ponderación de la evidencia”⁹².

Es decir, que todas las investigaciones que relacionan *P. gingivalis* con bolsas periodontales profundas y pérdida de inserción, son transversales y no se ha publicado ningún estudio longitudinal que demuestre que el sobrecrecimiento del agente patógeno precede a la lesión periodontal, por lo que una explicación derivada de un estudio transversal, en el caso que nos ocupa, puede ser que el aumento de *P. gingivalis* en la periodontitis sea debido a la existencia de bolsas

periodontales (el aumento del patógeno es el efecto y no la causa de la lesión)⁹⁴. Esta nueva hipótesis sugiere que serían los colonizadores primarios del biofilm, los que iniciarían la inflamación, y una vez establecida la lesión, aparecería la microflora considerada periodontopatógena hasta ahora. Por lo tanto, dos conclusiones de esta nueva teoría derivada de las investigaciones sobre la resolución de la inflamación en la periodontitis del grupo de Van Dyke, serían que la inflamación determina la composición de la microflora y no al contrario, y que estaría indicado hacer una reevaluación de los agentes patógenos periodontales⁹³.

En el tejido periodontal sano se encuentran pequeñas cantidades supragingivales de aerobios gram positivos y anaerobios facultativos, como especies de *Streptococcus* y *Actinomyces*⁹⁴. El mayor acumulo de placa bacteriana conduce a una gingivitis con infiltrados de linfocitos T como células predominantes, en las periodontitis se observan infiltrados celulares constituidos por linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos junto con concentraciones elevadas de IL-1 β , TNF- α , PGE2, IFN- γ en los tejidos gingivales y el fluido crevicular, mientras que en los biofilms subgingivales predominan los anaerobios gram negativos antes mencionados^{91,95}.

La respuesta inmunitaria se vale de una familia de receptores denominados tipo Toll (TLR) para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) como LPS, peptidoglucanos, lipoproteínas, ADN bacteriano y ARN bicatenario. Los TLR tras la interacción con los PAMP, transmiten información por medio de vías de señalización intracelular que activan la transcripción de citocinas proinflamatorias en polimorfonucleares neutrófilos, monocitos/macrófagos y DC como respuesta inmunitarias innatas predominantemente, aunque dicha respuesta es también crucial para el desarrollo y adecuada respuesta del sistema inmunitario adaptativo. En la figura 6 puede observarse los distintos ligandos de TLR derivados de los microorganismos de la placa bacteriana periodontal y las rutas de señalización intracelular que utilizan. Hasta la fecha se han descrito 10 TLR en humanos⁹⁶.

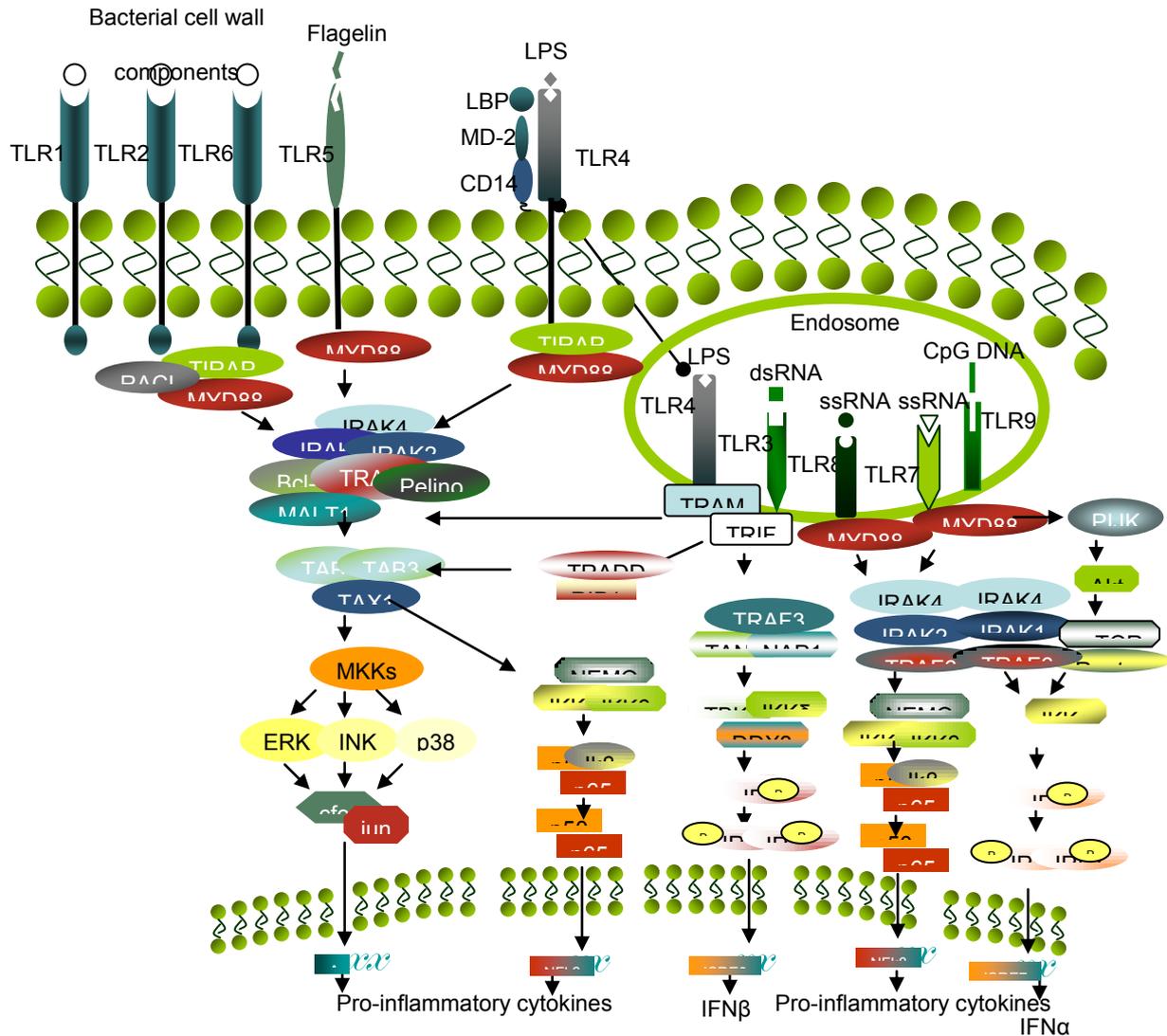


Figura 6. Representación esquemática de los receptores toll-like humanos y las vías de señalización TLR: toll-like receptor. Tomado de Mesa y cols. *Current immunology reviews* 2011; 7: 83-91.

Los TLR en las células innatas están codificados genéticamente mientras que los receptores de antígenos en los linfocitos T y B, se generan somáticamente⁹⁷.

Los neutrófilos, como primeras células inmunitarias que migran por quimiotaxis hacia el sitio de la infección, son las que mayor número de receptores TLR expresan, todos excepto TLR-398. Aparte de las células inmunitarias del tejido periodontal, antes descritas, todas las células del periodonto, expresan receptores

TLR. TLR-2 es con mucho el más expresado por los constituyentes celulares del periodonto, sobretodo en células del epitelio gingival (más en la capa espinosa que en la basal) y en fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal^{99,100} dicha señalización por su ligando, LPS y fimbrias de *P. gingivalis* entre otros, conduce a la síntesis de IL-8 por las células del epitelio gingival cuyo mecanismo no está aún aclarado⁹⁹.

Se ha puesto de manifiesto la implicación vírica en el desarrollo de la periodontitis. Diferentes evidencias demuestran que herpes virus, en especial citomegalovirus humano (HCMV) y el virus de Epstein-Barr (EBV) están ligados a la gravedad de la periodontitis, como la detección de ADN vírico en el tejido gingival¹⁰¹.

La mayor proporción de ADN vírico en periodontitis que en tejidos sanos^{102, 103} y la detección de una replicación activa de HCMV en el tejido periodontal¹⁰⁴.

Contrariamente, un reciente estudio, de una amplia serie de pacientes de raza caucásica con diferentes formas de periodontitis (periodontitis agresiva localizada (PAL), periodontitis agresiva generalizada (PAG), periodontitis crónica) y pacientes sanos, cuyo objetivo fue detectar por PCR, ADN de HCMV, EBV, del virus varicela zoster (VZV), y herpes simple (HSV), no demostró ADN de HCMV, VZV, HSV en ninguna muestra de placa subgingival y el ADN de EBV fue detectado en un 25% de las PAL, en 3% de PAG y en el 10% de pacientes sanos. Según los autores, estos resultados desafían la alta prevalencia de herpes virus en muestras subgingivales en estudios previos y cuestionan el papel de estos patógenos en la periodontitis¹⁰⁵.

Ciertos componentes víricos, como las proteínas de la envoltura, el ADN, el ARN genómico o el ARN bicatenario producido en las células infectadas del hospedador, son reconocidos por TLR 2, 3 y 9 comenzando la respuesta inmunitaria innata antivírica¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

La existencia de la expresión de ARNm de TLR-2, TLR-3 y TLR-9 en las células epiteliales gingivales y fibroblastos de encía humana pueden sugerir un papel activo del tejido periodontal también en las respuestas antivíricas.

2.4.4.3. OSTEOIMMUNOLOGÍA DE LOS TEJIDOS PERIODONTALES.

Los diferentes componentes del periodonto participan de manera activa en los fenómenos de la respuesta inmunitaria que se desencadena en la enfermedad periodontal. Los osteoblastos regulan la reabsorción ósea merced a la activación y reclutamiento de osteoclastos maduros¹⁰⁹.

La confirmación de esta teoría tuvo lugar con el descubrimiento del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa β (RANKL)^{109,110} y su receptor anzuelo, la osteoprotegerina (OPG)¹¹¹.

RANKL es una proteína anclada en la membrana de los osteoblastos, pero también es expresada por los linfocitos T. La alteración del gen en ratones produce anomalías en el desarrollo de los ganglios linfáticos y la maduración de linfocitos T, lo que sugiere que RANKL es también una molécula importante en la respuesta inmune¹¹².

En la reabsorción ósea de causa inflamatoria, los linfocitos T activados podrían participar a través de la producción excesiva de RANKL soluble, ya que la forma anclada es muy limitada en estas células¹¹³.

Teng y cols. demostraron por primera vez la expresión de RANKL en los linfocitos T de pacientes con periodontitis agresiva infectados con *A. actinomycetemcomitans*¹¹⁴.

Takayanagi y cols. informaron que la formación de osteoclastos mediada por los linfocitos T se produce a través de la señalización cruzada entre RANKL e interferón gamma ($INF\gamma$). La producción de $INF\gamma$ por los linfocitos T suprime la osteoclastogénesis, al interferir con la vía de señalización RANKL-RANK. $INF\gamma$ induce la rápida degradación de la proteína adaptadora de RANK, TRAF6 (factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral) que da lugar a una fuerte inhibición del factor de transcripción del NK-kB y de la cinasa N-terminal de c-Jun.¹¹⁵

En las lesiones de periodontitis, los linfocitos T y B, macrófagos y neutrófilos, colonizan el tejido conjuntivo subepitelial e interactúan con células del estroma (osteoblastos, fibroblastos del conectivo gingival y fibroblastos del ligamento

periodontal). Los macrófagos y los linfocitos T producen mediadores inflamatorios como IL-1, IL-6, TNF- α y PGE2 que pueden inducir la reabsorción ósea indirectamente estimulando a los osteoblastos a producir RANKL o bien, los linfocitos T del infiltrado, favorecerían la diferenciación a osteoclastos mediante la producción directa de RANKL¹¹⁶.

La expresión de ARNm de RANKL en los tejidos con periodontitis ha sido claramente demostrada por diferentes autores utilizando diversas metodologías. Empleando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) Nagasawa y su grupo, demostraron que en lugares con bolsas periodontales más profundas, la expresión de RANKL era significativamente mayor¹¹⁷.

Liu y cols. señalaron que la concentración de ARNm de RANKL determinado por PCR semicuantitativa, fue mayor en los pacientes con periodontitis avanzada, respecto a los pacientes con periodontitis moderada o sanos. Además demostraron mediante hibridación in situ que la localización de la expresión celular del ARNm de RANKL, era en linfocitos y macrófagos principalmente¹¹⁸.

Crotti y cols. empleando técnicas inmunohistoquímicas, demostraron concentraciones significativamente mayores de la proteína RANKL y una reducción significativa de OPG en el tejido con periodontitis. La proteína RANKL se asoció con los linfocitos y los macrófagos mientras que la OPG con las células endoteliales¹¹⁹.

En líquido crevicular el cociente RANKL/OPG fue significativamente superior en los pacientes con periodontitis respecto a los individuos sanos¹²⁰.

Estos resultados indicarían que los linfocitos en pacientes con periodontitis son una de las principales células productoras de RANKL y responsables de su incremento. Es difícil valorar la expresión de RANKL directamente en los osteoblastos por la dificultad que entraña su aislamiento. El estudio de la expresión de RANKL y OPG en los fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal, ha encontrado una clara heterogeneidad. Los fibroblastos gingivales estimulados por LPS producen OPG e inhiben la osteoclastogénesis derivada de RANKL¹¹⁷. Los fibroblastos del ligamento periodontal estimulados por LPS de *A. actinomycetemcomitans* produjeron RANKL y la expresión fue mediada por

PGE2.¹²¹

Los fibroblastos gingivales sin estimulación, producen más OPG y menos RANKL, que los fibroblastos del ligamento periodontal. IL-1 aumentó la producción de OPG en ambos tipos de fibroblastos, pero los gingivales produjeron más que los periodontales¹²².

Los fibroblastos gingivales podrían tener la capacidad de suprimir la osteoclastogénesis inducida por mediadores inflamatorios como IL-1 y PGE2 y componentes bacterianos principales como LPS, mientras que estos mediadores provocarían una amplia reabsorción ósea si actúan sobre los fibroblastos del ligamento y los osteoblastos.

CD40 es un antígeno de superficie que se expresa en los linfocitos B y su ligando se expresa en los linfocitos T activados, la interacción entre CD40 y su ligando es necesaria para la proliferación y modificación del isotipo en los linfocitos B. Brouty-Boye y cols. demostraron que los fibroblastos humanos de diferentes tejidos expresan CD40 y producen un perfil de citocinas específico, lo que implica también a los fibroblastos en la respuesta inmunitaria¹²³.

La expresión de CD40 fue mayor en los fibroblastos gingivales que en los del ligamento periodontal¹²⁴.

Dongari y cols. demostraron que los fibroblastos gingivales CD40 positivos aumentan en el tejido gingival inflamado y que la señalización a través de CD40, incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8, hablando de una relación directa entre la expresión de este receptor y la producción de citoquinas por los fibroblastos¹²⁵.

Wassenaar y cols. Sin embargo, demostraron que la activación de fibroblastos gingivales CD40 positivos, produce una disminución de metaloproteinasas (MMP) 1 y 3, mientras que la producción de MMP-2 y el inhibidor tisular 1 de MMP (TIMP-1) no se vio afectado^{126,127}.

Los fibroblastos gingivales juegan un papel importante en la destrucción tisular en la periodontitis vía producción citoquinas MMP-1 y MMP-3, en las cuales, IL-17 juega un papel de llave reguladora. IL-17 se incrementa en la periodontitis y regula estas citoquinas y metaloproteinasas de la matriz de los tejidos, tanto en las

células migratorias como residentes. La inmunohistoquímica ha demostrado elevados niveles de IL-1 β , TNF- α , y IL-17 en la periodontitis. Estas citoquinas inducen proMMP-1 y especialmente MMP-3 en fibroblastos gingivales. IL-17 fue menos potente como inductor de MMP que IL-1 β y TNF- α , pero estimulo la producción de IL-1 β y TNF- α en macrófagos, e IL-6 y IL-8 en fibroblastos gingivales. De acuerdo con estos hallazgos, la inmunohistoquímica demuestra que MMP-1 y MMP-3 están incrementadas en la periodontitis¹²⁷.

Estas y otras implicaciones del sistema inmunitario, han sido revisadas y publicadas por nuestro grupo, en un reciente artículo¹²⁸.

2.4.5. FACTORES AMBIENTALES ADQUIRIDOS.

La respuesta inmune del individuo puede verse modificada por factores ambientales o adquiridos, como el consumo de tabaco o el estrés.

El tabaco, es el factor externo adquirido que más se ha asociado con periodontitis y especialmente, con periodontitis avanzada^{129, 130}.

Sus efectos son variados, además de modificar las características clínicas, es capaz de reducir la tensión de oxígeno creando un ambiente favorable para la colonización y crecimiento de bacterias Gram-negativas. También tiene efectos importantes sobre el sistema inmune. El tabaco afecta la función leucocitaria, altera la quimiotaxis y fagocitosis de los neutrófilos orales y periféricos^{131, 132} y reduce la producción de anticuerpos^{133, 134}.

Factores psicoemocionales como el estrés crónico pueden ocasionar una depresión de la respuesta inmune frente a la infección periodontal a través de una aumento crónico de corticoides sistémicos^{134, 135}.

La gingivitis ulceronecrotizante fue la primera patología relacionada con el estrés. Pero hoy en día, el significado etiológico del estrés no acaba de ser corroborado en las periodontitis crónicas^{134, 135}.

2.4.6. PREDISPOSICIÓN GENÉTICA.

Los factores genéticos que modifican la respuesta del individuo frente a las agresiones microbiológicas son los determinantes de la susceptibilidad a las periodontitis, afectan a la tasa de progresión y determinan la severidad de la enfermedad¹³⁶.

Kornman y cols. en 1997 ponen de manifiesto que existe una asociación entre la periodontitis y una variación genética en el gen que codifica la IL-1 sugiriendo que el 30% de adultos con periodontitis tiene éste genotipo. De este modo, se apunta que la variabilidad clínica que se observa en pacientes periodontales se basa en la influencia de diferentes interleuquinas sobre la reabsorción ósea y la destrucción de tejido conectivo. Aquellos pacientes positivos para la IL-1(IL-1a /IL1b) presentarían de dos a cuatro veces más posibilidades de desarrollar periodontitis crónica del adulto¹³⁷.

La evidencia sobre la susceptibilidad genética de las periodontitis proviene de las siguientes tres fuentes:

La asociación de periodontitis con rasgos específicos transmitidos genéticamente. Existen enfermedades de transmisión genética, como la Neutropenia o el síndrome de Papillon-Lefèvre, con alteraciones en el número / función de los neutrófilos y con una mayor susceptibilidad a padecer periodontitis^{138,139}.

Los estudios en gemelos con periodontitis han señalado una gran concordancia entre gemelos monocigóticos y bicigóticos. Se ha demostrado que esta herencia aumenta en un 50 % el riesgo de padecer periodontitis avanzada¹⁴⁰.

- Estudios en familias que padecen periodontitis de comienzo temprano (agresivas localizadas / generalizadas, según la clasificación de 1999 han demostrado que poseen uno o más genes autosómicos dominantes asociados con el aumento de la susceptibilidad a las periodontitis¹⁴¹.

Existen una serie de rasgos genéticos que pueden aumentar la susceptibilidad a periodontitis, son los siguientes^{142,143}.

- Anormalidades en la función de los fagocitos. Se ha demostrado en el 75% de los individuos con periodontitis juvenil, actualmente conocida como periodontitis agresiva.

- Capacidad reducida para producir inmunoglobulina G₂ (IgG₂). Es el mayor anticuerpo sérico que se produce en respuesta a la infección periodontal. La capacidad de producir esta inmunoglobulina viene determinada genéticamente, está regulada por el cromosoma 6 y varía mucho entre individuos.

- Polimorfismo en el receptor hFc-γ-RIIa. Es el único receptor que reconoce las bacterias unidas a IgG₂. Su afinidad para unirse al complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) viene determinada genéticamente. Existe una forma de expresión en que el receptor tiene muy poca afinidad para unirse, con lo que provoca una mayor susceptibilidad para sufrir infecciones.

- El polimorfismo de los receptores Fc IIIb de los neutrófilos se ha asociado igualmente con la resistencia a periodontitis¹⁴⁴, así como el polimorfismo que define el receptor Fcγ RII que ha aparecido en la literatura como un marcador de la susceptibilidad a la periodontitis juvenil localizada¹⁴⁵.

Dichos polimorfismos comprometen la comunicación de las células fagocíticas, claves en la respuesta del huésped, ya que son el medio de conexión de las inmunoglobulinas.

- Además, se ha observado que el polimorfismo de la N-acetyltransferasa (NAT2) esta significativamente asociado con una pérdida de hueso más severa¹⁴⁶.

- Polimorfismos del TNF-α. El gen que lo expresa se halla en el cromosoma 6, y el polimorfismo se encuentra en la región que determina su producción, aumentándola de forma exagerada. Este polimorfismo se ha asociado con mayor susceptibilidad a infecciones.

- Función alterada de monocitos y macrófagos. La respuesta de estas células viene marcada genéticamente. La alteración, en los pacientes susceptibles, consiste en la liberación significativa de más TNF-α, IL-1β, y PGE₂ que los individuos resistentes^{147,148}.

- El gen de IL-1 que se encuentra en el cromosoma 2q13 es polimórfico. Los individuos con uno de los genotipos específicos producen 4 veces más IL-1β que los genotipos negativos, y tienen 20 veces más probabilidad de padecer periodontitis a partir de los 40 años¹⁴⁹.

-Igualmente, se observó que el polimorfismo para la IL 10 estaba asociado con la periodontitis crónica o agresiva^{150, 151,152}.

- Otros estudios de polimorfismos se han llevado a cabo, como el de la interleukina IL-4, potente reguladora de la función de los macrófagos. Se observó que la aparición del polimorfismo para la IL-4 era más frecuente en pacientes con periodontitis agresiva que en los controles¹⁵³.

- Gen de la ciclooxigenasa 1. Esta enzima se encarga de producir PGE₂. Su expresión viene determinada por el cromosoma 9q32-33. La susceptibilidad viene determinada por una producción excesiva de PGE₂.

Basándonos en un esquema publicado por Hart y Kornman , presentamos en la siguiente tabla un resumen de la influencia de determinados factores genéticos en la periodontitis y su potencial biológico¹⁵⁴.

Como hemos visto, numerosos polimorfismos han sido y continúan siendo investigados como futuros candidatos a factores de riesgo para la susceptibilidad a la enfermedad periodontal. Entre ellos, el fenotipo HLA (Human Leukocyte Antigen), que también ha sido investigado como posible factor de resistencia, ha sido asociado fundamentalmente con la periodontitis juvenil (periodontitis agresiva) y de evolución rápida e incluso con la periodontitis del adulto.(periodontitis crónica).

Las moléculas del sistema HLA están presentes en las membranas de las células nucleadas del organismo e intervienen en la respuesta inmune presentando el antígeno a las células T; la hipótesis que se han planteado algunos estudios es que la expresión de determinadas moléculas HLA (polimorfismos) pudiese interferir a este nivel.

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) se conoce en el hombre como sistema HLA (antígeno leucocitario humano), ya que se destinó al principio a "tipificar" únicamente a los leucocitos) y consiste en un conjunto de genes localizado en el cromosoma 6 humano y 17 murino. Tiene una función fundamental en el sistema inmune: la de codificar un grupo de glucoproteínas presentes en las membranas de la mayoría de las células nucleadas del organismo denominadas moléculas HLA.

Se han propuesto numerosas hipótesis que implican a los factores genéticos y, entre éstas, nos encontramos con la asociación de periodontitis con fenotipos determinados del HLA (American Academy of Periodontology 1999). Numerosos estudios han

afirmado la contribución del sistema HLA como un factor genético potencial en la etiopatogénesis de la enfermedad periodontal^{155, 156, 157, 158, 159}.

Ya desde 1990, Izumi y cols.¹⁶⁰, comentaron que si antígenos HLA están asociados a la susceptibilidad o resistencia de determinadas enfermedades, ¿porqué no podrían estarlo en las enfermedades periodontales?. Hay varios estudios que han encontrado una relación del antígeno HLA-A9 así como el HLA-A28, Bw15, Bw35 y DQw1 sugiriéndose que su presencia aumenta la susceptibilidad para las periodontitis agresivas (HLA-A9,-A28,-Bw15) y crónicas (HLA-A9,-A28). Por otro lado, otros antígenos HLA se han asociado con la resistencia a determinadas periodontitis agresivas (HLA-A2) y crónicas (HLA-A10,-B5.-A28).

Además de ser un eje poco explorado, el campo de estudio del HLA es complejo, la evolución y avance en las técnicas de biología molecular hacen que aparezcan nuevos descubrimientos de antígenos y conceptos lo que conlleva una nueva nomenclatura que obstaculiza aún más la interpretación de numerosos estudios lo que provoca que aparezcan resultados aparentemente divergentes. Las investigaciones más recientes afirman que la susceptibilidad o resistencia tanto de la periodontitis crónica como de la agresiva podría estar influenciada por determinadas combinaciones de antígenos del HLA¹⁶¹.

Autores como Shapira (1994) concluyen además que determinados antígenos HLA están asociados a una forma localizada de la periodontitis juvenil (actualmente conocida como periodontitis agresivas) (HLA A9 y B15) pero no a las formas generalizadas y que ambas son enfermedades diferentes bajo un diferente control genético.¹⁶²⁻¹⁶⁵.

2.4.6.1. VARIABILIDAD GENÉTICA.

Una de las contribuciones más importantes de la secuenciación del genoma humano^{166,167}, ha sido la caracterización e identificación de cientos de miles de loci polimórficos distribuidos a lo largo de los 3250 millones de nucleótidos que constituyen nuestro genoma¹⁶⁸.

Como su nombre indica, las secuencias polimórficas (también conocidas como secuencias anónimas, loci anónimos, loci polimórficos, marcadores anónimos o marcadores polimórficos) son secuencias de ADN que, normalmente, no codifican

para un producto génico, se distribuyen de forma más o menos aleatoria a lo largo del genoma y presentan como característica singular el hecho de ser polimórficas. Este último hecho es de suma importancia pues confiere a este tipo de secuencias la característica primordial del análisis genético, la variabilidad.

Un polimorfismo es una variante genética que aparece al menos en el 1% de los cromosomas de una población. Estas variantes pueden estar localizadas en regiones codificantes o reguladoras de un gen o bien localizarse en regiones intergénicas. Las variantes localizadas en un gen pueden inducir cambios en la proteína o en el patrón de expresión del gen. Así, variaciones en la región 5' no traducida (UTR, del inglés untranslated región) pueden alterar los niveles de expresión, mientras que cambios en la región 3'UTR pueden afectar al transporte, estabilidad y vida media del ARNm. Cuando las variaciones se localizan en un exón pueden generar una alteración en la secuencia del codón de forma que este siga codificando el mismo aminoácido, cambio sinónimo, o bien que el codón pase a codificar un aminoácido diferente, cambio no sinónimo, que puede alterarla secuencia de la proteína y como consecuencia, en mayor o menor grado, su función biológica. Además, los polimorfismos pueden generar la aparición de un codón de parada de traducción y por tanto dar lugar a la síntesis de proteínas truncadas.

La mayoría de estas variaciones polimórficas se localizan en regiones intergénicas y, por tanto, no dan lugar a efectos fenotípicos observables. Sin embargo, dichas variaciones "neutras" pueden actuar como marcadoras de las secuencias adyacentes, situación conocida como desequilibrio de ligamiento¹⁶⁹.

Una pequeña proporción de las variaciones polimórficas afectan a regiones génicas, es decir la región codificadora (exones) o la región reguladora (promotor, intrones, región final no traducida) de un gen. Dichas variantes pueden alterar la estructura del producto génico, el grado de expresión del gen e incluso dar lugar a su ausencia de expresión. Resulta evidente que las variaciones polimórficas en ningún caso suponen una disfunción grave, bien porque la función alterada es redundante (otros genes pueden suplir la función perdida) o bien porque la alteración debida a la variación no ejerce efectos deletéreos.

Estos cambios polimórficos pueden distribuirse en la población, causando una variabilidad genética subyacente que, en determinadas circunstancias, puede manifestarse como variabilidad fenotípica

2.5 LA VITAMINA D Y EL GEN VDR.

La vitamina D, descubierta como un nutriente esencial que previene el raquitismo, presenta un papel fundamental en la homeostasis de calcio y fósforo.

Hoy se conoce que el raquitismo se puede prevenir mediante la exposición a la radiación UV, la cual estimula la producción de vitamina D3 en la piel. Esta capacidad endógena de producir una cantidad suficiente de vitamina D3 mediante la exposición a la luz solar indica que la históricamente conocida como vitamina D, no es una vitamina sino una hormona. La denominación vitamina D engloba una serie de hormonas secoesteroideas siendo las más conocidas el colecalciferol (vitamina D3), que se sintetiza en la piel, y el ergocalciferol (vitamina D2), que es sintetizado por las plantas¹⁶⁹.

2.5.1. ESTRUCTURA DE LA PROTEINA VDR.

La proteína VDR de humanos es una molécula de 427 aminoácidos y un peso molecular de 50 kDa. En la figura 4, se presenta un esquema de la proteína VDR y sus dominios funcionales.(Fig 7)

Estos son:

- i) dominio de unión a ligandos (LBD, del inglés ligand binding domain),
- ii) regiones de heterodimerización con el receptor del ácido retinoico (RXR, del inglés retinoic X receptor).
- iii) dominio de unión al ADN (DBD, del inglés DNA binding domain) y
- iv) lugar de unión a proteínas nucleares coreguladoras del complejo transcripcional que modulan el nivel de transcripción de los genes diana. ^{170,171}

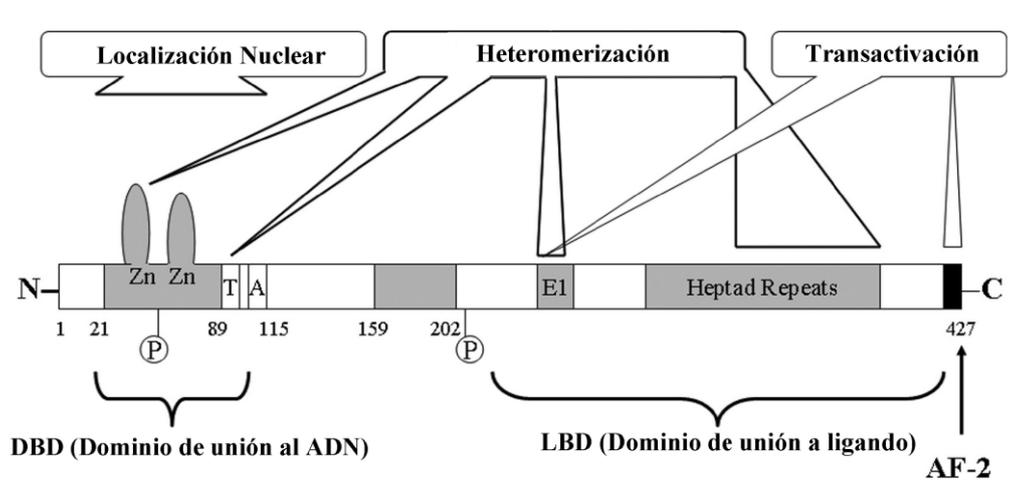


Figura 7. Estructura del Receptor de la Vitamina D. Tomado de Manuel Sánchez de la Torre (tesis doctoral) Universidad de Lleida, 2008

2.5.2. ESTRUCTURA DEL GEN VDR.

El gen VDR se localiza en el cromosoma 12 (12q13.11) la figura 8, presenta una secuencia de una longitud aproximada de 63,5 kb. La longitud del transcrito varía entre especies de forma que en humano y rata presenta una extensión de 4,63 Kb mientras que en aves es de 2,7 kb y en anfibios (*Xenopus laevis*) es de 2kb. Sin embargo la proteína tiene un tamaño parecido entre las distintas especies, presentando una extensión en humanos de 427 aminoácidos, 424 en rata y 4 en *Xenopus*.¹⁷²

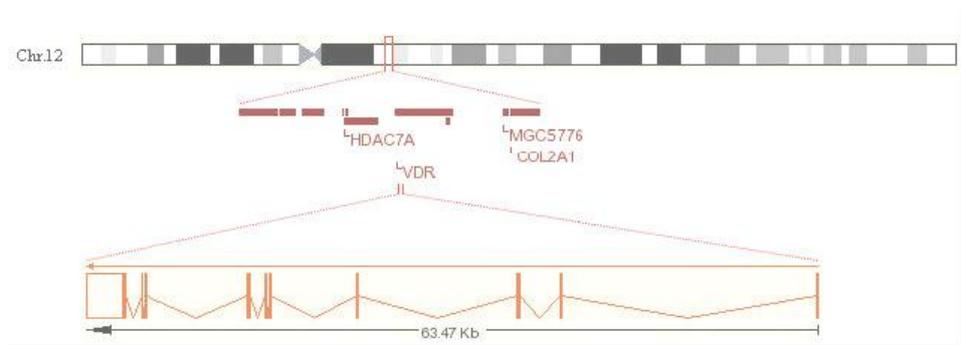


Figura 8. Localización Genómica, Genes vecinos y Estructura el Gen VDR. Tomado de Manuel Sánchez de la Torre (tesis doctoral) Universidad de Lleida, 2008

2.5.2.1. VARIANTES DEL GEN VDR.

Se han detectado polimorfismos en la región 5'UTR, región codificante y región 3'UTR (Fig. 9). Algunos de estos polimorfismos tienen un efecto directo sobre la estructura o expresión del VDR o bien sobre la estabilidad del ARNm. Sin embargo, otros polimorfismos no presentan, aparentemente, efectos directos sobre la función de la proteína VDR.

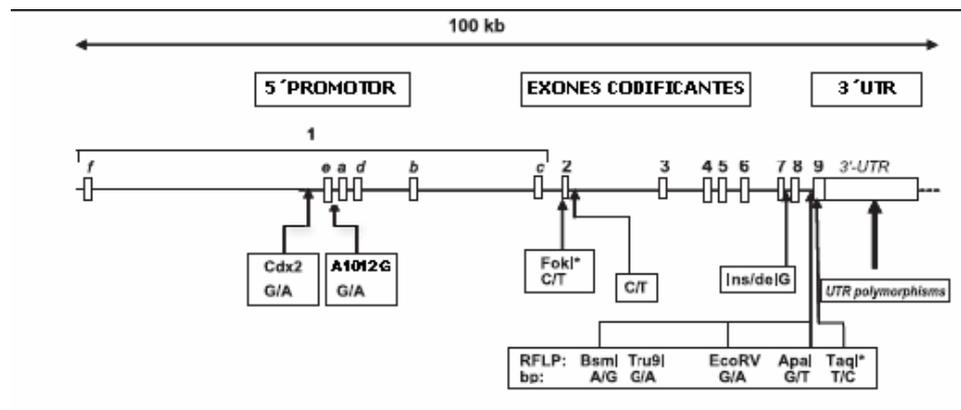


Figura 9. Estructura del gen VDR y polimorfismos conocidos (polimorfismos localizados en región codificante). Tomado de Manuel Sánchez de la Torre (tesis doctoral) Universidad de Lleida, 2008

2.5.2.2. Polimorfismos de la región 5'UTR.

En la región promotora del VDR se ha identificado un lugar de unión para el factor de transcripción CDX-2, específico de células intestinales, que participa en la regulación de la expresión del VDR en dichas células. Se ha descrito que la proteína CDX-2 está relacionada con fenómenos de absorción de calcio a nivel intestinal.¹⁷³ y juega un papel importante en el desarrollo y diferenciación del intestino.¹⁷⁴

2.5.2.3. Polimorfismos de la región codificante.

En la región codificante se localiza un polimorfismo que modifica la secuencia de sitio de inicio de transcripción del exon 2. Este polimorfismo, el rs1073810-C/T, consiste en un cambio de base C por T que introduce una diana de restricción para la enzima Fok-I. La nomenclatura utilizada para los polimorfismos de tipo RFLP (RFLP, del inglés restriction fragment length polymorphism) hace referencia a la ausencia o presencia de la diana de restricción. La ausencia de la diana se denota con la letra mayúscula, mientras que la presencia de la diana se denota con letra minúscula. En el caso del polimorfismo Fok-I, el alelo F, que indica la ausencia de diana, se corresponde con el alelo C a nivel de secuencia, y el alelo f, que indica la presencia de diana, se corresponde con el alelo T. Cuando la variante C está presente se pierde el códon de inicio de transcripción (ATG >ACG) de forma que se utiliza un lugar de inicio de transcripción alternativo localizado en el códon 4, dando lugar a una proteína más corta. Por este motivo, este polimorfismo produce dos isoformas alternativas de la proteína VDR que se diferencian en tres aminoácidos. Los tres aminoácidos presentes en la isoforma f, la más larga, son Met-Glu-Ala. Se ha descrito que la isoforma F del VDR es la que presenta una mayor actividad transcripcional. Estos resultados se relacionan con estudios que demuestran que la interacción del factor de transcripción TFIIB y el VDR presenta una mayor afinidad en la variante derivada del alelo F.

2.5.2.4. Polimorfismos de la región 3'UTR.

En la región 3'UTR del gen VDR se ha descrito una alta variabilidad genética debida a la presencia de varios polimorfismos. El número y posición de estos ha sido ampliamente discutido en la literatura de forma que Morrison y cols.¹⁷⁵ habla de 13 polimorfismos y Durrin y cols.¹⁷⁶ describe 7 de estos. Algunos de estos polimorfismos son de tipo RFLP como por ejemplo los polimorfismos Apa-I.¹⁷⁷, Bsm-I (rs1544410-C/T)¹⁷⁸, Taq-I¹⁷⁸ y Tru9¹⁷⁹.

Morrison y cols.¹⁷⁹ en el año 1992 fueron los primeros en correlacionar el genotipo BB del polimorfismo *Bsm I* del gen *VDR* con los niveles de osteocalcina,

indicando que los alelos son funcionalmente diferentes, contribuyen a la variabilidad normal fisiológica de los niveles de osteocalcina y son predictores de la diversidad en el recambio óseo y en consecuencia en la DMO. Otros investigadores han reportado hallazgos similares a los de Morrison y cols. mientras que algunos no han encontrado diferencias significativas entre el genotipo BB y la pérdida de masa ósea^{178,180-193}

La región 3'UTR del gen VDR está relacionada con la estabilidad del ARNm y como consecuencia con el nivel de expresión de VDR. Los polimorfismos Bsm-I, Taq-I y Apa-I se localizan en una región que presenta un alto desequilibrio de ligamiento lo que explica la asociación observada entre ellos. Mediante el estudio de expresión con el gen luciferasa como gen reportero, Morrison, Qi y cols. 1994.¹⁷⁵ demostraron que el haplotipo BAt genera mayor actividad luciferas que el haplotipo baT, lo que sugiere que el haplotipo BAt confiere una mayor estabilidad del ARNm en células que presentaban dicho haplotipo. Sin embargo otros trabajos no encontraron efectos significativos de las variantes alélicas de la región 3'UTR en la estabilidad o niveles de ARNm.^{194, 195,177}

2.6 POLIMORFISMO DE RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR) Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Actualmente, se asocia el polimorfismo genético del receptor de vitamina D (VDR) a una pérdida del hueso alveolar y al desarrollo de la periodontitis, interviniendo de este modo en la homeostasis ósea, y siendo otro factor genético implicado en la patogénesis de dicha enfermedad.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

Podría pensarse que una determinada masa ósea, en cantidad como en calidad, podría también intervenir en la patogénesis de la periodontitis, facilitando los procesos de reabsorción ósea alveolar.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

Mohammad y cols.¹⁹⁹ determinaron que se puede evidenciar radiográficamente e histológicamente al mecanismo de la osteoporosis, que repercute ciertos efectos sobre el reborde alveolar conllevando a producir, una disminución de la masa y del trabeculado óseo. Otros investigadores determinan que la osteoporosis está relacionada directamente con la altura de la cresta alveolar y con los dientes perdidos en la mujer postmenopáusica²⁰⁰.

Una serie de polimorfismos han sido identificados por su variación bi alélica en el lado de la restricción enzimático, ejemplo de ello es la restricción fragmentaria de la longitud de polimorfismo (RFLPs) en el gen VDR, que involucra Tru91¹⁷⁹, TaqI¹⁷⁵ BsmI¹⁷⁸, EcoRV¹⁸⁰ ApaI¹⁷⁷ y FokI^{194,201}.

Todos estos RFLPs, están localizados entre el exon 8 y 9, a excepción del FokI que se localiza en el exón 2. Usando la técnica secuencial, un nuevo polimorfismo como el Cdx2²⁰² en la región promotora ha sido también detectado.

El gen VDR va a mediar la función hormonal de la vitamina D y regula la expresión de una variedad de genes, estos, forman parte de los genes candidatos a ser determinantes genéticos de la masa ósea y por ende representan un papel fundamental en la homeostasis ósea y en el metabolismo de calcio^{203,204}.

La vitamina D influye en el desarrollo de la enfermedad periodontal a través de efectos inmuno-modulatorios y efectos en la densidad ósea.^{205,206}

Según los estudios realizados por Dietrich²⁰⁷, existe una asociación inversamente proporcional entre la concentración de 25(OH)D3 y la enfermedad periodontal en personas mayores de 50 años.

Además la vitamina D representa un papel importante en la formación ósea y en el mantenimiento del nivel óseo, diferentes estudios epidemiológicos han publicado una asociación entre la osteoporosis o la baja densidad ósea y entre el hueso alveolar y la pérdida dentaria, indicando de esta manera, que una pobre calidad ósea representa un factor importante para el desarrollo de la enfermedad periodontal²⁰⁸⁻²¹⁰.

Hoy en día y tras numerosos estudios epidemiológicos, se acepta la existencia de determinados factores de riesgo que van a modular la susceptibilidad o resistencia del hospedador a padecer periodontitis, por tal razón se considera esta entidad patológica de una etiología multifactorial¹⁴¹.

De hace varios años, el polimorfismo genético del receptor de vitamina D juega un papel importante en el metabolismo óseo, esto hecho despierta un interés mayor en la asociación de este gen como un factor de riesgo en la osteoporosis²¹¹.

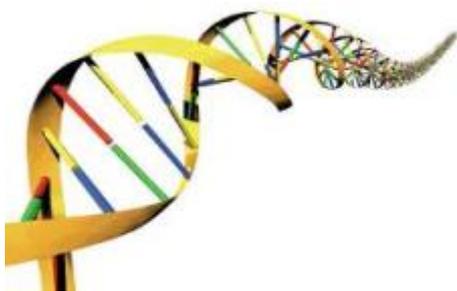
Como ya hemos comentado, el receptor de vitamina D está implicado en una serie de procesos biológicos, incluyendo el metabolismo óseo y la modulación de la respuesta

inmune, también se considera un receptor nuclear de la vitamina D3 siendo esencial para el mantenimiento de la homeostasis mineral, la integridad de la estructura ósea ²¹².

De Souza y cols.²¹³ analizan la modulación de la respuesta inmune y el mecanismo de la transcripción de una variedad de genes envueltos en enfermedad renal crónica y periodontitis, esta asociación ha sido analizada por la asociación del polimorfismo VDR con pacientes que presentaban la enfermedad renal crónica y la periodontitis.

La vitamina D3 y su receptor también actúa como un agente regulador durante la inmunidad innata, a través del incremento de de la fagocitosis a través de los monocitos/macrófagos²¹⁴.

Estudios recientes han comprobado que el VDR interviene de manera profunda en el desarrollo de la tuberculosis y en la infección crónica del virus de la hepatitis B. Este hecho interpreta la relación existente entre el VDR y la acción inmunológica, debido a que la vitamina D activa los monocitos, estimulando la inmunidad celular mediata y la supresión de la proliferación de linfocitos²¹⁵⁻²¹⁶.



3.-JUSTIFICACIÓN

3.0 JUSTIFICACIÓN:

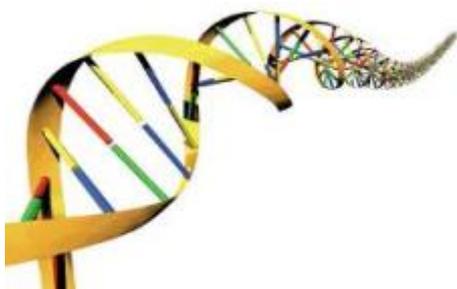
Como ha quedado expuesto en la introducción, el principal efecto adverso de la periodontitis es la destrucción de hueso alveolar a nivel de la cresta ósea maxilar, único componente del tejido periodontal que no es recuperable de manera natural. La evolución natural de la periodontitis es la pérdida del diente. Estudios longitudinales han estimado que la pérdida de hueso alveolar en casos de periodontitis crónicas del adulto es de 0,05 a 0,1 mm/ año, lo que viene a representar la pérdida de 7 dientes por paciente en 15 años.

Podría pensarse que una determinada característica tanto en calidad como en cantidad de este componente, como la expresión genética de un determinado polimorfismo del receptor de la vitamina D3, previa a la aparición de la enfermedad, podría influir en su mayor o menor pérdida cuando aparece el proceso inflamatorio. Lo contrario sería demostrar que el proceso bacteriano - inflamatorio periodontal, se desarrolla totalmente independiente del tipo de hueso donde acontece.

Sabemos que en la aparición, progresión y gravedad de la periodontitis, la respuesta defensiva del hospedador condicionada genéticamente es determinante, por ello la confirmación de esta hipótesis sobre la idea de un hueso alveolar más sensible de ser destruido cuando aparece un proceso inflamatorio, clarificaría más el concepto de paciente susceptible para el padecimiento de la enfermedades periodontales.

En la literatura hay estudios en población general con resultados controvertidos, pero hasta donde conoce el autor, ninguno realizado en ortopantomografías digitales de una muestra tan amplia de población (n=319) con edades por debajo de los 47 años y por encima de los 21, para descartar el efecto de los picos hormonales sobre el hueso, y utilizando un software específico de análisis de densidad óptica y morfometría.

El uso complementario de la biología molecular (PCR) junto con el uso del software antes descrito, para el estudio de esta hipótesis, creemos que justifica la presente investigación.



4.-OBJETIVOS

4.0 OBJETIVOS:

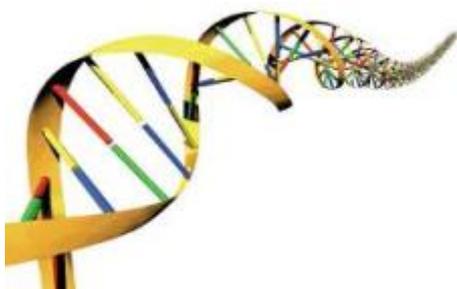
- 1°. Cuantificar el nivel de hueso alveolar (cantidad de masa ósea) en ortopantomografías digitales mediante un programa informático de análisis digital de imagen y compararlo con la densidad óptica ósea (calidad ósea) determinada en dos zonas específicas mandibulares, en hueso alveolar y hueso basal.

- 2°. Comparar el nivel de hueso alveolar con el ancho cortical mandibular medido en la zona propuesta por Taguchi (índice de Taguchi).

- 3°. Determinar la influencia del tabaco, como factor de riesgo ambiental de periodontitis, sobre el nivel de masa ósea y densidad ósea alveolar, en ortopantomografías digitales.

- 4°. Determinar a través del método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, enzima de restricción BSML, el polimorfismo del receptor genético de vitamina D en los pacientes con y sin afectación periodontal.

- 5°. Demostrar si el proceso de destrucción periodontal se asocia a un determinado estatus de masa o densidad ósea mandibular.



5.-DISCUSIÓN

5.0 DISCUSIÓN:

5.1 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DEL NIVEL DE HUESO ALVEOLAR CON LAS VARIABLES DE DENSIDAD OPTICA E INDICE MORFOMETRICO.

La pérdida de hueso alveolar es una lesión acumulativa a través de los años y la variable de periodontitis más importante²¹⁸. La cresta alveolar, en condiciones normales se encuentra situada a 1-1.5 mm del límite amelo-cementario. Valores mayores suelen deberse, en principio, a pérdida de soporte óseo por periodontitis, de manera que la distancia de cresta ósea al límite amelo-cementario puede considerarse, según algunos autores, como un aceptable indicador de la pérdida ósea en un punto²¹⁹.

El objetivo de la presente investigación fue determinar si la pérdida de hueso alveolar medida en ortopantomografías digitales por medio de procedimientos también digitales, se asocia con la densidad ósea mineral mandibular y/o con una determinada expresión genética para el receptor de la vit. D que pudiera magnificar la destrucción ósea alveolar. El uso de radiografías panorámicas para determinar medidas lineales absolutas, no es seguramente el método de elección, es por ello que optamos, al igual que otros autores, por expresar la pérdida de nivel de hueso alveolar como una proporción ($A/B \times 100$) donde A es la distancia desde la unión amelocementaria hasta el punto más coronal de la cresta alveolar adyacente al ligamento periodontal y B, la distancia desde este mismo punto de la unión amelocementaria, hasta el ápice radicular. Desde estos tres puntos de referencia, unión amelocementaria, cresta ósea alveolar, ápice radicular, se han trazado perpendiculares al eje axial radicular y se han obtenido las medidas, salvando las dificultades que habrían supuesto el localizar otros puntos de referencia²²⁰.

Hemos utilizado el ancho cortical mandibular medido en la zona propuesta por Taguchi (índice de Taguchi) como índice radiomorfométrico por los siguientes motivos. Uno, numerosos investigadores han demostrado una asociación estadísticamente significativa entre este índice y la densidad mineral ósea del

esqueleto, tales como el fémur y la columna vertebral y con biomarcadores de turnover óseo²²¹⁻²²⁵.

Dos, por realizarse en la zona anterior de la mandíbula, zona con mayor precisión como predictor de alteraciones de la masa ósea, que otras zonas como el ángulo o la rama²²²⁻²²⁶ y tres, por su fácil determinación en una zona muy “limpia” de estructuras anatómicas. La estimación visual del ancho cortical mandibular y su posterior medición, podría necesitar realizar índices de concordancia intra e interobservador, en nuestro estudio, un solo investigador mediante un software digital, excluyendo aquellas Rx con límites de las corticales poco claros y realizando todas las mediciones en el mismo sitio, en la perpendicular al foramen mentoniano, creemos que es una metodología que reduce la posible variabilidad en los resultados.

En nuestro estudio, la medida de este índice radiomorfométrico, mostró diferencias por sexo, mayor en los hombres, como también demostraron Holbrook y cols.²²⁷ y Jacobs y cols.²²⁸, estos autores indicaron que las mujeres alcanzan el mayor pico de densidad ósea en la tercera década de la vida (entre los 20-30 años) y posteriormente va disminuyendo. Resultados similares fueron descritos por Bras y cols.¹⁰ Yang¹¹ y Benson y cols.¹², quienes demostraron con sus propios índices, como disminuían de manera significativa más en las mujeres que en los hombres, a partir de los cincuenta años.

Algunos autores^{229,230}, han comunicado, también coincidiendo con nuestros resultados, que los individuos que presentaban valores mayores de densidad ósea, tenían la particularidad de retener con mayor facilidad sus dientes periodontalmente afectados al ser comparados con el grupo control, como si una mayor masa ósea influyera en la mayor permanencia de los dientes. En este sentido, la disminución del índice cortical mandibular contribuye entre otros factores en la pérdida de los dientes después de la menopausia en las mujeres, como demostraron Palmqvist y cols. y Von Wowern y cols.^{231,232}.

Nuestros hallazgos revelaron valores parecidos de ancho cortical mandibular en las radiografías digitales de los pacientes con y sin pérdida de hueso alveolar. El grupo de mayor pérdida ósea presentó el valor medio de ancho cortical

mandibular más alto, aunque en este grupo hubo un número muy reducido de pacientes, doce.

La principal causa de pérdida de hueso alveolar en altura es la periodontitis. En nuestro estudio, todos los pacientes con pérdida ósea estaban diagnosticados en sus historias clínicas de diferentes grados de periodontitis, pero quedo fuera de nuestro objetivo la valoración clínica y clasificación de la periodontitis de estos pacientes.

En los últimos 9 años, solo tres estudios clínicos y uno radiológico, han sido publicados relacionando, en pacientes con periodontitis, nivel de inserción / nivel óseo alveolar con densidad mineral ósea, determinada en diferentes sitios y con diferentes técnicas. Von Wowern y cols. determinaron el contenido óseo mineral en mandíbula y antebrazo en 24 jóvenes adultos con periodontitis severa y concluyeron que la periodontitis es un desorden local sin repercusiones sistémicas en el estatus óseo mineral. En este estudio, no hubo grupo control y algunos factores confundentes como el sexo, y el consumo de tabaco no se determinaron²³³. Inagaki y cols. en 190 mujeres japonesas analizaron la relación entre periodontitis y disminución de masa ósea mediante la medición de la densidad mineral ósea metacarpal y encontraron una asociación positiva tanto en pre como en mujeres postmenopausicas²³⁴. Hattatoglu-Sönmez y cols. en 85 mujeres premenopáusicas no encontró asociación entre variables clínicas periodontales y densidad mineral ósea determinada por absorciometría dual de rayos x tanto en vértebras lumbares como en cadera izquierda. Una limitación de este estudio fue no valorar ni confirmar el nivel de hueso alveolar mediante radiografías²³⁵.

Nackaerts y cols. determinan la densidad ósea en radiografías panorámicas de dos maneras, expresando los valores de gris (escala 0-255) mediante un software de imagen, y mediante un índice de calidad basado en la cantidad - proporción de hueso cortical y trabecular. Los datos los comparan con el nivel de hueso alveolar expresado como un porcentaje y calculado como nosotros, en 94 mujeres. La asociación fue débil con el primer método de densidad ósea radiográfica y no hubo con el segundo. Este estudio, solo en mujeres, no ajusta por edad incluyendo mujeres pre y postmenopausicas²³⁶.

Se ha demostrado que los niveles de gris en imágenes ofrecen una medida válida de densidad ósea²¹⁸. Taba-Junior y cols.²³⁷ aplicaron en radiografías un software de análisis de imagen para valorar la densidad ósea (niveles de gris) alrededor de implantes dentales y demostraron similares resultados que los obtenidos en el estudio histológico²³⁸.

La utilización de software de radiología digital, para la medición de densidades ópticas óseas, se basan en la medición precisa de la escala de grises (entre 0 y 255 tonos de gris). Los resultados de la medición la pueden presentar de tres formas, como información estadística numérica, como un histograma que muestra la distribución de la densidad y como un perfil de la misma (Digora®, Dent-a-View®, Trophy-Window®).

Consideramos dicha técnica un método útil, económica, automática y no invasiva que permite conocer de una manera muy sencilla la densidad ósea óptica mandibular y solventa los problemas que plantean las técnicas radiométricas en un doble sentido, por un lado la precisión, Benson¹² y Taguchi¹³ sobre radiografías analógicas emplean diversos artilugios manuales como reglas milimétricas, lupas o calibradores para obtener sus medidas, nosotros, sobre radiografías después de ser digitalizadas (menor magnificación), obtenemos de manera automática el resultado densitométrico basado en la escala de grises, en segundo lugar, la rapidez - sencillez, una vez capturada la imagen por el programa informático, el resultado se obtiene en segundos o décimas de segundos.

Nosotros hemos determinado los niveles de gris (calidad ósea) aplicando un programa informático específico, Dent - a - View, en dos áreas iguales, área de hueso alveolar DOA, en la vertical del foramen mentoniano hacia coronal, en la zona de premolares, y muy importante, sin incluir las corticales internas alveolares y área ósea basal DOB, en hueso basal, mesial al foramen mentoniano. Los datos fueron obtenidos de forma no ajustada por el programa, con un rango de valores más amplio (0 - 4095) y por lo tanto con un poder más discriminativo al analizar el valor óptico. Ambas variables presentaron una correlación significativa y cada una de ellas se correlacionó de manera

significativa con el ancho cortical mandibular, índice de Taguchi, pero no con el nivel de hueso alveolar (cantidad ósea). Estos hallazgos sugieren que la inflamación, principal causa responsable de la destrucción ósea en la periodontitis, no está influenciada por la densidad

5.2 DISCUSION DE LOS RESULTADOS DEL RECEPTOR DE VITAMINA D Y SU COMPARACION CON EL RESTO DE VARIABLES.

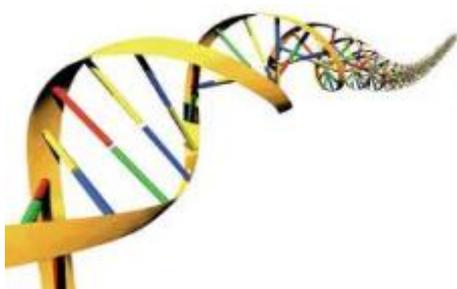
No está claro si un determinado genotipo del receptor de vitamina D (VDR) pudiera estar asociado a la pérdida de hueso alveolar en pacientes con periodontitis, o si ser portador de un determinado gen del receptor de vitamina D pudiera aumentar la susceptibilidad a periodontitis²³⁹.

Aunque una mayoría de estudios asocian las formas agresivas y de aparición temprana de periodontitis con este gen, no ocurre lo mismo con las formas crónicas en adultos. El polimorfismo del gen VDR puede ser determinado mediante cuatro enzimas de restricción (BsmI, TaqI, ApaI and FokI) y ha sido asociado con la densidad mineral ósea^{239,240}, sin embargo, un estudio de meta análisis reciente ha mostrado resultados contradictorios entre el polimorfismo VDR y la densidad ósea y solo encuentra una modesta pero significativa asociación entre baja frecuencia de alelos bb, por BsmI, y fracturas óseas²⁴¹.

En 72 pacientes españoles de nuestro estudio, (20 sin pérdida ósea, 6 con pérdida ósea y menos de 30 años y 46 con pérdida ósea y más de 30 años) en muestras nucleadas obtenidas de células epiteliales de la mucosa yugal, determinamos por PCR el genotipo VDR (enzima endonucleasa de restricción BsmI). No hubo asociación estadística en la distribución de los alelos b,B (haplotipos bb, bB, BB) y pérdida de hueso alveolar, tanto en el estudio bivalente ($p=0.575$, Tabla 2, artículo 2) como en el análisis multivariante (Resultados no mostrados).

Recientemente en un estudio longitudinal, Nibali y cols. encontraron una moderada asociación entre vitamina D receptor Taq-I polimorfismo con presencia y progresión de periodontitis en fumadores y no asociación en no

fumadores, concluyendo que factores genéticos del VDR podrían interactuar con el tabaco en la patogénesis de la periodontitis.²⁴⁰ En nuestro estudio, después de ajustar los diferentes haplotipos BsmI por consumo de tabaco, edad, número de dientes presentes, no fue significativa su asociación con la pérdida ósea alveolar. Debe de quedar claro que esta falta de relación se refiere a mujeres premenopáusicas y hombres menores de 50 años, pues como queda reflejado en material y métodos de los artículos publicados, nuestro estudio se ajustó a una franja etaria que pretendió excluir los pacientes con posibles alteraciones óseas de desarrollo o envejecimiento. En un estudio transversal no podemos demostrar causalidad, por ello, nuevos estudios de diseño longitudinal, serán necesarios para establecer si una determinada densidad ósea local o expresión genética para el gen del receptor de la vitamina D, puedan ser factores predictivos de destrucción ósea alveolar o si por el contrario, la pérdida de hueso a nivel de la cresta alveolar, es un proceso inflamatorio independiente del estatus de densidad ósea local.



6.-CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES:

1.- El nivel de hueso alveolar (cantidad ósea) mostró una relación NO significativa con la densidad ósea mandibular (calidad ósea) medida en radiografías panorámicas digitales, mediante la determinación de los niveles de gris en hueso alveolar y hueso basal.

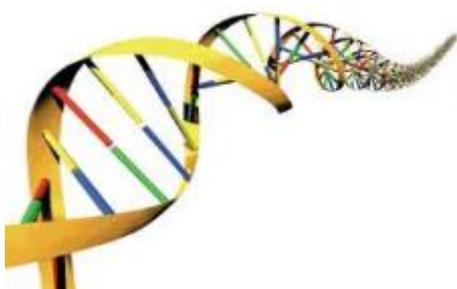
2.- El nivel de hueso alveolar NO se asoció con el ancho cortical mandibular medido en la zona propuesta por Taguchi (índice de Taguchi).

Ambas asociaciones se refieren a población caucásica de mujeres premenopáusicas y hombres por debajo de los 50 años.

3.- La pérdida de hueso alveolar fue mayor en los fumadores que en los no fumadores, mientras que los valores de densidad óptica no se relacionaron con el consumo de tabaco.

4.- La expresión genética del gen del receptor de la vitamina D (enzima de restricción BsmI) determinada por PCR, NO se asoció con el nivel de hueso en la cresta ósea alveolar en dicha población.

5.- Los resultados de este estudio sugieren que la destrucción ósea en la periodontitis es un proceso inflamatorio local independiente del estatus óseo.



7.-PERSPECTIVAS

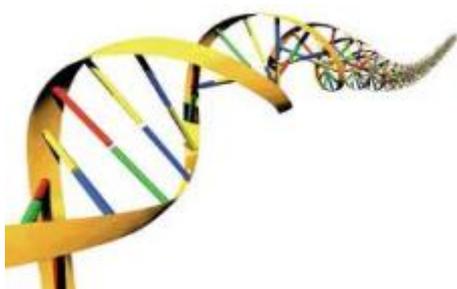
7.0 PERSPECTIVAS

De las variables analizadas en nuestro estudio, tan solo el consumo de tabaco ha influido sobre el nivel de la cresta ósea, recomendación sobre este hallazgo, en el sentido de la necesidad de abandonar su consumo, estaría en la misma línea que sobre el tabaco se hace en la periodontitis y en la oseointegración de implantes dentales. En la primera, el tabaco constituye el principal factor de riesgo de lesión periodontal, en la segunda, el tabaco influye en la remodelación ósea y por lo tanto en la supervivencia a corto y medio plazo de los implantes dentales. En nuestro estudio, el consumo de tabaco, influye en mantener una correcta altura de cresta ósea alveolar.

Hemos encontrado una falta de asociación entre la densidad óptica ósea, un índice morfométrico de masa ósea y la expresión genética del receptor de vitamina D y el nivel de cresta ósea alveolar. Este hallazgo NO apoyaría la idea de tratar la periodontitis con medicación osteogénica tipo bifosfonatos, derivados estrogénicos etc. como ocurre en procesos tipo osteoporosis. La periodontitis es un proceso inflamatorio y recomendaciones de tratamiento que apoyan este estudio, se basan en la actuación sobre los factores etiológicos y de riesgo conocidos, sin necesidad, a espera de otros estudios, de una actuación directa sobre el hueso. Hay publicaciones que demuestran una expresión genética del receptor de vitamina D asociada con formas clínicas de periodontitis agresiva que implicaría a la herencia junto con los polimorfismos de ciertas interleucinas en el desarrollo de la periodontitis, nosotros no hemos encontrado dicha asociación.

Otra recomendación importante en el campo de la implantología, lo constituye la seguridad que nos permite este hallazgo a la hora de colocar un implante en una zona de hueso alveolar donde se perdió un diente por periodontitis, nuestro estudio demuestra que la calidad ósea de esa zona ósea no influyó la pérdida dental.

Nuestro estudio ha estado centrado en un grupo poblacional reducido, > 21 años y < de 50 años, con objeto de evitar el desarrollo ósea en menores de 21 años y el efecto de la menopausia en mujeres de más de 50 años, no sabemos en caso de realizar el estudio en población general y controlando la edad en modelos de regresión, que resultados habríamos obtenido, constituyendo esta idea una recomendación para futuras investigaciones.



8.-REFERENCIAS

8.0 REFERENCIAS

- 1.- Johnston C, Epstein S, Clinicale, biochemical, radiographic, epidemiologic and economics features of oteoporosis. Orthop Clin North Ann 1981;12;559-569.
- 2.-Westmacott C. osteoporosis. What is it, how it is measured and what can be done about it? Radiography 1995;1:35-48.
- 3.- Silverman SL. Quality of life issues in ostoporosis. Curr Rheumatol Rep 2005;7: 39-45.
- 4.- Bullon P. Grobrena B, Guerrero JM, Segura JJ, Perez-Cano R, Marinez-Sahuquillo A. Serumsaliva and gingival crevicular fluid osteocalcin:their relation to periodontal status and bone mineral density in postmenopausal women. J periodontol 2005;76:513- 519.
- 5.- Famili P, Cauley J, Suziki JB, Weyant R. Longitudinal study of periodontal disease in edentulism with rates of bone loss in older women. J Periodontol 2005; 76: 11-15.
- 6.- Bissada NF . Women health issues and relationship to periodontitis J Am Dental Assoc 2002;133:323-327.
- 7.- Choel L, Dubuoeuf F, Bourgeois D, Briquet A, Lissac M. Trabecular alveolar bone in the human mandible: a dual energy x-ray abssoptiometry study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 95:364-370.
- 8.- Taguchi A The basic study on measurement of bone mineral density of mandible with dual energy quantitative computed tomography. J Hiroshima Univ Dent Soc 1992; 24:18-38.
- 9.- Dubravka K, Asja C. Comparison of mandibular bone density and radiomorphometric indices in wearers of complete or removable partial dentures. Oral Radiol 2005; 21:51-55.
- 10.- Bras J, Ooij V , Abraham-Inpijin L, Kusen GJ., and Wilmink JM. Radiographic interpretation of the mandibular angular cortex: a diagnostic tool in metabolic bone loss-Part 1: normal state. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1982; 53: 541-545.
- 11.-Yang RC. Quantitive measurement of jaw bone mineral contents in radiogram. J Dent Med 1987; 26: 911-920.
- 12.- Benson BW, Prihoda TJ, Glass BJ. Variations in adult cortical bone mass as measured by a panoramic mandibular index. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71:349-56.

- 13.- Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y Wada T. Coth loss and mandibular osteopenia Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1995; 79:127-132.
- 14.- .-Klemetti E, Kolmakov S Heiskanem P Vainio P, Lassila V. Panoramic mandibular index and bone mineral densities in postmenopausal women. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993; 75:774-779.
- 15.- Jowitt N, T Macfarlane, H Devlin, E Klemetti and k Horner. The reproducibility of the mandibular cortical index. Dentomaxillofac Radiol 1999; 28:141-144.
- 16- Taguchi A, Tanimoto K, Suii Y, Otani K, Wada T. Oral signs as indicadores of posible osteoporosis en elderly women. Oral Surg Oral Med Oral Patholo Oral Radiol Endod 1995; 80:612-616.
- 17.- Taguchi A, Suii Y, Ohtsuka M, Otani K, Tanimoto K, Ohtaki M, Usefunless of panoramic radiography in the diagnosis of postmenopausal osteoporosis in women. Width and Morphology of inferior cortex of the mandibule. Dentomaxillofac Radiol 1996; 25:263-267.
- 18.-Klemetti E, Kolmakow S. Morphology of the mandibular cotex on panoramic radiographs as an indicador of bone quality. Dentomaxillofac Radiol 1997; 26:22-25.
- 19.- Horner K, Devlin H. The relationships between two indicates of mandibular bone quality and bone mineral density measured by dual energy X-ray absorptiometry. Dentomaxillofac Radiol 1998; 27:17-21.
- 20.- Klemetti E, Kolmakov S, Coger H. Pantomography in assesment of the osteoporosis risk group. Scand J Dent Res 1994; 102:68-72
- 21.-.- Taguchi A, Tanimoto K, Suie Y, Yamada T Ohtsuka M, Sumida H et al. The estimation of the radiomorphometric indices of the mandibule using panoramic radiography. Dent Radiol 1993; 33:309-319.
- 22.- Ledgerton D, Horner K Devlin H, Worthington H. Radiolmorphometric indices of the mandibule in a Britsh female population. Dentomaxillofac Radiol 1999; 28:173-181.
- 23.-Zlataric DK, Celebic A, Kobler P. relationship between body mass index and local quality of mandibular bone structure in elderly individuals J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2002; 57:588-93.
- 24.- .-Zlataric DK, Celebic A. Clinical bone densitometric evaluation of the mandible in removable denture wearers dependent on the morphology of the mandibular cortex. J Prosthet Dent 2003; 90:86-91.

- 25.- Klemetti E, Kolmakov S, Coger H. Pantomography in assesment of the osteoporosis risk group. Scand J Dent Res 1994; 102:68-72.
- 26.-Bollen A-M, Taguchi A Hujeol PP, Hollender LG. Case-control study on self-reported osteoporotic fractures and mandibular cortical bone. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod 2000; 90:518-24.
- 27.-Persson RE, Hollender LG, Powell LV, MacEntee MI, Wyatt CC, Kayak HA et al. Assessment of periodontal condicions and systemic disease in older subjects. I Focus on ostroporosis. J Clin Periodontol 2002; 29:796-802.
- 28.-Taguchi A, Suie Y, Horner K, Devlin H, Nakamoto T, Yamashina A, Ishii K, Ohtsuka M, Lee K, Fujita M, Tanimoto K, Klemetti E Is there any diferrence between the british and japanese definitions of the mandibular cortical index (MCI) on panoramic radiographs? A pilot study. Oral Radiol 2004;20:44-48.
- 29.- Nakamoto T, Taguchi A, Ohtsuka M, Suie Y, Fujita M, Tanimoto K et al. Dental Panoramic radiograph as a tool to detect postmenopausal women with low bone mineral density: untrained general dental practitioners Diagnostic Performance. Osteoporos Int 2003;14: 659-664.
- 30.- Taguchi A, Sanada M, Krall E, Nakamoto T, Ohtsuka M, Suei Y y cols. Relationship between dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover J Bone Miner Res 2003;18:1689-1694.
- 31.- Watson EL, Katz RV, Adelezzi R, Gift HC, Duna SM, The measurment of mandibular cortical bone height in osteoporotic vs. non osteoporotic postmenopausal women. Spec Care Dentist 1995;15:124-128.
- 32.-Drozdowska B, Pluskiewiez W, Tarnawska B. Panoramic-based mandibular indices in relation to mandibular bone mineral density and skeletal status assessed by dual energy x-ray absorptiometry and quantitive ultrasound. Dentomaxillofac Radiol 2002; 31:361-367.
- 33.-Devlin H, Horner K, Mandibular radiomorphometric indices in the diagnosis of reduced skeletal bone mineral density. Osteoporos Int 2002;13:373-378.
- 34.-Horner K, Delvin H, Harvey L, Detecting patioents with low skeletal bone mass. J Dent 2002; 30:171-175.
35. Kalender Wa, Klotz E, Suess C, Vertebral bone mineral análisis: An integrated aproach with ct. Radiol 1987; 164:419-422.
- 36- Mesa Aguado Fl; Masseroli M; López Leyva C; Revelles Marin F; O'Valle

- Ravassa fj. Valoración Morfométrica Del Epitelio Gingival. Cuantificación De Los Cambios Morfológicos Mediante Análisis Digital De Imagen. Arch Odont-Estomatol 1997; 11:652-660.
- 37.- O'Valle F, Mesa F, Aneiros J, Gomez-Morales M, Lucena MA, Ramirez C, Revelles F, Moreno E, Navarro N, Caballero T, et al. Gingival overgrowth induced by nifedipine and cyclosporin A. Clinical and morphometric study with image analysis. J Clin Periodontol 1995; 22:591-597.
- 38.- Mesa F, López C, Bravo M. Afectación periodontal en adultos de la consulta de odontología del Distrito de Guadix-Granada. Periodoncia y Osteointegración 1997; 7: 25-30
- 39.- Haffeejee A, Socransky S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5: 78-111.
- 40.- Offenbacher S. Periodontal diseases: patogénesis. Ann Periodontol 1996;1:821-887.
- 41.- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 1999; 4:1-6.
- 42.- Heitz-Mayfield LJ, Trombelli L, Heitz F, Needleman I, Moles D. A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2002; 29:92-102.
43. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res 1970; 49:203-222.
- 44.-. Albandar JM. A 6-year study on the pattern of periodontal disease progression. J Clin Periodontol 1990; 7:467-471.
- 45.-. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. J Clin Periodontol 1990;7: 479-493.
- 46.-. Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J. Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes in periodontal health and disease. Oral Microbiol Immunol 1991; 2:115-118.
- 47.- Ebersole JL, Cappelli D. Gingival crevicular fluid antibody to Actinobacillus actinomycetemcomitans in periodontal disease. Oral Microbiol Immunol 1994; 9:6:335-344.
- 48.- Listgarten MA, Wong MY, Lai CH. Detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, and Bacteroides forsythus in an

- A. actinomycetemcomitans-positive patient population. *J Periodontol* 1997; 28:158-164.
- 49.- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997; 14:9-11.
- 50.- The American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: The American Academy of Periodontology. 1989
- 51.- Attström R, van der Velden U. Consensus report (epidemiology). In: Lang NP, Karring T, editors. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontics. London: Quintessence, 1994: 120-126
- 52.- Armitage GC. Classifying periodontal diseases- a long-standing dilemma. *Periodontol 2000* 2002; 30:9-23.
- 53.- Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000* 2002; 29:31-69.
- 54.- Sheiham A, Netuveli G. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000* 2002; 29:104-121.
- 55.- Bravo-Pérez M, Cásales Pedro E, Cortes Martíni F; Llodra Calvo JC, Encuesta de salud oral de España 2005. *RCOE* 2006; 11:409-456.
- 56.- Michalowicz B, Aeppli D, Virag JG. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991; 62:293-299.
- 57.- Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Matchete EE et al. Assessment of risk for periodontal disease. 1. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994; 65: 260-267.
- 58.- Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol* 1999; 4: 54-63.
- 59.- Rioboo Crespo M, Bascones A. Factores de riesgo de la enfermedad periodontal: factores genéticos. *Avances Periodoncia e Implantología*. 2005; 17: 2:69-77.
- 60.- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997; 14:9-11.
- 61.- Consensus Report for Periodontal Diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1:926-932.
- 62.- Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2000; 35:3-16.
- 63.- Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic. *J Periodontol* 1999;

70:478-484.

64.-Ting M, Contreras A, Slots J. Herpesvirus in localized juvenile periodontitis. J Periodontal Res 2000; 35:17-25.

65.- Velazco CH, Coelho C, Salazar F, Contreras A, Slots J, Pacheco JJ. Microbiological features of Papillon-Lefèvre syndrome periodontitis. J Clin Periodontol 1999; 26:622-627.

66.- Cutler C.W. Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface. J Dent Res. 2006; 85: 678-689.

67.- Lundqvist C, Baranov V, Teglund S, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Cytokine profile and ultrastructure of intraepithelial gamma delta T Cell in chronically inflamed human gingival suggest a cytotoxic effector function. J Immunol 1994; 153:2302-2312.

68.- Das G, Janeway CA Jr. MHC specificity of iIELs. Trends Immunol 2003;24:88-93.

69.- Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. J Dent Res 2005; 84:9-20.

70.- Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontol 2000; 13:91-120.

71.- Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane DH. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. J Periodontal Res 1992; 27: 623-630.

72.- Tonetti MS, Gerber L, Lang NP. Vascular adhesion molecules and initial development of inflammation in clinically healthy human keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. J Periodontal Res 1994; 29: 386-392.

73.- Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane DH. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. J Periodontal Res 1992; 27: 623-630.

74.- Tonetti MS, Gerber L, Lang NP. Vascular adhesion molecules and initial development of inflammation in clinically healthy human keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. J Periodontal Res 1994; 29: 386-392

75.- Scully C, Challacombe SJ. The migration of polymorphonuclear leucocytes into

- the oral cavity in the rhesus monkey. *J Periodontal Res* 1979; 14: 53-66.
- 76.- Van Dyke TE. Role of the neutrophil in oral disease: receptor deficiency in leukocytes from patients with juvenile periodontitis. *Rev Infect Dis* 1985; 7:419-425.
- 77.- Lu H, Wang M, Gunsolley JC, Schenkein HA, Tew JG. Serum immunoglobulin G Subclass concentration in periodontally healthy and diseased individuals. *Infect Immun* 1994; 62:1677-1682.
- 78.- Kronstrom M, Svensson B, Erickson E, Houston L, Braham P, Persson GR. Humoral immunity host factors in subjects with failing or successful titanium dental implants. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 875-882.
- 79.- Cutler C.W. Jotwani R. Dendritic Cells at the Oral Mucosal Interface. *J Dent Res* 2006; 85: 678-689.
- 80.- Cook DN, Prosser DM, Foster R. et al. CCR6 mediated dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 2000; 12: 495-500.
- 81.- Iwasaki A. Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein MIP-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000; 191: 1381-1394.
- 82.- Jotwani R, Pulendran B, Agrawal S, Cutler CW. Human dendritic cells respond to *P. gingivalis* LPS by promoting Th2 effector response in vitro. *Eur J Immunol* 2003; 33:2980-2986.
- 83.- Pulendran B, Kumar P, Cutler CW. et al. Lipopolisaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 2001; 167: 5067-5076.
- 84.- Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D, et al. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo and in vitro studies. *J Immunol* 2001; 167:4693-4700.
- 85.- Jotwani R, Cutler CW. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature dendritic cells with CD4+ T-cells in situ. *J Dent Res* 2003; 82:736-741
- 86.- van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:697-709.
- 87.- van Kooyk Y, Engering A, Lekkerkerker AN, Ludwig IS, Geijtenbeek TB.

Pathogens use carbohydrates to escape immunity induced by dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2004;16:488–493.

88.- Caparros E, Muñoz P, Sierra-filardi E. et al. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and P13K activation and modulates cytokine production. *Blood* 2006; 107: 3950-3958.

89.- Gaffen S.L., Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res* 2008; 87:817-828.

90.- van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SA, Kapsenberg ML, de Jong EC. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007; 27:660-669.

91.- Socransky SS, Haffaje AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.

92.- Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics., Michael G. Newman editor. Chicago : American Academy of Periodontology, 1989.

93.- Van Dyke TE. Control of inflammation and periodontitis. *Periodontol* 2000 2007; 45:158-166.

94.- Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 66-77.

95.- Anonymous. Consensus report. Periodontal diseases; pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1: 926-932.

96- Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430: 257-263.

97.- Akira S, Takeda K, Kaiso T. Toll-like receptors signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.

98.- Hayashi E, Measn TK, Luster AD. Toll- like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003; 102: 2660-2669.

99.- Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant proteína-1 after stimulation with *P.gingivalis* via toll-like receptor-2. *J Periodontol* 2004; 75: 370-379.

100.- Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y.

Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 54-58.

101.- Amit R, Morag A, Ravid Z, Hochman N, Ehrlich J, Zakay-Rones Z. Detection of herpes simplex virus in gingival tissue *J Periodontol* 1992; 63: 502-506.

102.- Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2000; 35: 5-16.

103.- Michalowitz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *P. Gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol* 2000; 71: 981-988.

104.- Contreras A, Slots J. Active cytomegalovirus infection in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 225-230.

105.- Nibali L, Atkinson C, Griffiths P, Darbar U, Rakmanee T, Suvan J, Donos N. Low prevalence of subgingival viruses in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 928-932.

106.- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003; 77: 4588-4596.

107.- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa β by toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-738.

108.- Krug A, French AR, Barchet W et al. TLR-9 dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004; 21: 107-119.

109.- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20: 345-357.

110.- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhanced T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390:175-179.

111.- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR. Osteoprotegerin; a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309- 315.

112.- Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*

1999; 397:315-323.

113.- Kanamaru F, Iwai H, Ikeda T, Nakajima A, Ishikawa I, Azuma M. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of RANKL in human T cell. *Immunol Lett* 2004; 94: 329-246.

114.- Teng YT, Nguyen H, Gao X et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000; 106:59-67.

115.- Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S. et al. T-cell mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000; 30: 535-536.

116.- Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-Lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12: 125-135.

117.- Nagasawa Y, Kobayashi H, Kiji M et al. LPS stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of OPG. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 338-344.

118.- Liu D, Xu JK, Figliomeni L y cols. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003; 11: 17-21.

119.- Crotti T, Stmith MD, Hirsch R et al. RANKL and OPG protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res* 2003; 38: 380-387.

120.- Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83: 166-169.

121.- Tiranathanagul S, Yongchailtrakul T, Pattamapun K, Pavasant P. A. actinomycetemcomitans lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 and increases receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2004; 75:1647-1654.

122.- Hormdee D, Nagasawa T, Kili M. et al. Protein kinase-A dependent OPG production on IL-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 490-497.

123.- Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Doucet C, Jasmin C, Azzarone B. Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 2000; 30:

914-919.

124.- Han X, Amar S. Identification of genes differentially expressed in culture human periodontal ligament fibroblasts vs. human gingival fibroblasts by DNA microarray analysis. *J Dent Res* 2002; 102: 1421-1227.

125.- Dongar-Bagtzoglou AI, Warren WD, Berton MT, Ebersole JL. CD 40 expression by gingival fibroblasts: correlation of phenotype with function. *Int Immunol* 1997; 9: 1233-1241.

126.- Wassenaar A, Verschoor T, Kievits F et al. CD40 engagement modulates the production of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:161-167.

127.- Beklen A, Ainola, M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Kontinen Y.T. MMPs, IL-1, and TNF are Regulated by IL-17 in Periodontitis. *J Dent Res* 2007; 86:347-351.

128.- Mesa F, Liébana J, Galindo-Moreno P, O´Valle F. Oral pathogens, immunity and periodontal diseases. *Current Immunol Rev* 2011; 7: 83-89.

129.-Bennet KR, Read PC. Salivary immunoglobulin A levels in normal subjects, tobacco smokers and patients with minor aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53:461-465.

130.- Haber J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol* 1994;12-18.

131.- Kenney EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* 1977; 12:227-234.

132.- Kraal JH, Chancellor MB, Bridges RB, Bemis KG, Hawke JE. Variations in the gingival polymorphonuclear leukocyte migration rate induced by tobacco smoke. *J Periodontal Res* 1977; 12:242-249.

133.- da Silva AM, Newman HN, Oakley DA. Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol* 1995; 22:516-526.

134.-Moss ME, Beck JD, Kaplan R, Offenbacher S, Weintraub JA, Koch G et al. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol* 1996; 67:1060-1069.

135.- LeResche L, Dworkin SF. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontol* 2000 2004; 30:91-103.

136.- Schenkein HA. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the

- climb worth the view? *Periodontol* 2000 2002; 30:79-90
- 137.- Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* 1998; 3: 327-38.
- 138.- Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol* 2000 2003; 32:1:82-104.
- 139.- Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2001; 25:1:8-20.
- 140.- Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NS. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991; 62:293-299.
- 141.- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 1997; 14:216-248.
- 142.- Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontol* 2000 2003; 32:36-49.
- 143- Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14:202-215.
- 144.- Bredius RGM, de Vries CEE, Troelstra A, van Alphen L, Weening RS, van de Minkel JGJ, Out TA. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae* type B on opsonized with polyclonal human IgG1 and IgG2 antibodies. Functional hFc-gamma-RIIa polymorphism to IgG2. *J Immunol* 1993; 151S: 1463-1472
- 145.- Osborne JM, Chacko GW, Barndt JT, Anderson CL. Ethnic variation in frequency of allelic polymorphism of human Fc-gamma-RIIA determined with allele specific oligonucleotide probes. *J Immunol Methods* 1994; 173: 207-17.
- 146.- Kocher T, Sawaf H, Fanghanel J, Timm R, Meisel P. Association between bone loss in periodontal disease and polymorphism of N-acetyltransferase (NAT2). *J Clin Periodontol* 2002; 29: 21-27.
- 147- Garrison SW, Holts C, Nichols FC. Lipopolysaccharide-stimulated PG release from human monocytes. *J Periodontol* 1988; 59:684-687.
- 148.- Garrison SW, Nichols FC. LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but not IL-1 β in patients with adult periodontitis. *J Periodontal Res* 1989; 24:88-95.
- 149.- Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, di Giovine FS, Newman HN, Pirk FW et

- al. The interleukin 1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24:72-77.
- 150.-. Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis if genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 1999; 34: 379-386.
- 151.-Yamazaki K, Tabeta K, Nakajima T, Ohsawa Y, Ueki K, Itoh H, Yoshie H. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 828-832.
- 152.-. Reinholdt J, Bay I and Svejgaard. Association between HLA-Antigens and periodontal disease. *J Dent Res* 1977; 56:1261-1263.
- 153.-. Henning BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor IJ. Dinucleotide repeat polymorphism in the interleukin10 gene promoter (IL-10,G) and genetic susceptibility to early-onset periodontal disease. *Genes Immun* 2000; 1: 402-404.
- 154.- Hart TC, Kornman KS. Genetic factores in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14: 202- 215.
155. Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontol* 2000 2003; 82: 36-49.
- 156.-. Machulla HKG. HLA, B, Cw, DRB1, DRB3/4/5, DQB1 in German patients suffering from rapidly progressive periodontitis (RPP) and adult periodontitis (AP). *J Clin Periodontol* 2002; 29: 573-579.
- 157.-. Schenck K. Proceedings of the conference "New Frontiers in Oral Immunological Diseases", Lillehammer, Norway, 2001, Part I. *Acta Odontol. Scand.* 2001; 59: 120-124.
- 158.-. Tatakis D.HLA-27 Transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. *J Periodontol.* 2000; 71: 1395-1399.
- 159.-. Reyes-Botella, C. Expression of molecules involved in antigen presentation and T cell activation (HLA-DR, CD80, CD86, CD44, and CD54) by cultured human osteoclasts. *J Periodontol* 2000; 71: 614-617.
- 160.- Izumi Y. Association HLA/maladies parodontales. *J Periodontol* 1990; 9:145-149.
- 161.-. Stein, J. Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis?. *J Periodontal Res* 2003; 38: 508-517.

- 162.- Goteiner D and Goldman M. Human Lymphocyte Antigen haplotype and resistance to periodontitis. J Periodontol.1983: 155-157.
- 163.- Amer A, Singh G, Darke C and Dolby E. Association between HLA antigens and periodontal disease. Tissue Antigen 1988; 31: 53-58.
- 164.-. Shapira L, Eizemgerg S, Sela MN, Soskolne A, and Brautbar H. HLA A9 and B15 are associated with generalized form, but not the localized form, of early-onset periodontal diseases. J Periodontol 1994; 65: 219-223.
- 165.- Henning BJW, Parkhill JM, Chapple ILC, Heasman PA, Taylor JJ. Association of a Vitamin D Receptor Gene Polymorphism with localized Early-Onset J Periodontol 1999; 70:1032-1038.
- 166.- Venter JC, Adams MD, Myers E. y cols. The sequence of the human genome. Science 2001; 291:1304-1351.
- 167.- . Lander ES, Linton LM, Birren B y cols. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409: 860-921.
- 168.- . Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC y cols. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 2001; 409: 928-933.
- 169.- Reich DE, Cargill M, Bolk S. Y cols. Linkage Disequilibrium in the human genome. Nature 2001; 411:199-204.
- 170.-Brumbaugh P F, and Haussler MR. "1 Alpha,25-ihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin." J Biol Chem 1974; 249:1251-1257.
- 171.- Mellon WS, and Luca HF De. An equilibrium and kinetic study of 1,25-dihydroxyvitamin D3 binding to chicken intestinal cytosol employing high specific activity 1,25-dehydroxy[3H-26, 27] vitamin D3. Arch Biochem Biophys 1979;1: 90-95.
- 172.- Miyamoto K, Kesterson RA, y cols. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. Mol Endocrinol 1997;11: 1165-1179.
- 173.- Yamamoto HK, Miyamoto y cols. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. J Bone Miner Res 1999;14: 240-247.
- 174.- Freund JN, Domon-Dell C. y cols. The Cdx-1 and Cdx-2 homeoboxgenes in the

intestine. *Biochem Cell Biol* 1998; 76: 957-969.

175.- Morrison NA, Qi JC. Y cols. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284-287.

176.- Durrin LK, Haile RW. Y cols. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453: 311-320.

177.- Faraco JH, Morrison NA. y cols. ApaI dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2150-2158.

178.- Morrison NA, Yeoman R. et al. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 6665-6669.

179.- Ye WZ, Reis AF. et al. Identification of a novel Tru9 I polymorphism in the human vitamin D receptor gene. *J Hum Genet* 2000; 45: 56-57.

180.- Swains J, Van Tornout J, Loro ML, Sayre J, Roe T, Gilsanz V. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone density in prepubertal american girls of Mexican descent. *N Engl J Med* 1997; 337: 2: 77-82.

181.-- Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli E, Cepollaro C, Martini S, Montagnani A, Lentini G, Becorpi A, Brandi M. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3: 939-944.

182.-. Howard G, Nguyen T, Morrison NA, Watanabe T, Sambrook P, Eisman J, Kelly P. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2800-2805.

183.-. Sosa-Henriquez M, Torres-Ramirez A, Domínguez-Cabrera C, Salido E, Saavedra-Santana P, Barrios Y, Limiñana-Cañal JM, Betancor-Leon P. Genetic polymorphism of vitamin D receptor and osteoporosis. *Med Clin Barc* 1998; 110: 646-650.

184.-. Ramalho AC, Lazareti-Castro M, Hauache O, Kasamatsu T, Brandao C, Reis AF, Takata E, Cafalli F, Tavares F, Gimeno SG, Vieira JG. Fractures of the proximal femur: correlation with vitamina D receptor gene polymorphism. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 921-927.

185.- Poggi M, Aterini SA, Nicastro L, Chiarugi V, Ruggiero M, Pacini S, Gulisano

- M. Lack of association between body weight, bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphism in normal and osteoporotic women. *Dis Markers* 1999; 15: 221-227.
- 186.- Bernad M, Jaramillo G, Aguado P, Del Campo T, Coya J, Gijón-Baños J, Saldaña-Barrera H, Martínez ME. Polymorphism of the gene of vitamin D receptor and bone mineral density in postmenopausal women. *Med Clin Barc* 1999; 112: 651-655.
- 187.- Kikuchi R, Lemur T, Gorai I, Ohno S, Minaguchi H. Early and late postmenopausal bone loss is associated with Bsm I vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese women. *Calcif Tissue Int* 1999; 64:102-106.
- 188.- Murakami F, Hagino H, Shimomura T, Ikawa S, Hirano Y, Iijima K, Yamamoto K. Association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphism changes in radial bones mineral density with long-term follow-up: longitudinal study. *Rinsho Byori* 1998; 46: 766-773.
- 189.- Zhang H, Tao G and Wu Q. Preliminary studies on the relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and osteoporosis in Chinese women. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 1998; 19:12-14.
- 190.- Yokoyama K, Shigematsu T, Tsukada T, Ogura Y, Takemoto F, Hara S, Yamada A., Kawaguchi Y, Hosoya T. Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with endstage renal disease. *Kidney Int* 1998; 53: 454-458.
- 191.- Cárdenas-Ibarra L, Jaramillo-Rangel G, Sánchez CN, Montes-Villarreal J, Villarreal-Pérez J, Barrera-Saldaña H. Diversidad en el gen receptor de la vitamina D en Mexicanas. *Bioquímica* 1999; 24: 59-63.
- 192.- Ho YV, Briganti EM, Duan Y, Buchanan R, Hall S, Seeman E. Polymorphism of the vitamin D receptor gene and corticosteroid-related osteoporosis. *Osteoporos Int* 1999; 9:134-138.
- 193.- Kannus P, Palvanen M, Kaprio J, Parkkari J, Koskenvuo M. Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people: prospective 25 year follow up of nationwide cohort of elderly Finnish twins. *Br Med J* 1999; 319: 1334-1337.
- 194.- Mocharla HA, Butch W. Y cols. Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic variants. *J Bone Miner Res* 1997; 12:726-733.

- 195.- Gross C, Krishnan AV. et al. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of Fok-I variants." *J Bone Miner Res* 1988;13: 1691-1699.
- 196- Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV. et al. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporos Int* 1999;10:34-40.
- 197.- Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, y cols. The relationship between mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol.*2000;71:1492-1498.
- 198- Devis E, Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100:349-356.
- 199.- Mohammad A.R., Jones D.J. y Brunsvold M.A.: Osteoporosis and periodontal disease: a review. *J Calif Dent Assoc* 1994; 22:69-75.
- 200- Wactawski-Wende J, Grossi SG, Trevisan M. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *J Periodontol* 1996; 67:1076-1084.
- 201.- Saijo T, Ito M, Takeda E. et al. A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection *Am J Hum Genet* 1991; 49:668-673.
- 202.- Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M. y cols. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* 2001;16:1256-1264.
- 203.- Kikuchi R, Lemur T, Gorai I, Ohno S, Minaguchi H. Early and late postmenopausal bone loss is associated with Bsm I vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese women. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 102-106.
- 204.- Raymond MH, Schutte BC, Torner JC, Burns TL, Willing MC. Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics* 1999; 60: 210-217.
- 205.- D'ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG. Y cols. Inhibition of IL-12 production by 1.25-dihydroxyvitamin D3. involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest* 1998;101;252-262.
- 206- Krall EA, Wehler C, Garcia RI. et al. Calcium and vitamin D supplements reduce tooth loss in the elderly. *Am J Med* 2001;111:452-456.

- 207.- Dietrich T, Joshipura KJ, Dawson-Hughes B. et al. Association between serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D3 and periodontal disease in the US population. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:108-113.
- 208.- Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV. Y cols. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporos Int.* 1999;10:34-40.
- 209.- Tezal M, Wactawawski-Wende J, Grossi SG. et al. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women *J Periodontol* 2000;71:1492-1498.
- 210.- Dervis E. Oral implications of osteoporosis. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:349-356.
- 211.-Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T, Miura Y, Fukamauchi K, Mitsuhashi N, Irimoto M, Yamamori S, Miura M, Watanabe T, Kuwabara Y, Yabuta K, Eximan JA. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1996;11: 1003-1009.
- 212.- Park KS, Nam JH, Choi J. The short vitamin D receptor is associated with increased risk for generalised aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006; 33:524-528.
- 213.- De Souza C, Ribeiro AP, De Brito R Jr, Ignacio SA, Probst CM, Riella MC, Sotomayor VS, Mira MT, Precoits.Filho R, Trevilatto PC, Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to chronic kidney disease and periodontitis. *Blood Purif* 2007; 27:411-419.
- 214- Selvarej P, Chandra G, Jawahar M, Rani MV, Raheshawari D, Narayanan PR. Regulatory role of vitamin D receptor gene variants of Bsm1, Apal, TaqI, and FokI polymorphisms on macrophage phagocytosis and lymphoproliferative response to mycobacterium tuberculosis antigen in pulmonary tuberculosis. *J Clin Immunol* 2004; 24:523-532.
- 215.- Yoichi T, Hitomi S, Yasuhiro N, Tatsuya K, Mitsuko S, Masatosi U, Hisao I, Kiyoshi O. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. *Life Sciences* 2003; 73:3313-3321.
- 216- Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999; 179:721-724.

- 217.-Wilkinson RJ, Llewelyn M, Tosí Z, Patel P, Pasvol G, Lalvania, Wright D, Latif M, Davidson RN. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 2000; 355:618-621
- 218.- Persson GR, Ohlson O, Pettersson T, Renvert S. Chronic periodontitis, a significant relationship with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003; 24: 2108-2115.
- 219- Kribbs PJ, Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent.* 1999; 63:218-222.
- 220.- Bassiouny MA, Grant AA . The accuracy of the Schei ruler: a laboratory investigation. *J Periodontol* 1975; 46: 748-52.
- 221.- Taguchi A, Tanimoto K, Sueti Y, Ohama K, Wada T. Relationship between the mandibular and lumbar vertebral bone mineral density at different postmenopausal stages. *Dentomaxillofac Radiol* 1996; 25: 130-135.
- 222.- Leite AF, Figueiredo PT, Guia CM, Melo NS, de Paula AP. Correlations between seven panoramic radiomorphometric indices and bone mineral density in postmenopausal women. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 449-456.
- 223.- Taguchi A. Triage screening for osteoporosis in dental clinics using panoramic radiographs. *Oral Dis* 2010; 16: 316-327.
- 224.- Karayianni K, Horner K, Mitsea A, Berkas L, Mastoris M, Jacobs R, Lindh C, van der Stelt PF, Harrison E, Adams JE, Pavitt S, Devlin H. Accuracy in osteoporosis diagnosis of a combination of mandibular cortical width measurement on dental panoramic radiographs and a clinical risk index (OSIRIS): the OSTEODENT project. *Bone* 2007; 40: 223-229.
- 225.- Morita I, Nakagaki H, Taguchi A, Kato K, Murakami T, Tsuboi S, Hayashizaki J, Inagaki K, Noguchi T. Relationships between mandibular cortical bone measures and biochemical markers of bone turnover in elderly Japanese men and women. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108: 777-783.

- 226.- Horner K, Devlin H, Alsop CW, Hodgkinson IM, Adams JE. Mandibular bone mineral density as a predictor of skeletal osteoporosis. *Br J Radiol* 1996; 69: 1019-1025.
- 227.-Holbrook TL, Barreto-Connor E, Wingard DL. Dietary calcium and risk of hip fracture: 14 year prospective population study. *Lancet* 1988;ii 1046-1049.
- 228- Jacobs R, Ghyselen J, Koninckx P, van Steenberghe D. Long term bone mass evaluation of mandible and lumbar spine in a group of women receiving hormone replacement therapy. *Eur J Oral Sci* 1996;104: 10-16.
- 229.- Klemetti E, Collin H-L, Forss H,Markkanen H and Lassila V: Mineral status of skeleton and advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1994; 21:184-188.
- 230.- Ward VJ, Manson JD. Alveolar bone loss in periodontal disease and the metacarpal index. *J Periodontol* 1973; 44:763-769.
- 231.- Palmqvist S, Soderfeldt B, Arnbjerg D. Dental conditions in a Swedish population aged 45-69 years: a questionnaire study. *Acta Odontol Scan* 1991;49:377-384.
- 232.- Von Wowern N, Hjorting-Hansen E, Stoltze K. Changes in bone mass in rat mandibles after tooth extraction. *Int J Oral Surg* 1979;8: 229-33.
- 233.- Von Wowern N, Westergaard J, Kollerup G. Bone mineral content and bone metabolism in young adults with severe periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28: 583-588.
- 234.- Inagaki K, Kurosu Y, Kamiya T, Kondo F, Yoshinari N, Noguchi T, Krall EA, Garcia RI. Low metacarpal bone density, tooth loss, and periodontal disease in Japanese women. *J Dent Res* 2001; 80: 1818-1822.
- 235- Hattatoglu-Sönmez E, Ozcakar L, Gökce-Kutsal Y, Karaagaoglu E, Demiralp B, Nazliel-Erverdi H. No alteration in bone mineral density in patients with periodontitis. *J Dent Res* 2008; 87: 79-83.
- 236.- Nackaerts O, Gijbels F, Sanna AM, Jacobs R. Is there a relation between local bone quality as assessed on panoramic radiographs and alveolar bone level? *Clin Oral Invest* 2008;12: 31-35.

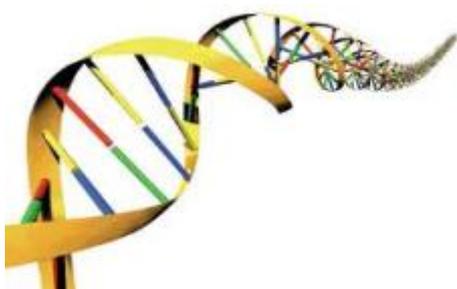
237.- Taba-Junior M, Novaes AB Jr, Souza SL, Grisi MF, Palioto DB, Pardini LC. Radiographic evaluation of dental implants with different surface treatments: an experimental study in dogs. *Implant Dent* 2003; 12: 252–258.

238- Novaes AB Jr, Souza SL, Oliveira PT, Souza AM. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 377–383.

239.- Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res* 1996;11: 1841–1849.

240.- Thakkestian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 2004;19: 419–428.

241- Ji GR, Yao M, Sun CY, Li ZH, Han Z. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in Caucasians: a meta-analysis. *Bone* 2010;47: 681-686.



9.-ANEXO

9.0 ANEXO DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS