



UNC

Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS
EN LA PERIODONTITIS AGRESIVA, INDUCIDAS POR
PERIODONTOPATÓGENOS”**

TESISTA:

OD. JOSÉ LUIS ATALA

DIRECTOR:

PROF. DR. LUIS AUGUSTO OLMEDO

CÓRDOBA, 2009



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

I. TITULO

**“Determinación de alteraciones inmunológicas
en la periodontitis agresiva, inducidas por
periodontopatógenos”**

II. INTRODUCCION

PERIODONTITIS

INTRODUCCION:

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial producto de una compleja interacción entre factores microbianos, inmunológicos, genéticos, psicológicos, neuroendócrinos, epidemiológicos y ambientales, que con lógica científica permiten interpretar su fisiopatogenia, los polimorfismos clínicos, la extensión del daño, alteraciones tisulares locales y sistémicas y la progresión clínica de la enfermedad. Bajo este paradigma, asociar el efecto deletéreo de la patología a la simple presencia de microorganismos colonizadores en estado planctónico o conformando el biofilm subgingival implica desconocer los complejos, variados y regulados mecanismos fisiopatogénicos que la enfermedad involucra.

La periodontitis como enfermedad infecciosa, presenta la particularidad de que los elementos dentarios son órganos parcialmente expuestos al ambiente bucal, que es un ecosistema abierto, dinámico y heterogéneo, portador de una microbiota comensal compleja, que puede en forma transitoria o por períodos prolongados de tiempo, colonizar sus estructuras duras (elementos dentarios), blandas (tejidos periodontales) y materiales biocompatibles que conforman el ecosistema bucal.

Es menester ponderar que las bacterias que colonizan los ecosistemas primarios de la boca, pueden hacerlo en concentraciones variables en espacios muy reducidos, desarrollando altas tasas metabólicas, lo que implica potencialidad patogénica. Desde este enfoque, la naturaleza infecciosa es un factor causal relevante en la etiología multifactorial de la enfermedad, como también lo es el factor genético, fuertemente asociado a fenotipos clínicos y progresión de la enfermedad, ya, que el polimorfismo genético involucra tanto a las **bacterias** que según el biotipo de pertenencia codifican factores de virulencia específicos por mutaciones en el ADN cromosómico (mutación-selección o depleción de pares de bases codificantes de un mecanismo de virulencia específico) o por ADN extracromosómico introducido por plásmidos (conjugación), bacteriófagos (transducción), o por transformación (a través

del medio) como al **hospedador**, condicionando respuestas inmunes innatas o adaptativas proinflamatorias o antiinflamatorias.

En base a lo expuesto, puede decirse que la infección (colonización bacteriana) no necesariamente se expresa en enfermedad infecciosa, con alteración ostensible de las funciones biológicas de las estructuras duras y blandas que conforman el periodonto. Es decir no hay una relación lineal entre la colonización bacteriana (infección) y la periodontitis (enfermedad infecciosa).

El periodonto o periodoncio es el conjunto de tejidos que constituyen el órgano de sostén y protección del elemento dentario. El cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, constituyen el aparato de sostén o periodonto de inserción. El tejido que rodea a la dentina radicular es el cemento, que estructuralmente pertenece al elemento dentario, pero funcionalmente conforma el periodonto de inserción. La raíz del elemento dentario se inserta en el alveolo dentario que es una cavidad del hueso maxilar y es una estructura odontodependiente, es decir, se forma con el diente y se pierde con él. El conjunto de alveolos dentarios forma el proceso o reborde alveolar de los maxilares. La pared interna o periodóntica está constituida por una fina capa de tejido óseo compacto y constituye el sitio de inserción de las fibras periodontales. La pared externa o lámina perióstica también es de tejido óseo compacto. Entre ambas láminas existe tejido óseo esponjoso. La unión de las láminas compactas da lugar a la cresta alveolar. Esta estructura es la primera que pierde altura por reabsorción ósea en la enfermedad periodontal. El hueso alveolar y el cemento están unidos mediante tejido conectivo fibroso denominado ligamento periodontal. La función de esta estructura además de fijar el diente al hueso alveolar, es de soportar las fuerzas de la masticación. Por este motivo, las fibras colágenas que lo forman estructuralmente se parecen a una cuerda retorcida en la cual las hebras individuales pueden ser remodeladas de forma continua, sin que la fibra en sí pierda su arquitectura y función. Las fibras colágenas que constituyen el ligamento periodontal, por lo general, se disponen oblicuamente entre el hueso alveolar y el cemento radicular. Todas las estructuras de soporte del elemento dentario al hueso alveolar, están protegidas por el denominado periodoncio o periodonto de protección que comprende dos regiones: la encía que rodea al cuello dentario y la unión dentogingival que une la encía al elemento dentario. Estas estructuras aíslan al periodonto de inserción del ambiente bucal densamente colonizado

en todos sus ecosistemas primarios. El diente con su periodonto constituye un conjunto estructural y funcional que recibe el nombre de odontón **(1)**.

La inflamación es la característica patogénica central de la enfermedad, la infección el factor etiológico inductor de la respuesta inflamatoria del hospedador, pérdida de inserción progresiva, formación de bolsas patológicas que pueden afectar un número variable de elementos dentarios, todo lo cual podría expresarse en diferentes tiempos de progresión con alternancias entre periodos de activación y periodos estacionarios y/o reparadores.

La Academia Americana de Periodoncia (AAP) en el Workshop de 1999, estableció las diferencias entre formas crónicas y agresivas de progresión de la periodontitis en base a parámetros clínicos, composición microbiana de la placa subgingival (perfil microbiano) y aspectos inmunológicos del hospedador. **(2)**. En base a esta clasificación, la Periodontitis Agresiva (PA) se caracteriza por los siguientes parámetros o criterios: primarios y secundarios **(3)**.

Características Primarias o Comunes

- Los pacientes, excepto por la presencia de periodontitis, están sistémicamente sanos.
- Rápida pérdida de inserción y destrucción del hueso.
- Agregación familiar de casos.

Las Características Secundarias son:

- La cantidad de placa bacteriana y tártaro no es significativa en relación a la destrucción periodontal (al daño).
- Las especies bacterianas mas representativa de la destrucción tisular y progresión de la enfermedad, son: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* **(4)** (*A. actinomycetemcomitans*) y *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*), ambos considerados microorganismos exógenos ya que no conforman la microbiota comensal normal en estado de salud periodontal **(5,6,7,8,9,10,11)** y asociados a la instalación y progresión clínica de la enfermedad.
- Deficiencias fagocíticas (trastornos funcionales de los neutrófilos). Sujetos con periodontitis agresiva (PA) sufren defectos funcionales de leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos o ambos que alteran la atracción quimiotáctica

leucocitaria hacia el sitio de la infección o bien su capacidad de fagocitar y eliminar bacterias. Estudios recientes han demostrado una reacción hiperactiva de monocitos en pacientes con periodontitis agresiva localizada (PAL) respecto a la producción de factores solubles proinflamatorios tales como prostaglandinas, de las cuales la isoforma E2 (PGE-2) es la más involucrada en la destrucción ósea, como reacción al lipopolisacárido (LPS), actualmente denominado lipooligosacárido (LOS) de las bacterias Gram negativas (Gram -). Este fenotipo de reacción exagerada incrementaría la pérdida de tejido conectivo periodontal. Las prostaglandinas actúan sobre los fibroblastos y osteoclastos, junto con las citocinas proinflamatorias para inducir la producción de metaloproteinasas de la matriz (MMP) lo cual es relevante para el intercambio tisular y el proceso destructivo periodontal.

- Elevados niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α y de PGE-2) se observan en el fluido crevicular gingival (FCG) durante los períodos de activación y progresión de la enfermedad. **(12)**.

Además de estas características comunes y secundarias hay algunas estrictamente específicas para cada una de las formas clínicas de PA.

La periodontitis agresiva localizada (PAL) se caracteriza por:

- Comienza en la pubertad.
- Localizada en primeros molares e incisivos, con pérdida de inserción interproximal en al menos dos dientes permanentes, uno de los cuales es un primer molar y que afecta a no más de otros dos dientes aparte del primer molar e incisivos.
- Se asocia frecuentemente con deficiencias en la función de los PMN y a una exagerada respuesta de anticuerpos séricos contra los periodontopatógenos *A. actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis*. **(13,14,15)**

La periodontitis agresiva generalizada (PAG) se caracteriza por:

- La aparición en personas menores de treinta y cinco años.
- La pérdida de inserción interproximal generalizada, afecta como mínimo a tres dientes permanentes (además de los molares e incisivos).

- Los microorganismos más representativos de la destrucción tisular y progresión de la enfermedad son *A.actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis*.
- Su asociación con una baja respuesta de anticuerpos séricos contra *A.actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis*.
- La producción de pérdida de inserción y hueso alveolar en forma episódica.
- Existencia de factores añadidos modificadores de riesgo (estrés, tabaco, droga, etc.) que podrían modificar y afectar el curso clínico de la enfermedad. **(16,17,18,19,20)**

Actualmente se diagnostica como PA cuando el paciente expresa las tres características principales primarias asociadas y cuando alguna de ellas estuviera ausente, se diagnosticará PC.

Epidemiológicamente en la dentición primaria el porcentaje de prevalencia de PA en niños de 5 a 11 años varía entre el 0,9% y 1,3% **(21,22)**.

En la dentición permanente la mayoría de los estudios con sujetos de entre 13 y 20 años han demostrado una prevalencia siempre menor al 1% **(23)**. El riesgo no es compartido entre distintas razas.

No todos los investigadores encuentran una relación dependiente y lineal entre *A.actinomycetemcomitans* y PA. Actualmente, la mera presencia de *A.actinomycetemcomitans* no es tomada en cuenta a la hora de diferenciar entre la forma crónica y agresiva de periodontitis **(24)**.

Esta revisión microbiológica sistemática nos indica que la presencia de bacterias específicas no pueden ser usadas como criterio univariable para efectuar un diagnóstico diferencial correcto.

Otros estudios, como el de Wang y Cols. 2005 **(25)** han demostrado, tras analizar muestras de placa subgingival, que la presencia de *A.actinomycetemcomitans* en sujetos con PC y PAG es similar (25% y 24% respectivamente).

Demasiada es la información de evidencias que avalan la predisposición genética a contraer PA. Esto se fundamenta en el análisis de agregación de casos en familias con sujetos que padecen PA desde 2 o más generaciones, con patrones de transmisión autosómica dominante, autosómica recesiva y dominante ligado a X. Todavía no ha sido posible establecer un patrón único que incluya a todas las familias estudiadas.

Existe una correlación entre la depleción del complemento 5a (C5a), la disminución del número de receptores para el péptido N-formil-metionilfenilalanina e IL-8 **(26)** y el desarrollo de formas de PAL.

En la mayoría de los casos de PA, parece no haber asociación entre la cantidad de destrucción periodontal respecto a los parámetros clínicos de valoración periodontal visual, ya que generalmente la destrucción tisular es significativamente mayor en relación a la nula o poca presencia de tártaro y placa bacteriana respectivamente. Este criterio, nos permite inferir que la fisiopatogenia obedece a la presencia de una microbiota periodontopatógena que expresa específicos mecanismos de virulencia en relación a un hospedador particularmente susceptible.

En relación a la colonización subgingival por bacterias periodontopatógenas, cabe destacar que una vez establecido el biofilm en el ecosistema primario de referencia, la acción patógena de las bacterias sobre los tejidos periodontales se produce por mecanismos directos e indirectos (o reactivos). Los mecanismos patogénicos directos refieren a la capacidad que tienen las bacterias de colonizar y multiplicarse evadiendo la respuesta inmunitaria del hospedador, hasta alcanzar concentraciones patogénicas e invadir los tejidos periodontales, todo lo cual le posibilite alterar las funciones y producir daño local y/o sistémico mediante mecanismos de virulencia estructurales (antígenos) o no estructurales (enzimas-toxinas). La patogenicidad indirecta esta ligada a la capacidad de las bacterias de inducir una respuesta inmunitaria deletérea (27,28).

Entre los mecanismos directos de agresión bacteriana se ha demostrado que A.actinomycetemcomitans es capaz de producir y liberar al medio extracelular como un importante mecanismo de virulencia, la leucotoxina: (LTxA) de 116 KDa, cuya principal función biológica es lisis de leucocitos humanos (29,30). No todas las cepas de esta bacteria producen LTxA. Algunas producen y liberan grandes cantidades, mientras que otras cepas poco tóxicas, lo hacen en menor proporción (31,32). Este fenómeno se produce debido a polimorfismos genéticos con diferencias en la secuencia de la región promotora de LTxA, lo que indicaría posibles diferencias moleculares entre cepas de A.actinomycetemcomitans con distintos grados de virulencia. Las cepas altamente tóxicas, involucradas en el proceso de destrucción tisular rápida, presenta una deleción de 530 pares de bases en el ADN, en correlación con cepas menos virulentas, lo que proporcionaría un marcador que permitiría distinguir entre ambas cepas (32).

P.gingivalis expresa como principal mecanismo de patogenicidad directa la producción de proteasas relacionadas a la fisiopatogenia de la enfermedad por medio de la degradación de los tejidos del

hospedador y de la modulación de sus mecanismos defensivos. La gingipaina se constituye como la principal proteasa capaz de degradar las proteínas en las uniones peptídicas, de esta manera modula los efectos de citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y la quimiocina IL-8 (33,34). Además de producir enzimas proteolíticas, *P.gingivalis* es capaz de activar la producción de citocinas a través de la interacción de la molécula de LPS que actúa como patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) que interactúan en los receptores Toll like (TLR), en especial con TLR4 de macrófagos (35). La estimulación de los TLR en los macrófagos potencia su actividad fagocítica y microbicida e induce la producción de un nutrido grupo de quimiocinas y citocinas. La activación de los TLR en las células dendríticas induce su migración desde los tejidos periféricos a los ganglios linfáticos drenantes y el incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, favoreciendo así su capacidad de actuar como célula presentadora de antígeno (CPA) ante los linfocitos T (LT) “naive” o vírgenes. La homeostasis de los tejidos requiere de un regulado equilibrio entre actividades catabólicas y anabólicas, mediadas por citocinas con acción biológica proinflamatoria o antiinflamatorias respectivamente. La periodontitis es iniciada por la acción de una serie de patógenos, cuyas estructuras celulares actúan como quimioattractantes induciendo una cascada de eventos inmunológicos, cuyos efectores estimulan la destrucción de los tejidos. Los **quimioattractantes** son sustancias que dirigen la migración celular a lo largo de un gradiente de concentración que se incrementa hacia el sitio de producción (foco infeccioso o inflamatorio). Además de los PAMP, entre los quimioattractantes se incluyen moléculas tan diversas como péptidos formilados producidos por proteínas bacterianas, C5a, C3a, intermediarios lipídicos de la inflamación como el leucotrieno B4 (LTB4), entre una extensa familia de quimiocinas. Cabe destacar una diferencia semántica, ya que el término quimioattractante es genérico y se reserva para ser aplicado a productos bacterianos inductores de atracción leucocitaria al foco infeccioso, en tanto el término quimiocina se aplica a los productos de la respuesta inmune innata (macrófagos) inductores de atracción leucocitaria. Las **quimiocinas** constituyen una superfamilia de citocinas pequeñas (de 8 a 14 KDa), estructuralmente relacionadas. Algunas quimiocinas son sintetizadas en condiciones inflamatorias, otras en cambio se producen en forma constitutiva y son las llamadas quimiocinas homeostáticas. Las **citocinas** componen un grupo heterogéneo de moléculas de bajo peso molecular (menos de 80 KDa) que modulan la actividad del Sistema Inmune y son producidas

y secretadas por diversos tipos celulares pertenecientes o no a este sistema. Pese a la heterogeneidad molecular, comparten varias propiedades, entre las cuales cabe mencionar:

- Las citocinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad natural y adquirida y sirven para mediar y regular las respuestas inmunitarias infecciosas – inflamatorias.
- La secreción de citocinas es breve y autolimitada. En general no se almacenan como moléculas preformadas y su síntesis se inicia por una nueva transcripción genética. Una vez sintetizadas suelen secretarse con rapidez, lo que da lugar a un pico de liberación en momentos específicos destinados a mediar el curso de una respuesta inflamatoria.
- Las citocinas son producidas por muchos tipos celulares y actúan sobre diferentes tipos celulares, esta propiedad se llama pleiotrofismo.
- Las citocinas a menudo tienen múltiples efectos diferentes sobre la misma célula diana.
- Las citocinas a menudo influyen en la síntesis de otras citocinas, produciendo cascadas en las que una segunda o tercera citocina puede mediar los efectos de la primera, proporcionando así mecanismos reguladores positivos o negativos en las respuestas inflamatorias.
- Las citocinas, como otras hormonas peptídicas, inician su acción uniéndose a receptores específicos en la superficie de la misma célula que la secreta (acción autócrina) sobre una célula próxima (acción parócrina) o en células distantes que se estimulan mediante citocinas secretadas a la circulación (acción endócrina).
- Sólo se necesitan cantidades muy pequeñas para desencadenar efectos biológicos, debido a que los receptores muestran elevada afinidad a sus ligandos con constantes de disociación (Kd) entre 10^{-10} y 10^{-14} M, mucha más afinidad que los complejos Ag-Ac cuya Kd es 10^{-7} y 10^{-11} M y moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) con péptidos antigénicos con una Kd de 10^{-6} M.

La primera respuesta que se activa por la infección bacteriana es la respuesta inmune innata que involucra la activación del Sistema de Complemento (C), la migración de polimorfos nucleares neutrófilos y macrófagos al sitio de la infección, iniciando de esta manera una cascada de respuestas cuyo objetivo de destruir al patógeno **(36)**.

Los macrófagos son las células mononucleares responsables de orquestar la respuesta inmune en la fase temprana no específica de la defensa contra los microorganismos actuando como células efectoras mediante mecanismos microbioestáticos y microbicidas dependiente o independiente del oxígeno y a la vez participan como células accesorias de la respuesta inmune adaptativa a través de la producción de citocinas y en la presentación de antígenos (CPA) al LTCD4 **(36)**. En las últimas décadas, varios estudios han demostrado que los macrófagos presentes en las lesiones periodontales expresan variados fenotipos **(37)**, lo que permite inferir que esto se traduzca en distintos niveles funcionales de los mismos, con incidencia directa en la instalación, progresión y expresión clínica de la patología periodontal.

Entre los mecanismos indirectos de *A. actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis* cabe destacar que ambos microorganismos estimulan la activación pro-inflamatoria de macrófagos induciendo la liberación de óxido nítrico (NO_2), una importante molécula microbicida por activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), de la cual hay tres isoformas. Una de estas, la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) es activada por estímulos inflamatorios como citocinas $\text{ITFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, y lipopolisacáridos bacterianos. El sustrato de dicha enzima es la L-arginina que se encuentra presente en los macrófagos **(38)**. Además de activarse esta vía, considerada clásica o pro-inflamatoria el macrófago puede ser activado en forma alternativa (o anti-inflamatoria). Distintos componentes microbianos así como perfiles Th1 o Th2 de citocinas influyen las vías metabólicas de L-arginina. En presencia de citocinas como IL-4 o IL-13, los macrófagos activan la enzima arginasa (vía alternativa), que también utiliza como sustrato a la L-arginina **(39)**. Dependiendo de cuáles sean los factores y citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria, será la vía metabólica de la L-arginina que predominará. En definitiva esto va a depender, entre otros factores del sistema inmune del individuo como del periodontopatógeno y sus factores de virulencia.

En la actualidad se disponen para el **diagnóstico de periodontitis** de métodos muy sensibles y específicos, tales como determinación de marcadores inmunológicos en fluido crevicular gingival (FCG) y sangre venosa periférica, determinación de periodontopatógenos por técnicas de biología molecular y técnicas convencionales, además de la valoración de parámetros clínicos y radiológicos **(40)**. La determinación de estos parámetros se constituyen en objetivos de estudio de este proyecto de investigación transversal, observacional-analítico de pacientes con PA según criterio de la Academia Americana de Periodoncia (AAP). Workshop de 1999.

En base a todo lo expuesto y por la importancia clínica de esta patología escasamente tipificada desde el punto de vista microbiológico e inmune; se propone caracterizar la respuesta inmunológica innata y correlacionarla con las bacterias periodontopatógenas responsables de la enfermedad periodontal.

III. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar la respuesta inmune innata en pacientes con distintos grados de periodontitis agresiva (PA) en correlación con las bacterias periodontopatógenas responsables del daño y progresión de la lesión y la expresión radiológica del daño a las estructuras de soporte de los elementos dentarios.

Objetivos Específicos:

- 1-** Identificar la respuesta inmune innata en pacientes con periodontitis agresiva con distinto grado de afección, mediante los siguientes parámetros inmunológicos: funcionalidad y grado de activación de células de la inmunidad innata (activación iNOS y arginasa) y la presencia de factores solubles inducidos (quimiocinas y citocinas).
- 2-** Tipificar la microbiota periodontopatogénica relacionada con la expresión del daño y progresión de la PA, a través de los aislamientos y tipificación de *A.actinomycetemcomitans* y *P.gingivalis* en muestras clínicas obtenidas de los pacientes por técnicas de biología molecular (PCR), y en forma aleatoria realizar las determinaciones microbiológicas por técnicas convencionales.
- 3-** Determinar la pérdida de tejido de inserción mediante estudios por imágenes radiológicas digitalizadas.

IV . MATERIALES Y METODOS

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. Los pacientes fueron notificados de su inclusión en este proyecto de investigación y dieron su consentimiento por escrito, completando 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 protocolo de investigación se establecen en el cuadro 1:

Cuadro 1

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
-Hombres y mujeres entre 15 y 35 años -Buen estado de salud general (sistémica) (Clínicamente detectable) -Con PA. -No haber sido tratados por enfermedad periodontal en los 2 últimos años. -No tratados con medicación antibiótica ni antiinflamatoria en los últimos 6 meses.	-Pacientes embarazadas. -Pacientes medicadas con anticonceptivos por vía oral. -Pacientes con aparatología ortodóncica -Pacientes con medicación estrogénica. -Pacientes con enfermedades sistémicas: enfermedades cardíacas, diabetes, etc.

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 años 2007 y 2008 en la Cátedra de Periodoncia "C" de la Facultad de Odontología - UNC.

*Primera etapa: de diagnóstico clínico. Se realizó el examen periodontal y las tomas radiográficas de los sitios con PA siguiendo el protocolo de trabajo consignado en materiales y métodos.

Se confeccionó la Historia Clínica de cada paciente. El paciente firmó el consentimiento informado para participar de este proyecto el cual fue oportunamente aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de Universidad Nacional de Córdoba, en base a las determinaciones

microbiológicas, inmunológicas y radiológicas consignadas en el Protocolo, prestando conformidad a todo lo propuesto en materiales y métodos.

*Segunda etapa: toma y procesamiento de las muestras clínicas. Se procedió a la **toma** de las muestras de fluido crevicular gingival (FCG), tejido gingival y sangre venosa periférica para realizar a partir de ellas las determinaciones microbiológicas e inmunológicas.

Parte de las muestras obtenidas fueron **procesadas** de inmediato con el propósito de realizar las determinaciones microbiológicas convencionales y moleculares (PCR). La alícuotas restantes fueron **preservadas** a -70°C hasta ser utilizadas para realizar las determinaciones inmunológicas (citocinas y quimiocinas, nitritos y arginasa).

Se **procesaron** en forma conjunta todas las muestras que oportunamente se recogieron de cada paciente e inmediatamente congeladas a -70°C y se **realizaron** las determinaciones inmunológicas (citocinas y quimiocinas, nitritos y arginasa).

*Tercera etapa: resultados de las determinaciones microbiológicas-inmunológicas y radiológicas.

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

*Cuarta etapa: análisis estadístico de los resultados microbiológicos, inmunológicos y radiológicos.

Este es un estudio transversal, observacional - analítico de pacientes con PA según criterio de la Internacional Workshop de 1999 .

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

Para comparar las frecuencias relativas de **perfiles bacterianos** de *P.gingivalis* y *A.actinomycetemcomitans* entre pacientes con PA (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 β 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 β y resorción ósea** entre grupo problema y sanos se usó el índice de Spearman con 95% de confianza.

DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS EN CADA ETAPA

Primera etapa: diagnóstico clínico.

Se estudiaron un total de 12 (doce) pacientes ($n=12$), de los cuales 8 (ocho) eran adultos jóvenes de entre 20 y 35 años de edad con diagnóstico clínico de PAL y PAG ($n=8$), 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 PAL y PAG yBite Wing en pacientes sanos.

La representación de la etapa clínica se expresa en la (figura 1).

Cada paciente firmó su consentimiento informado para participar del proyecto. (ver anexo pag. 59).

Figura 1.





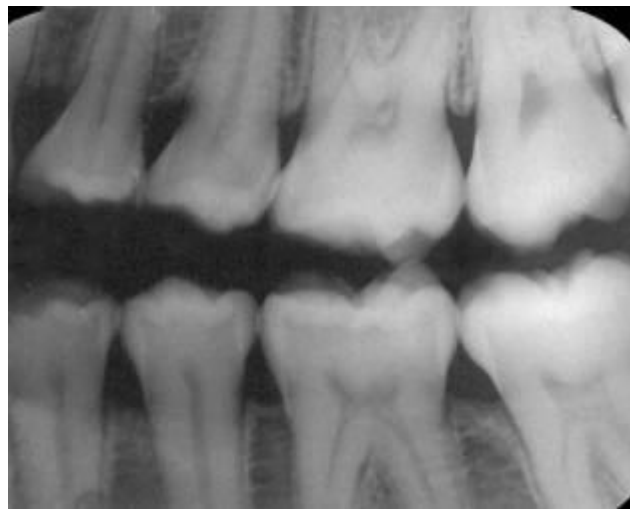
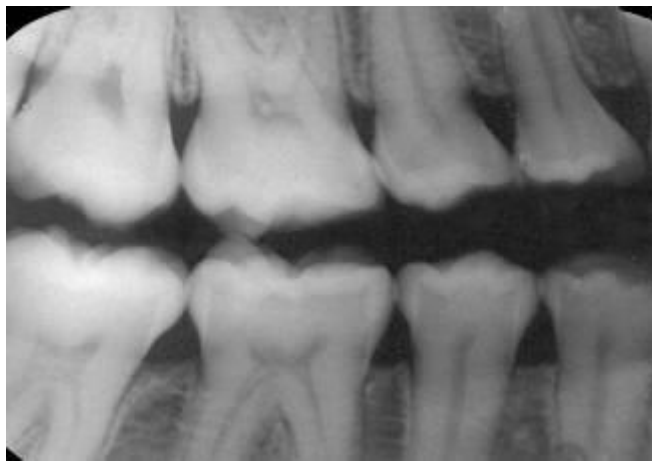
C



D



E



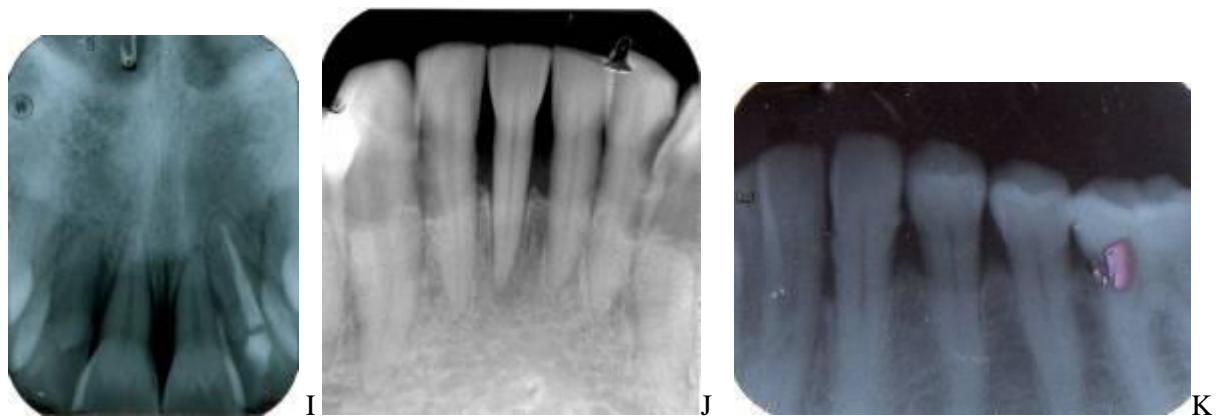


Figura 1.- Las imágenes fotográficas se corresponden con: clínica compatible a: A= grupo sanos. B= PAG. C= PAL. D- E- y F= examen periodontal. G- y H= Rx Bite Wing en grupo sanos. I- J- y K= Rx periapical en grupo problema.

Segunda etapa: Toma y procesamiento de las muestras clínicas.

En los sitios seleccionados y con una profundidad de sondaje ≥ 5 mm, se procedió a la toma de muestras de FCG con conos de papel de filtro estériles N° 35-40 (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 ≥ 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 conos se lo recolectó en un Eppendorf que contenía 2 ml de medio de transporte Viability Medium Göteborg Anaerobically III (VMGA III) prerreducido mediante Baño 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 en este segmento del cono y 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, para las que el oxígeno sería deletéreo. El medio de transporte es pobre en nutrientes lo que impide la multiplicación bacteriana. Las muestras se transportaron de inmediato al Laboratorio de Microbiología y se comenzó el procesamiento de las mismas en un tiempo no mayor de dos horas para evitar la pérdida de bacterias anaerobias o facultativas. El cultivo, aislamiento y

tipificación de *P.gingivalis* y *A.actinomycetemcomitans* se realizó según las recomendaciones de Slots (5,7) cuyas técnicas fueron previamente estandarizadas en nuestro laboratorio. Para el cultivo y aislamiento de los microorganismos, previo a realizar la siembra se agitaron las muestras contenidas en los tubos con VMGA III en vortex durante 30 segundos para homogenizarlas.

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*.

Las placas fueron preparadas inmediatamente antes de ser utilizadas para los cultivos. A la primera placa se la sembró con una anada 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, durante 7 días.

Para el cultivo de *A.actinomycetemcomitans* las muestras sin diluir (provenientes del medio de transporte VMGA III) se sembraron en agar TSBV (Trypticase, Soja, Bacitracina, Vancomicina) en los cuatro cuadrantes de la placa y se incubaron en atmósfera de microaerofilia (10% de CO₂) = 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 TSBV mostró colonias pequeñas de 0,5mm a 1 mm de diámetro de forma circular, convexas, translúcidas, 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* pierden las dos últimas características (adhesión y aspecto estrellado). Del material patológico en el cultivo primario, el desarrollo típico aparece alrededor del tercer día, luego 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 la cual oscureció la expresión del desarrollo de *A.actinomycetemcomitans*. (figura 2)

Figura 2



A



B



C



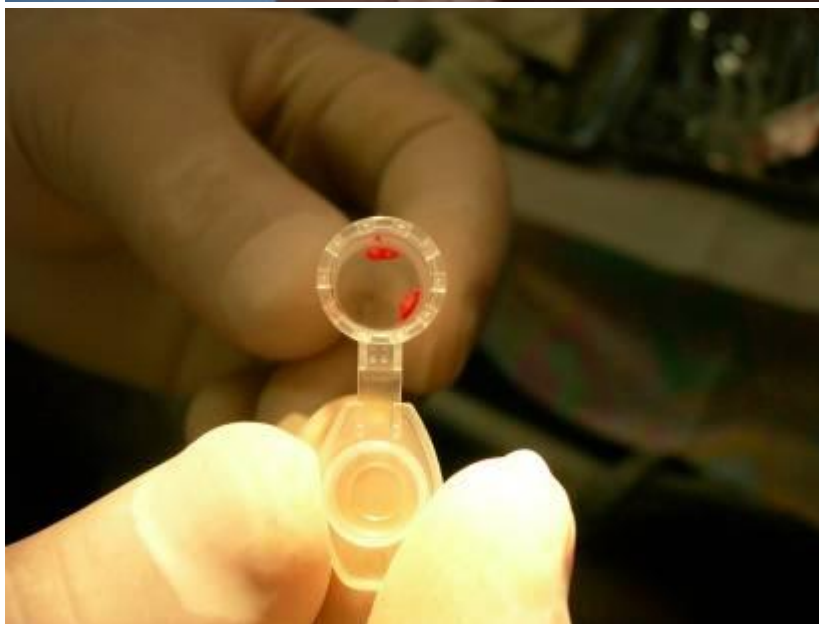
D



E



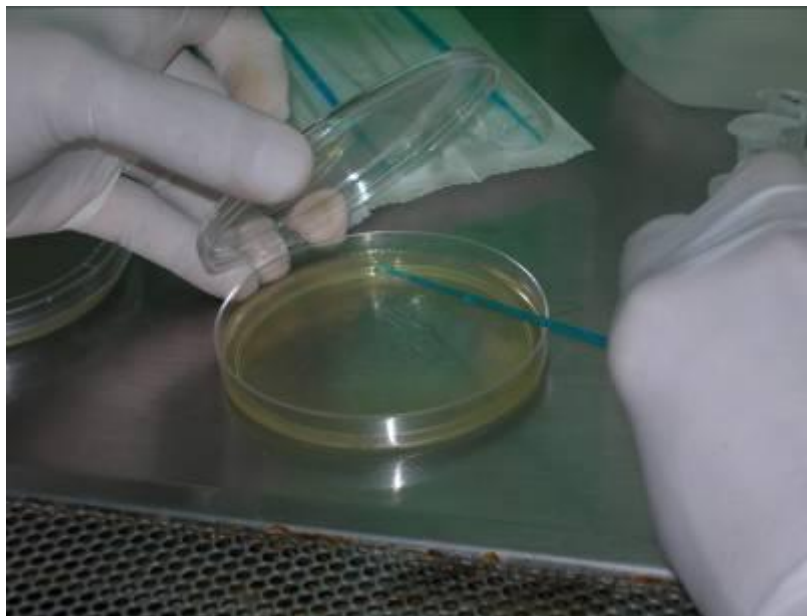
F



G



H



I



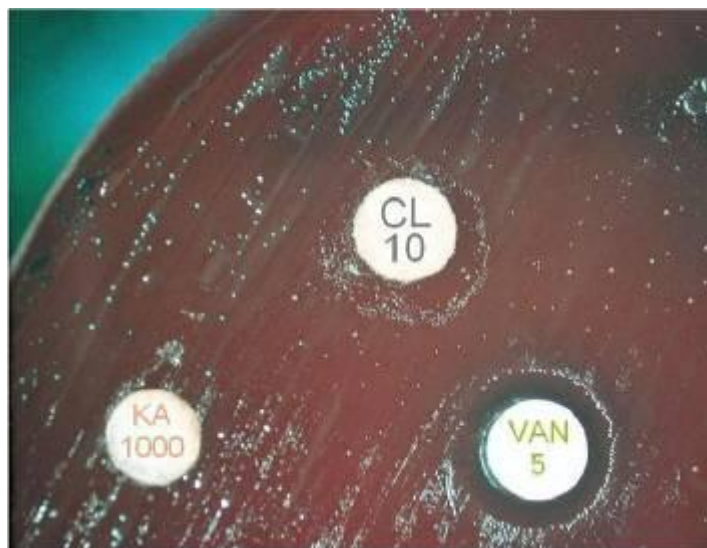
J



K



L



M

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

**COMPOSICION DE LA MEZCLA DE GASES PARA
BACTERIAS ANAEROBIAS Y FACULTATIVAS (cuadro 2)**

Cuadro 2

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

**DETERMINACION BACTERIOLOGICA POR TECNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR:
PCR**

a- Extracción del ADN: a los tubos Eppendorf que contenían los Periopaper con los que se obtuvo el FCG de la bolsa periodontal se le agregó 200 µl 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 es 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).

Cuadro 3

PATÓGENO BACTERIANO	SECUENCIA ESPECÍFICA DE PRIMERS PARA PCR (5' ---3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO AMPLIFICADO en pb
<i>P. gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG	404
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC	575

La reacción de amplificación se realizó con 10µl de ADN en 40 µl de mezcla de reacción que contiene 5µl de tampón de PCR 10x, 25 mM de MgCl₂ (Promega), 1, 25 U de Taq polimerasa (Promega), 0.2mM de cada dNTPs (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

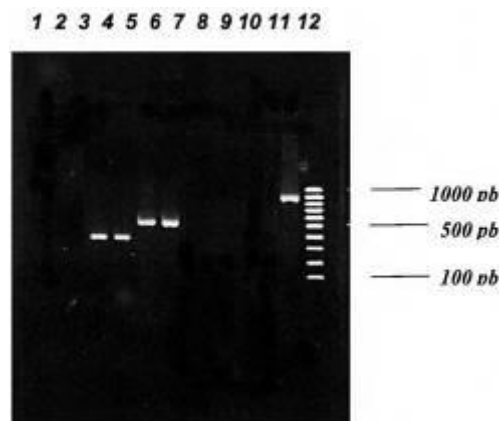
de 95°C durante 2 minutos, seguidos por 36 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, etapa de complementariedad de primers a 60°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto con una extensión final de 72°C por 2 minutos.

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). (Cuadro 4).

Cuadro 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 en la segunda etapa correspondiente a la toma de muestras clínicas (FCG).

DETERMINACIONES INMUNOLOGICAS

A los tres conos restantes conteniendo FCG se los colocó en tubos Eppendorf con 40 µl de solución salina 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 cc de sangre venosa la que se colocó en tubos estériles con heparina para separar el plasma, el cual

se guardó alicuotado a -70° C hasta el momento de ser utilizado para determinar también 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 que se colocó en un Eppendorf estéril con 500 μ l 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 descongeló y alicuotó el tejido de granulación gingival. Una alícuota se colocó en un Eppendorf con 450 μ l de PBS para determinar nitritos (actividad clásica o antiinflamatoria por activación de la enzima iNOS). Los Eppendorf debían encontrarse fríos, en hielo, previo al agregado al material de granulación gingival. **Determinación de la actividad arginasa:** el excedente del tejido de granulación gingival alicuotado, se introdujo en un Eppendorf con 250 μ l de tampón tritón X-100 con inhibidores de proteasas (cóctel inhibidor proteasa). Los Eppendorf para esta determinación debían encontrarse fríos, en hielo, previo al agregado del tejido de granulación gingival.

Se procesaron en forma conjunta todas las muestras oportunamente recogidas de los diferentes pacientes preservadas por congelación a -70° C hasta ese momento (FCG, tejido de granulación del curetaje de las paredes de la bolsa y sangre venosa).

A- Determinación de citocinas y quimiocinas por ELISA (enzimoinmunoanálisis)

En el FCG y suero se determinó por ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay). El kit empleado fue el Bio Source International, Camarillo CA. USA, para determinar los niveles de quimiocinas (IL8) y citocinas (IL-1 β y TNF- α). 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 NO₂ 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 producto del curetaje de las paredes de la bolsa, 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 RADIOLOGICAS

Se trabajó sobre 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 PA. Asimismo se utilizó para el grupo sanos el método radiográfico de Bite –Wing (aleta mordida) para precisar con este registro intrabucal (isométrico-isomorfo) la visualización de la altura de la cresta ósea lo más real posible.

Ambos métodos siguieron los criterios técnicos - radiográficos tendientes a lograr la optimización en calidad de imagen, densidad, contraste y definición.

Las radiografías obtenidas por los métodos utilizados, fueron digitalizadas indirectamente por medio de un Scanner HP calibrado con una regla patrón que permite 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 radioopaca que se encuentra en el ángulo de la radiografía, y tomando el valor cero (0) de la escala el tono negro que se corresponde con la radiotransparencia.

Esto permitió poder medir los distintos tonos de grises y así transferirla a la pérdida ósea que analizamos en el 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 gingival y por raspaje del fondo y pared interna de la bolsa periodontal para obtener tejido de granulación.

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

El aspecto radiográfico del grupo sanos se observó en ambos primeros molares tanto ligamento periodontal, cortical lamina dura y cresta alveolares con índices de densidades normales, se expresa las corticales alveolares continuas regulares y lisas, adoptando las morfologías de las crestas alveolares superiores la forma angulada y la inferior la forma plana. En ambos casos conservando su espesor normal guardando relación entre la distancia amelocementaria con el nivel mas 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 alveolar y cresta alveolar y los pseudocolores verde y azul indican estructuras desmineralizadas y espacios aéreos que se corresponden a la tronera gingival.

V. RESULTADOS

RESULTADOS

Tercera etapa: resultados de las determinaciones microbiológicas-inmunológicas y radiológicas.

- 1- Resultados microbiológicos:** Tanto por técnica de biología molecular (reacción en cadena de polimerasa: PCR), como por tipificación convencional (cultivo, aislamiento e identificación) se determinó la presencia de *P.gingivalis* y *A.actinomycescomitans* colonizando las bolsas periodontales de pacientes con PAL y PAG. *A.actinomycescomitans* se aisló y tipificó en un 24% de los pacientes del grupo problema (n=8) con PAL y PAG, en tanto *P.gingivalis* se aisló y tipificó en el 100% del grupo problema con PAL y PAG. 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- α , IL-1 β , solo en FCG se determinó la producción de nitritos y del tejido de granulación de la bolsa periodontal se determinó arginasa. (cuadro 5)

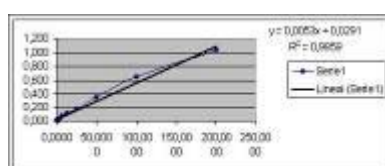
■ Concentraciones negativas

■ Concentraciones positivas

Cuadro 5

IL 8 - FCG

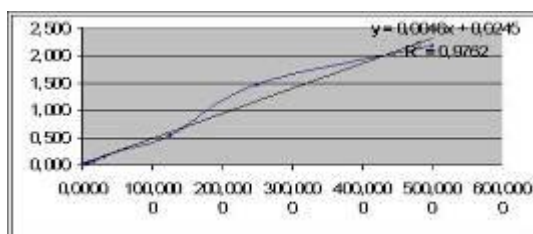
Conc pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
200,0000	1,011	0,856	202	0,144	-0,012	-7,6604
100,0000	0,618	0,645	203	0,106	-0,050	-14,8302
50,0000	0,374	0,344	204	0,423	0,268	44,9611
			101	0,359	0,204	32,3057
			102	0,181	0,026	-0,6792
			103	1,009	0,854	155,5472
			104	1,326	1,171	215,3685
			105	0,299	0,144	21,5849
			106	0,521	0,366	63,4717
Blanco	0,155		107	0,886	0,731	130,3066
Blanco	0,156		108	0,301	0,146	21,9623



IL-8 en FCG se midió en el 33% del grupo sanos y 87% del grupo problema.

TNF- α - FCG

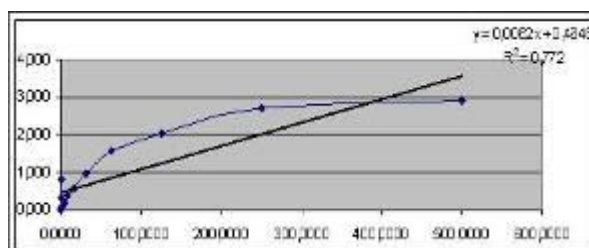
Cc.en pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
500,0000	1,125	0,995	202	0,172	0,042	3,6957
250,0000	0,634	0,504	203	0,148	0,018	-1,5217
125,0000	0,356	0,226	204	0,118	-0,013	-8,0435
62,5000	0,263	0,133	101	0,14	0,010	-3,2609
31,2500	0,186	0,056	102	0,138	0,008	-3,6957
15,6200	0,162	0,032	103	0,177	0,047	4,7826
7,8100	0,191	0,061	104	0,141	0,011	-3,0435
3,9000	0,097	-0,034	105	0,125	-0,006	-6,5217
1,9500	0,133	0,003	106	0,123	-0,008	-6,9565
0,9700	0,136	0,006	107	0,108	-0,023	-10,2174
promedio B	0,131		108	0,108	-0,023	-10,2174



TNF- α en FCG se midió en bajos porcentajes en ambos grupos

IL-1 β - FCG

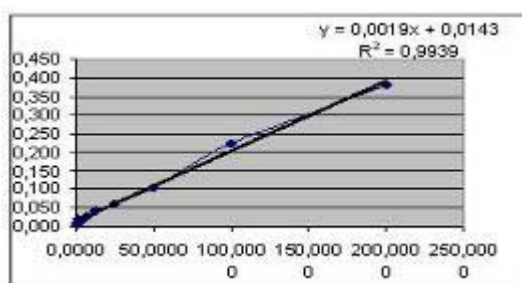
Cc.en pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
500,0000	1,229	1,176	202	0,144	0,091	11,6792
250,0000	0,876	0,823	203	0,106	0,053	4,5094
125,0000	0,509	0,456	204	0,423	0,370	64,3208
62,5000	0,324	0,271	101	0,359	0,306	52,2453
31,2500	0,205	0,152	102	0,181	0,128	18,6604
15,6200	0,150	0,097	103	1,009	0,956	174,8868
7,8100	0,100	0,047	104	1,326	1,273	234,6981
3,9000	0,087	0,034	105	0,299	0,246	40,9245
1,9500	0,068	0,015	106	0,521	0,468	82,8113
0,9700	0,061	0,008	107	0,886	0,833	151,6792
promedio B	0,053		108	0,301	0,248	41,3019



IL-1 β en FCG se midió en el 100% de ambos grupos

IL-8 SUERO

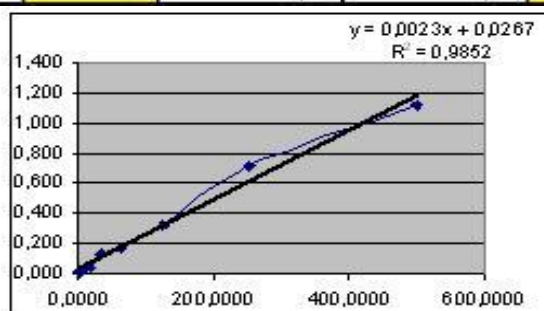
Conc pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
200,0000	0,416	0,379	202	0,055	0,018	1,6842
100,0000	0,262	0,225	203	0,067	0,030	8,0000
50,0000	0,143	0,106	101	0,063	0,026	5,8947
25,0000	0,100	0,063	102	0,086	0,049	18,0000
12,5000	0,079	0,042	103	0,066	0,029	7,4737
6,2500	0,065	0,028	104	0,073	0,036	11,1579
3,1250	0,052	0,015	105	0,065	0,028	6,9474
1,5620	0,059	0,022	106	0,06	0,045	16,1579
0,7810	0,046	0,008	107	0,079	0,042	14,3158
0,3900	0,046	0,008	108	0,063	0,026	5,8947



La IL-8 en suero se midió en el 100% de ambos grupos.

TNF- α – SUERO

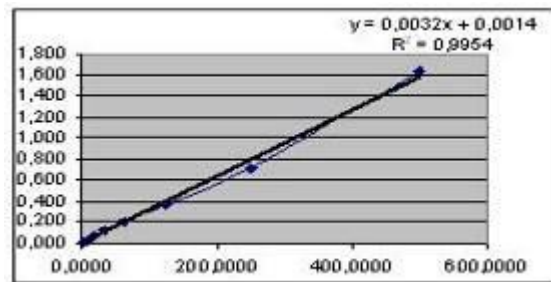
Cc.en pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
500,0000	1,160	1,115	202	0,059	0,014	-5,7391
250,0000	0,756	0,711	203	0,051	0,006	-9,2174
125,0000	0,367	0,322	101	0,083	0,038	4,6957
62,5000	0,215	0,170	102	0,298	0,253	98,1739
31,2500	0,175	0,130	103	0,068	0,023	-1,8261
15,6200	0,089	0,044	104	0,066	0,021	-2,6957
7,8100	0,077	0,032	105	0,055	0,010	-7,4783
3,9000	0,064	0,019	106	0,058	0,013	-6,1739
1,9500	0,052	0,007	107	0,055	0,010	-7,4783
0,9700	0,057	0,012	108	0,051	0,006	-9,2174



TNF- α en suero se midió en ambos grupos en bajas concentraciones.

IL-1β – SUERO

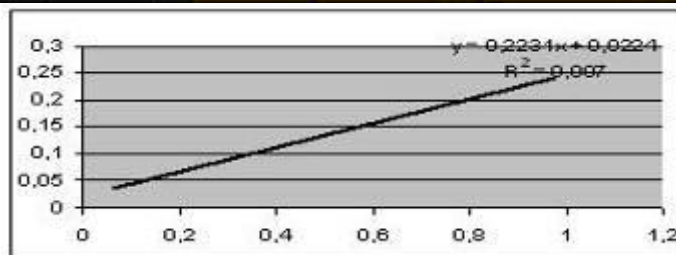
Cc.en pg/ml	Abs	Abs corregida	MUESTRAS	Abs muestra	Abs corregida	Concentracion pg/ml
500,0000	1,683	1,629	202	0,052	-0,003	-1,2188
250,0000	0,763	0,709	203	0,056	0,002	0,0313
125,0000	0,431	0,377	101	0,07	0,016	4,4063
62,5000	0,267	0,213	102	0,071	0,017	4,7188
31,2500	0,176	0,122	103	0,055	0,001	-0,2813
15,6200	0,117	0,063	104	0,057	0,003	0,3438
7,8100	0,081	0,027	105	0,052	-0,003	-1,2188
3,9000	0,074	0,020	106	0,052	0,049	14,8750
1,9500	0,071	0,017	107	0,055	0,001	-0,2813
			108	0,046	-0,009	-3,0938



IL-1β en suero solo se midió en el 50% de ambos grupos.

NITRITOS- FCG

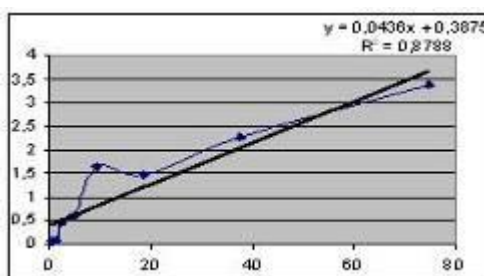
CURVA ug/ml	CURVA uM	ABSOR	ABS CORREG	MUESTRAS	ABSOR correg	CONCENTRACION uM	Concetracion final
				101	0,063	0,1820	36,39023487
				102	0,071	0,2178	43,56790677
				103	0,065	0,1909	36,18915285
				104	0,067	0,1999	39,98307052
				105	0,046	0,1058	21,15643209
				106	0,048	0,1147	22,94935007
				107	0,057	0,1551	31,01748095
				108	0,05	0,1237	24,74226804
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



Nitritos se midió en FCG en 100% de ambos grupos.

ARGINASA- FCG

Conc ug/ml	Abs	Abs corregid	MUESTRAS	Abs	bs corregid	Conc ug/ml
			101	3,323	3,323	
blanco	0,061		102	3,5	3,5	
blanco	0,049		103	3,168	3,168	
promedio bla	0,055		104	2,743	2,743	
			105	1,451	1,451	
			106	2,022	2,022	
			107	2,611	2,611	
			108	0,246	0,246	



Se determinó arginasa en FCG y tejido de granulación de grupo problema, pero no se cuantificó debido a no haberse predeterminado el número de células que incluía la muestra clínica.

3- 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

GRUPO SANOS	VALORES PROMEDIO DE PERDIDA OSEA EXPRESADO EN mm
201	0
202	0
203	0
204	0
GRUPO PROBLEMA	
101	11,21
102	7,80
103	7,80
104	9,82
105	7,90
106	11,63
107	11,52
108	9,10

Figura 3

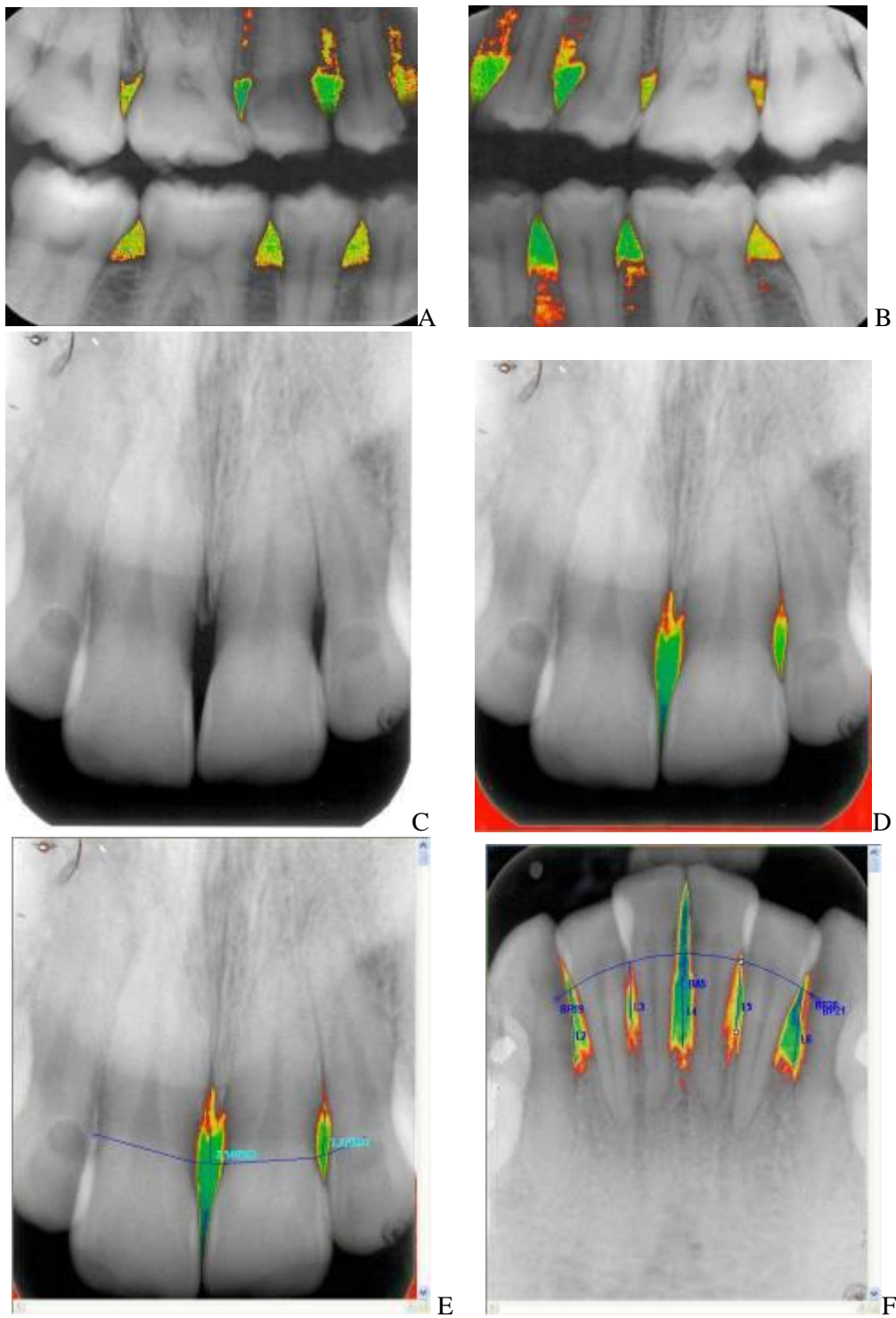


Figura 3.- A-B corresponden a Rx Bite-Wing digitalizadas-pseudocolor- grupo sanos. C- Rx periapical digitalizada – escala de grises- grupo problema (PAG). D-E y F- Rx periapical digitalizada pseudocolor grupo problema – resorcion osea (PAG)

VI. ANALISIS ESTADISTICO

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cuarta etapa: análisis estadístico de los resultados microbiológicos, inmunológicos y radiológicos.

- 1- Análisis estadísticos de los resultados microbiológicos:** En relación a los perfiles bacterianos en pacientes con PA y sanos se observaron diferencias significativas entre *P.gingivalis* ($p=0.001$) y *A.actinomycetemcomitans* ($p=0.05$), siendo mayor la frecuencia relativa de presencia de *P.gingivalis* (100% de las determinaciones), respecto a *A.actinomycetemcomitans* (25% de los casos). (Figura 4).

Figura 4

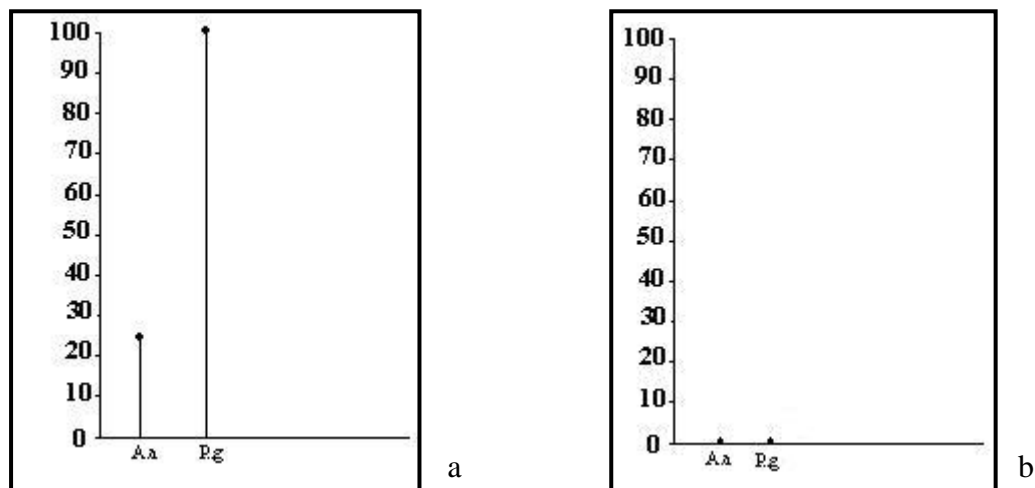


Figura 4 a.- Porcentaje de periodontopatógenos en PA. 4 b.- Porcentaje de periodontopatógenos en grupo sanos.-

2- 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 β y TNF- α . 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 β en suero ($p=0,0112$) e IL-1 β en FCG ($p=0,0124$). (Figura 5-6 y 7).

Figura 5

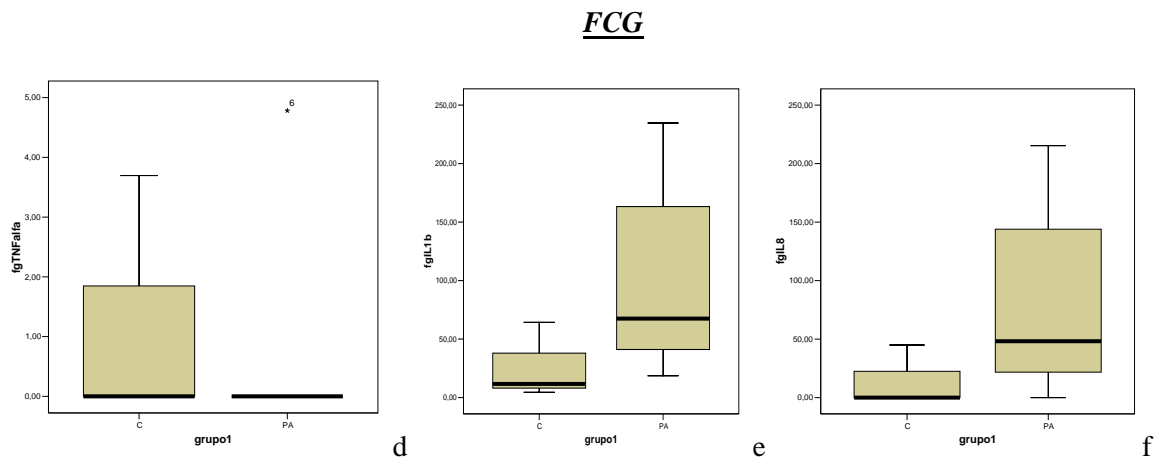
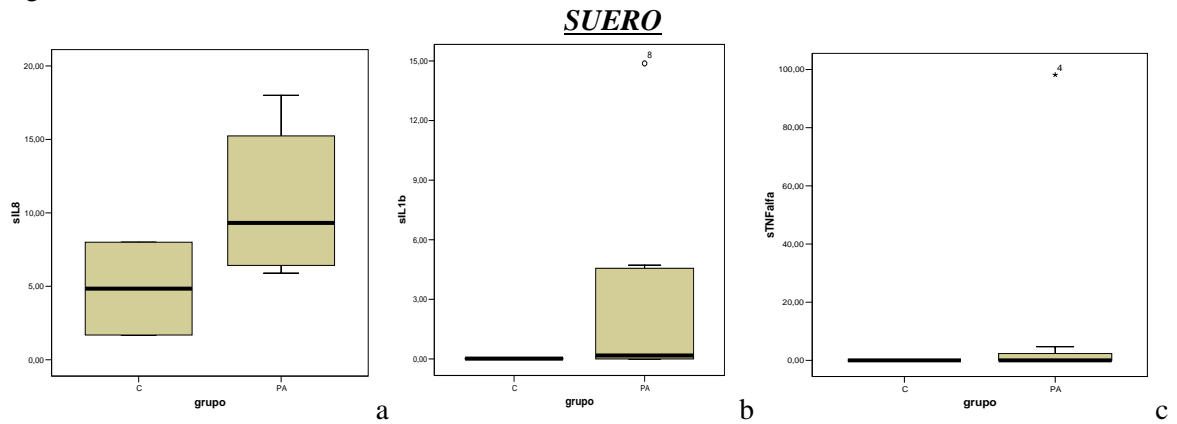


Figura 5.- En las mediciones realizadas en muestras de suero se observó que los valores de todas las variables se mostraron una gran dispersión (Figura 5 a, b y c). Observándose en algunos pacientes valores extremos (muy altos) en sustancias como IL1 β y TNF α (Figura 5 b y c). En FCG no hubo presencia de valores extremos. Si, en general se observó una distribución asimétrica, con tendencias a valores elevados (Figura 5 d, e y f).

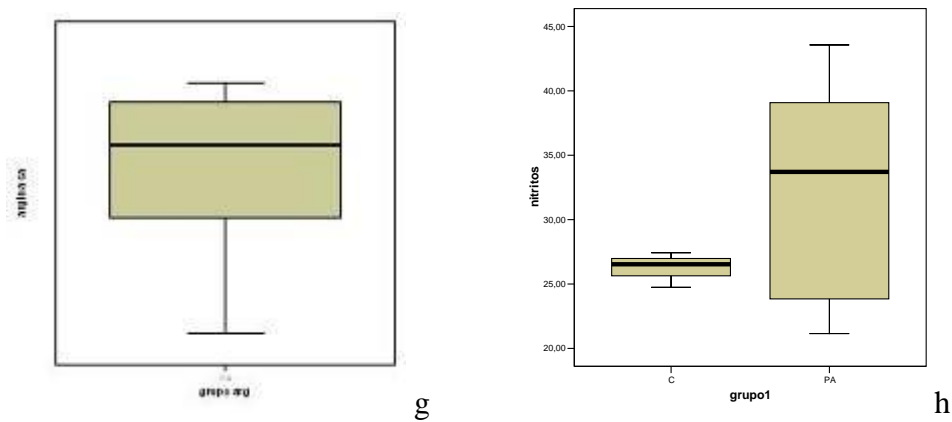


Figura 5 g-h.- la medición tanto de arginasa como de nitritos se realizó solo en FCG y la determinación fue positiva en el 100% del grupo problema y sanos, pero arginasa no se pudo cuantificar ya que esta determinación se realiza en relación directa al número de células. Dicha cuantificación no se realizó en este trabajo de investigación.

Figura 6

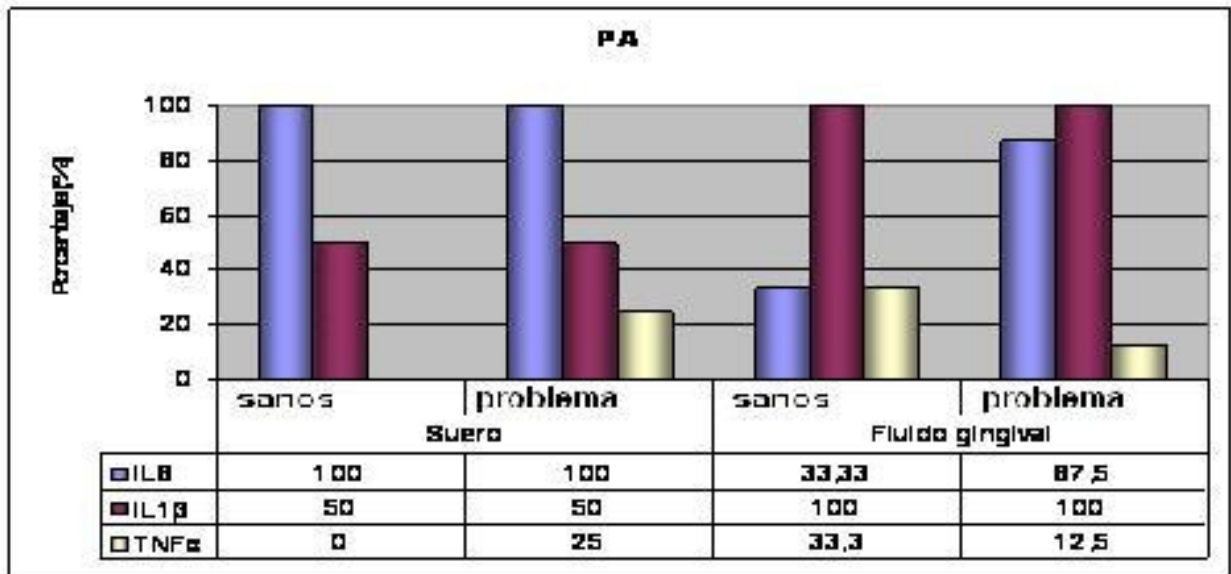


Figura 6.- La IL8 se midió en el 100% de los sanos y problema en suero, en tanto que en FCG sólo en el 33,33% del grupo sanos y el 87,5% del grupo problema. En relación a la IL1β, esta interleuquina solo se midió el 50 % de los sanos y problemas, en suero, mientras que en FCG fue en 100% en sanos y problemas. El TNFα fue medido, en general, tanto en suero como FCG en un bajo porcentaje de problemas y sanos. La medición tanto de nitritos como de arginasa se realizó en el FCG y tejido de granulación respectivamente en el 100% de los sanos y problemas. Arginasa no se cuantificó por lo cual no se incluyó en el sistema de barras.

Figura 7

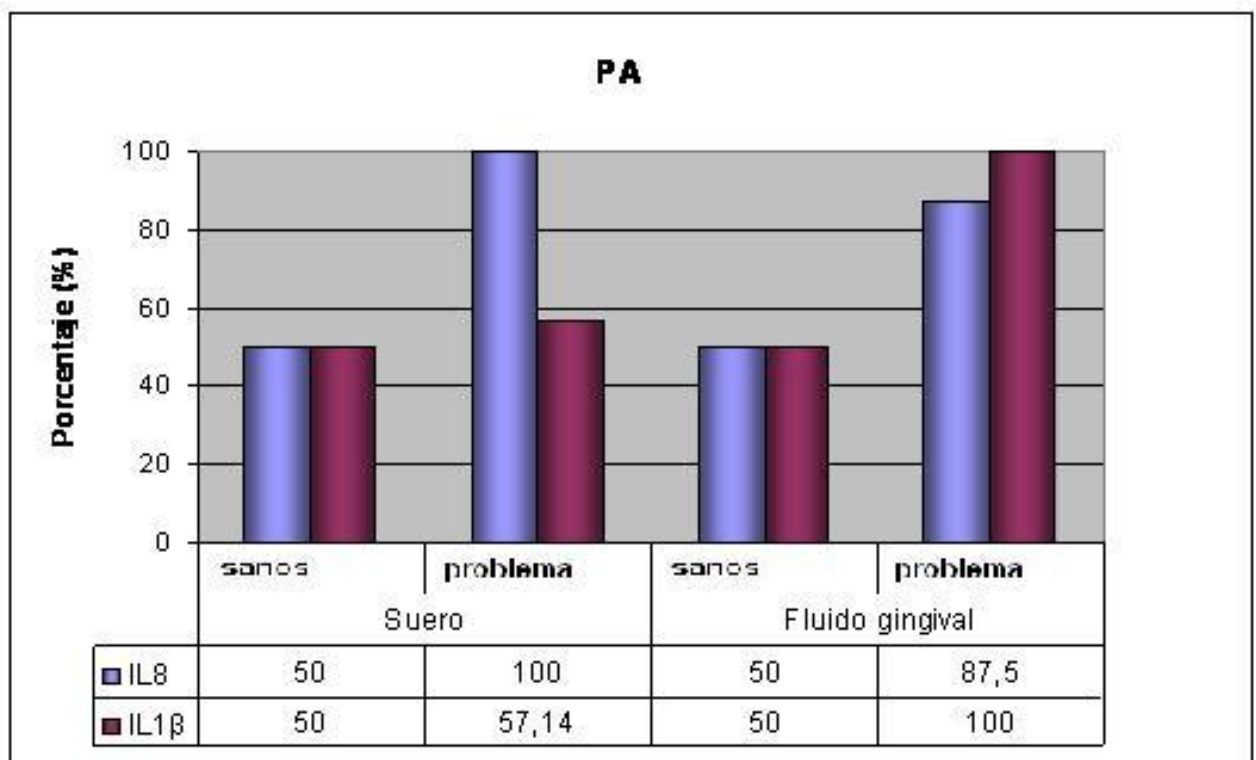


Figura 7.- Grupo problema y sanos en donde IL-8 e IL-1β midieron valores mayores que la mediana

3-Análisis estadísticos de los resultados de la correlación entre IL-1 β y resorción ósea: (figura 8)

Figura 8

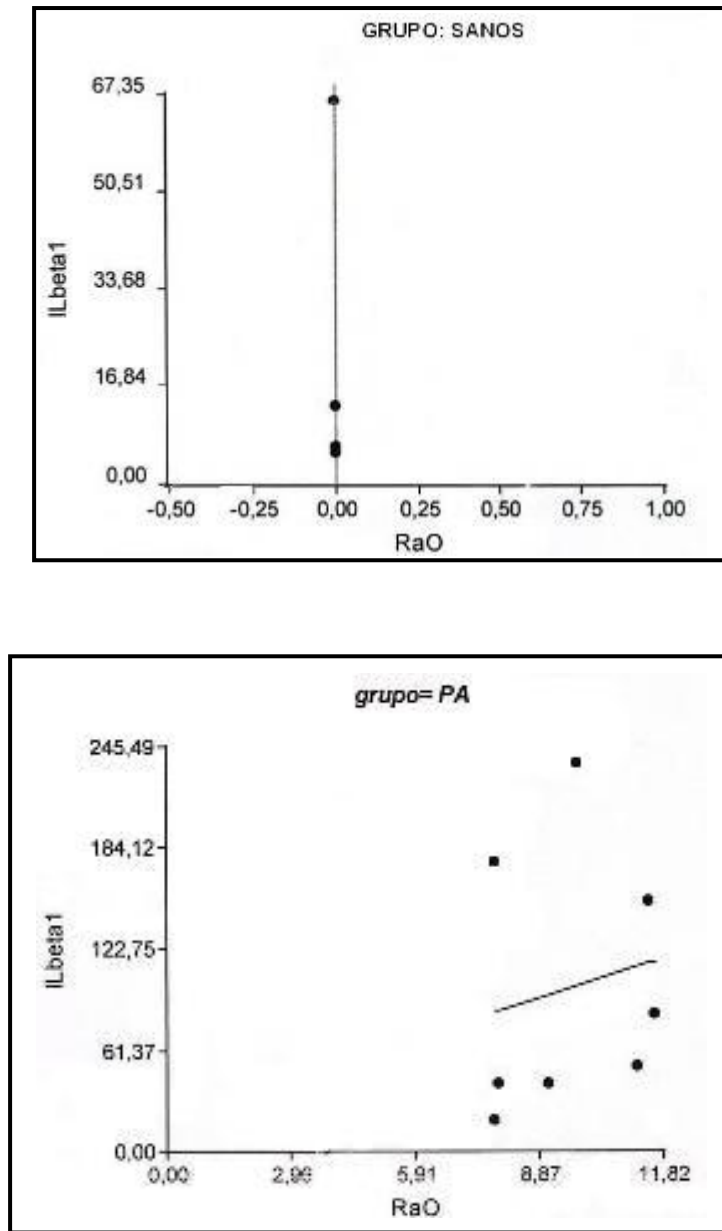


Figura 8- los perfiles de IL-1 β presentaron una gran dispersión lo que no permitió hacer una asociación con lo resorción ósea. (Indice de Spearman)

4-Análisis estadísticos de los resultados de sangrado al sondaje:

Sangrado al sondaje (%positivo) PA = 75% (n=6) $p < 0.001$ y en sanos 0% (n=0) $p < 0.001$. Prueba chi cuadrado / prueba exacta de Fisher.

5-Análisis estadísticos del NIC:

NIC en sitios muestreados se estableció mediante la MEDIA en mm. NIC en PA = 4.05 ± 3.6 (n=8) $p < 0.05$.

VII. DISCUSSION

DISCUSION

La periodontitis agresiva (PA) es una entidad patológica de baja prevalencia. Se expresa clínicamente en edades tempranas de la vida, con características de progresión rápida y consecuencias frecuentemente severas para el paciente. Cursa con una elevada pérdida de inserción, formación de bolsas periodontales profundas y sangrado en grados superlativos en períodos cortos de tiempo.

En este estudio se tipificó la microbiota periodontopatígena prevalente en pacientes que viven en la Ciudad de Córdoba, República Argentina, con diagnóstico de PA. Se determinaron las respuestas inmunes innatas ante la agresión microbiana y a los valores de los resultados obtenidos se los correlacionó con las resorciones óseas en cada paciente.

P.gingivalis se aisló en la totalidad de las muestras clínicas, en tanto *A.actinomycetemcomitans* tan sólo en el 25% de los casos. La prevalencia de *P.gingivalis* sobre *A.actinomycetemcomitans* coincide con resultados obtenidos por Cortelli JR (41) en Brasil, Gajardo M (42) y Lopez NJ (43) en Chile, Kamma JJ (44) en Grecia, Takeuchi Y (45) en Japón, Dahlen G (46) en Kenia y Mullally BH (47) en Inglaterra. En cambio *A.actinomycetemcomitans* fue el periodontopatígeno prevalente sobre *P.gingivalis* en pacientes con PA según estudios de Ali RW (48) en Rumania, Van der Weijden GA (49) en Holanda, Slots J (50) en Norte América, Dogan B (51) en Turquía, Choi BK (52) en Corea y Dahlen G (53) en Tailandia. Este último investigador obtiene perfiles microbiológicos diferentes en estudios realizados en Tailandia (prevalente *A.actinomycetemcomitans*) comparado con los resultados obtenidos en Kenia (prevalente *P.gingivalis*). Tonetti MS y Mombelli A (54) reportan que *A.actinomycetemcomitans* se aisló en el 90% de las lesiones de PAG. Existe coincidencia entre este estudio y publicaciones de Socransky SS (55) y Zambon JJ (56) en cuanto a que *P.gingivalis* y *A.actinomycetemcomitans* están fuertemente asociados a bolsas con una profundidad mayor a 5 mm, sangrado al sondaje, pérdida de adherencia y resorción ósea. Haubek D (57) en 2002 demuestra que la presencia de *A.actinomycetemcomitans* supone un incremento en el riesgo de pérdida de inserción superior a cualquier otro periodontopatígeno.

Los resultados de este trabajo de investigación son coincidentes con Wang D y col (25) que en 2005 reportaron que *A.actinomycetemcomitans* se aislaba con una frecuencia relativa en el 24% de las muestras de placa subgingival analizadas en pacientes con PAG.

De lo expuesto se puede inferir que los microorganismos involucrados en PAG varían en cada región dependiendo de distintos factores, en virtud de lo cual cada región o país deberá establecer su propio perfil microbiológico y en consecuencia aplicar estrategias preventivas y terapéuticas.

De las determinaciones inmunológicas se cuantificó en FCG **IL-8, TNF- α , IL-1 β , nitritos y arginasa**, en tanto en suero solo se cuantificaron **IL-8, TNF- α e IL-1 β** .

Histológicamente, la enfermedad periodontal se caracteriza por la acumulación de células inflamatorias en el tejido conectivo gingival, las que no logran controlar eficientemente a los microorganismos residentes en las bolsas periodontales. Esto ocasiona una respuesta continua y excesiva del hospedador que rompe los mecanismos homeostáticos. El reclutamiento leucocitario y la subsecuente liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-8 y nitritos) que conducen a la destrucción de los tejidos periodontales con formación de bolsa profunda y resorción ósea. La progresión de la PA es diferente según la respuesta del huésped a las bacterias que colonizan el ecosistema primario conformado en la bolsa periodontal.

Los cambios producidos en las estructuras periodontales, han sido relacionados a la participación del Sistema Inmune local en el infiltrado de la bolsa periodontal. Existe una tendencia generalizada a relacionar IL-1 β con la resorción ósea (58,59,60,61,62,63).

La determinación de IL-1 β en pacientes con PA en este estudio, no permitió establecer una relación lineal con la resorción ósea ($p=0.042$) debido al grado de dispersión de ésta citocina.

Inferimos que varias pueden ser las causas, entre otras que esta citocina no se almacena sino que se produce y excreta fundamentalmente por monocitos, linfocitos y fibroblastos en el momento de mediar una acción biológica específica, lo que se traduce en que, en los distintos pacientes se produjo la liberación en diferentes momentos, algunos coincidentes con la toma del FCG y en otros con anterioridad. La falta de correlación también podría atribuirse a que el número de pacientes ($n=8$) no es suficiente para establecer esta relación (IL-1 β y resorción ósea). Por lo expuesto precedentemente en

este estudio IL-1 β no se constituye en un marcador idóneo de pronóstico de daño periodontal como lo reportan Birkedal-Hansen H (64) y Baker JP (65).

VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- En este estudio se estableció el perfil microbiológico en PAL y PAG contextualizado a pacientes residentes en la Ciudad de Córdoba-República Argentina, resultando *P.gingivalis* el periodontopatógeno prevalente sobre *A.actinomycetemcomitans*.
- La IL-1 β esta presente en algunas encías no inflamadas (función homeostática) y en todas las PA. Los niveles de IL-1 β aumenta en pacientes con periodontitis independientemente de la severidad de la enfermedad en el sitio muestreado, lo que demuestra que los niveles de IL-1 β no mantienen una relación lineal con la expresión clínica de la enfermedad.
- Los valores de las determinaciones inmunológicas deben ser interpretados en forma conjunta con los parámetros clínicos y radiológicos comunes y característicos de PA.
- La enfermedad periodontal presenta condicionantes etiológicos múltiples por lo que resulta muy impreciso describir con exactitud el papel que desarrollan células y moléculas en la entramada red de señales químicas que permanentemente y en forma conjunta interactúan para mediar procesos inflamatorios como antiinflamatorios en forma simultánea.
- Es necesario controlar la infección periodontal a efectos de reducir la sobreproducción de citocinas proinflamatorias relacionadas a la progresión de la enfermedad y destrucción de las estructuras de soporte del diente.
- El análisis de agregación de casos en familias con sujetos que padecen PA desde dos o más generaciones, avala la predisposición genética de la enfermedad.
- La PA es una enfermedad infecciosa inflamatoria producto de una respuesta inmune exagerada con acción deletérea de los tejidos del huésped (mecanismo de agresión indirecto de las bacterias que colonizan la placa subgingival).
- Las bacterias que colonizan la placa subgingival en PA varían entre regiones y países, por lo que cada región debiera definir el perfil microbiológico en PA a **efectos de poder implementar acciones profilácticas oportunas, un tratamiento específico basado en evidencias científicas, y así poder predecir en base al control de los distintos parámetros involucrados, el pronóstico del/**

los elementos dentarios afectados con PA y el costo/beneficio de su permanencia en el ecosistema bucal.

- **La importancia y originalidad de esta investigación es la población estudiada, conformada por pacientes residentes de la Ciudad de Córdoba asistentes a un servicio odontológico universitario.**

IX. RESUMEN

RESUMEN

La periodontitis agresiva (PA) es una enfermedad infecciosa inflamatoria, de baja prevalencia y etiología multifactorial. 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 y la progresión de la PA.

Investigadores de regiones geográficas diferentes han reportado el perfil microbiano de la microbiota asociada a PA en sus determinaciones microbiológicas, no existiendo un criterio unificado respecto al porcentaje de los periodontopatógenos aislados de las placas subgingivales de pacientes afectados con PA. En distintos países o regiones la bibliografía existente comparte sus resultados en proporciones relativas semejantes en cuanto algunas demuestran que *A.actinomycetemcomitans* es el microorganismo frecuentemente más aislado (hasta en un 90%) respecto a *P.gingivalis* (hasta en un 27%) en PA. Un porcentaje similar de referencias bibliográficas demuestran que *P.gingivalis* es la bacteria aislada con mayor frecuencia (80%), en referencia a *A.actinomycetemcomitans* (24%) en las etapas activas de la enfermedad, criterio este, con el que se asemejan los resultados de este estudio.

La Comunidad Científica en general entiende que las bacterias constituyen un cofactor etiológico necesario en la fisiopatología de PA y coinciden que la respuesta inmune del hospedador a los microorganismos del biofilm subgingival, es la que determina la instalación, progresión y fenotipo clínico de la enfermedad. En este estudio ha quedado demostrado que las moléculas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-8 pueden ser usados como marcadores de la inmunidad innata en el diagnóstico de PA. La acción coordinada de estas moléculas y una cascada de efectores inmunológicos interactuando sinérgicamente, serían los responsables de la destrucción de los tejidos periodontales, pérdida del nivel de inserción clínica, aumentos en la profundidad de sondaje, índice de hemorragia, movilidad dentaria, resorción ósea y eventualmente pérdida de los elementos dentarios afectados con PA.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la determinación de los diferentes parámetros estudiados, se concluye que la PA obedece a una etiología multifactorial, donde, en una compleja asociación entre

bacterias periodontopatógenas de alta virulencia y una respuesta inflamatoria en grados superlativos al consorcio bacteriano del biofilm subgingival, serían los responsables de la instalación, progresión y expresión de PA. Asimismo cabe destacar que los perfiles microbiológicos son específicos de cada región, atribuibles a una multicausalidad de factores actuando sinérgicamente, por lo que cada región debiera definir el perfil microbiológico en PA a efectos de poder implementar acciones profilácticas oportunas, un tratamiento específico basado en evidencias científicas, y así, poder predecir en base al control de los distintos parámetros involucrados, el pronóstico del/ los elementos dentarios afectados con PA y el costo/beneficio de su permanencia en el ecosistema bucal.

Palabras claves: Periodontitis Agresiva. Parámetros de la Inmunidad Innata. Periodontopatógenos. Citocinas. Quimiocinas. Resorción Osea.

X. SUMMARY

SUMMARY

Aggressive Periodontitis (AP) is a low prevalence, infectious, inflammatory disease and multifactorial etiology. Many worldwide authors agree as to subgingival biofilm microorganisms behave as immune response conductors and their immunologic effectors would directly be involved in PA harboring and progression.-

Researchers from different regions have reported about microbial profile associated to AP in its microbiological determinations, but no unified criteria exist regarding isolated periodontopathogens percentage of subgingival plaques from patients undergoing AP.-

Worldwide bibliography shares results in similar relative proportions since some of them show that *A. actinomycetemcomitans* is found to be the most frequently isolated microorganism seen (up to 90%) respect to *P. gingivalis* (up to 27%) in AP.

A similar percentage by bibliography references show that *P. gingivalis* is the most often isolated bacterium (80%) as compared to *A. actinomycetemcomitans* (24%) in active stages of the disease, criterion being similar to the results of present study.-

Scientific Community has reported that bacteria constitute a necessary etiologic co-factor in AP pathophysiology and also there is general agreement as regards host immune response to subgingival biofilm microorganisms to be the one that determines settling, progression and clinical phenotype of the disease. Present paper has demonstrated that pro-inflammatory molecules as IL-1 β , TNF- α , IL-8 can be used as innate immunity-markers in AP diagnosis. Coordinated activity of molecules and the many immunologic effectors synergically interacting could be the ones that knock out periodontal tissue, clinical insertion level loss, probing depth increasing, bleeding index, dental movement, bone resorption and eventually tooth loss due to AP.-

According to the results obtained as to determination of different parameters studied, it is concluded that AP is caused by multifactorial etiologies, where a complex association between high virulence periodontopathogen bacteria and a high inflammatory response to bacterial group of subgingival biofilm could be the triggering of AP settling, progression and expression.-

Likewise, it is worth to stand out that immunologic profiles are truly specific to each region, attributable to a myriad of factors synergically acting. in which, each region should define AP microbiologic profile in order to provide prophylactic activities, an specific treatment based on scientific evidence, to be able to predict, based on control of different parameters involved , the prognosis of tooth/teeth with AP involvement and also cost-benefit of its stay within buccal eco-system.-

Key Words: Aggressive Periodontitis-Innate Immunity Parameters-Cytokines-Periodontopathogenesis-Chemokines-Bone Resorption.-

XI. ANEXOS



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

Córdoba, 5 de Mayo de 2007.-

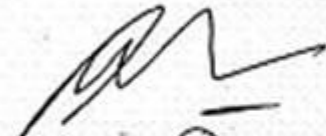
Al Sr. Decano de la
Fac. de Cs. Médicas UNC
S/D

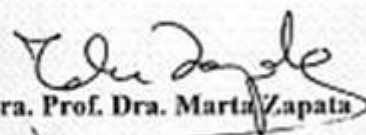
Distinguido Sr. Decano:

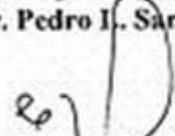
Tenemos el agrado de dirigirnos a Ud., en nuestro carácter de miembros del Comité de Bioética de esta Facultad, para comunicarle lo siguiente:

-Que tras haber estudiado el Proyecto del Tesista: Od. José Luis Atala: "DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA PERIODONTITIS AGRESIVA INDUCIDAS POR PERIODONTOPATÓGENOS CON DIFERENTES GRADOS DE VIRULENCIA", y habiéndose cumplimentado con las indicaciones requeridas por este Comité, se aprueba dicho Proyecto.

Sin otro particular, saludamos a Ud. muy atentamente.

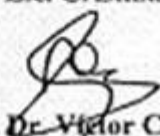

Prof. Dr. Pedro I. Saracho Cornet


Sra. Prof. Dra. Marta Zapata


Prof. Dr. Edgardo F. Secchi

Sra. Lic. Cristina Arrambide de Nores


Prof. Dr. Mario Forteza


Prof. Dr. Victor Cinelli

Aprobación de proyecto por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Medicas - UNC.

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

ATALMA JOSÉ LUIS
DNI...12.98.217.2.....

Nombre del Director del Proyecto.

Pedro Luis A. Ojeda
DNI...10.377.242.....

b- Por la presente declaro aceptar participar como voluntario en el Proyecto de Investigación titulado " DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA PERIODONTITIS AGRESIVA INDUCIDAS POR PERIODONTOPATÓGENOS CON DIFERENTES GRADOS DE VIRULENCIA".

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 y el Director del Proyecto y un testigo ajeno al equipo actuante.

Nombre del Voluntario

BAROTTI NATALIA
.....

Director del Proyecto

.....

Testigo.

MARIA INES ARCAÑA
.....

101



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

H.C.Nro: _____
Fecha: 4/09/2007

FICHA PERIODONTAL

Apellido y nombre: BURGOS MARIA VERGENIA Edad: _____
Domicilio: RAEPI 150 Barrio: CENTRO
Tel: 4226231 Ciudad: CORDOBA C.P.: _____ Ocupación: Estudiante
Referido por: _____ Obra social: _____
Afilado Nro: _____ Gº de parentesco: _____

MOTIVO DE LA CONSULTA movilidad de algunos dientes

ANTECEDENTES DE LA E. ACTUAL: se comenzaron a mover los dientes de arriba.

MEDICACIÓN EFECTUADA _____

ESTADO ACTUAL movilidad grado II de ICSP, ICINF y 100 molares superiores

ANTECEDENTES SISTÈMICOS

Alérgico: Si No Artritis: Si No
Diabético: Si No E. Renal: Si No
Enf. Infecciosa: 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 ¿Por qué? _____
Fecha del último examen clínico: AÑO

OBSERVACIONES: _____

PLAN DE TRATAMIENTO

- a) Tentativo: eliminación radicular y eliminación de bobas / aris dentales.
- b) Definitivo: idm y cirugía periodontal

Paciente: BURGOS VIRGINIA

MAXILAR SUPERIOR

18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	10	R.PI.
18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	10	R.II.
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	S

3	4	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	3	N p de S N I C
3	2	2	2	2	2	3	4	2	3	3	3	3	2	3	2	3	4	
3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
2	2	3	3	3	2	3	4	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	

Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	FURC.
	4																	NOVIL.

DIAGNOSTICO

																		G
																		PL
	X					X	X	X	X							X		PA
																		PC

MAXILAR INFERIOR

48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	20	R.PI.
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	20	R.II.
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	S

3	3	3	3	3	3	2	3	4	2	2	3	3	3	3	2	3	3	N p de S N I C
3	3	2	2	2	2	1	4	1	3	1	2	2	1	1	3	4	6	
3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
3	3	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	FURC.
	X																X	NOVIL.

DIAGNOSTICO

																		G
																		PL
	X					X	X	X	X							X		PA
																		PC




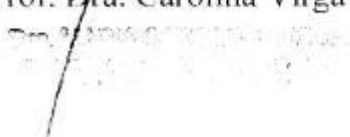
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

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. José Luis Atala 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




**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. José Atala 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
BIOQUIMICA Y BIOL. M.



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

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología



Ante quién corresponda

Por la presente dejo constancia que el Odontólogo José Luis Atara, DNI:12 983 172, legajo de la UNC No 26424, 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 "Determinaciones de alteraciones inmunológicas en la periodontitis agresiva inducida por Periodontopatógenos con diferentes grados de virulencia".

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

XII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1- Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. 3 ed. México : Médica Panamericana, 2009: 2-12.
- 2- Lang, NP, Bartold PM, Cullinam M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami, S, Page R, Papapanou, P, Tonetti M, Van Dyke T. Consensus report: Aggressive periodontitis. Ann Periodontol. 1999; 4:53.
- 3- Bimstein E, Soskolne A. A radiographic study of interproximal alveolar bone crest between the primary molars in children. ASDC J Dent Child. 1988; 55: 348-350.
- 4- Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraprophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol 2006 ;56(Pt 9):2135-2146.
- 5- Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. Scand J Dent Res 1976; 84: 1-10.
- 6- Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. J Clin Periodontol 1986;13: 912-917.
- 7- Slots J. Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromona gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000 1999;20:82-121.
- 8- Albandar JM, DeNardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn M. Association between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. J Periodontol 2001;72: 1463-1469.
- 9- Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, Bernimoulin JP, Göbel UB, Moter A. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? J Clin Microbiol. 2009; 47(6):1705-1711.

- 10- Asss AM, Rossow I, Preus HR, Gjermø P. Incidence of early periodontitis in a group of young individuals during 8 years: associations with selected potential predictors. *J Periodontol* 1994;65: 814-819.
- 11- Di Rienzo JM, Slots J, Sixou M, Sol MA, Harmon R, McKay TL. Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 1994; 62(8):3058-3065.
- 12- Offenbacher S, Collins JD, Heasman PA. Diagnostic potential of host response mediator. *Adv Dent Res* 1993; 7: 175-181.
- 13- Aass AM, Tollefsen T, Gjermø P. A cohort study of radiographic alveolar bone loss during adolescence. *J Clin Periodontol.* 1994; 21(2):133-138.
- 14- Committee on Research, Science and Therapy of the American Academy of Periodontology. Periodontal diseases of children and adolescents. *J Periodontol.* 1996; 67(1):57-62.
- 15- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(12):3859-3869.
- 16- Ebersole JL. Immune responses in periodontal diseases. In: Wilson T, Kornman K. eds. *Fundamentals of Periodontics.* Chicago: Quintessence Publishing Co. 1996: 109-158.
- 17- Ebersole JL. Systemic humoral immune responses in periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1990;1(4):283-331.
- 18- Lally ET, Kieba IR, Golub EE, Lear JD, Tanaka JC. Structure/ function aspects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Leukotoxin. *J Periodontol* 1996; 67, 298-308.
- 19- Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(7):566-73.
- 20- Esquenasi J, Capó C, Batlle A. Periodontitis agresivas: etiología, características clínicas y su tratamiento. *Rev Fundac Juan José Carraro* 2005; 10(21):27-32.

- 21- Bimstein E, Treasure ET, Williams SM, Dever JG. Alveolar bone loss in 5-year-old New Zealand children: its prevalence and relationship to caries prevalence, socio-economic status and ethnic origin. *J Clin Periodontol*. 1994; 21(7):447-450.
- 22- Loe H, Brown LJ. Early onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol* 1991; 62: 608-616.
- 23- Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):1-36.
- 24- Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:10-21.
- 25- Wang D, Kawashima Y, Nagasawa T, Takeuchi Y, Kojima T, Umeda M, Oda S, Ishikawa I. Elevated serum IgG titer and avidity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype c in Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20(3):172-179.
- 26- Van Dyke TE, Horoszewics HU, Cianciola LJ, Genco RJ. Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect Immun*. 1980 ;27(1):124-132.
- 27- Rodríguez BN, Ureña JL, Alonso MS, González DH, Aguado FM. *Microbiología Oral*. 2º Ed. Mc GRAW-HILL. Interamericana.
- 28- Jenkinson HF, Dymock D. The microbiology of periodontal disease. *Dent Update* 1999; 26: 191-197.
- 29- Ohta H, Hara H, Fukui K, Kurihara H, Murayama Y, Kato K. Association of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin with nucleic acids on the bacterial cell surface. *Infect Immun*. 1993;61(11):4878-4884.
- 30- Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 1980;28(1):258-68.
- 31- López M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromas gingivalis* en relación a las periodontitis agresivas. *Rev Estomatol Herediana* 2005; 15(2): 178-183.

- 32- Erck S, Reissmann A, Rodel J, Schmidt KH, Pfister W. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 ;21(4):321-327.
- 33- Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Meer JW. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 2002; 23(3):135-139.
- 34- Carrillo de Albornoz Sainz A, García Kass A, Bascones Martínez A. Papel de la IL-6 y TNF- α en la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol* 2006; 18(2): 83-89.
- 35- Regueiro González JR; López Larrea C; González Rodríguez; Martínez Naves *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune.* 3 ed. Buenos Aires : Médica Panamericana, 2003.
- 36- Schlegel Gómez R, Langer P, Pelka M, von den Driesch P, Johannessen AC, Simon M Jr. Variational expression of functionally different macrophage markers (27E10, 25F9, RM3/1) in normal gingiva and inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1995;22 (5):341-346.
- 37- Gyurko R, Boustany G, Huang P, Kantarci A, Van Dike T, Genco C, Gibson III F. Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*, *Infect Immun* 2003; 71: 4917-4924.
- 38- Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(8):641-654.
- 39- Olmedo LA. Identificación de bacterias periodontopatógenas vs. diagnóstico etiológico y clínico. *Claves Odontol* 2006 13(58):65-69.
- 40- Frías López MC, Uria Ovando V, Carrasol Campillo M. Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal. *Cient Dent* 2009; 6(2): 93-101.
- 41- Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(8):860-866.
- 42- 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.

- 43- López NJ, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1996 ;23(2):101-105.
- 44- Kamma JJ, Nakou M, Gmür R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(5):314-321.
- 45- Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *J Periodontol.* 2003 ;74(10):1460-1469.
- 46- Dahlén G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Black-pigmented *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. *J Clin Periodontol.* 1989 ;16(5):305-310.
- 47- Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 2000 ;35(4):232-241.
- 48- Ali RW, Velcescu C, Jivanescu MC, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1996 ;23(2):133-139.
- 49- Van der Weijden GA, Timmerman MF, Reijerse E, Wolffe GN, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1994;21(9):583-588.
- 50- Slots J, Bragad L, Wokström M, Dahlén G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1986;13: 570-577.
- 51- Doğan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E, Uygur C, Firatli E, Lakio L, Asikainen S. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol.* 2003 ;74(6):803-814.

- 52- Choi BK, Park SH, Yoo YJ, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Kim CK. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *J Periodontol.* 2000 ;71(9):1387-1394.
- 53- Dahlén G, Widar F, Teanpaisan R, Papapanou PN, Baelum V, Fejerskov O. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a rural adult population in southern Thailand. *Oral Microbiol Immunol.* 2002 ;17(3):137-142.
- 54- Tonetti MS, Mombelli A. Early onset periodontitis . *Ann Periodontol.* 1999; 4:39-53
- 55- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 ;25(2):134-144.
- 56- Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):879-925.
- 57- Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(7): 657-660.
- 58- Palcanis KG, Larjava IK, Wells BR, Suggs KA, Landis JR, Chadwick DE, Jeffcoat MK. Elastase as an indicator of periodontal disease progression. *J Periodontol* 1992;63: 237-242.
- 59- Loesche WJ. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1:65-70.
- 60- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 1993;28: 500-510.
- 61- Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health on disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9(3):248-266.
- 62- Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;1: 821-878.
- 63- Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res* 1986; 21: 101-112.
- 64- Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993; 28:500-510.
- 65- Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect* 2000;2: 1181-1192.