



**UNC**

Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN  
PACIENTES DURANTE LA PERIODONTITIS CRÓNICA: ROL  
DE QUIMIOCINAS Y CITOCINAS”**

TESISTA:

**OD. MARCELO OCAMPO**

DIRECTOR:

**PROF. DR. LUIS AUGUSTO OLMEDO**

**CÓRDOBA, 2010**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE POSGRADO**

**“CARACTERIZACIÓN  
DE LA RESPUESTA INMUNE  
EN PACIENTES DURANTE  
LA PERIODONTITIS CRÓNICA:  
ROL DE QUIMIOCINAS  
Y CITOCINAS”**

Trabajo de Tesis para optar al título de  
Doctor en Odontología

Doctorando:

**Od. Marcelo Ocampo**

Director:

**Prof. Dr. Luis Augusto Olmedo**

**Córdoba, Julio de 2010**



## **TRIBUNAL DE TESIS**

**Prof. Dr. Enrique Giménez**

**Prof. Dra. Ana Filkenberg**

**Prof. Dr. Oscar Pessah**



## DEDICATORIA

- *A Miryam, mi esposa,  
la mujer que amo por haberme permitido  
compartir su vida .*
- *A mis tres hijos que adoro:  
Arian, Martín y Marcelo.*

*El hombre existe en un mundo  
de significaciones preexistentes,  
que sólo podemos conocer en la medida  
en que nos impliquemos en él.  
Martín Heidegger*



## AGRADECIMIENTOS

- *Al Profesor Doctor Luis Augusto Olmedo por haberme dirigido en todos los trayectos de este trabajo de investigación, con solvencia científica, responsabilidad y total dedicación.*
- *A los miembros de la Comisión de Tesis, por su permanente apoyo y sugerencias tendientes a mejorar la calidad de este trabajo.*
- *A las autoridades de la Facultad de Odontología- UNC por haber encontrado en ellos en todo momento el apoyo y aliento para continuar.*
- *A mi amigo y compañero de equipo, Dr. José Luis Atala, con quien compartimos muchas alegrías cuando los resultados de investigación lo meritaban y nos alentamos a seguir cuando alguna situación nos desanimaba.*

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>12</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>71</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>88</b>

## INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica (PC), es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por un proceso inflamatorio destructivo de los tejidos de soporte de los dientes del hospedador, en grados clínicamente detectables. Incluye signos y síntomas comunes, tales como reabsorción del hueso alveolar y formación de bolsas periodontales, con eventual pérdida de elementos dentarios, probable sangrado al examen clínico y eventualmente exudado purulento (1-2). A esto se puede asociar crecimiento coronal o recesión gingival y la enfermedad puede progresar en forma continua o en picos de actividad.

La PC es la forma más frecuente de periodontitis en el adulto y la magnitud de la destrucción tisular es consecuente a la relación que se establece entre los mecanismos de virulencia de los microorganismos periodontopatógenos de la placa subgingival y el sistema inmune del hospedador que no logra controlar eficientemente a todos los patógenos (1). Esto ocasiona una inflamación crónica que se expresa en una respuesta sostenida y moderada del huésped, conducentes a la destrucción tisular mediante el reclutamiento leucocitario y la subsecuente liberación de citocinas y quimiocinas (3).

Las citocinas, comprenden un grupo heterogéneo de moléculas de bajo peso molecular que modulan la actividad del sistema inmune. Son



producidas y secretadas por diversos tipos celulares, pertenecientes o no al sistema inmune. Las citocinas median su actividad a través de la interacción con receptores celulares específicos de alta afinidad, expresados por las células diana, entendiéndose como tales, a todas las células sensibles a la acción moduladora ejercida por las citocinas. Esta interacción conduce a la transducción de señales que se traducen, en última instancia, en la expresión de un patrón génico alterado (4).

Las citocinas suelen actuar de **modo autócrino**, uniéndose a receptores expresados en la célula que la secreta, o de **modo parácrino**, uniéndose a receptores expresados en células presentes en su entorno inmediato. En ocasiones, aunque no es lo más frecuente, puede actuar de **modo endócrino**, modulando la actividad de células ubicadas en sitios distantes. Las acciones de las citocinas suelen ser pleiotrópicas y redundantes. El pleiotropismo se refiere a la capacidad que presenta una citocina particular de mediar distintas acciones biológicas actuando sobre diferentes células dianas. La redundancia, implica la capacidad de diversas citocinas de mediar una misma acción biológica. En este sentido suelen observarse **efectos sinérgicos y efectos antagónicos**. Nos referimos a sinergismo cuando el efecto mediado por dos citocinas actuando en forma conjunta, es mayor que la suma de los efectos de las citocinas cuando actúan individualmente. Entendemos por antagonismo la capacidad de una citocina particular de inhibir la acción de una segunda citocina (5).

**Las citocinas** participan en los diferentes mecanismos efectores e inmunorreguladores propios tanto de la inmunidad innata, como de la respuesta inmune adaptativa. No es sencillo definir un criterio de

clasificación abarcativo de las diferentes citocinas. Muchas de ellas manifiestan una notable redundancia respecto de su actividad, participando tanto en la respuesta innata como en la respuesta adaptativa en forma activa. Otras, sólo condicionan desde la inmunidad innata, el rumbo posterior de la respuesta inmune adaptativa.

**Las quimiocinas** componen una superfamilia de citocinas de pequeño peso molecular, que tienen como función primaria dirigir el tránsito leucocitario a los sitios infectados o inflamados. El término quimiocina no es sinónimo de quimioattractante, el cual es más abarcativo. Los quimioattractantes dirigen la migración celular a lo largo de un gradiente de concentración que se incrementa hacia el foco infeccioso o inflamatorio. Incluye a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), tan diversas como el Complemento 3a (C3a)-Complemento 5a (C5a), intermediarios lipídicos de inflamación como el leucotrieno B4 (LTB4), y péptidos formilados producidos por degradación de proteínas bacterianas entre otros. También algunas citocinas son quimioattractantes, como lo es IL8.

Algunas citocinas son sintetizadas en condiciones inflamatorias, en tanto otras, se producen en forma constitutiva y son citocinas con funciones biológicas homeostáticas. Citocinas y quimiocinas juegan un papel importante no sólo en la homeostasis de los tejidos, sino también en la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas; entre ellas la enfermedad periodontal. El curso clínico de la PC varía de una velocidad leve a moderada, pero puede haber periodos de progresión rápida (6). Aunque la presencia de bacterias periodontopatógenas es un prerrequisito,

la progresión de la enfermedad periodontal es dependiente de la respuesta del huésped hacia los patógenos que colonizan las estructuras periodontales. La persistencia de la respuesta inmune debido a perpetuación de los patógenos periodontales rompe los mecanismos homeostáticos y causa la liberación de mediadores tales como las citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ ), proteasas (metaloproteinasas) y prostanoïdes (prostaglandina E2: PGE2) las cuales promueven cambios en los tejidos periodontales y estimulan la reabsorción ósea (7-8).

Sólo unas pocas especies bacterianas se relacionan con la PC, tales como *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) y *Treponema denticola* (9-10). De este consorcio bacteriano, en este trabajo de investigación, determinaremos la presencia de *P.gingivalis* y *A.actinomycetemcomitans*, por ser ambos periodontopatógenos exógenos, es decir que no forman parte de la microbiota comensal de la placa subgingival. La selección también obedece a que ambos microorganismos son predictores del curso clínico de la enfermedad periodontal. En la revisión bibliográfica están asociadas a progresión de la lesión y destrucción tisular (7-10-11-12-13). La PC es una enfermedad infecciosa multicausal, en la cual la producción de daño tisular no puede atribuirse solamente a la acción de los microorganismos, sino además a la activación de células y moléculas del sistema inmune natural y adquirido del hospedador (monocitos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos, fibroblastos y otras células) que en forma conjunta con la acción de estructuras

bacterianas, como los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas (Gram -), estimularían la producción de citocinas que median la liberación de metaloproteinasas, responsables de destruir la matriz extracelular y el hueso alveolar (14-15). Por tanto, las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ , pueden ser candidatos idóneos como marcadores pronósticos del daño periodontal. En cambio el aumento de citocinas y moléculas con acción antiinflamatoria tales como IL-4-IL-10-factor de crecimiento  $\alpha$  (TGF $\alpha$ )-IL-1 receptor antagonista (IL-1Ra) y factores inhibidores de metaloproteinasas de matriz (TIMPs), garantizan un periodonto sano (16).

Por lo expuesto, el destino clínico de la periodontitis, está altamente influenciado por la respuesta inmune local del hospedador (17). En este sentido, estudios sugieren que la polarización de la respuesta inmune local por LTCD4 podría determinar la estabilidad o progresión de la lesión (18-19). Esta respuesta inmune polarizada, puede ser caracterizada por dos patrones bien definidos: un fenotipo Th1 o Th2, en los cuales predominan respuestas proinflamatorias celulares o respuestas antiinflamatorias humorales, respectivamente. Estas distintas respuestas, involucran distintos patrones de factores solubles que incluyen quimiocinas y citocinas encargadas de activar y reclutar selectivamente células en el foco infeccioso. La respuesta inmune hacia los periodontopatógenos protege de la infección (20). Sin embargo, tanto la persistencia de los patógenos como una respuesta inmune exacerbada, puede transformar el papel protector de las células inflamatorias en un papel deletéreo hacia los tejidos del huésped, ya que poseen importantes efectos relacionados a la destrucción del tejido periodontal que involucra la estimulación de la

resorción ósea y la inducción de proteinasas (17). Además estos patógenos, poseen la capacidad de evadir o desviar, en distinta forma, la respuesta inmune celular, favoreciendo un determinado tipo de respuesta. De este modo, ciertos factores de virulencia afectan la respuesta inmune, tales como las proteasas de *Porphyromonas gingivalis* o la leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Los factores solubles como quimiocinas y citocinas producidas en respuesta a la colonización participan en la orquestación del tráfico celular hacia el tejido periodontal. **Sin embargo, es insuficiente y a veces contradictoria la información existente sobre la relevancia y cinética de las mismas en el curso de la enfermedad periodontal humana.** Así, algunas citocinas y quimiocinas han sido encontradas en tejidos humanos con enfermedad periodontal, cumpliendo un papel importante en la activación y reclutamiento de células inflamatorias y células inmunes, en el sitio de asiento de estas patologías, encontrándose las mismas en concentraciones menores en zonas sin lesiones, donde cumplen una función biológica de homeostasis. Es menester recordar que las citocinas, como toda hormona, no se almacenan en las células, sino que se producen y liberan en forma inmediata, cuando es necesaria su intervención como mediadores en una acción biológica específica. Es por eso que, al ser este un estudio transversal, no nos permite inferir el momento en que se produjo la liberación de citocinas y quimiocinas, en relación al momento de la toma de la muestra clínica, ni tampoco establecer una relación lineal entre los valores de las determinaciones inmunológicas y la clínica que presentaba el paciente en ese momento. Se

ha determinado que los niveles de proteínas de membrana quimiotácticas: Monocyte chemotactic protein-1 (MPC-1), factor de necrosis tumoral  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleucina-8 (IL-8), regulador de activación T normal expresado y secretado (RANTES), MPI- $\alpha$  e Interferon inducible de la proteína 10 (IP-10), en pacientes con PC varían entre tomas en diferentes tiempos (21-22-23). Los periodontopatógenos son capaces de estimular la producción de quimiocinas y citocinas por diferentes tipos de células inmunes, y este tipo de respuesta estará influenciada por el microorganismo presente y el grado de virulencia del mismo. Dado que la reacción inflamatoria, es clave en el desarrollo de la respuesta inmune protectora o deletérea, es importante identificar el papel de los factores microbianos e inmunológicos que participan en la patogénesis de estas enfermedades.

Los macrófagos presentan diferentes tipos de receptores, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones de patogenicidad (RRP), que, al reconocer a sus ligandos que son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como así también a los receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (RFc), receptores para componentes del complemento (RC) y receptores para citocinas y quimiocinas que gatillan su activación. La activación de estos receptores conduce a la producción de una amplia variedad de citocinas y quimiocinas que median diferentes funciones biológicas.

La IL-1 es prototipo de la citocina proinflamatoria que induce la expresión de una variedad de genes y la síntesis de varias proteínas que

expresan e impactan en la inflamación aguda y crónica. Los monocitos y los macrófagos son los más importantes productores de IL-1.

Existen dos formas bioquímicamente distintas pero estructuralmente relacionadas con IL-1: la IL-1 $\alpha$  que predomina en los queratinocitos y la IL-1 $\beta$  que predomina en los macrófagos. A las citocinas producidas por macrófagos activados podemos agruparlas en distintas categorías de acuerdo a la naturaleza de las funciones que median; siendo de interés en este estudio las citocinas: IL-1 $\beta$  -TN $\alpha$  que median la inducción de una respuesta inflamatoria aguda, local y/o sistémica, y la quimiocina IL-8, que induce el reclutamiento de leucocitos en el tejido lesionado y favorece el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

La IL-1 $\beta$  actúa sobre los osteoblastos induciendo la expresión del factor activador del ligando (NF-KB) o del factor activador de la diferenciación de osteoclastos (RANKL), responsables éstos de la resorción del hueso. La matriz ósea puede ser reabsorbida únicamente por los osteoclastos, por lo que la activación de esta célula es un prerrequisito para la pérdida del hueso alveolar en la PC (24-25-26).

Otros trabajos de investigación disienten con esta teoría y proponen que la pérdida ósea depende de otros mediadores como los metabolitos del ácido araquidónico, IL-3, IL-11, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor de diferenciación de osteoclastos (27-28).

IL1 $\beta$  y TNF  $\alpha$  son inductores potentes de la metaloproteinasa de matriz (MMPs), eicosanoides, oxidasa del óxido nítrico (óxido nítrico

sintetasa inducible: iNOS), etc, involucrados con la destrucción de la matriz extracelular y resorción ósea. Por lo expuesto, estas citocinas estarían estrechamente relacionadas con la PC, enfermedad que lleva a la pérdida del 10% al 15% de la dentición en los adultos y es, a la vez, una de las enfermedades más prevalentes del hueso en el ser humano.

Debemos remarcar que los patógenos periodontales, poseen una alta capacidad de evadir o desviar en distinta forma las respuestas inmune naturales adquiridas, mediante la producción de impedinas, tales como proteasas que clivan al sistema de complemento, hidrolisan inmunoglobulinas (Igs), producen leucotoxinas (LTx), por lo que en caso de ser necesario implementar terapias antimicrobianas, es un factor a tener en cuenta para que la concentración del antimicrobiano cumpla un efecto bactericida, debido a que el sistema inmune no es competente para cumplir dicho papel.

Pese a la existencia de técnicas muy sensibles y específicas, es importante identificar a las bacterias periodontopatógenas asociadas a la PC. Existen técnicas muy sensibles y específicas, tales como la técnica de biología molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacciones serológicas que permiten el diagnóstico temprano. No obstante, las técnicas convencionales de cultivo, aislamiento y tipificación se mantienen como las pruebas de oro "gold standard", porque a partir de un microorganismo aislado en cultivo puro, no sólo se lo puede identificar, sino también realizar pruebas de sensibilidad *in-vitro* a los antimicrobianos, lo que posibilita implementar una terapia más adecuada.



## OBJETIVOS

### Objetivos Generales:

- Caracterizar la respuesta inmune innata en pacientes con distintos grados de periodontitis crónica (PC), en correlación con las bacterias periodontopatógenas responsables del daño y progresión de la lesión: *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*) y la pérdida del tejido de inserción, mediante diagnóstico por imágenes radiográficas.

### Objetivos Específicos:

- Caracterizar la respuesta inmune innata en pacientes con PC con distintos grados de afección. Se determinaron los factores solubles inducidos (**quimiocinas** y **citocinas**) y la funcionalidad y grados de activación de células de la inmunidad innata (**nitritos** y **arginasa**).
- Determinar la **microbiota periodontopatogénica**. Se tipificaron *P.gingivalis* y *A.actinomycetemcomitans* de las muestras clínicas obtenidas de fluido crevicular gingival (FCG), por **técnicas de biología molecular (PCR) y aleatoriamente por técnicas convencionales (cultivo, aislamiento y tipificación)**.

- Determinar la pérdida de tejido de inserción mediante **diagnóstico por imágenes radiográficas: se realizó el estudio mediante la interpretación radiológica de imágenes digitalizadas de radiografías periapicales** (técnica paralela) y "Bite-Wing" (aleta mordida).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los pacientes que participaron de este estudio fueron los que concurrieron en el Ciclo Lectivo 2007-2008 a la Cátedra de Periodoncia "C" de la Facultad de Odontología - UNC. En el año 2007 se examinaron periodontalmente 205 pacientes de los cuales, a 10 de ellos se los incluyó en el proyecto con el diagnóstico de PC. En el año 2008 se examinaron periodontalmente 243 pacientes de los cuales a 13 de ellos se le diagnosticó PC y se incluyeron al proyecto. Los pacientes seleccionados en ambos ciclos lectivos, respondían a los criterios de inclusión estipulados en el proyecto de investigación. Así se constituyó el Grupo Problema compuesto por 23 pacientes con PC (n=23). Se seleccionaron además, 4 pacientes sistémica y periodontalmente sanos, los que conformaron el Grupo Sanos (n=4). Los pacientes de ambos grupos, fueron notificados de su inclusión en este proyecto de investigación y debieron dar su consentimiento por escrito, debiendo completar una ficha ad-hoc aprobada por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencia Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los criterios de inclusión y exclusión de pacientes en este proyecto de investigación se establecen en el cuadro 1.

**Cuadro 1**

<b>Criterios de inclusión</b>	<b>Criterios de exclusión</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hombres y mujeres entre 35 y 65 años.</li> <li>➤ Buen estado de salud general clínicamente detectable.</li> <li>➤ Con P.C.</li> <li>➤ No haber sido tratados por enfermedad periodontal en los 2 últimos años.</li> <li>➤ No tratados con medicación antibiótica ni corticoides en los últimos 6 meses.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pacientes embarazadas.</li> <li>➤ Pacientes medicadas con anti-conceptivos por vía oral.</li> <li>➤ Pacientes con aparatología ortodóncica</li> <li>➤ Pacientes con medicación estrogénica.</li> <li>➤ Pacientes con enfermedades sistémicas: enfermedades cardíacas, diabetes, etc.</li> </ul>

## **DESARROLLO DE LAS ACTIVIDADES**

Las diferentes determinaciones propuestas, se realizaron en 4 (cuatro) etapas, a partir de las muestras biológicas recolectadas durante los períodos lectivos 2007 y 2008 en la Cátedra de Periodoncia "C" de la Facultad de Odontología - UNC.

## I- DESCRIPCION GENERAL DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS EN CADA ETAPA

### ● **Primera etapa: de diagnóstico clínico.**

En esta etapa se realizó:

- a. Examen periodontal de los pacientes, siguiendo el protocolo estipulado en el proyecto de investigación. Con los datos obtenidos se confeccionó la ficha periodontal.
- b. Tomas radiográficas de los sitios con periodontitis al grupo problema mediante técnica paralela (periapicales) y al grupo sanos mediante técnica "Bite-Wing" (aleta mordida).

**Con los datos obtenidos** (del examen clínico y radiográfico) **se confirmó el diagnóstico de PC.**

### ● **Segunda etapa: toma preservación y procesamiento de las muestras clínicas.**

- a. *Toma de las muestras:* En esta etapa se realizó la recolección de FCG, tejido gingival y sangre periférica para realizar, a partir de ellas, las determinaciones microbiológicas e inmunológicas.
- b. *Preservación de las muestras:* las destinadas a determinaciones inmunológicas se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su

utilización, mientras las destinadas a estudios bacteriológicos fueron inmediatamente procesadas.

- c. *Procesamiento de las muestras:* las muestras destinadas a determinaciones inmunológicas de los pacientes del grupo problema y grupo sanos, fueron procesadas en forma conjunta; con las mismas se realizaron las determinaciones inmunológicas (citocinas y quimiocinas, nitritos y arginasa).

● **Tercera etapa: resultados de las determinaciones microbiológicas-inmunológicas, radiológica y su análisis estadístico.**

- a. Se determinaron las frecuencias relativas de los periodontopatógenos colonizadores de las bolsas subgingivales de cada paciente.
- b. Se determinaron los valores de la respuesta inmune innata en FCG y suero.
- c. Se analizaron las imágenes radiológicas digitalizadas, obtenidas del grupo sano y grupo problema en correlación a la resorción ósea

Este es un estudio transversal, observacional-analítico de pacientes con PC, según criterio de la "Internacional Workshop" de 1999 (29).

Para el **análisis estadístico** se usaron los siguientes parámetros:

Para comparar las frecuencias relativas de **perfiles bacterianos** de *P.gingivalis* y *A.actinomycescomitans* entre pacientes con PC (grupo problema) y sanos, se usó la prueba no paramétrica de "Mann-Whitney" (chi cuadrado / Prueba exacta de Fisher), fijando un valor  $p < 0.05$  para significación estadística. La **profundidad de la bolsa** (PB) en sitios muestreados se estableció mediante la Media en mm (percentil 25, 50 y 75) con un  $p < 0.05$  para significación estadística. **El sangrado** al sondaje se estableció en frecuencias relativas (porcentajes positivos) fijando un  $p < 0.001$  para significación estadística. El **nivel de inserción clínica** (NIC) en sitios muestreados se estableció mediante la Media en mm (percentil 25, 50 y 75) con un  $p < 0.05$  para significación estadística. Para comparar **valores de IL-1 $\beta$  entre grupo problema y sanos** se aplicó la prueba de "Irwin-Fisher", fijando un valor  $p < 0.05$  para significación estadística. Para **correlacionar IL-1 $\beta$  y resorción ósea** entre grupo problema y sanos, se usó el índice de Spearman con 95% de confianza.

## **II- DESCRIPCION ESPECÍFICA DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS EN CADA ETAPA**

### ● **Primera etapa: diagnóstico clínico.**

Se estudiaron un total de 27 (veintisiete) pacientes ( $n=27$ ), de los cuales 23 (veintitrés) eran adultos de entre 35 y 65 años de edad con diagnóstico clínico de PC ( $n=23$ ), en distintos estadios de progresión

clínica. Estos pacientes concurren en forma espontánea a la Cátedra de Periodoncia "C" de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, a efectos de recibir atención periodontal, los que se constituyeron el **Grupo Problema** de este proyecto.

Los 4 (cuatro) pacientes restantes que conformaron el **Grupo Sanos** (n=4) del proyecto estuvo conformado por estudiantes de la Carrera de Odontología - U.N.C. De estos alumnos se comprobó que eran periodontal y sistémicamente sanos, sus edades oscilaban entre los 21 a 25 años, y no poseían antecedentes de enfermedad periodontal previa.

En ambos grupos (problema y sanos) se realizó la anamnesis y el examen periodontal. Para el examen periodontal se usó una sonda tipo Marquis. Se trabajó en seis dientes por paciente, en las caras mesial (M), distal (D), vestibular (V) y palatino (P) o lingual (L) de cada diente. En el examen periodontal se evaluó el Registro de Placa Supragingival (RPS), el Registro de Hemorragia (RH), el Grado de Movilidad Dentaria (GMD), la Profundidad de Sondaje (PS: que es la distancia desde el margen gingival hasta el tope radicular de la bolsa periodontal) y el Nivel de Inserción Clínica (NIC: medido desde el límite amelocementario al fondo de la bolsa). Con los datos recogidos se confeccionó la Historia Clínica Periodontal de cada paciente. Posteriormente siguiendo el protocolo de trabajo, consignado en el proyecto de investigación, se realizaron las tomas radiográficas (Rx periapicales, Técnica de cilindro largo) de los diferentes sectores seleccionados y que respondían a los criterios fundamentales de PC y Bite Wing en pacientes sanos.



La representación de la etapa clínica se expresa en la figura 1 (A-B-C-D-E-F-G).

Finalmente cada paciente firmó su consentimiento informado para participar del proyecto. (ver anexo)

**Figura 1**









**F**



**G**

**Figura 1:** Las imágenes fotográficas corresponden a: clínica compatible a: **A)** grupos sanos. **B)** PC. **C)** y **D)** examen periodontal. **E)** Rx" Bite Wing" en grupo sanos. **F)** y **G)** Rx periapical en grupo problema.

● **Segunda etapa: Toma, preservación y procesamiento de las muestras clínicas.**

En los sitios seleccionados y con una profundidad de sondaje  $\geq 5$  mm, se procedió a la toma de muestras de FCG con conos de papel de filtro estériles N° 40 "Periopapers".

Antes de la recolección del FCG se eliminó la placa supragingival con curetas estériles, sin producir sangrado y se aisló el sector con rollos de algodón, secando luego con aire los elementos dentarios. A cada paciente se le tomaron 6 (seis) muestras de los sitios preseleccionados (con bolsas de profundidad  $\geq a 5$  mm). Se usaron 6 (seis) "Periopapers" por diente, en dos sesiones, de tres conos por vez, los cuales se introdujeron hasta hacer tope en el fondo de la bolsa periodontal, permaneciendo durante 30 segundos. A tres de los seis conos recogidos como muestras biológicas se los colocó en un tubo de Eppendorf que contenía 2 ml de medio de transporte: Viability Medium Göteborg Anaerobically (VMGA III), prerreducido mediante Baño de María durante 10 minutos, para realizar las determinaciones microbiológicas clásicas. Sólo se incluyeron en el tubo las porciones inferiores al punto de sujeción con la pinza usada para introducir los conos en las bolsas, cortando con tijera estéril descartando la porción superior del mismo.

El medio de transporte VMGA III esterilizado y prerreducido a efectos de mantener la viabilidad de las bacterias anaerobias, sin permitir su multiplicación y manteniendo un ambiente prerreducido de oxígeno, el

cual sería deletéreo para las bacterias anaerobias obligadas como la *P.gingivalis* o microaerófilas como *A.actinomycescomitans*.

Las muestras se transportaron de inmediato al Laboratorio de Microbiología y se comenzó el procesamiento de las mismas, antes de las dos horas, para evitar la pérdida de bacterias anaerobias o facultativas. El cultivo, aislamiento y tipificación de *P.gingivalis* y *A.actinomycescomitans* se realizó según las recomendaciones de Slots (44-45), cuyas técnicas fueron previamente estandarizadas en nuestro laboratorio. Para el cultivo y aislamiento de los microorganismos, previo a realizar la siembra, las muestras contenidas en los tubos con VMGA III fueron homogenizadas en vortex, durante 30 segundos.

Para el cultivo de *P.gingivalis*, a partir del material patológico, se realizaron seis diluciones y se sembraron tres placas en Agar Brucella, a las que se les incorporó 50 µg/mL de Gentamicina para inhibir bacterias aerobias y Vancomicina para inhibir bacterias Gram+. Al medio de cultivo se lo suplementó con 5 µg/mL de Hemina, se incorporó vitamina K a una concentración de 1µg/mL y sangre de caballo lacada a una concentración final de 7%. Todos los suplementos, contribuyeron a la expresión del morfotipo de desarrollo de colonias típicas de *P.gingivalis*.: bacilos Gram- anaerobios pigmentados (BGNAP).

Las placas fueron preparadas inmediatamente antes de ser utilizadas para los cultivos. A la primera placa se la sembró con una ansada directa del material patológico, extraído del medio de transporte. A la segunda y tercera se las sembró mediante micropipetas, inoculando 1 µL

de las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ . La siembra se realizó por agotamiento en los cuatro cuadrantes y los medios sembrados se incubaron a 35°C durante siete días, en atmósfera de anaerobiosis, utilizando sobres Anaerogen, (Oxoid, Hampshire, England).

Para el cultivo de *A.actinomycetemcomitans*, las muestras sin diluir (provenientes del medio de transporte VMGA III) se sembraron en agar TSBV (Tripticasa, Soja, Bacitracina, Vancomicina) en los cuatro cuadrantes de la placa y se incubaron en atmósfera de microaerofilia (10% de CO<sub>2</sub>) = Campygen, (Oxoid, Hampshire, England), a 35°C, durante 3 a 5 días.

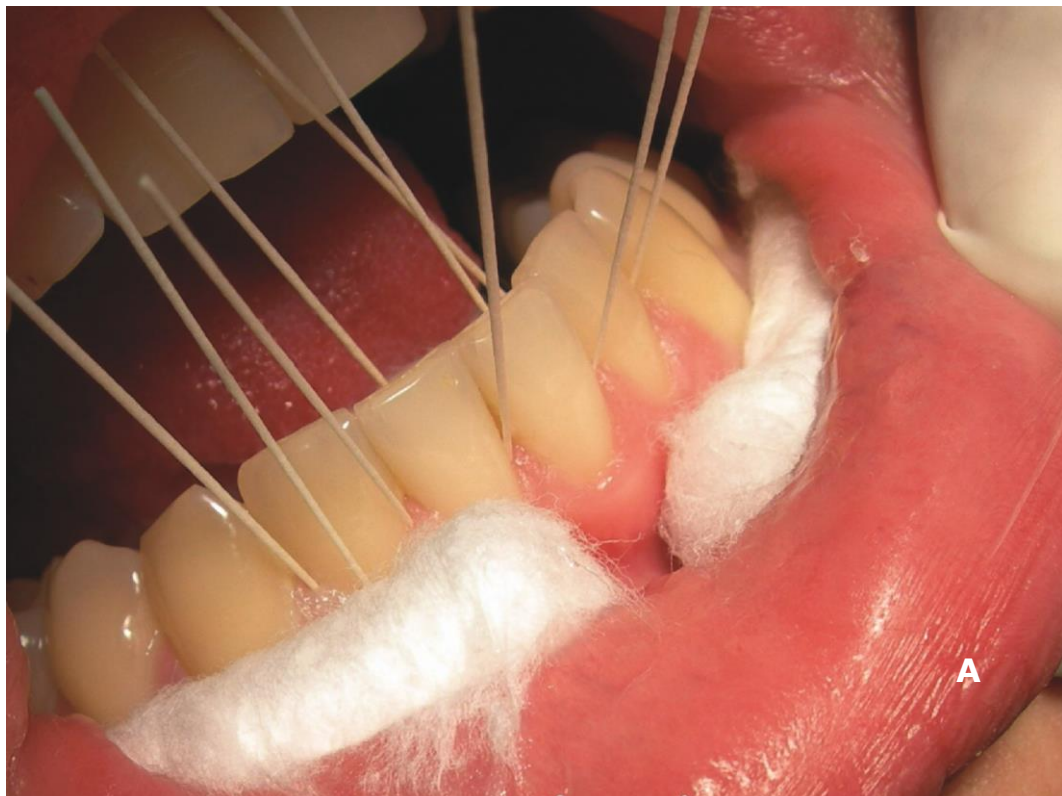
El examen del desarrollo bacteriano, tras el proceso de incubación, se realizó con lupa para diferenciar las colonias y apreciar sus características (determinar los diferentes morfotipos).

Las colonias de *P.gingivalis* se identificaron por su morfología: colonias grandes, levemente convexas (casi planas) de color negro (pigmento melánico). La prueba de luz ultravioleta resultó negativa, en cambio la prueba de CAAM dio positiva. En el subcultivo (cultivo puro) se colocaron discos de potencia especial: Vancomicina (Vc) 5 µg. Colistina (Cs) 10 µg y Kanamicina (Ka) 1000 µg. Las placas sembradas fueron cultivadas en anaerobiosis, a 35°C, durante 7 días y los resultados para *P.gingivalis* fueron: Vc sensible, Cs resistente y Ka resistente. La prueba bioquímica del Indol resultó positiva.

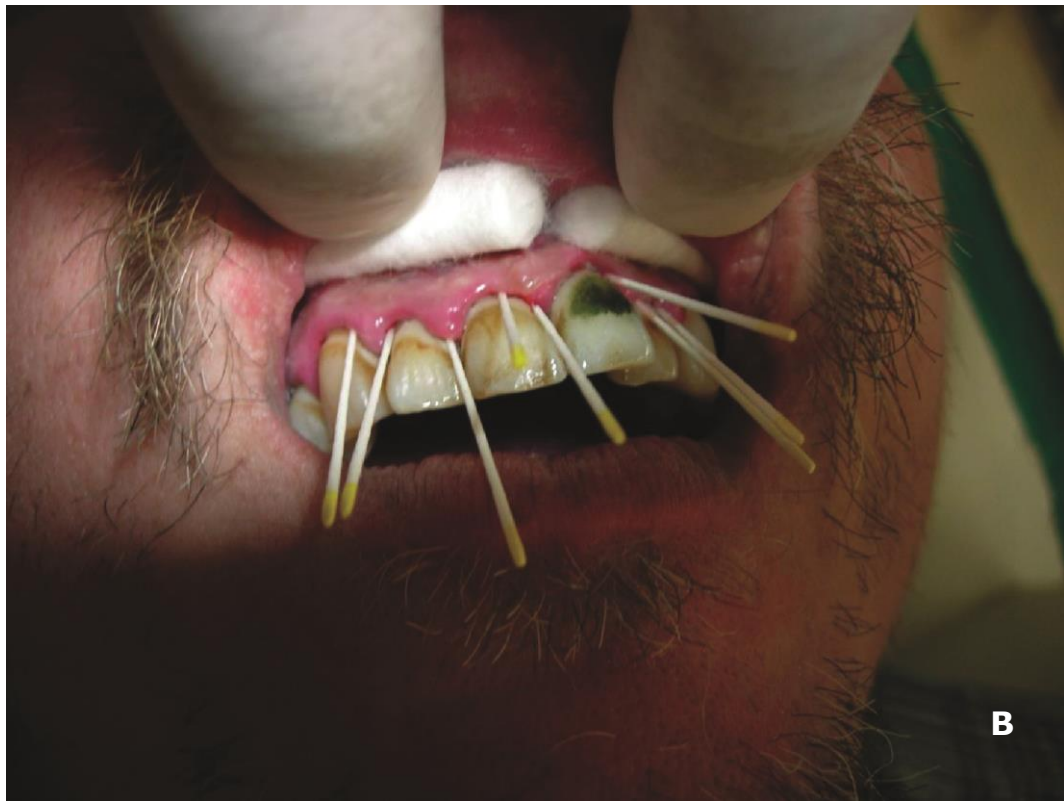
El desarrollo de colonias de *A.actinomycetemcomitans* en tripticasa, soja, bacitracina, vancomicina (TSBV) mostró colonias pequeñas de

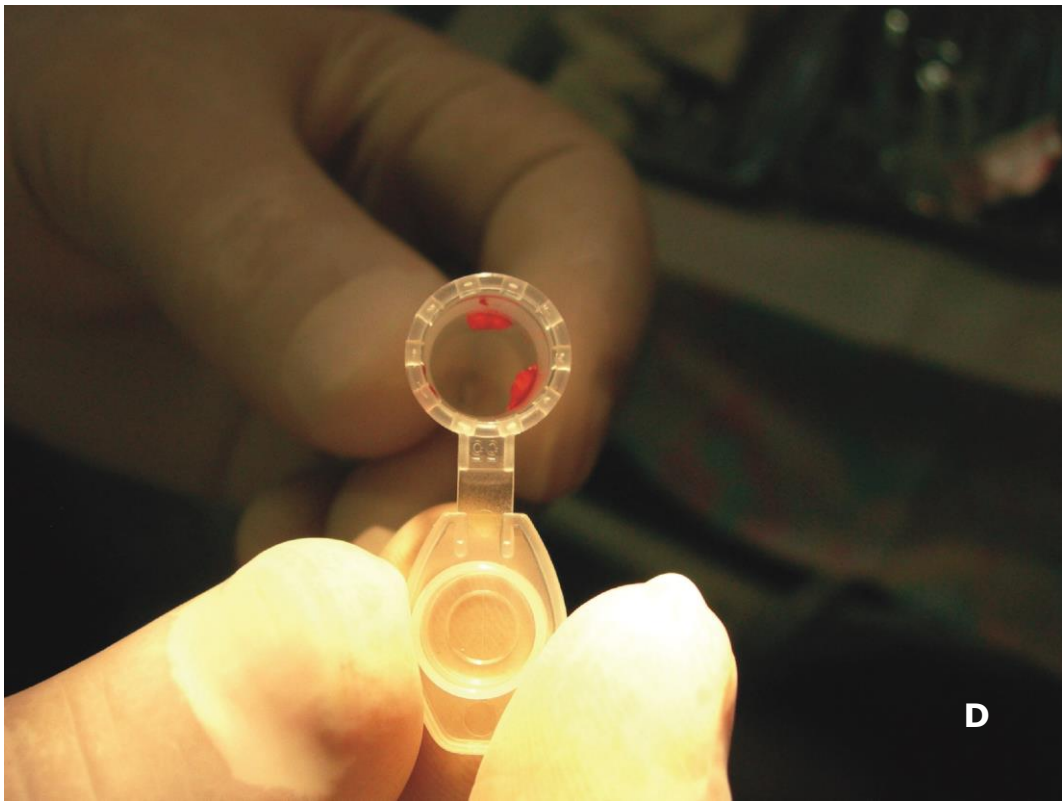
0,5mm a 1 mm de diámetro de forma circular, convexas, traslúcidas, exhibiendo un suave brillo nacarado y de bordes irregulares a los tres días de incubación. Las colonias parecían firmemente adheridas al medio de cultivo, con una estructura interna estrellada. En los subcultivos *A.actinomycetemcomitans* pierde las dos últimas características (adhesión y aspecto estrellado). Del material patológico, en el cultivo primario, el desarrollo típico aparece alrededor del tercer día. Luego de este período de tiempo, el desarrollo de la microbiota acompañante, sobretodo *Streptococcus spp*, pueden inhibir su desarrollo *in Vitro*, siendo en esta investigación, *Eikenella corrodens* la especie con desarrollo prevalente, a partir del quinto día, lo cual oscureció la expresión del desarrollo de *A.actinomycetemcomitans*. Figura 2 :(A-B-C-D-E-F-G-H-I-J-K-L).

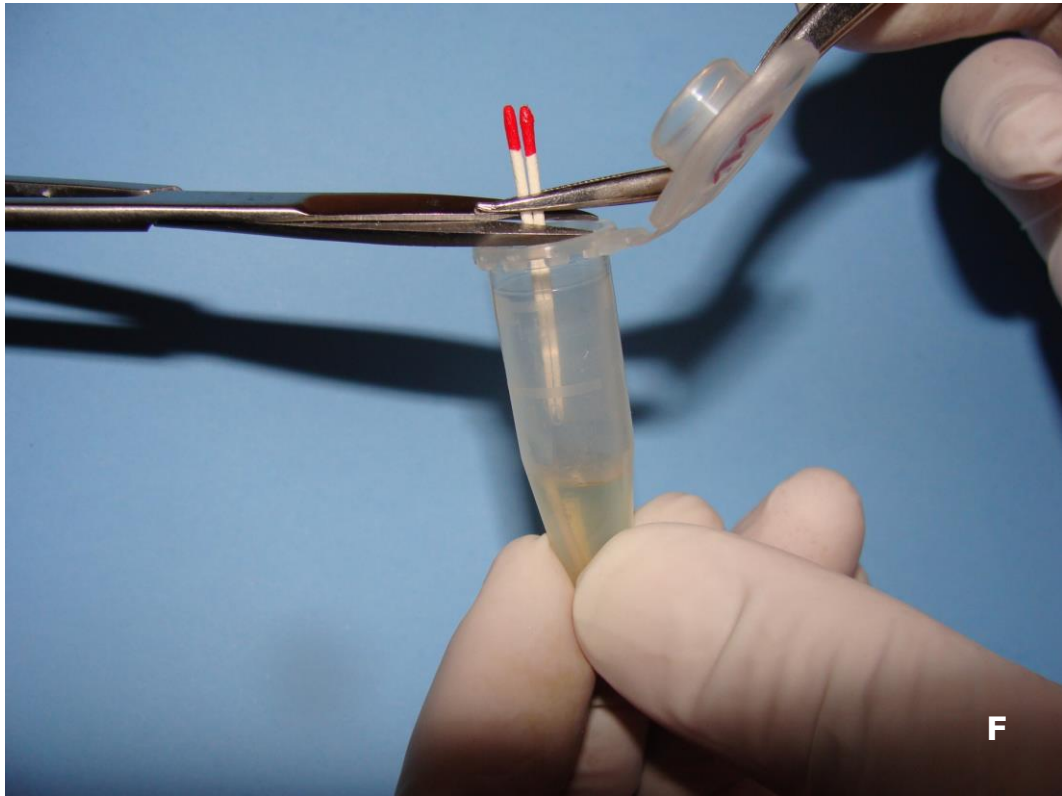
**Figura 2**

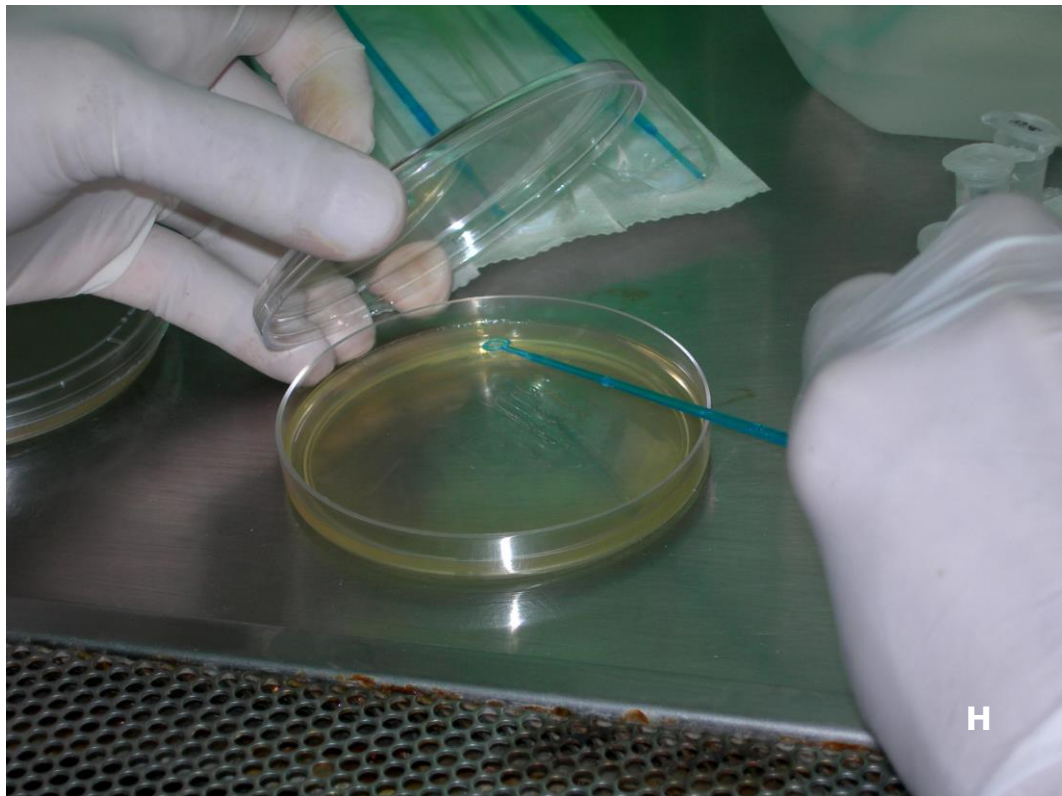




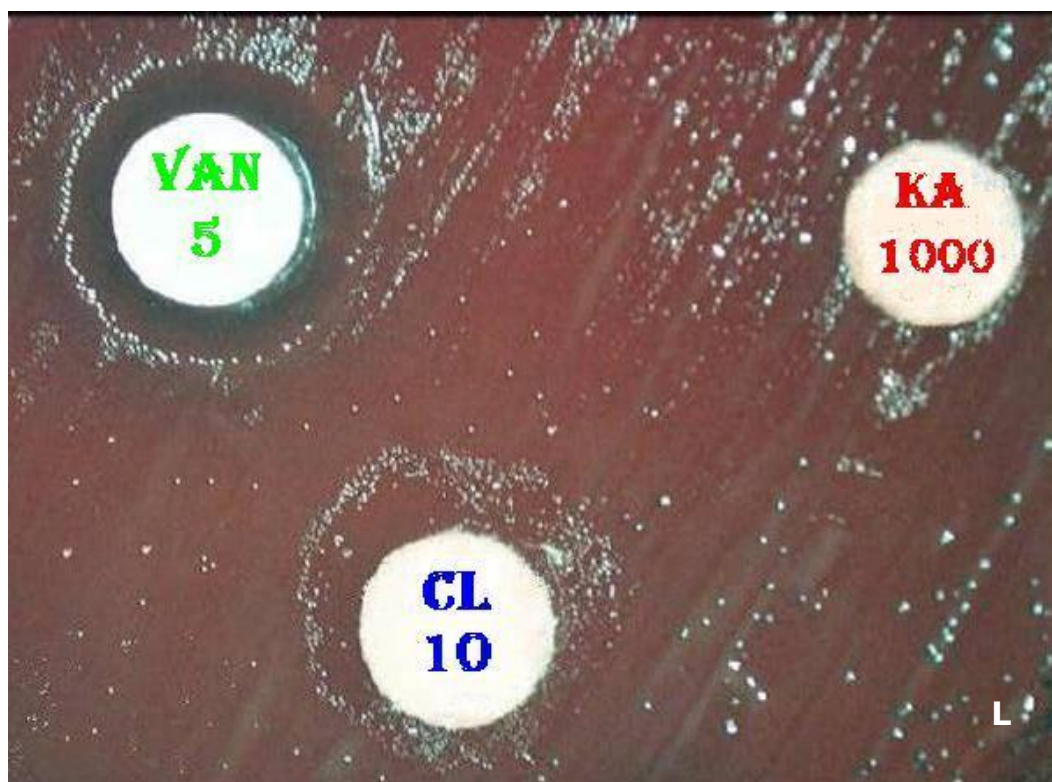












**Figura 2:** Imágenes fotográficas de toma del material clínico: **A)** grupo sano. **B)** PC. **C)** toma de tejido de granulación. **D)** tejido de granulación. **E)** obtención por venopunción de sangre venosa periférica. **F)** corte del cono. **G)** siembra del material patológico en Agar Brucella suplementado. **H)** siembra del material patológico en TSBV. **I)** incubación en microaerofilia de *A.actinomycescomitans*. **J)** incubación en anaerobiosis de *P.gingivalis*. **K)** incubación en estufa. **L)** tipificación con discos cargados con antimicrobianos de potencia especial.

## COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE GASES PARA BACTERIAS ANAEROBIAS Y FACULTATIVAS (cuadro 2)

**Cuadro 2**

Atmósfera de incubación	Oxígeno	CO <sub>2</sub>	Nitrógeno	Hidrógeno
Aeróbicos	21%	< 0,5%	S/D	S/D
Anaeróbicos estrictos	0%	5%	85%	10%
Microaerofilias	5%	10%	85%	S/D

## **DETERMINACIÓN BACTERIOLÓGICA POR TÉCNICA DE BIOLOGÍA MOLECULAR: PCR (cuadro 3)**

- a. Extracción del ADN: a los tubos Eppendorf que contenían los "Periopaper", con los que se obtuvo el FCG de la bolsa periodontal, se les agregó 200  $\mu$ L de agua estéril. Se incubó a 37°C durante 10 minutos y se centrifugó a 14.000 g durante 5 minutos. En el sobrenadante obtenido se verificó la presencia de ADN visualizado con luz ultravioleta en gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio.
- b. Amplificación: confirmada la presencia de ADN en las muestras clínicas, en primer lugar se amplificó la secuencia específica y altamente conservada del gen 16S rRNA de 960 pares de bases (pb) para identificar bacterias Gram-. El gen 16S rRNA está presente en todas las bacterias y está altamente conservado en todas las especies. La detección de esta secuencia por PCR, es un método valioso en este caso, ya que se trata de microorganismos difíciles de cultivar.

Se realizó PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar las especies de *P.gingivalis* y *A.actinomycetemcomitans*. A continuación observamos las secuencias específicas de cada par de oligonucleótidos para cada especie, indicando el tamaño del fragmento reproducido por PCR.

**Cuadro 3**

PATÓGENO BACTERIANO SECUENCIA ESPECÍFICA DE TAMAÑO  
DEL PRODUCTO PRIMERS PARA PCR (5' ---3') AMPLIFICADO en pb

Fragmento Universal GATTAGCGAATGTGCTCATTTACAT 960 pb

CCCGGGAACGTATTCACCG

*P.gingivalis* AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC 404 pb

ATGCCAACTTGACGTTAAAT

*A.actinomycetemcomitans* AGGCAGCTTGCCATACTGCG 575 pb

ACTGTTAGCAACTACCGATGT

La reacción de amplificación se realizó con 10µL de ADN en 40 µL de mezcla de reacción que contiene 5µl de buffer de PCR 10x, 25 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1, 25 U de Taq polimerasa (Promega), 0.2mM de cada desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) de laboratorio Pharmacia. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmers Cetus. El perfil térmico de amplificación para *P.gingivalis* incluyó una desnaturalización inicial de 95°C durante 2 minutos, seguidos por 36 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30s, etapa de complementariedad de primers a 60°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 72°C por 2 minutos.

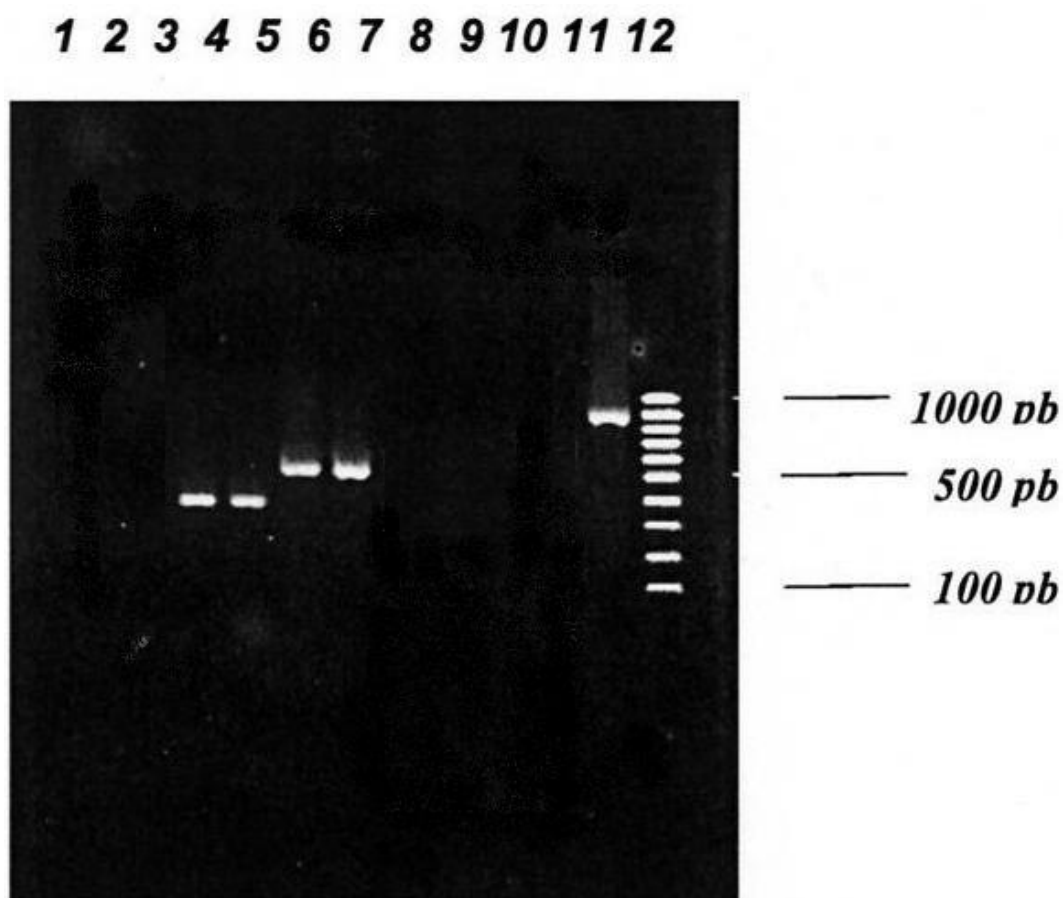
El perfil térmico para *A.actinomycetemcomitans* incluyó, una etapa inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 36 ciclos de 94°C por 30s, 55°C de 1 minuto y 72°C por 2 minutos y una etapa final de 72°C por 10 minutos.



Cada muestra se realizó por duplicado y en cada reacción se agregó un tubo sin ADN, como control negativo de la reacción y un tubo conteniendo ADN de organismos aislados de cultivos de cepas puras, (ATCC) obtenidas del CEMIC (Bs. As.).

Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1.6%. Se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz ultravioleta. Un marcador de tamaño molecular, indica el tamaño del producto de amplificación del gel (Perkin Elmers – 100 pb). (Figura 4).

**Figura 4**



Todas las determinaciones microbiológicas (por cultivo- aislamiento y tipificación mediante técnicas convencionales y por técnica de Biología Molecular), se realizaron con tres de los seis conos obtenidos de cada bolsa periodontal, durante la toma de muestras clínicas de FCG.

## **DETERMINACIONES INMUNOLÓGICAS**

A los tres conos restantes conteniendo FCG (de los seis recogidos como muestras biológicas de las bolsas periodontales) se los colocó en tubos Eppendorf con 40 µL de solución salina suero fetal bovino (PBS), los que se preservaron por congelación a -70°C hasta su utilización, para determinar citocinas y quimiocinas por ELISA (enzimoinmunoanálisis). Asimismo, a cada paciente se le extrajeron 10 mL de sangre venosa, la que se colocó en tubos estériles con heparina para separar el suero, el cual se guardó alicuotado a -70°C hasta el momento de ser utilizado para determinar citocinas y quimiocinas por ELISA.

Después de la recolección de FGG con conos y en la misma sesión, se obtuvo tejido de granulación gingival, por curetaje de las paredes blandas de la bolsa, alisado y raspaje de las superficies radiculares dentarias. El mismo se colocó en un Eppendorf estéril, con 500 µl de trizol, el cual fue marcado con un código de identificación específico y se congelaron a -70°C, para determinar la actividad de las células de la Inmunidad Innata, evaluando la actividad de la enzima iNOS y de la enzima arginasa.

**Determinación de la actividad iNOS:** se introdujeron tres "periopapers" por paciente en un Eppendorf con 450 µl de PBS. Los "Eppendorf" que contenían PBS para determinación de nitritos (actividad clásica o antiinflamatoria determinada por activación de la enzima iNOS) debían encontrarse fríos, en hielo, previo al agregado de los "periopapers".

**Determinación de la actividad arginasa:** se introducen tres "periopapers" por paciente en un Eppendorf con 250 µl de buffer Tritón X-100, con inhibidores de proteasas (cóctel inhibidor proteasa). Los "Eppendorf" para esta determinación debían encontrarse fríos, en hielo, previo al agregado de los "periopapers".

Las muestras recogidas de los diferentes pacientes y preservadas por congelación a -70°C hasta ese momento, se procesaron en forma conjunta (FCG, tejido de granulación y sangre venosa).

#### **A- Determinación de citocinas y quimiocinas por ELISA (enzimo-inmunoanálisis)**

En el FCG y suero se determinó por ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). El kit empleado fue el Bio Source International, Camarillo CA. USA, para determinar los niveles de quimiocinas (IL8) y citocinas (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ). El FCG se eluyó de los "periopapers" por método de centrifugación y se obtuvo el fluido; las determinaciones se realizaron por técnica ELISA de Captura utilizando pares de anticuerpos monoclonales específicos y curvas de calibración, (utilizando testigo de concentración conocida).

## **B- Determinación de la activación de células de la Inmunidad Innata**

Se determinó la activación de la **vía clásica o proinflamatoria** del macrófago, evaluando la actividad de la enzima iNOS en las muestras de FCG obtenidas, determinando los niveles de NO<sub>2</sub> utilizando el reactivo de Griess. La activación de la **vía alternativa o antiinflamatoria** del macrófago se evaluó determinando la actividad de la enzima arginasa, en células presentes en FCG. Para ello, se centrifugó el tejido de granulación gingival, se obtuvo el fluido y el precipitado fue lisado con Tritón X-100 e inhibidores de proteasas, en agua destilada. La determinación se realizó con la técnica de Albina.

## **DETERMINACIONES RADIOLÓGICAS**

Se trabajó e interpretaron los datos obtenidos en las radiografías periapicales mediante el método de la Técnica Paralela o de Cilindro Largo; las mismas tuvieron como finalidad registrar imágenes del parodencio de inserción como: ligamento periodontal, cortical alveolar y medular, como así también evaluar la pérdida ósea de las crestas alveolares, de pacientes con PC. Asimismo se utilizó para el grupo sanos el método radiográfico de "Bite-Wing" (aleta de mordida) para precisar con este registro intrabucal (isométrico-isomorfo) la visualización de la altura de la cresta ósea, lo más real posible como rasgo significativo.

Ambos métodos siguieron los criterios técnicos-radiográficos, tendientes a lograr la optimización respecto a calidad, densidad, contraste,

y definición de las imágenes resultantes, para lograr una correcta y precisa interpretación imagenológica normales y patológicas.

Las radiografías obtenidas por los métodos utilizados, fueron digitalizadas indirectamente por medio de un Scanner HP, calibrado con una regla o medida patrón que permitió ampliar el histograma para definir las zonas de densidades en la escalas de grises, donde al valor 255 de la escala se corresponde a la zona radiopaca que se encuentra en el ángulo de la radiografía, y, tomando el valor cero (0) de la escala, el tono o densidad negro que se corresponde con la radiotransparencia.

Esto nos permitió poder medir los distintos tonos en la escala de grises y así transferirla a la pérdida ósea que procesamos y analizamos mediante un software digitalizador del sistema Image Pro Plus para determinar resorción ósea.

Se realizaron tomas radiográficas del sector anterior (superior e inferior de canino a canino) y primeros molares superiores e inferiores que coincidieron con las zonas donde se extrajeron conos de papel con fluido crevicular y tejido de granulación.

Se evaluaron y analizaron las distintas imágenes de cada una de los métodos radiográficos, utilizando la escala de grises, la aplicación de un pseudocolor con el programa "Surface-Plot" y la reconstrucción tridimensional.

El aspecto radiográfico del grupo sanos mostró índices de densidades normales en ambos primeros molares, tanto el ligamento periodontal, la cortical (lámina dura) y cresta alveolar. Se evidenciaron las

corticales alveolares continuas regulares y lisas, adoptando las crestas alveolares superiores la forma angulada y las inferiores la forma plana. En ambos casos conservan su espesor normal, guardando relación entre la distancia amelocementaria, con el nivel más coronal de la cresta alveolar. En la valoración de la resorción ósea en el grupo problema, se adoptó, como criterio de ponderación, el pseudocolor perteneciente al programa "Surface-Plot" en el que los pseudocolores rojo, anaranjado y amarillo son indicadores de la presencia de sales cálcicas, correspondiente a corticales y crestas alveolares y los pseudocolores verde y azul, indican estructuras desmineralizadas y espacios aéreos que se corresponden a la tronera gingival.

## RESULTADOS

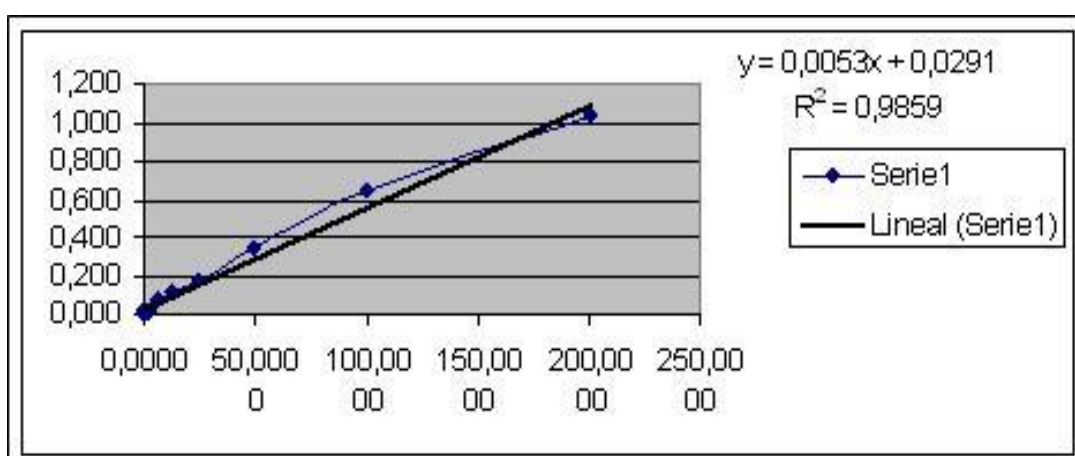
### ● **Tercera etapa: resultados de las determinaciones microbiológicas-inmunológicas, radiológicas y su análisis estadístico**

1. **Resultados microbiológicos:** Tanto por técnica de biología molecular (PCR), como por tipificación convencional (cultivo, aislamiento e identificación) se determinó la presencia de *P.gingivalis* y *A.actinomycetemcomitans* que colonizaron las bolsas periodontales de pacientes con PC. *A.actinomycetemcomitans* se aisló y tipificó en un 13% de los pacientes del grupo problema (n=23) con PC, en tanto *P.gingivalis* se aisló y tipificó en el 72% del grupo problema con PC. En el grupo sanos (n=4) no se aisló ninguno de los dos periodontopatógenos en estudio por ninguna de las técnicas empleadas (0% de ambos microorganismos).
2. **Resultados inmunológicos:** Se determinaron a partir de FCG y suero IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . En FCG se determinó la producción de nitritos y en tejido de granulación de la bolsa periodontal, se determinó arginasa. (cuadro 5).

Cuadro 5

**Determinación de IL 8 en FCG**

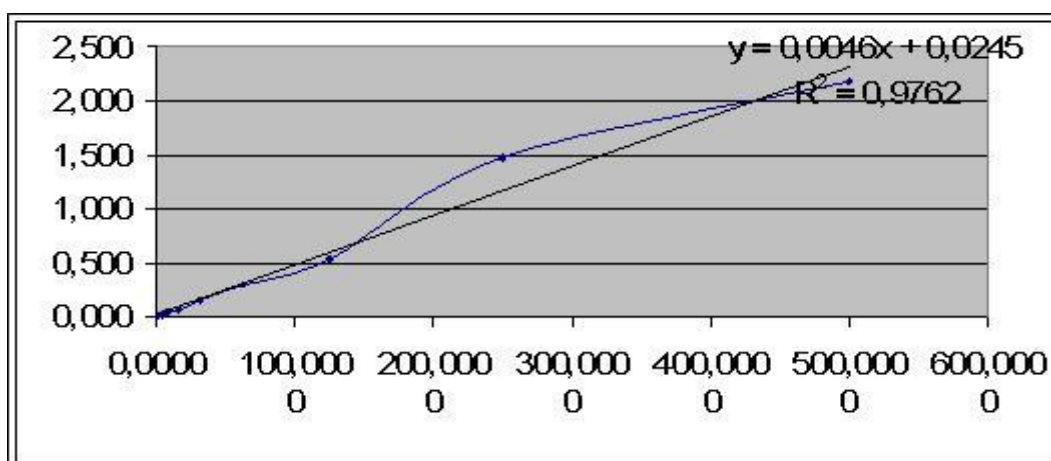
Conc pg/ml	Abs	Abs corregid	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
200,0000	1,011	0,856	202	0,144	-0,012	-7,6604
100,0000	0,618	0,645	203	0,106	-0,050	-14,8302
50,0000	0,374	0,344	204	0,423	0,268	44,9811
25,0000	0,268	0,183	1	0,19	0,035	1,0189
12,5000	0,242	0,112	2	0,072	-0,084	-21,2453
6,2500	0,170	0,074	3	0,292	0,137	20,2642
3,1250	0,152	0,031	4	0,678	0,523	93,0943
1,5620	0,138	0,015	5	0,167	0,012	-3,3208
0,7810	0,145	0,015	6	0,045	-0,111	-26,3396
0,3900	0,143	0,014	7	0,572	0,417	73,0943
			8	0,153	-0,003	-5,9623
			9	0,125	-0,031	-11,2453
			10	0,772	0,617	110,8302
			11	0,634	0,479	84,7925
			12	0,576	0,421	73,8491
			13	1,122	0,967	176,8679
Blanco	0,155		14	0,842	0,687	124,0377
Blanco	0,156		15	0,42	0,265	44,4151
promedio B	0,156		16	0,759	0,604	108,3774
			17	0,272	0,117	16,4906
			18	0,156	0,001	-5,3962
			19	0,046	-0,110	-26,1509
			20	0,386	0,231	38,0000
			21	0,256	0,101	13,4717
			22	1,431	1,276	235,1698
			23	0,675	0,520	92,6283





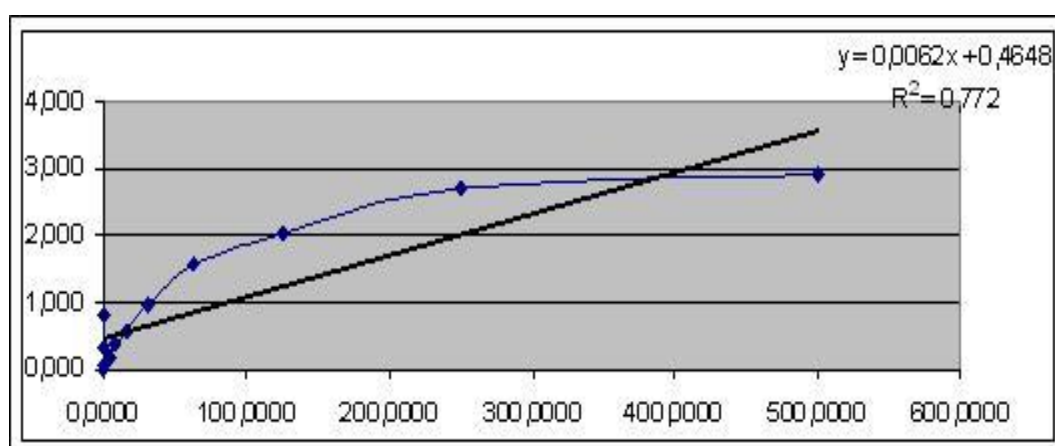
### Determinación de TNF $\alpha$ en FCG

Cc. en pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
500,0000	1,125	0,995	202	0,172	0,042	3,6957
250,0000	0,634	0,504	203	0,148	0,018	-1,5217
125,0000	0,356	0,226	204	0,118	-0,013	-8,0435
62,5000	0,263	0,133	1	0,107	-0,024	-10,4348
31,2500	0,186	0,056	2	0,113	-0,018	-9,1304
15,6200	0,162	0,032	3	0,121	-0,010	-7,3913
7,8100	0,191	0,061	4	0,151	0,021	-0,8696
3,9000	0,097	-0,034	5	0,148	0,018	-1,5217
1,9500	0,133	0,003	6	0,162	0,032	1,5217
0,9700	0,136	0,006	7	0,162	0,032	1,5217
Blanco	0,119		8	0,156	0,026	0,2174
Blanco	0,142		9	0,138	0,008	-3,6957
promedio B	0,131		10	0,125	-0,006	-6,5217
			11	0,116	-0,015	-8,4783
			12	0,104	-0,027	-11,0870
			13	0,091	-0,040	-13,9130
			14	0,104	-0,027	-11,0870
			15	0,105	-0,026	-10,8696
			16	0,108	-0,023	-10,2174
			17	0,123	-0,008	-6,9565
			18	0,133	0,003	-4,7826
			19	0,132	0,002	-5,0000
			20	0,115	-0,016	-8,6957
			21	0,11	-0,021	-9,7826
			22	0,136	0,006	-4,1304
			23	0,098	-0,033	-12,3913



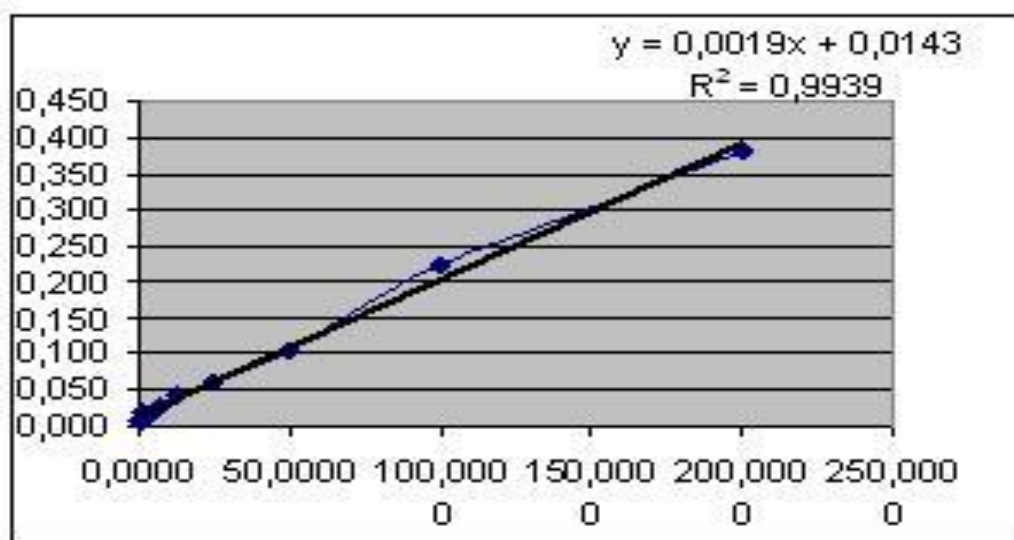
### Determinación de IL-1 $\beta$ en FCG

Cc.en pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
500,0000	1,683	1,629	202	0,052	-0,003	-1,2188
250,0000	0,763	0,709	203	0,056	0,002	0,0313
125,0000	0,431	0,377				
62,5000	0,267	0,213				
31,2500	0,176	0,122	3	0,062	0,008	1,9063
15,6200	0,117	0,063	6	0,082	0,028	8,1563
7,8100	0,081	0,027	7	0,069	0,015	4,0938
3,9000	0,074	0,020	9	0,061	0,067	20,5000
1,9500	0,071	0,017	11	0,072	0,018	5,0313
			12	0,048	-0,007	-2,4688
Blanco	0,057		13	0,048	-0,007	-2,4688
Blanco	0,052		14	0,057	0,003	0,3438
promedio B	0,055		15	0,054	-0,001	-0,5938
			16	0,063	0,009	2,2188
			17	0,05	-0,005	-1,8438
			18	0,052	-0,003	-1,2188
			19	0,055	0,001	-0,2813
			20	0,061	0,007	1,5938
			21	0,049	-0,006	-2,1563
			22	0,052	-0,003	-1,2188
			23	0,048	-0,007	-2,4688



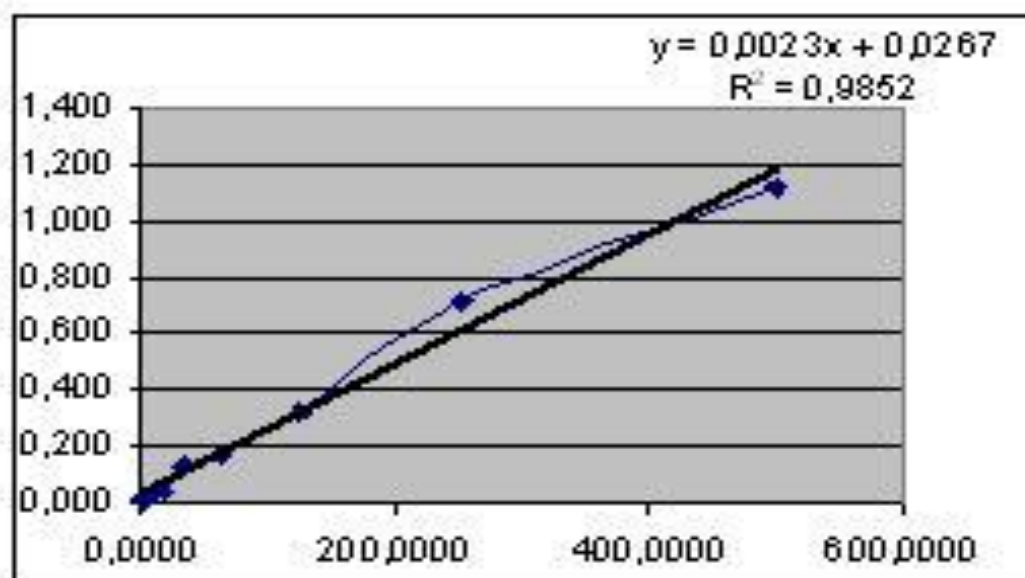
### Determinación de IL-8 en SUERO

Conc pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
200,0000	0,416	0,379	202	0,055	0,018	1,6842
100,0000	0,262	0,225	203	0,067	0,030	8,0000
50,0000	0,143	0,106	3	0,073	0,036	11,1579
25,0000	0,100	0,063	6	0,086	0,049	18,0000
12,5000	0,079	0,042	7	0,076	0,039	12,7368
6,2500	0,065	0,028	9	0,06	0,045	16,1579
3,1250	0,052	0,015	11	0,071	0,034	10,1053
1,5620	0,059	0,022	12	0,085	0,048	17,4737
0,7810	0,046	0,008	13	0,063	0,026	5,8947
0,3900	0,046	0,008	14	0,059	0,022	3,7895
Blanco	0,035		15	0,067	0,030	8,0000
Blanco	0,040		16	0,065	0,028	6,9474
promedio B	0,038		17	0,092	0,055	21,1579
			18	0,073	0,036	11,1579
			19	0,09	0,053	20,1053
			20	0,078	0,041	13,7895
			21	0,123	0,086	37,4737
			22	0,15	0,113	51,6842
			23	0,119	0,082	35,3684



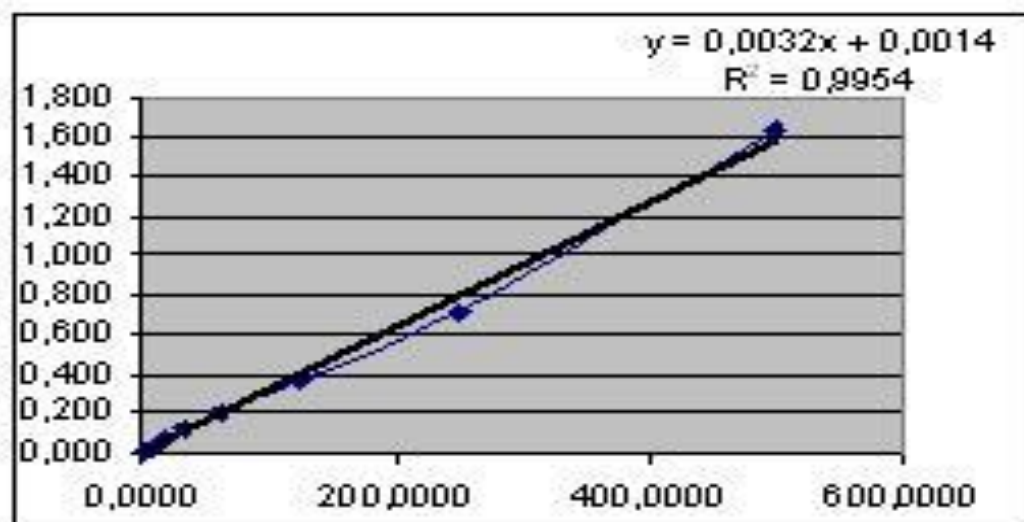
### Determinación de TNF- $\alpha$ en SUERO

Cc.en pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
500,0000	1,160	1,115	202	0,059	0,014	-5,7391
250,0000	0,756	0,711	203	0,051	0,006	-9,2174
125,0000	0,367	0,322	3	0,05	0,005	-9,6522
62,5000	0,215	0,170	6	0,077	0,032	2,0870
31,2500	0,175	0,130	7	0,065	0,020	-3,1304
15,6200	0,089	0,044	9	0,068	0,023	-1,8261
7,8100	0,077	0,032	11	0,088	0,043	6,8696
3,9000	0,064	0,019	12	0,062	0,017	-4,4348
1,9500	0,052	0,007	13	0,068	0,023	-1,8261
0,9700	0,057	0,012	14	0,092	0,047	8,6087
Blanco	0,041		15	0,06	0,015	-5,3043
Blanco	0,050		16	0,074	0,029	0,7826
promedio B	0,046		17	0,053	0,008	-8,3478
			18	0,051	0,006	-9,2174
			19	0,062	0,017	-4,4348
			20	0,134	0,089	26,8696
			21	0,143	0,098	30,7826
			22	0,082	0,037	4,2503
			23	0,048	0,003	-10,5217



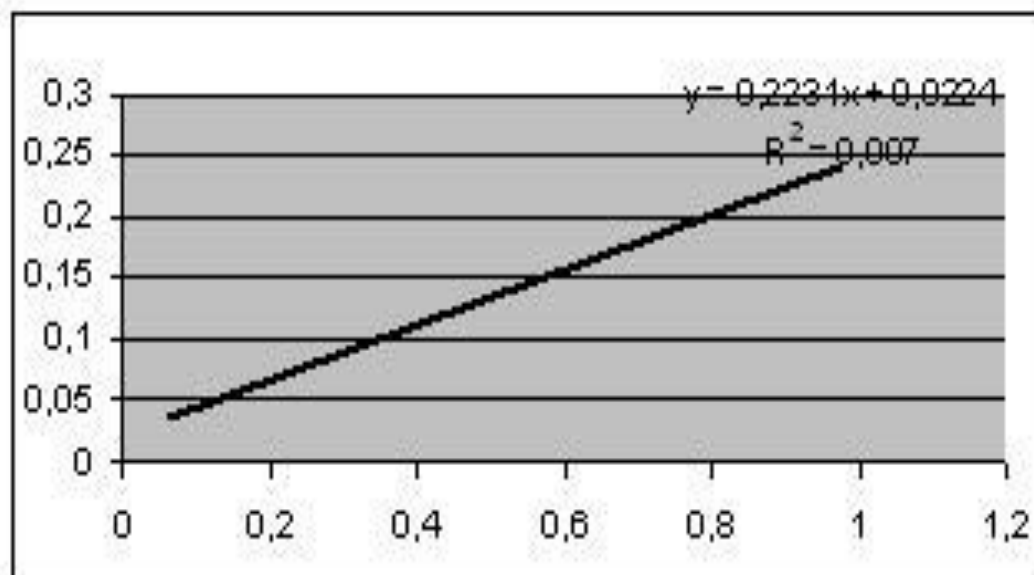
### Determinación de IL-1 $\beta$ en SUERO

Cc.en pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
500.0000	1,683	1,629	202	0,052	-0,003	-1,2188
250.0000	0,763	0,709	203	0,056	0,002	0,0313
125.0000	0,431	0,377				
62.5000	0,267	0,213				
31.2500	0,176	0,122	3	0,062	0,008	1,9063
15.6200	0,117	0,063	6	0,082	0,028	8,1563
7.8100	0,081	0,027	7	0,069	0,015	4,0938
3.9000	0,074	0,020	9	0,061	0,067	20,5000
1.9500	0,071	0,017	11	0,072	0,018	5,0313
			12	0,048	-0,007	-2,4688
Blanco	0,057		13	0,048	-0,007	-2,4688
Blanco	0,052		14	0,057	0,003	0,3438
promedio B	0,055		15	0,054	-0,001	-0,5938
			16	0,063	0,009	2,2188
			17	0,05	-0,005	-1,8438
			18	0,052	-0,003	-1,2188
			19	0,055	0,001	-0,2813
			20	0,061	0,007	1,5938
			21	0,049	-0,006	-2,1563
			22	0,052	-0,003	-1,2188
			23	0,048	-0,007	-2,4688



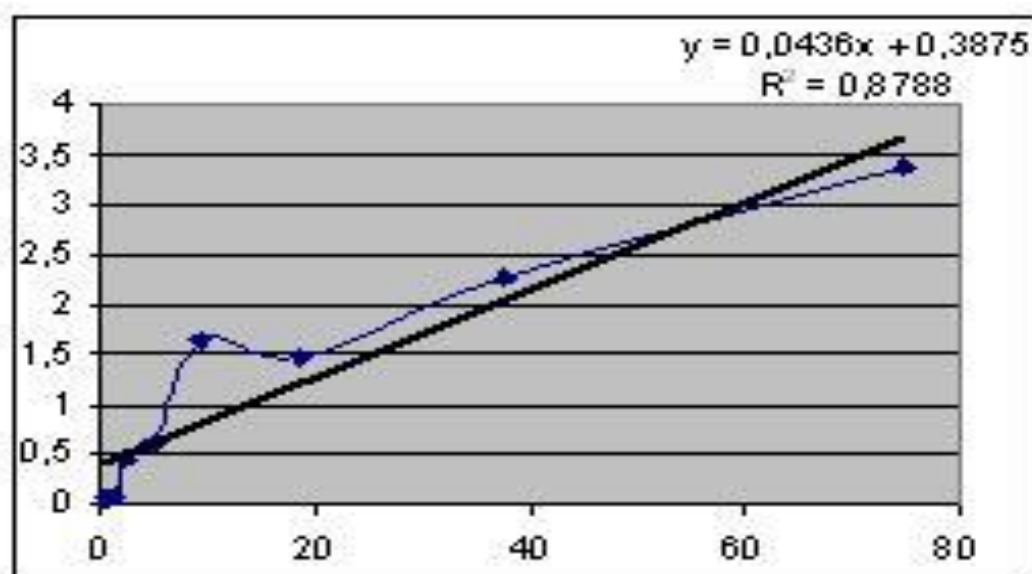
### Determinación de NITRITOS en FCG

FECHA	CURVA ug/ml	CURVA uM	ABSORBANCIA	ABS CORREG	MUESTRAS	ABSORBANCIA corregida	CONCENTRACION uM	Concetracion final uM
16-10-08	531.250	0.977	0.28	0.238	202	0.05	0.1237	24.74226804
	265.600	0.488	0.178	0.136	203	0.053	0.1372	27.431645
	132.800	0.244	0.118	0.076	204	0.052	0.1327	26.53518602
	66.400	0.122	0.096	0.054	1	0.05	0.1237	24.74226804
	33.200	0.061	0.072	0.03	2	0.064	0.1865	37.29269388
					3	0.118	0.4285	85.70147316
					4	0.048	0.1147	22.94935007
	BLANCO		0.042		5	0.045	0.1013	20.25997311
					6	0.095	0.3254	65.08292246
					7	0.079	0.2537	50.73957868
					8	0.059	0.1641	32.81039892
					9	0.077	0.2447	48.94566065
					10	0.087	0.2896	57.91125058
					11	0.175	0.6840	136.7996414
					12	0.073	0.2268	45.36082472
					13	0.06	0.1685	33.70685794
					14	0.054	0.1416	28.32810398
					15	0.052	0.1327	26.53518602
					16	0.085	0.2806	56.11833258
					17	0.052	0.1327	26.53518602
					18	0.049	0.1192	23.84580905
					19	0.069	0.2089	41.77498872
					20	0.049	0.1192	23.84580905
					21	0.053	0.1372	27.431645
					22	0.059	0.1641	32.81039892
					23	0.069	0.2089	41.77498872



### Determinación de ARGINASA en FCG

Conc ug/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs	Abs corregida	Conc ug/ml
75	3,431	3,376	4	1,863	1,808	NO SE PUEDE INFERIR
37,5	2,315	2,26	5	1,523	1,468	CONCENTRACION DE ARGINASA
18,75	1,531	1,476	6	2,013	1,958	PORQUE NO SE SABE DE CUANTO
9,375	1,712	1,657	7	1,142	1,087	MATERIAL SE PARTE SOLO SE PUEDE
4,6875	0,638	0,583	8	1,768	1,713	EXPRESAR COMO
2,34375	0,511	0,456	9	1,566	1,511	ACTIVIDAD DE ARGINASA
1,171875	0,152	0,097	10	2,169	2,114	
0,5859375	0,12	0,065	12	0,503	0,448	
0,29296875	0,102	0,047	13	1,045	0,99	
			14	0,756	0,701	
			15	0,508	0,453	
			16	0,757	0,702	
			17	0,451	0,396	
blanco	0,061		18	0,253	0,198	
blanco	0,049		19	0,402	0,347	
promedio bla	0,055		20	1,956	1,901	
			21	0,341	0,286	
			22	1,127	1,072	
			23	0,421	0,366	



## 1- Resultado de la correlación de las imágenes radiológicas

**digitalizadas y la resorción ósea:** los valores de resorción ósea fueron obtenidos por medición, desde límite amelocementario (LAC), hasta la cresta ósea (cuadro 6 y figura 3).

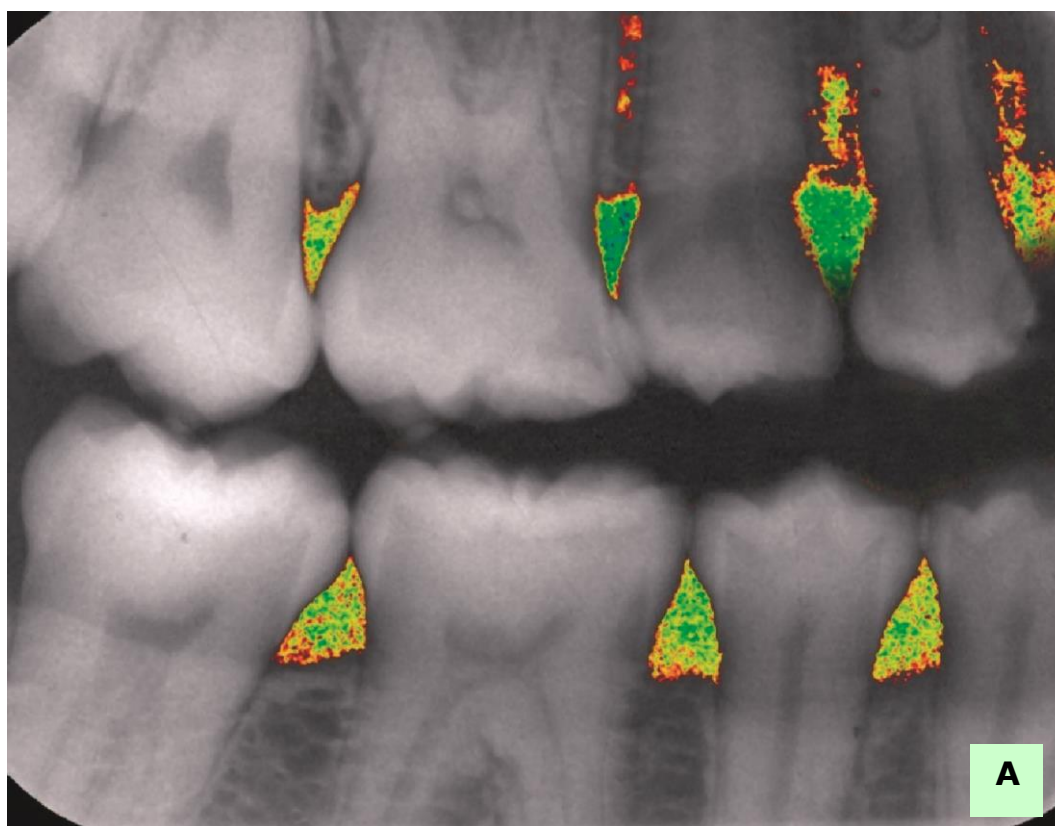
**Cuadro 6: Correlación de pérdida ósea entre grupo problema y grupo sanos**

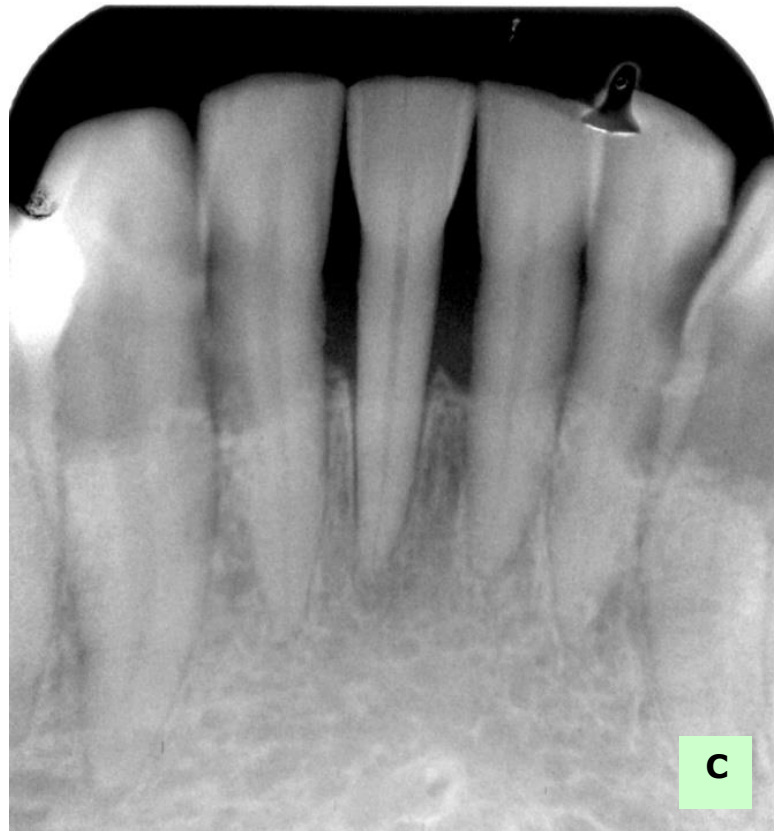
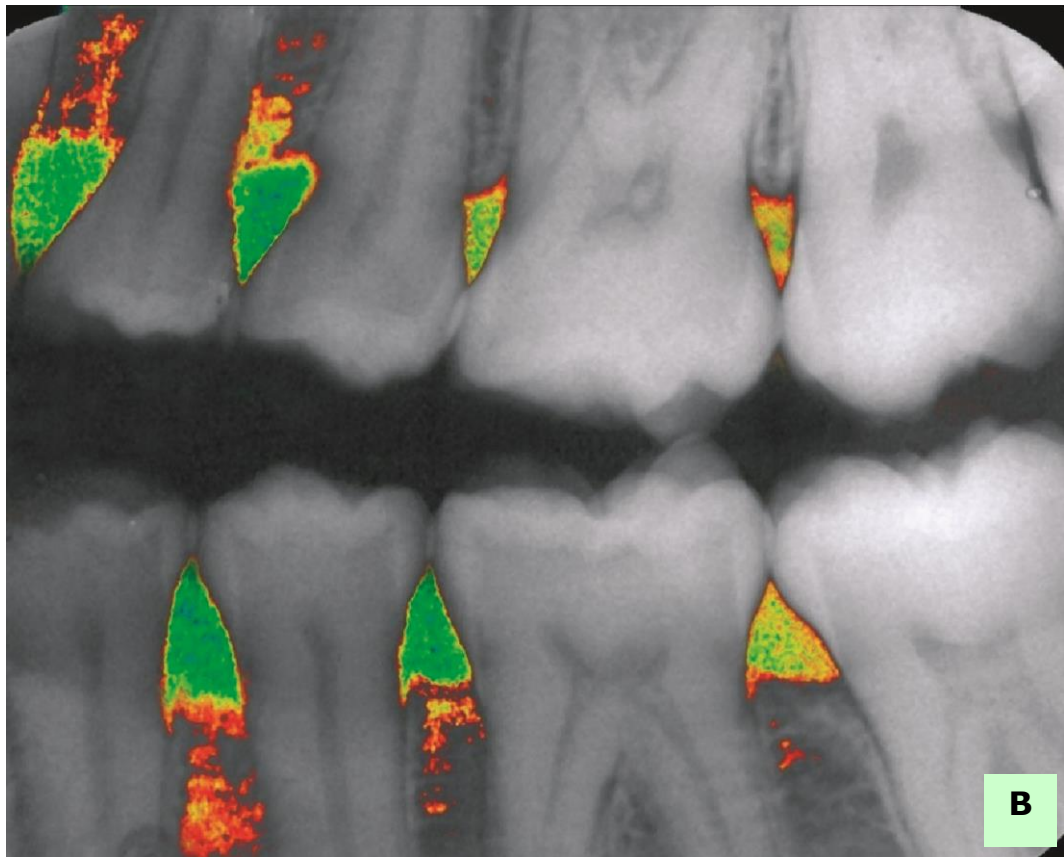
GRUPO SANOS	VALORES PROMEDIO DE PÉRDIDA OSEA EXPRESADO EN mm
201	0
202	0
203	0
204	0
<b>GRUPO PROBLEMA</b>	
1	5,7
2	6,6
3	11,02
4	11,72
5	5,07
6	5,02
7	11,01
8	7,02
9	11,4
10	12,01
11	10,01
12	11,03
13	11,03
14	11,02
15	8,06
16	11,72
17	5,8
18	7,9
19	9,01
20	7,1
21	7,01
22	11,91
23	10,29

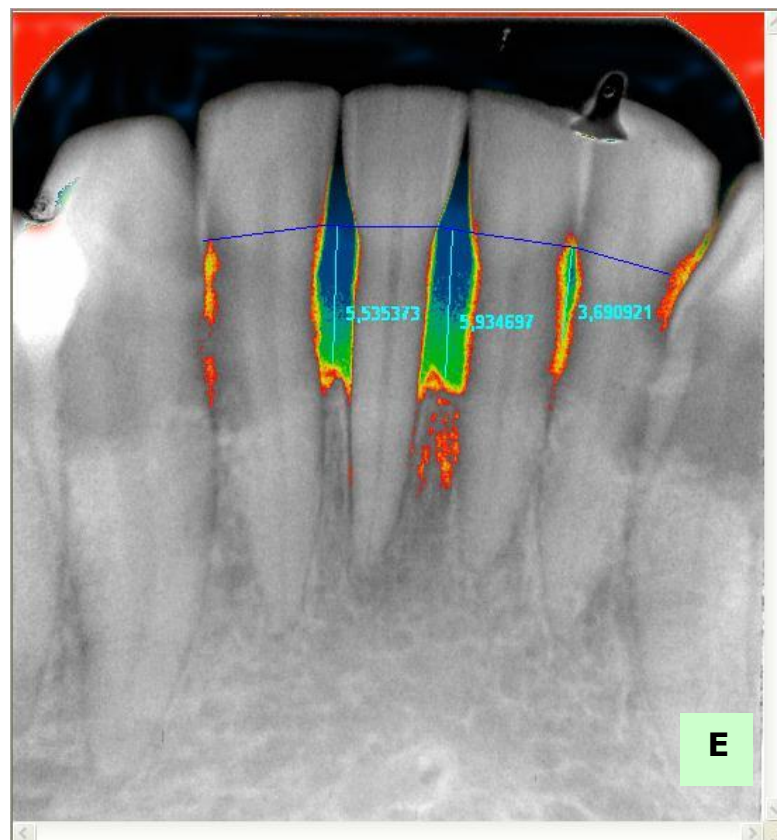
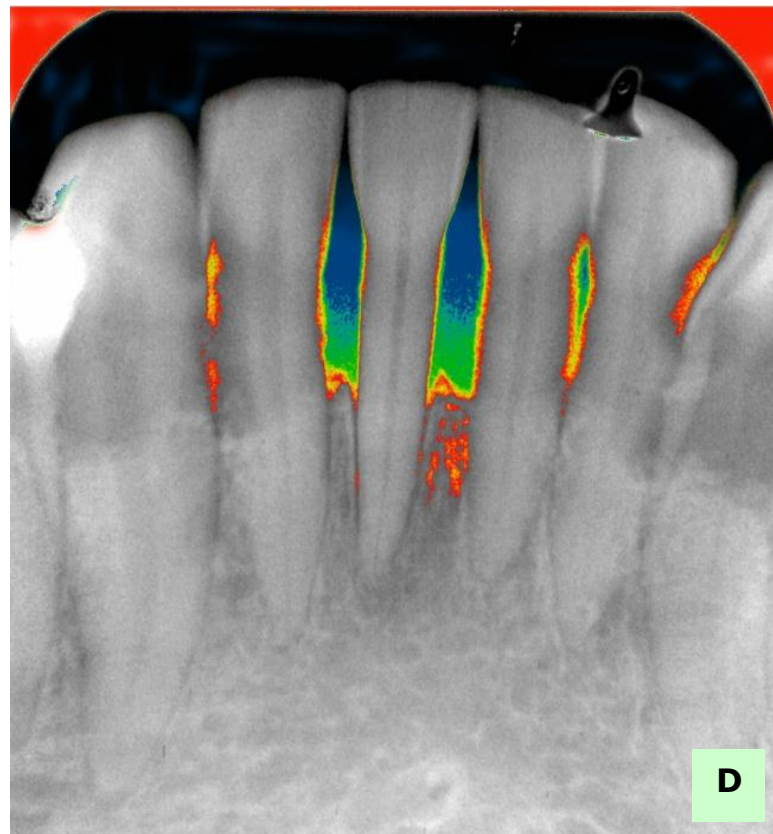


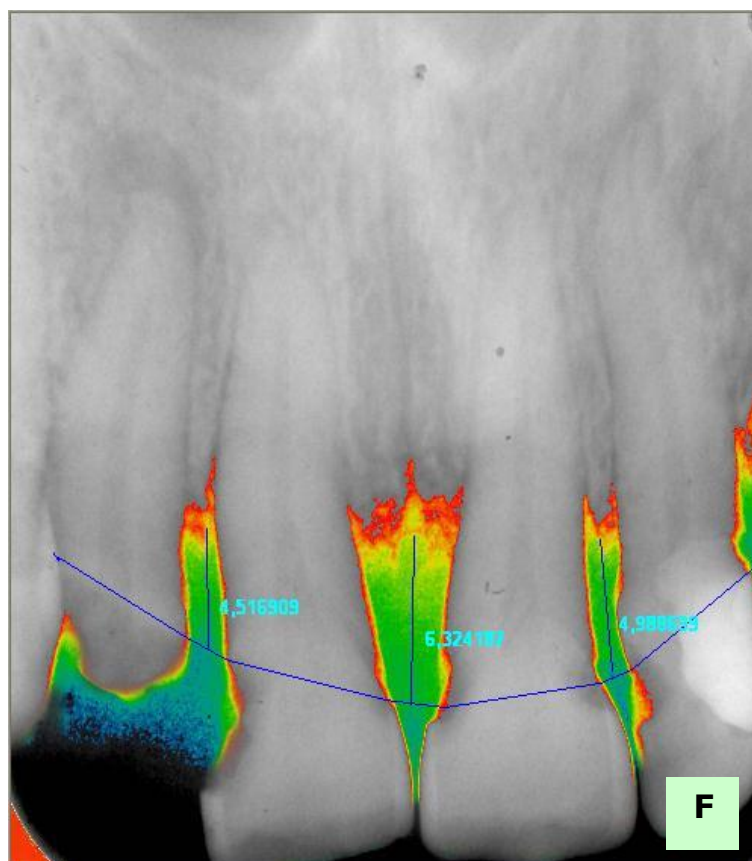
Los pacientes con PC presentaron diferencias significativas en los valores promedio de pérdida ósea expresados en mm ( $p < 0,002$ )

**Figura 3 (A-B-C-D-E-F)**





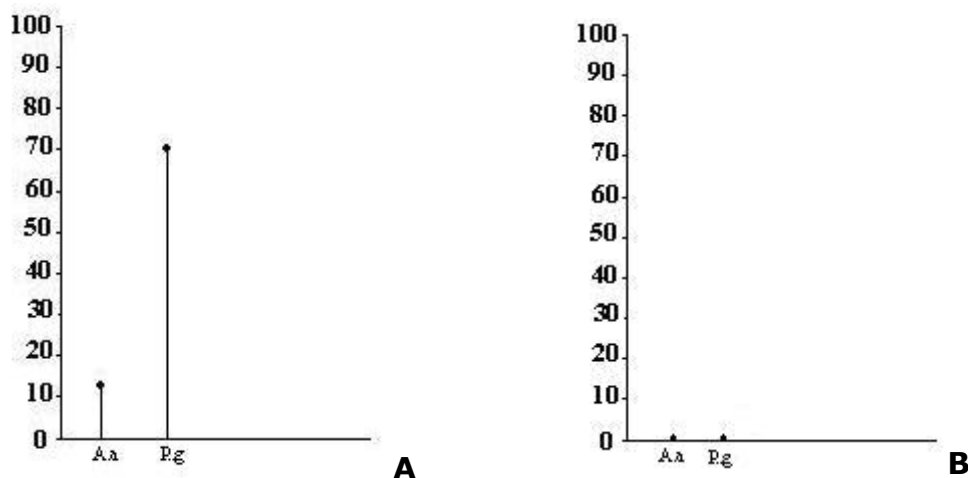




**Figura 3:** **A-B** corresponden a Rx "Bite-Wing" digitalizadas-pseudocolor- grupo sanos. **C-** Rx periapical digitalizada – escala de grises- grupo problema (PC). **D-E** y **F-** Rx periapical digitalizada pseudocolor grupo problema – resorción ósea (PC).

## 2- Análisis estadístico de los resultados microbiológicos, inmunológicos y radiológicos.

- a. **Análisis estadísticos de los resultados microbiológicos:** En relación a los perfiles bacterianos, en pacientes con PC y sanos, se observaron diferencias significativas entre *P.gingivalis* ( $p=0.001$ ) y *A.actinomyetemcomitans* ( $p=0.05$ ), siendo mayor la frecuencia relativa de presencia de *P.gingivalis* (72% de las determinaciones), respecto a *A.actinomyetemcomitans* (13% de los casos). (Figura 4).

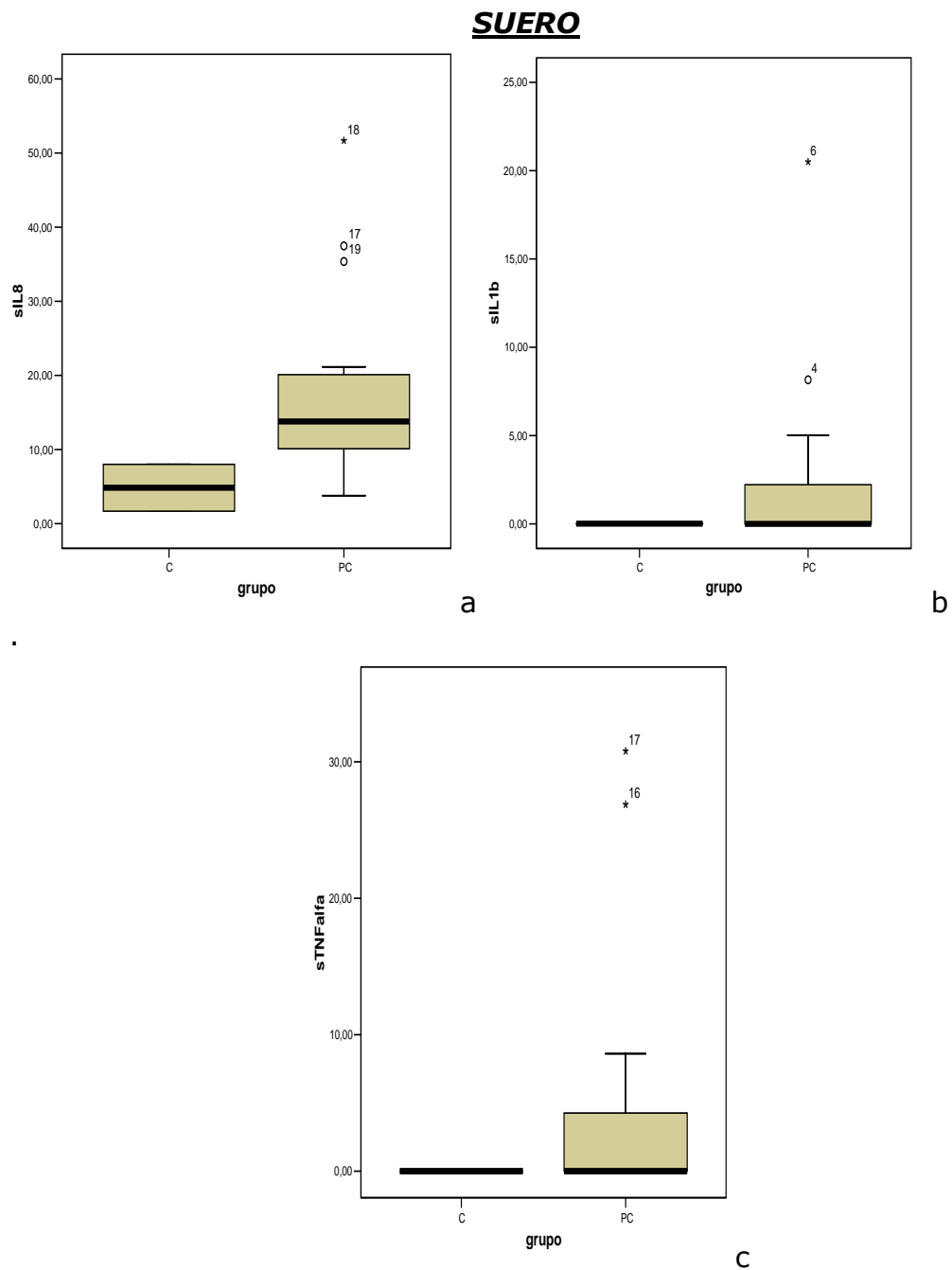
**Figura 4**

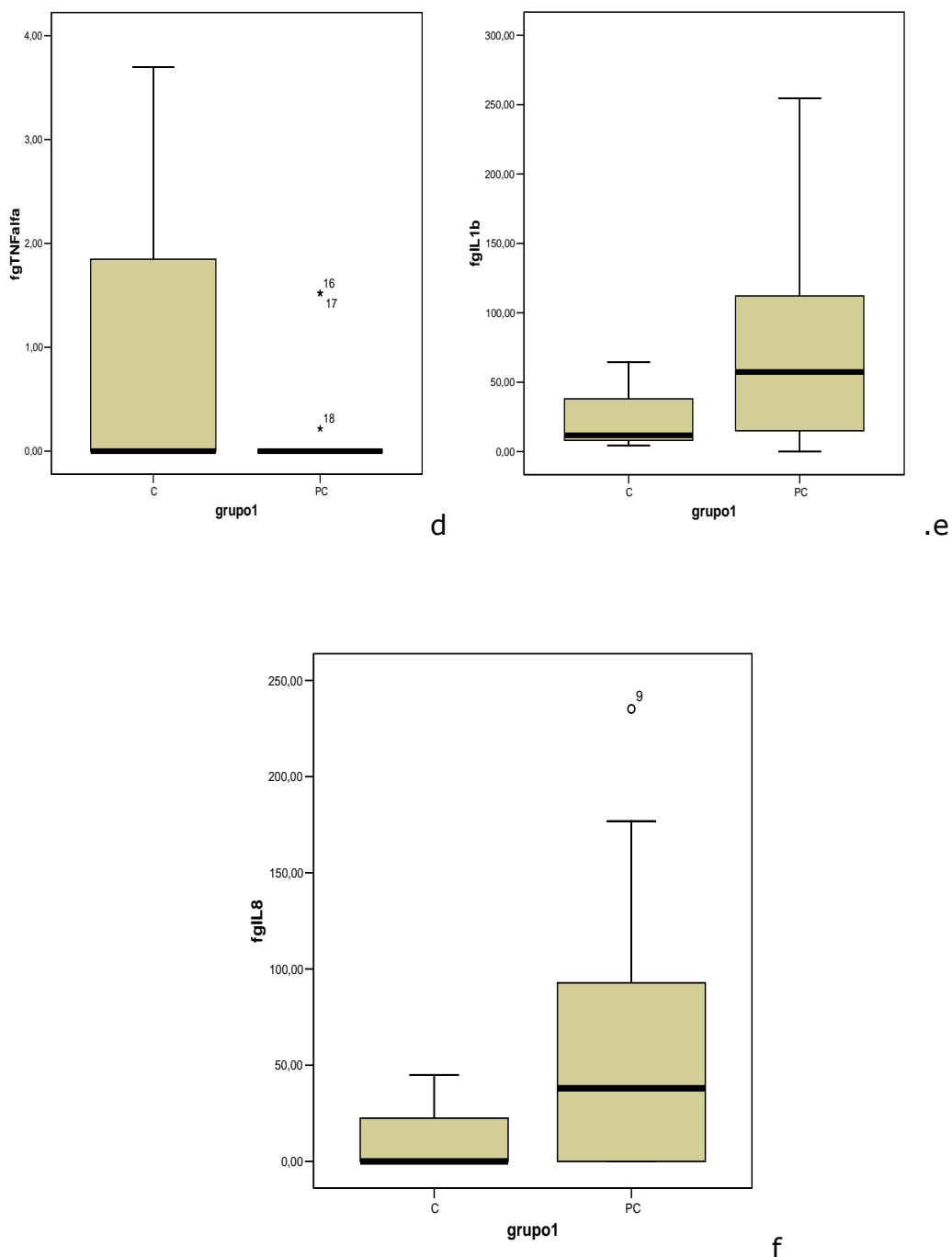
**Figura 4 a:** Porcentaje de periodontopatógenos en PC. **4 b:** Porcentaje de periodontopatógenos en grupo sanos.

**b. Análisis estadísticos de los resultados inmunológicos:**

En las mediciones realizadas en muestras de suero, se observó que los valores de todas las variables mostraron una gran dispersión, observándose en algunos pacientes valores extremos (muy altos) en sustancias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . En FCG, no hubo presencia de valores extremos. En general se observó una distribución asimétrica, con tendencias a valores elevados. Realizando el estudio comparativo, las citocinas y quimiocinas estudiadas mostraron diferencias significativas entre los grupos problema y sanos para IL8 en suero ( $p=0,0265$ ), IL-1 $\beta$  en suero ( $p=0,0112$ ) e IL-1 $\beta$  en FCG ( $p=0,0124$ ). (Figura 5-6 y 7).

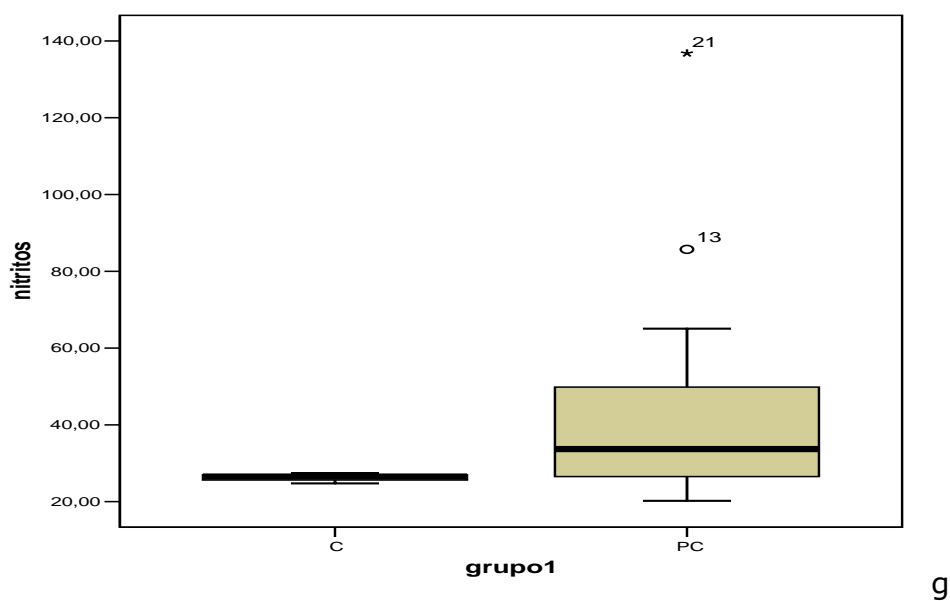
**Figura 5**



**FCG**

**Figura 5:** En las mediciones realizadas en muestras **de suero** se observó que los valores de todas las variables se mostraron una gran dispersión (Figura 7 a, b y c). Observándose en algunos pacientes valores extremos (muy altos) en sustancias como IL1 $\beta$  y TNF  $\alpha$  (Figura 7 b y c).

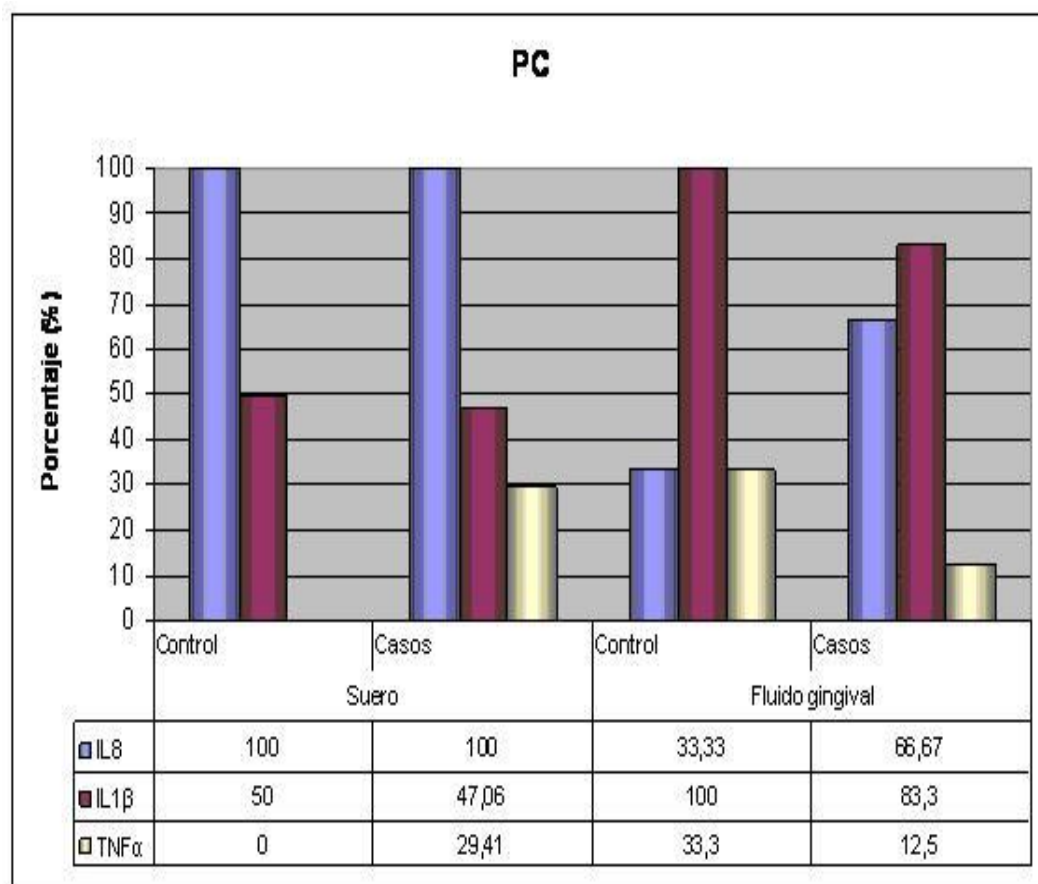
En FCG no hubo presencia de valores extremos. Si, en general se observó una distribución asimétrica, con tendencias a valores elevados (Figura 7 d, e y f).



**Figura 5 g:** La medición tanto de arginasa como de nitritos, se realizó sólo en FCG y la determinación fue positiva en el 100% del grupo problema y sanos, pero arginasa no se pudo cuantificar ya que esta determinación se realiza en relación directa al número de células.



Figura 6



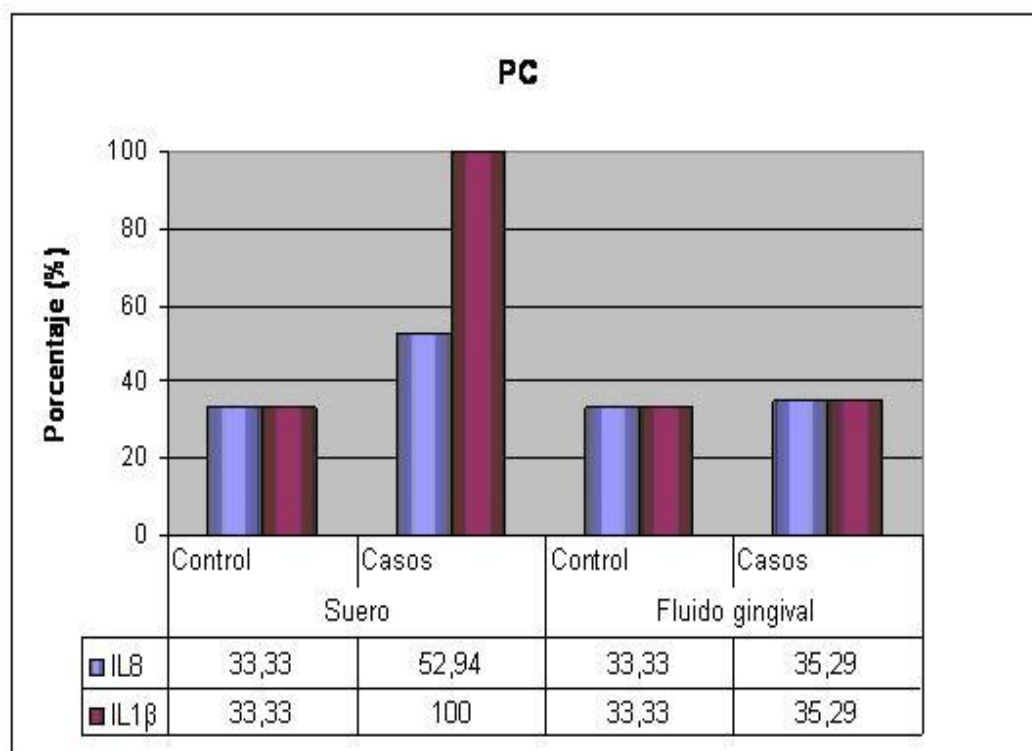
Porcentajes de casos y controles que presentaron valores de medición de cada una de las variables observadas.

Como se observa en la Figura 1, la IL8 se midió en el 100% de los casos y controles en suero, en tanto que en el fluido gingival sólo en el 33,33% de los controles y el 66,67% de los casos.

En relación a la IL1 $\beta$ , esta interleuquina sólo se midió el 50 y 47,06% de los controles y casos, respectivamente en suero, mientras que en fluido gingival fue en todos los controles y un 83,3% en los casos.

El TNF $\alpha$  fue medido, en general, tanto en suero como fluido gingival, en un bajo porcentaje de los pacientes y controles.

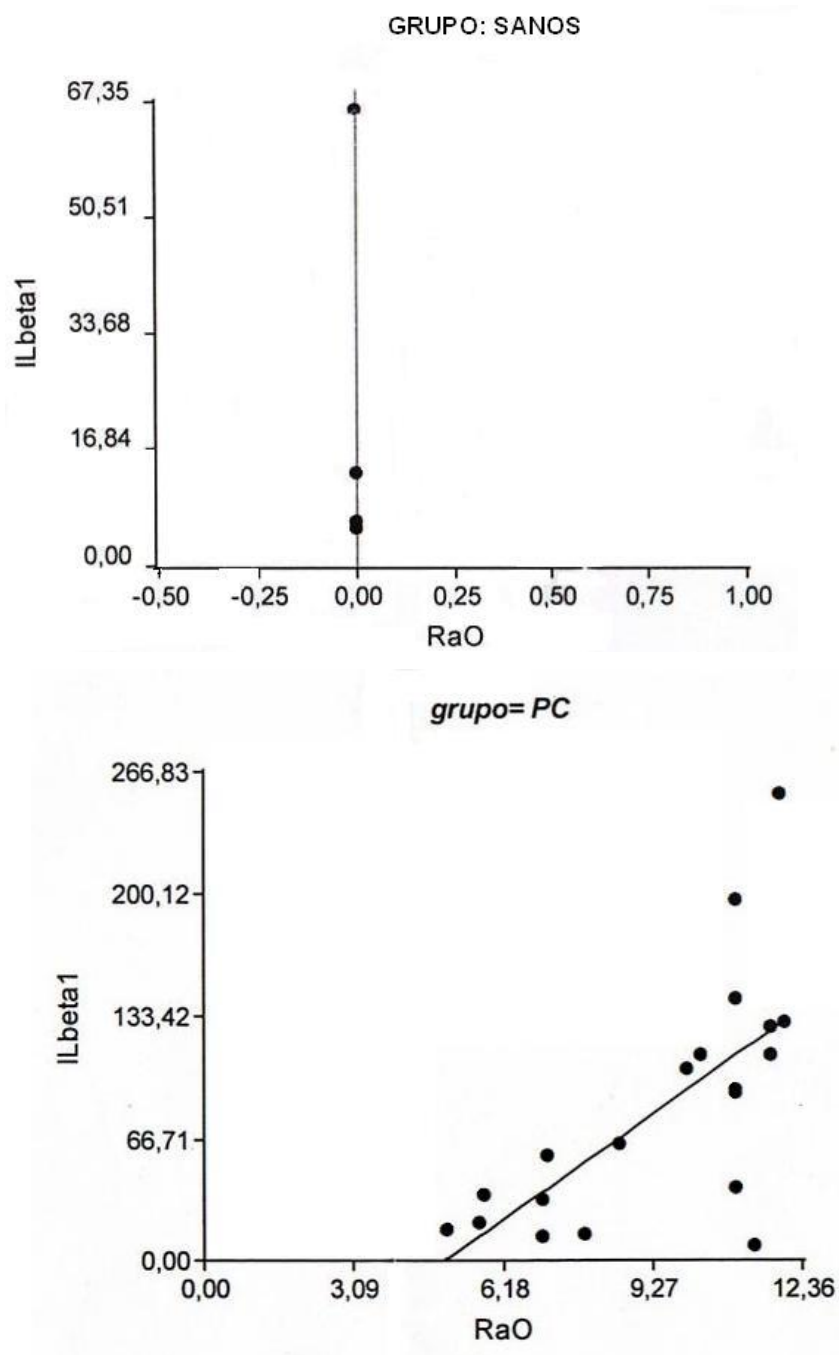
Figura 7



**Figura 7:** Grupo problema y sanos, en donde IL-8 e IL-1 $\beta$  midieron valores mayores que la mediana.

c. **Análisis estadísticos de los resultados de la correlación entre IL-1 $\beta$  y resorción ósea:** (figura 8)

Figura 8



**Figura 8: RESULTADOS:** Los pacientes con PC presentaron diferencias significativas con el grupo sanos en los valores de IL-1 $\beta$  con  $p < 0.05$ , y hubo correlación entre IL-1 $\beta$  y resorción ósea ( $p = 0,02$ ).

- d. **Análisis estadísticos de los resultados de sangrado al sondaje:** Sangrado al sondaje (% positivo) PC = 73%  $p = < 0.001$  y en sanos 25%  $p = < 0.05$ . Prueba chi cuadrado / prueba exacta de Fisher.
- e. **Análisis estadísticos del Nivel de Inserción Clínica (NIC):** El NIC en sitios muestreados se estableció mediante la MEDIA en mm. NIC en PC =  $8.95 \pm 3.15$   $p = < 0.1$ .

## DISCUSIÓN

Entre las características comunes a la PC se destacan: la alteración de color y textura del periodonto de protección, debido a la instalación de un proceso inflamatorio, sangrado al sondaje en el área de la bolsa gingival, pérdida de inserción con formación de bolsa de diferente profundidad y pérdida del hueso alveolar. Las características frecuentes son: hipertrofia o retracción gingival, aumento de la movilidad y desplazamiento dentario, exposición de la porción radicular y exfoliación dentaria.

La PC, generalmente se inicia como gingivitis durante la pubertad, pero las características comunes o frecuentes descritas precedentemente, sólo se advierte luego del cuarto decenio de la vida. La PC generalmente se caracteriza por una lenta progresión, aunque puede experimentar una exacerbación aguda, en cualquier estadio de su ciclo evolutivo. Una característica a destacar de la PC es la predilección por sujetos y sitios. Socransky y col. (30) sustentan "la hipótesis de brotes", dado que en la PC pueden, en forma alternativa, sucederse episodios de remisión y exacerbación. Esto posiblemente estaría relacionado a los **microorganismos** que conforman la placa subgingival, que mediante sus mecanismos directos de agresión, inducirían a respuestas inflamatorias

---

sostenidas en el tiempo, con su consiguiente efecto deletéreo con una disminución "in situ" de las **defensas del hospedador** (31-32-33-34-9). Se considera que en un mismo sujeto un NIC superior a 3 mm y la cantidad de sitios afectados aumenta con la edad, lo que estaría relacionado a los niveles de higiene bucal, frecuencia y cantidad de placa subgingival sostenida en el tiempo, y así que el factor edad es una variable dependiente determinante de PC. Debemos tener siempre presente que el perfil subgingival de las bacteria que conforman el "biofilm" subgingival es simplemente un factor iniciador y sustentador de PC, pero que es la respuesta inmune del huésped, la que ejerce mayor influencia, al momento de valorar la patogenia y progresión de la enfermedad.

La microbiota subgingival esta conformada por un complejo polimicrobiano y mixto, la mayoría anaerobios obligados y facultativos. En este estudio, los mas prevalentes en pacientes con PC. fueron *P.gingivalis* en un 70% (n=16) y *A.actinomycetemcomitans* en un 13% (n=3). Estos periodontopatógenos son denominados exógenos, ya que no forman parte de la microbiota comensal del surco gingival y, por lo que no se encontraron en el grupo sano. Estos resultados discrepan con publicación de Guillarte, C que aisló *P.gingivalis* en un 16,66% de muestras de sacos periodontales de pacientes con PC (35). En este estudio *P.gingivalis* fue la bacteria anaerobia Gram negativa pigmentada (BAGNP), que se recuperó con mayor prevalencia de sacos profundos (con más de 4 mm), lo que coincide con determinaciones microbiológica realizadas por Petit (36).

Los pacientes con PC que concurrieron a la Cátedra de Periodoncia "C" de la Facultad de Odontología de la UNC, fueron diagnosticados según la clasificación de la Asociación Americana de Periodoncia (AAP), Workshop 1999, los que clínicamente se caracterizaron por presentar un grado de inflamación ostensible, alto índice de sangrado, exudado purulento, profundidad de más de 5mm de bolsa periodontal, gran cantidad de tártaro y placa bacteriana (compatible con la expresión clínica) con lo cual coincidimos con Kamma y cols (10).

El segundo periodontopatógeno relacionado a PC fue *A.actinomy-cetemcomitans*, también considerado un periodontopatógeno exógeno, pero a diferencia de *P.gingivalis* que es un bacilo Gram- pigmentado anaeróbico obligado (GNAP), éste es un bacilo Gram- microaerófilo no pigmentado, el cual se aisló en el 13% del grupo con PC (n=3).

La prevalencia de altas concentraciones de *P.gingivalis* asociada a *A.actinomy-cetemcomitans* se asocian con periodos de activación o exacerbación de lesiones en PC (37).

En América Central y América del Sur el componente microbiano de PC se analizó en detalle sólo por Barbosa (38) y Klein MJ (39) en Brasil, Gajardo M (40) y López NJ (41) en Chile y Nogueira TMA (42) en Argentina. El perfil microbiano de los periodontopatógenos determinados en este estudio, con pacientes residentes en la ciudad de Córdoba- República Argentina, que asistieron a la Cátedra de Periodoncia "C" de la Facultad de Odontología-UNC, fue coincidente con los reportes de los investigadores antes mencionados.

En la fisiopatogenia de la PC, el proceso inflamatorio, deletéreo de la estructura de soporte dentario, es gatillado por la presencia de PAMP, específicamente en este caso el PAMP sería el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias periodontopatógenas Gram-. Los LPS bacterianos actúan sobre los receptores de patrones de patogenicidad (RPP) de macrófagos. Específicamente el RPP que se activa, es el receptor tipo "toll like" (TLR), fundamentalmente el TLR tipo 4 que reconoce a los LPS de las bacterias Gram-. Los macrófagos, activados por los periodontopatógenos de la placa subgingival, liberan citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y quimiocina 8, hecho demostrado en este estudio al determinar los valores de estos marcadores, en la respuesta inmunológica del material clínico obtenido de FCG y tejido de granulación de pacientes con PC. Se ha especulado que la presencia de altos niveles de citocinas y quimiocinas en pacientes con PC, en relación a personas sanas, es el resultado del sistema inmune a la exposición crónica al LPS de bacterias Gram negativas comensales, del surco gingival. Evidencias científicas indicaron que las citocinas pueden regular la expresión de Prostaglandina E 2 (PGE2) o Metaloproteinasas de matriz (MM PS) y que a su vez la MMP-1 y MMP-8 (colagenasas, hialuronidasas) incrementaron su expresión, en presencia de niveles elevados de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (43). De esta manera se explicaría la fisiopatogenia de la PC, es decir, como los patógenos periodontales, mediarían la degradación del tejido conectivo periodontal. Las citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y la quimiocina IL-8 estimularían la liberación de PG (especialmente de PGE2), la producción y liberación local de metaloproteinasa de matriz (MMP5). Tanto la PGE2 como MMP5 son



---

efectores inmunológicos responsables de la degradación de la matriz extracelular durante la progresión de la PC. Estas conclusiones fueron coincidentes con los resultados de las determinaciones inmunológicas y microbiológicas en FCG de pacientes con PC, asistentes al servicio odontológico de la Facultad de Odontología de la UNC. En este sentido, también coincidimos con reportes realizados por Socranky (30) en los que *P.gingivalis* y *A.actinomycescomitans*, son los dos periodontopatógenos más fuertemente asociados a bolsas profundas (>5mm), pérdida de adherencia y sangrado al sondaje.

En cuanto a los resultados obtenidos de las determinaciones inmunológicas a partir del FCG de las bolsas periodontales de pacientes con PC, en este estudio, los valores de IL-1 $\beta$  permitieron inferir que hubo correlación entre IL-1 $\beta$  y resorción ósea ( $p=0,02$ ).

En las mediciones realizadas en muestras de **suero**, ambos grupos (grupo enfermos y pacientes sanos) presentaron una alta variabilidad en los perfiles de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y en la interleuquina IL-8 con valores extremos muy altos tanto en IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , los que se asocian al mantenimiento de la homeostasis sistémica. En tanto en **FCG**, no hubo presencia de valores extremos significativos y una distribución asimétrica con tendencia a valores elevados. Realizando estudios comparativos de los valores de las citocinas y quimiocinas estudiadas, se observaron diferencias significativas entre grupo enfermos y sanos. La IL-1 $\beta$ , molécula con gran actividad proinflamatoria y destructiva de los tejidos de soporte dentario, estaría relacionada con la patogénesis de PC y sería un marcador de expresión de la fase activa de la

enfermedad, resultando así la resorción ósea, una característica de la periodontitis. La determinación de estos mediadores inmunológicos podrán ser usados como marcadores de actividad y progresión de la enfermedad. Esto adquiere un valor relativo, cuando las determinaciones se realizan en forma aislada, por cuanto estas citocinas no se almacenan, sino que se producen y liberan al momento de mediar una acción biológica específica.

## CONCLUSIONES

1. Las bacterias periodontopatógenas de la placa subgingival, mediante la liberación de la endotoxina constitutiva del LPS de la membrana externa de bacterias Gram-, inducen la síntesis de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, las cuales incrementaron su concentración en el FCG, produciendo la degradación de la matriz extracelular, en los periodos de brote de PC.
2. La IL-1 $\beta$  a través de esta investigación, demostró ser un excelente marcador de destrucción tisular en PC.
3. **P.gingivalis** y **A.actinomycetemcomitans**, fueron dos periodontopatógenos exógenos, fuertemente asociados a bolsas profundas (>5mm), pérdida de adherencia y sangrado al sondaje.
4. Debido a que los periodontopatógenos involucrados en este estudio, poseen, como un importante mecanismo de virulencia, la producción de impedinas como mecanismo de evasión al sistema inmune natural y adquirido; este conocimiento debiera constituirse en una valiosa herramienta, en caso de ser necesario implementar terapias antimicrobianas, para que la concentración del agente antimicrobiano cumpla un efecto bactericida; ya que el paciente

inmunonormal sistémico, mediante estos mecanismos de virulencia, quedan en situación de inmunodeficiencia "in-situ" (en el sitio de la lesión y colonización bacteriana).

5. La PC presentó condicionantes etiológicos múltiples, por lo que resultó impreciso describir con exactitud la función biológica de células y moléculas, en la entramada red de señales bioquímicas que en forma permanente interactúan para mediar en forma simultáneas, tanto procesos inflamatorios como antiinflamatorios. Es preciso un gran esfuerzo, por parte de la comunidad científica, para conocer con mayor grado de precisión y certeza, cada una de las múltiples variables que convergen, contactan y modifican las interacciones microbianas, inmunológicas, genéticas y ambientales que suceden en la PC, como enfermedad infecciosa multicausal.
6. Debieran tomarse muestras clínicas de los sitios afectados con PC, en diferentes momentos de la progresión clínica de la enfermedad, para poder establecer con mayor grado de certeza una relación lineal entre la liberación de citocinas-quimiocinas y la clínica periodontal que expresará el paciente al momento de la toma de la muestra.
7. Los resultados de las diferentes determinaciones objeto de este estudio, arrojaron valores que permitieron establecer los patrones de respuestas inmunitarias, perfil bacteriano y daño tisular con que la PC se expresó en pobladores de la Ciudad de Córdoba-República

Argentina, concurrentes a un servicio odontológico que brinda a la comunidad la Facultad de Odontología de la UNC. **Tanto la contextualización en la que se realizó el proyecto, como su carácter inter y multidisciplinario le confieren a esta investigación un valor superlativo.**

## RESÚMEN

La periodontitis crónica (PC) es una enfermedad inflamatoria de etiología infecciosa, inmunológicamente reactiva y de alta prevalencia en adultos mayores. Diferentes autores, en distintos lugares del mundo, coinciden que los microorganismos de la placa bacteriana subgingival (biofilm), actúan como inductores de una respuesta inmune y sus efectores inmunológicos estarían directamente involucrados en la instalación, progresión y daño en PC.

Con trabajos de investigación publicados en distintos países o regiones del mundo compartimos los resultados con los que surgieron de esta investigación, aunque es la primera vez que se abordan en forma conjunta a los microorganismos periodontopatógenos exógenos con la respuesta inmune del huésped y su relación con el fenotipo clínico de la enfermedad. Los microorganismos aislados en este estudio, fueron *P.gingivalis* y *A.actinomycescomitans* en proporciones relativas de 72% y 13% respectivamente. En esta investigación ha quedado demostrado que las moléculas pro inflamatorias tales como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 pueden ser usados como marcadores de la inmunidad innata en el diagnóstico de PC. Estas moléculas actúan como mediadores en la respuesta inmune innata coordinando una cascada de efectores inmunológicos que interactuando sinérgicamente, serían los responsables de las alteraciones ostensibles de las funciones de los tejidos periodontales, tales como: pérdida del nivel de inserción clínica, aumento en la profundidad de sondaje e índice de hemorragia, movilidad dentaria, resorción ósea y eventualmente perdida de los elementos dentarios afectados.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la determinación de los diferentes parámetros estudiados, se concluye que la PC no puede atribuirse tan solo a la acción de los microorganismos y a la respuesta inmune del huésped, ya que ambos factores se encuentran estrechamente condicionados a otros como: genéticos, ambientales, socio-culturales-económicos y psicológicos. Por lo expuesto precedentemente amerita un estudio interdisciplinario para abordar con lógica científica a esta patología.

**Palabras claves:** Periodontitis Crónica. Periodontopatógenos exógenos. Parámetros de la Inmunidad Innata. Citocinas. Quimiocinas. Reabsorción ósea.

---

---

## SUMMARY

### ABSTRACT

Chronic Periodontitis is an inflammatory disease of infectious etiology, immunologically reactive and with a high prevalence among adult patients. Several authors, all around the world, agree that the microorganisms of the subgingival plaque (biofilm) act like inducers of an immune response and that their immunological effectors would be directly involved in the appearance, progression and injury in CP. Even though the results of this research are very similar to previous ones which have been published in different countries of the world, it is the first time that exogenous periodontopathogen microorganisms with the host immune response and their relationship with the clinical phenotype of the disease are approached altogether as a whole. The microorganisms isolated in this study were *P.gingivalis* and *A.actinomycetemcomitans* in relative proportions of 72% and 13% respectively. In this research, it has been showed that the pro inflammatory molecules, such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8 can be used as innate immune markers for the diagnosis of CP. These molecules act like mediators of innate immune response coordinating a cascade of immunological effectors which, interacting synergistically, would be responsible for the ostensible deterioration in the functions of the periodontal tissues, such as: loss of clinical attachment level, increase in the depth of probing and index bleeding, tooth mobility, bone resorption and, eventually, loss of affected teeth.

According to the results obtained in the determination of the different parameters studied, it is concluded that CP can not only be conferred to the action of microorganisms and the host immune response, since both factors are closely conditioned by other ones, such as: genetic, environmental, socio-cultural-economic and psychological.

For all the above mentioned, it is deserved an interdisciplinary study in order to approach this pathology with scientific logic.

**Key words:** Chronic Periodontitis. Exogenous Periodontopathogens. Innate Immune parameters. Cytokines. Chemokines. Bone resorption.

## **ANEXOS**



CATEDRA DE PERIODONCIA "C"  
Facultad de Odontología U.N.C.  
Prof. Dra. Nélida Tosco de Losano.



C.Nro: 04  
Fecha: 26 / 04 / 08

### FICHA PERIODONTAL

Apellido y nombre: Maidana Emilse Daniela Edad: 35  
Domicilio: Centro América 1494 Barrio: San Vicente  
Tel: 4550822 Ciudad: Córdoba C.P.: 5014 Ocupación: ama de casa  
Referido por: \_\_\_\_\_ Obra social: no  
Afiliado Nro: \_\_\_\_\_ G° de parentesco: \_\_\_\_\_

MOTIVO DE LA CONSULTA: "me sangran los encías y siento dolor al frío"

ANTECEDENTES DE LA E. ACTUAL: Se observó que anteriormente presentaba sangrado de encías al cepillado.

MEDICACIÓN EFECTUADA: Solución de prince, cepillado dental en seco y luego con pasta dental (Sensodyne ) 3 veces al día, conjuntamente con colutorios de uso tópico (Listenne 

#### ANTECEDENTES SISTÉMICOS:

Alérgico: Si /  No  
Diabético: Si /  No  
Enf. Infecciosa: Si /  No  
Artritis: Si /  No  
E. Renal: Si /  No  
E. Hormonales: Si /  No  
Embarazo: Si /  No  
Anticonceptivos: Si /  No  
E. Cardiovascular: Si /  No  
Hipo / Hipertenso: Si /  No

¿Toma algún medicamento?: no

¿Está bajo tratamiento médico?: Si /  No ¿Porqué? \_\_\_\_\_

Fecha del último examen clínico: \_\_\_\_\_

#### OBSERVACIONES:

#### PLAN DE TRATAMIENTO:

- a) Tentativo: • Motivación y téc de higiene, destartraje supra e infra gingival  
• Alisado radicular y topicación el fluor • Disminución de focos sépticos (eliminación de obturaciones deficientes)  
• Rehabilitación protésica
- b) Definitivo: • Activación de la higiene, destartraje alisado radicular • Topicación con fluor

Ref.																			
	X	O	X	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	X		
	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28			
Ref.																			
	X	O	X	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	O			
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38			

**REFERENCIAS**

X: No existe                      O: Obturado  
 C: Cariado                        PF: Prótesis Fija  
 P: Perdido                        PR: Prótesis Removible  
     I: Implante

**CODIGO:**  
 AZUL: a realizar; AZUL-ROJO: a repetir; ROJO: Efectuado  
 MARGEN GINGIVAL: ROJO, PROF. de SONDAJE: AZUL

PROBLEMAS ESPECIALES: (Hábitos, dieta, etc.)

---



---

DOCUMENTACION COMPLEMENTARIA: (Radiografías, Fotografías, Microfotografías)

---



---



---



---

CATEDRA DE PERIODONCIA C  
 Facultad de Odontología U.N.C.

Año \_\_\_\_\_

Paciente: Maidana Emilse Daniela

MAXILAR SUPERIOR

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	%	R.PI.
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	%	R.H.
																%	S
DIAGNOSTICO																	
																G	
																PL	
																PG	
																PC	

MAXILAR INFERIOR

48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	%	R.PI.
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	%	R.H.
																%	S
DIAGNOSTICO																	
																G	
																PL	
																PG	
																PC	

15



CATEDRA DE PERIODONCIA "C"  
 Facultad de Odontología U.N.C.  
 Prof. Dra. Néilda Tosco de Losano.

C.Nro: \_\_\_\_\_  
 Fecha: 18 / 10 / 07

FICHA PERIODONTAL

Apellido y nombre: ABDUCA GASTON Federico Edad: 35 años  
 Domicilio: Juan B. Justo 2758 Barrio: Alta cordoba  
 Tel: 4321047 Ciudad: Cordoba C.P. 5000 Ocupación: Empleado  
 Referido por: \_\_\_\_\_ Obra social: \_\_\_\_\_  
 Afiliado Nro: \_\_\_\_\_ G° de parentesco: \_\_\_\_\_

MOTIVO DE LA CONSULTA: "Me duelen los dientes,"

ANTECEDENTES DE LA E. ACTUAL: \_\_\_\_\_

MEDICACIÓN EFECTUADA: \_\_\_\_\_

ESTADO ACTUAL: el paciente relata que al cepillarse, siente dolor en los dientes, los encías,

ANTECEDENTES SISTÉMICOS:

Alérgico: Si / <u>No</u>	Artritis: Si / <u>No</u>	Embarazo: Si / <u>No</u>
Diabético: Si / <u>No</u>	E. Renal: Si / <u>No</u>	Anticonceptivos: Si / <u>No</u>
Enf. Infecciosa: Si / <u>No</u>	E. Hormonales: Si / <u>No</u>	E. Cardiovascular: Si / <u>No</u>
		Hipo / Hipertenso: Si / <u>No</u>

¿Toma algún medicamento? NO

¿Está bajo tratamiento médico?: Si / No ¿Porqué? \_\_\_\_\_

Fecha del último examen clínico Agosto de 2007

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

PLAN DE TRATAMIENTO:

a) Tentativo: tecuron de cepillado, solución de Prince, higiene, motivación  
raspado, almidón, pulido

b) Definitivo: Curetaje, aplicación con fluor, dentifric, raspado, almidón,  
pulido

Ref.																		
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Ref.																		
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		

**REFERENCIAS**

X: No existe	O: Obturado
C: Cariado	PF: Prótesis Fija
P: Perdido	PR: Prótesis Removable
	I: Implante

**CODIGO:**  
 AZUL: a realizar; AZUL-ROJO: a repetir; ROJO: Efectuado  
 MARGEN GINGIVAL: ROJO; PROF. de SONDAGE: AZUL.

PROBLEMAS ESPECIALES: (Hábitos, dieta, etc.)

*El paciente trata de mantener una dieta equilibrada, no relato tener hábitos de espavillo, edentul, etc.*

DOCUMENTACION COMPLEMENTARIA: (Radiografías, Fotografías, Microfotografías)

*Se realizó radiografía panorámica;*

CATEDRA DE PERIODONCIA C

Facultad de Odontología U.N.C.

Año 2007

Paciente: ABDUCA GASTON FEDERICO

MAXILAR SUPERIOR

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	70,83 %	R.PI.
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	64,58 %	R.H.
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	16,6 %	S
3/2 2 1	2/1 1/2 1	3/2 2 1	4/3 2 1	3/2 2 1	3/2 2 1	3/1 2 1	4/3 2 1	3/2 2 1	4/3 2 1	3/2 2 1	4/3 2 1	3/2 2 1	2/1 1/2 1	3/2 2 1			M P de S N I C
Y	Y	Y												Y	Y	FURC.	MOVIL.
DIAGNOSTICO																	
																	G PL PG PC

MAXILAR INFERIOR

48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	74,15 %	R.PI.
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	75 %	R.H.
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	15,38 %	S
3/2 3/2 2/1	3/2 4/3 4/3	2/1 4/2 4/3	4/2 3/2 1/1	3/2 3/2 3/1	3/1 4/3 4/3	4/3 4/2 3/1	4/2 3/1 4/2	3/2 2/1 4/3	3/1 2/1 4/3	4/2 2/1 3/2	3/2 2/1 2/1	4/3 3/2 2/1	3/2 2/1 2/1	3/2 2/1 2/1			M P de S N I C
																FURC.	MOVIL.
DIAGNOSTICO																	
																	G PL PG PC



SECRETARIA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, 5 de Mayo de 2007.-


Al Sr. Decano de la  
Fac. de Cs. Médicas UNC  
S/D


Distinguido Sr. Decano:

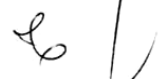
Tenemos el agrado de dirigirnos a Ud., en nuestro carácter de miembros del Comité de Bioética de esta Facultad, para comunicarle lo siguiente:

-Que tras haber estudiado el Proyecto del Tesista: Od. Marcelo Ocampo: "CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES DURANTE LA PERIODONTITIS CRÓNICA: ROL DE QUIMIOQUINAS Y CITOQUINAS", y habiéndose cumplimentado con las indicaciones requeridas por este Comité, se aprueba dicho Proyecto.

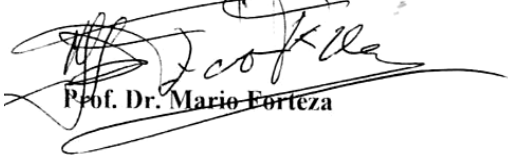
Sin otro particular, saludamos a Ud. muy atentamente.

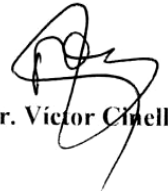
  
Prof. Dr. Pedro L. Saracho Cornet

  
Sra. Prof. Dra. Marta Zapata

  
Prof. Dr. Edgardo F. Secchi

Sra. Lic. Cristina Arrambide de Nores

  
Prof. Dr. Mario Forteza

  
Prof. Dr. Víctor Cielli

  
Prof. Dr. JOSE MARIA WILLINGTON  
DECANO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

(Tres folios indivisibles, numerados).

**Folio 1:** Información para el paciente.

**Título del proyecto** "CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES DURANTE LA PERIODONTITIS CRÓNICA: ROL DE QUIMIOQUINAS Y CITOQUINAS".

**Investigador:** Doctorando Od. Marcelo Ocampo. M.P.4212. D.N.I: 16.740.716.

**Director de Tesis:** Prof. Dr. Luis Augusto Olmedo. Docente Universitario. Profesor Titular Cátedra de Microbiología. Facultad de Odontología. U.N.C.

**Responsables Legales:** Od Marcelo Ocampo. Domicilio Legal: Tucumán 2546. Ciudad de Córdoba Te 4745575. Cel. 156502667. E-mail [marocampo64@yahoo.com.ar](mailto:marocampo64@yahoo.com.ar)  
Prof. Dr. Luis Augusto Olmedo. DNI: 10377.212. Domicilio Legal Av. Ambrosio Olmos 776 1º piso Departamento B. Ciudad de Córdoba. Te. 4683377. Cel. 156148591. E-mail [lolmedo@odo.unc.edu.ar](mailto:lolmedo@odo.unc.edu.ar).

**Lugar de Trabajo:** Cátedra "C" de Periodoncia. Facultad de Odontología de la U.N.C. Domicilio: Av. Haya de la Torre s/n. Pabellón Argentina. Ciudad Universitaria. Te.4333033.

### **RESEÑA DEL PROYECTO:**

**A-Generalidades:** La Periodontitis se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte de los elementos dentarios en grados clínicamente detectables. Esta destrucción incluye la pérdida de inserción clínica con formación de bolsas periodontales y pérdida del hueso alveolar. La Periodontitis Crónica es la forma más frecuente de Periodontitis en el adulto. La magnitud de la destrucción de los tejidos involucrados es consecuente con los factores de virulencia de los microorganismos periodontopatógenos colonizadores de la bolsa y tártaro y su correlación con la respuesta inmune del hospedador. **El destino clínico de esta patología está significativamente influenciada por la respuesta inmune local del hospedador.** En este sentido, estudios previos sugieren que la polarización de la respuesta inmune local por células TCD4, podría determinar la estabilidad o progresión de la lesión. Esta respuesta inmune polarizada puede ser caracterizada por dos factores bien definidos, un fenotipo Th1 (respuesta celular o proinflamatoria) o un fenotipo Th2 ( respuesta humoral o antiinflamatoria). Estas distintas respuestas involucran distintos patrones de factores solubles que incluyen a Citoquinas y Quimioquinas encargadas de activar y reclutar selectivamente células en el sitio de la lesión.

Para realizar este estudio resulta imprescindible contar con un número determinado de personas que voluntariamente aceptan participar en este Proyecto de Investigación.

**B-Acciones a realizar por parte de los donantes voluntarios: 1)** En ayunas de 12 horas se le tomará una única muestra de sangre de 10ml por punción de una vena del antebrazo. Dicha extracción cumplirá con todos los principios éticos vigentes y guías de buenas prácticas clínicas, aunque excepcionalmente se podrían producir hematomas (moretones) o flebitis en la zona de punción venosa.



**Folio 2** (indivisible del Folio 1)

2) Durante el tratamiento de la Periodontitis crónica y como parte del protocolo terapéutico de rutina se realizará alisado de los tejidos dentarios y curetaje del tejido periodontal de la bolsa. Los materiales residuales (tártaro y tejido de granulación) y fluido crevicular (exudado plasmático en la bolsa) en vez de ser descartados, como es de rigor en la práctica clínica, se recuperarán y serán usados para determinaciones bioquímicas (citoquinas y quimioquinas) y bacteriológicas (tipificación de periodontopatógenos y sus mecanismos de virulencia).

**C- Las muestras biológicas serán utilizadas de la siguiente manera:** 1- Una alícuota será procesada inmediatamente en el Laboratorio de Microbiología del Área de Biología Oral de la Facultad de Odontología de la UNC, a efectos de tipificar los periodontopatógenos involucrados en el sitio de infección. 2- Otra alícuota será frizada hasta obtener un número de muestras significativas para su procesamiento a efectos de determinar los parámetros inmunológicos objeto de este estudio de investigación (determinaciones bioquímicas: Citoquinas y Quimioquinas). 3- El resto de la muestra clínica se mantendrá frizado el tiempo necesario para realizar alguna corroboración de resultados mientras dure el proyecto de investigación (3 a 5 años). Finalizado los estudios pertinentes y tras la defensa de la Tesis Doctoral dichas muestras serán desechadas para su tratamiento, transporte, recolección y disposición final para residuos patógenos, según Ley Nacional N° 24051, protocolo con el que cuenta la Facultad de Odontología de la UNC.

**D- Se deja constancia** de que se ha informado debidamente sobre todos los aspectos del proyecto al voluntario y a la totalidad del equipo actuante. Se guardará absoluta confidencialidad sobre la identidad de los voluntarios intervinientes, la información y registros obtenidos en este estudio serán confidenciales, el nombre del donante no figurará en ningún registro ya que el mismo será reemplazado por un código de identificación alfanumérico. Los voluntarios podrán abandonar su participación en el proyecto de investigación en el momento que así lo decidan, sin que ello perjudique en absoluto su tratamiento periodontal, objetivo primario de su concurrencia a la Cátedra "C" de Periodoncia de la Facultad de Odontología.UNC.

**E- El objetivo** de este proyecto es poder aportar datos sobre el rol de Quimioquinas y Citoquinas en el curso clínico de la Periodontitis Crónica.

**F- Lugar de reclutamiento de voluntarios:** pacientes con Periodontitis Crónica que asisten a la Cátedra "C" de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UNC para su tratamiento.

**G- Personas responsables:** Por cualquier acción que hubiere lugar, se considerarán responsables al Odontólogo Marcelo Ocampo y al Prof. Dr. Luis Augusto Olmedo.

Nombre del Investigador  
... M. Ocampo ...  
DNI... 16.740.716 ...

Dr. LUIS A. OLMEDO  
PROFESOR TITULAR  
CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA  
Nombre del Director del Proyecto.  
DNI... 10.377.212 ...

Testigo  
DNI... 13.500.422

**Folio 3.****Documentación legal para consentimiento informado** (indivisible del Folio 1 y 2).

a- Por la presente declaramos que aceptamos cumplir en este proyecto, con todos los principios éticos vigentes y Guías de Buenas Prácticas Clínicas, habiendo informado debidamente de todos los detalles del mismo a los voluntarios intervinientes y al equipo actuante.

Nombre del Investigador

MARCELO OCAÑO  
DNI. 10.377.212

Nombre del Director del Proyecto.

LEONARDO OLIVERO  
DNI. 10.377.212

b- Por la presente declaro aceptar participar como voluntario en el Proyecto de Investigación titulado: "CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES DURANTE LA PERIODONTITIS CRÓNICA: ROL DE QUIMIOQUINAS Y CITOQUINAS." Declaro además haber recibido y entendido la totalidad de la información que al respecto se me ha brindado en tiempo y forma, explicándoseme detalladamente sobre los alcances que mi participación en dicho Proyecto significa, a tenor del Folio 1 y 2. Firmo al pie en señal de conformidad junto con el Tesista investigador, el Director del Proyecto y un testigo ajeno al equipo actuante.

Tesista Investigador

  
.....

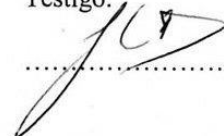
Director del Proyecto

  
.....

Voluntario

  
.....

Testigo.

  
.....

**Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e  
Inmunología**



Ante quién corresponda

Por la presente dejo constancia que el Odontólogo Marcelo Ocampo, DNI:16740716, legajo de la UNC No 34180, docente de la Facultad de Odontología ha realizado en el laboratorio del Área de Inmunología del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC las siguientes determinaciones en sueros y fluido gingival de pacientes:

- Técnica de Elisa Standard para citoquinas IL-1 beta, IL-8 y TNF alfa
- Detección de Nitritos (Reacción de Griess),
- Determinación de la actividad de arginasa (Corraliza IM, J Immunol. Methods, 1994),

Esto forma parte del proyecto de su tesis doctoral "Caracterización de la respuesta inmune en pacientes durante la periodontitis crónica. Rol de quimioquinas y citoquinas".

Dra. Clelia María Riera

Córdoba, 4 de Noviembre de 2008

**Dra. Clelia María Riera**  
Directora del CIBICI  
Departamento de Bioquímica Clínica - Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba




Haya de la Torre y Medina Allende Ciudad Universitaria 5000-Córdoba-ARGENTINA  
Tel: 54-351-434 4973/4/5/6 Fax: 54-351-4333048  
e-mail: crieram@mail.fcq.unc.edu.ar

**Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e  
Inmunología**



Ante quién corresponda:

Por la presente dejo constancia que durante el mes de Octubre del corriente año el Odontólogo Marcelo Ocampo, DNI:16740716, legajo de la UNC No 34180, docente de la Facultad de Odontología ha asistido, durante 24 horas, al Laboratorio del Área de Inmunología del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC para realizar técnicas de inmunología aplicadas al estudio de periodontitis en suero y fluido gingival de pacientes

  
Dra. Clelia María Riera

Córdoba, 4 de Noviembre de 2008

**Dra. Clelia María Riera**  
Directora del CIBICI  
Departamento de Bioquímica Clínica - Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba



Haya de la Torre y Medina Allende Ciudad Universitaria 5000-Córdoba-ARGENTINA  
Tel: 54-351-434 4973/4/5/6 Fax: 54-351-4333048  
e-mail: [criera@mail.fcq.unc.edu.ar](mailto:criera@mail.fcq.unc.edu.ar)




UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Córdoba, 30 de noviembre de 2007

Escuela de Graduados  
Comisión de Doctorado  
Facultad de Odontología  
Universidad Nacional de Córdoba  
S/D

Por la presente, en mi carácter de Profesor Titular de la Cátedra "C" de Periodoncia, de esta Facultad, certifico que el doctorando Od. Marcelo Ocampo asistió a la misma durante el año lectivo 2007, con los siguientes propósitos: perfeccionamiento en diagnóstico y tratamiento de Enfermedades Gingivales y Periodontales, para la toma de muestras de material para llevar a cabo su trabajo de investigación para optar al título máximo, siguiendo el Protocolo de la Cátedra.

Saluda atentamente.

  
Prof. Dra. Carolina Virga  
Dra. MARÍA CAROLINA VIRGA  
PROFESORA TITULAR INTERINA  
CÁTEDRA DE PERIODONCIA "C"



CATEDRA DE  
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA



Córdoba, 11 de noviembre de 2008

Por la presente certifico que, en la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Médicas se han realizado los ensayos de tinción con colorante May Grunwald-Giemsa en muestras de fluido crevicular y sangre para frotis, provenientes de pacientes del Od. Marcelo Ocampo para la realización de sus tareas de tesis doctoral. Además se realizó extracción de ADN de muestras obtenidas con periopapers en bolsas periodontales de pacientes, para amplificar por PCR secuencias específicas de bacterias Gram negativas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, conjuntamente con cultivos bacterianos de *A. actinomycetemcomitans* en medio TSBV en condiciones de microaerofilia, y *P. gingivalis* en medio Schaddler en anaerobiosis para luego realizar PCR de los cultivos. Además de reuniones de coordinación de tareas para cumplimentar el proyecto de tesis doctoral.

**Prof. Dra. NELIA M. GEREZ de BURGOS**  
PROFESORA TITULAR  
BIOQUIMICA



**Dra Nelia Gerez de Burgos**  
Prof Titular Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular

## BIBLIOGRAFÍA

1. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1):32-38.
2. Marsh P, Martin M. *Oral microbiology*. 4 ed. Oxford : Wright , 2000.
3. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PG 2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993; 64:432-444.
4. Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune an and inflamatory reponses. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 783-836.
5. Faimboin L, Geffner J. *Introducción a la inmunología humana*. 5 ed. Buenos Aires : Médica Panamericana. 2005, 504 p.
6. Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982; 9: 472-481.
7. Williams RC. Periodontal disease. *N Engl J Med* 1990; 322:373-376.
8. Seymour GJ. Possible mechanism involved in the inmunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. *J Dent Res* 1987; 66: 2-9.
9. Petsios A, Nakou M, Manti F. Microflora in adult. *J. Periodontol* 1995; 30:325-331.
10. Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J Periodontol*. 1994; 65 (11):1073-1078.

11. Bridges RB, Anderson JW, Saxe SR, Gregory K, Bridges SR. Periodontal status of diabetic and non-diabetic men: effects of smoking, glycemic control, and socioeconomic factors. *J Periodontol.* 1996; 67(11): 1185-1192.
12. Slotenberg J, Osborn J, Pilhstrom B, Hezberq M, Aeppli D, Wolf L, Fischer G. Association between cigarette smoling, bacterial pathogens and periodontal status. *J. Periodontol.* 1993; 64 (12):1225-1230.
13. Duerden B. Virulence factors in anaerobes. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 18 (Suppl 4): 253-259.
14. Preiss SD, Meyle J. Interleukin-1 $\beta$  concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1994; 65:5; 423-428.
15. Dayer JM. Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: The role of IL-1Ra. *Clin Exp Reumathol* 2002; 20: S14-S20.
16. Sodek J, Overall C. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix (suppl)* 1992: 352-362.
17. Craig RG, Yip JK, So MK, Boylan RJ, Socransky SS, Haffajee AD. Relationship of destructive periodontal disease to the acute-phase response. *J Periodontol.* 2003; 74(7):1007-1016.
18. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand.* 2001; 59(3): 167-173.
19. Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res.* 1997; 32(1 Pt 2): 115-119.
20. Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect.* 2005; 7(4): 738-747.
21. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res.* 1996; 31(7): 489-495.



22. Prabhu A, Michalowicz BS, Mathur A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1996; 67(5): 515-522.
23. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun.* 1994; 62(9):4005-4014.
24. Assuma R, Oates T, Cochrad D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998; 160: 403-409.
25. Kusano K, Muyauro Ch, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP.2,-3,-9 and 13) by interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP introduction with bone resorption. *Endocrinology* 1998; 139; 1338-1354.
26. Horowitz MC, Lorenzo JA. Local regulators of bone: IL-1, TNF, Lymphotoxin, Interferon- $\gamma$ , IL-8, IL-10, IL-4, the LIF/IL-6 family, and additional cytokines. En: *Principles of bone biology*, eds. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. San Diego: Academic Press. 1996, 687-700.
27. Tatakis D. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol* 1993; 64: 416-431.
28. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996; 1: 821-878.
29. American Academy of Periodontology. International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 8-38.
30. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 21-32.
31. Dahlén G. Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. *Adv Dent Res.* 1993; 7(2): 163-164.
32. Offenbacher S, Odle B, Van Dike T. The microbial morphotypes associated with periodontal health and adult periodontitis: composition and distribution. *J Clin Periodontol.* 1995; 12:736-749.

33. Gharbia S, Shah, H. Hidrolic enzyme liberates by Black Pigmented Gram negatives anaerobes. *Inmunol. Med. Microbiol* 1994; 6: 139-146.
34. Page R, Sjöström K, Ou J, Chen H. Clinical and immunological aspects of periodontitis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 1993; 13(2): 487-505.
35. Guillarte C. *Prevotella* sp. y *Porphyromonas* sp. en la periodontitis del adulto. *Acta Odontol Venez* 2002; 40(2): 137-143.
36. Petit MD, van Steenberghe TJ, Timmerman MF, de Graaff J, van der Velden U. Prevalence of periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1994; 21(2):76-85.
37. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2):134-144.
38. Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16(5): 306-310.
39. Klein MI, Gonçalves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. *J Periodontol.* 2003; 74(6):798-802.
40. Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, Gamonal J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol.* 2005; 76(2): 289-294.
41. López NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71(6): 948-954.
42. Nogueira Moreira A, Fernández Canigia L, Furman C, Chiappe V, Marcantoni M, Bianchini H. Clinical and microbiological study of adult periodontal disease. *Rev Argent Microbiol.* 2001; 33(3): 133-140.
43. Offenbacher S, Collins JG, Heasman PA. Diagnostic potential host response mediators. *Adv Dent Res* 1993; 7: 175-181.

44. Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. J. Clin Periodontol 1986; 13: 912-917.
45. Slots J. Ting M. *Actinobacillus actinomycetencomitans* and *Porphyromona gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000 1999; 20: 82-121.