




DEPARTAMENT D'ESTOMATOLOGIA
DOCTORAT EN ODONTOLOGIA



Efecto de la terapia fotodinámica como coadyuvante al raspado y alisado radicular en el tratamiento de la periodontitis crónica.

Estudio clínico, microbiológico (*Real Time-PCR*) y
bioquímico (IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANK-L/OPG)

Tesis doctoral de:
Marta Segarra Vidal

Dirigida por:
Dr. Francisco Alpiste Illueca
Dr. José M^a Vila Salinas
Dr. Francisco José Gil Loscos

Valencia, 2016



DEPARTAMENT D'ESTOMATOLOGIA
DOCTORAT EN ODONTOLOGIA

Efecto de la terapia fotodinámica como coadyuvante al raspado y alisado radicular en el tratamiento de la periodontitis crónica.

Estudio clínico, microbiológico (*Real Time-PCR*)
y bioquímico (IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANK-L/OPG)

Tesis doctoral de:

Marta Segarra Vidal

Dirigida por:

Dr. Francisco Alpiste Illueca

Dr. José M^a Vila Salinas

Dr. Francisco José Gil Loscos



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

D. **Francisco Alpiste Illueca**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Estomatología, D. **Francisco José Gil Loscos**, Profesor Asociado de Periodoncia del Departamento de Estomatología y D. **José María Vila Salinas**, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **Marta Segarra Vidal**, licenciada en Odontología, ha realizado bajo su dirección la presente Tesis Doctoral, titulada "**Efecto de la terapia fotodinámica como coadyuvante al raspado y alisado radicular en el tratamiento de la periodontitis crónica. Estudio clínico, microbiológico (Real Time-PCR) y bioquímico (Il-1 β , Il-6, TNF- α , RANK-L/OPG)**" para optar al grado de doctora.

Para que así conste, firman la presente en Valencia a 14 de enero de 2016.

Fdo:

Dr. Francisco Alpiste Illueca

Fdo:

Dr. José M^a Vila Salinas

Fdo:

Dr. Francisco José Gil Loscos

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todo el equipo de investigación sin el cual nada de esto habría sido posible.

Al Dr. Francisco Alpiste Illueca, director del máster de Periodoncia y Osteointegración, profesor contratado doctor de Periodoncia y codirector de esta tesis, por confiar en mí siempre, animarme, potenciarme y sacar mi yo más docente y científico.

Al Dr. José María Vila Salinas, catedrático de Fisiología y codirector de esta tesis, por invertir muchas horas en mí y en mi trabajo, por ayudarme a relativizar y por hacer de esta tesis un preciado tesoro.

Al Dr. Francisco Gil Loscos, profesor asociado de Periodoncia y codirector de esta tesis, por apostar por mí, ser mi padrino y guiarme en el camino de la periodoncia.

A la Dra. Diana Aguirre Rueda, a la Dra. Soraya Vallés Martí y a Sol Guerra Ojeda, sin ellas este trabajo no habría podido realizarse. Gracias por su fantástica tarea en el procesado de las muestras y por sus respuestas sin horarios, ante cualquier duda.

A mi compañero y predecesor Andrés López Roldán, por confiar en mí para seguir con este proyecto que empezó como un protocolo ganador gracias su esfuerzo y trabajo en equipo con Juan Puchades Rufino.

A Eduardo Lucas Alcahuz, compañero de máster, por su inestimable ayuda como explorador ciego en este trabajo, por su tiempo invertido y sobre todo por su comprensión y paciencia.

A Mario Ballesteros Penadés, alumno interno de Periodoncia, gracias por pasar cientos de periodontogramas a las hojas de exploración, un trabajo tedioso que él conseguía convertir en musical.

A Dorothy Walker, mi revisora externa, por guiarme y ayudarme a realizar un trabajo estandarizado, por nuestras largas conversaciones por Skype y sus visitas a España, en las que me formó para convertirme en una investigadora ética y estricta.

A mis compañeros de máster, por creer en mí y animarme, gracias por las confesiones, las risas e incluso alguna lagrimita, todo guardado en aquel pequeño despacho. Siempre os llevaré en mi corazón.

Al personal de la Clínica Odontológica, en especial a Pilar López Arroyo, por aguantar mis innumerables cambios de agenda y mis citas con pacientes fuera de horarios y a Amparo Pérez Moret por hacer que la búsqueda de las historias de los pacientes del estudio fuera más sencilla y amena.

A mis pacientes, por confiarme su salud periodontal, gracias porque con ellos y de ellos he aprendido muchísimo. Son los que le dan sentido a mi profesión.

Quiero hacer extensivos estos agradecimientos a:

A Daniel Alonso Safont, por regalarme su tiempo y su arte en el diseño de esta tesis.

A mi familia, por ser el pilar fundamental de mi vida y por apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos. A mis padres por ser mis ojos, mis pies, mi alma. A Blanca, mi hermana, mi amiga, mi profesora, por sus besos sonoros y a Ignasi, mi pequeño, por sus abrazos en silencio que me dan paz.

A Sergio, mi otra mitad, mi calma, mi tranquilidad, porque con él la vida puede ser maravillosa.

A mi futuro hijo/a, porque la ilusión de que nuestro sueño se haga realidad mueve mi mundo.

Este trabajo ha sido subvencionado en parte por la Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración, Madrid, España y Ondine Biomedical Inc., Vancouver, Canadá.

Índice

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN **15**

1. Definición y clasificación de periodontitis crónica	17
2. Histopatogenia de las enfermedades periodontales	18
2.1. Surco periodontal	19
2.2. Biopelícula bacteriana periodontal	20
2.3. Mediadores inflamatorios y del metabolismo óseo	21
2.3.1. Mediadores del proceso inflamatorio	22
2.3.2. Mediadores del metabolismo óseo	23
2.4. Respuesta inmune periodontal	25
3. Tratamiento periodontal	28
4. Terapias coadyuvantes	28
5. Terapia fotodinámica	29
5.1. Fundamento y mecanismo de acción	30
5.1.1. Agente fotosensibilizador	31
5.1.2. Láser	32
5.2. Terapia fotodinámica y periodontitis	32
6. Antecedentes bibliográficos	34
6.1. Criterios de inclusión	34
6.2. Resultados	34
6.3. Siglas	35

CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **39**

1. Población de estudio	45
2. Criterios de inclusión y exclusión	46
3. Protocolo de estudio	48
4. Metodología del tratamiento periodontal	52
4.1. Raspado y alisado radicular	52
4.2. Instrucciones en higiene oral	53
4.3. Terapia fotodinámica	53
5. Toma de muestras del fluido crevicular	54
6. Variables del estudio	56
6.1. Parámetros clínicos periodontales y exploración radiográfica	56
6.2. Variables microbiológicas	61
6.2.1. Calidad y cuantificación de ADN	61
6.2.2. Condiciones experimentales	65
6.2.3. Procedimiento	66
6.2.4. Cálculos	68
6.3. Variables bioquímicas	69
6.3.1. Fundamento	70
6.3.2. Il-1 β , Il-6, TNF- α humano	71
6.3.3. RANK-L humano	73
6.3.4. OPG humano	75
6.3.5. Cálculos	77
6.4 Método estadístico	78
6.4.1. Variables clínicas	78
6.4.2. Variables microbiológicas	80
6.4.3. Variables bioquímicas	81

1. Variables clínicas	85
1.1 Índice de placa	85
1.2 Profundidad de sondaje	87
1.3 Recesión clínica	89
1.4 Nivel de inserción clínica	91
1.5 Sangrado al sondaje	93
1.6 Grado de movilidad dental	95
1.7 Grado de afectación de furca	97
1.8 Volumen de fluido crevicular	99
2. Variables microbiológicas	102
2.1. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	102
2.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Tannerella forsythia</i>	104
2.3. <i>Treponema denticola</i> , <i>Prevotella intermedia</i> y <i>Campylobacter rectus</i>	108
3. Variables bioquímicas	114
3.1. Sustancias proinflamatorias	114
3.1.1. Il-1 β	114
3.1.2. Il-6	115
3.1.3. TNF- α	117
3.2. Sustancias reguladoras del metabolismo óseo	118
3.2.1. RANK-L	118
3.2.2. OPG	120
3.2.3. Cociente RANK-L/OPG	121
4. Valoración de los efectos adversos de la TFD	123

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	123
1. Justificación de la muestra, de la terapia coadyuvante y de los parámetros estudiados	127
2. Limitaciones del estudio	129
3. Evolución de los parámetros en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica	130
3.1. Evolución de los parámetros clínicos en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica	131
3.2. Evolución de los parámetros microbiológicos en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica	134
3.3. Evolución de los parámetros bioquímicos en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica	137
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	143
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

Índice de tablas

Tabla 1: Revisión bibliográfica.	36
Tabla 2: Secuencia de cebadores <i>reverse</i> y <i>forward</i> utilizados para cada bacteria.	65
Tabla 3: Composición del reactivo master mix.	66
Tabla 4: Distribución de frecuencias del índice de placa.	85
Tabla 5: Evolución de la media y la desviación típica del índice de placa según grupo.	86
Tabla 6: Distribución de frecuencias de la profundidad de sondaje (visita 2: <i>screening</i>).	87
Tabla 7: Evolución de la media y la desviación típica de la profundidad de sondaje según grupo .	88
Tabla 8: Distribución de frecuencias de la recesión clínica (visita 2: <i>screening</i>).	89
Tabla 9: Evolución de la media y la desviación típica de la recesión clínica según grupo.	90
Tabla 10: Distribución de la frecuencia del nivel de inserción clínica (visita 2: <i>screening</i>).	91
Tabla 11: Evolución de la media y la desviación típica del nivel de inserción clínica según grupo.	92
Tabla 12: Evolución de la frecuencia del sangrado al sondaje según grupo.	93
Tabla 13: Distribución de la frecuencia del grado de movilidad dental (visita 2: <i>screening</i>).	95
Tabla 14: Evolución de la media y la desviación típica del grado de movilidad dental según grupo.	96
Tabla 15: Distribución de la frecuencia del grado de afectación de furca (visita 2: <i>screening</i>).	97
Tabla 16: Evolución de la media y la desviación típica del grado de afectación de furca según grupo.	98
Tabla 17: Evolución de la media y la desviación típica del volumen de fluido crevicular según grupo.	99

Tabla 18: Evolución de la media y la desviación típica de <i>A. actinomycetemcomitans</i> según grupo.	103
Tabla 19: Evolución de la media y la desviación típica de <i>P. gingivalis</i> según grupo.	105
Tabla 20: Evolución de la media y la desviación típica de <i>T. forsythia</i> según grupo.	106
Tabla 21: Evolución de la media y la desviación típica de <i>T. denticola</i> según grupo.	109
Tabla 22: Evolución de la media y la desviación típica de <i>P. intermedia</i> según grupo.	110
Tabla 23: Evolución de la media y la desviación típica de <i>C. rectus</i> según grupo.	111
Tabla 24: Evolución de la media y la desviación típica de IL-1 β según grupo.	114
Tabla 25: Evolución de la media y la desviación típica de IL-6 según grupo.	116
Tabla 26: Evolución de la media y la desviación típica de TNF- α según grupo.	117
Tabla 27: Evolución de la media y la desviación típica de RANK-L según grupo.	119
Tabla 28: Evolución de la media y la desviación típica de OPG según grupo.	120
Tabla 29: Evolución de la media y la desviación típica del cociente RANK-L/OPG según grupo.	122

Índice de figuras

Figura 1: Esquema del mecanismo de acción de la TFD como agente antimicrobiano.	31
Figura 2: Diagrama de flujo para la estrategia de la búsqueda.	35
Figura 3: Diagrama de flujo a través de las fases del estudio.	46
Figura 4: Cronograma.	51
Figura 5: Condiciones del termociclador (<i>A. actinomycetemcomitans</i>).	66
Figura 6: Curva de amplificación de <i>A. actinomycetemcomitans</i> por <i>Real Time</i> -PCR.	68
Figura 7: Curva estándar (<i>A. actinomycetemcomitans</i>).	69
Figura 8: Curva estándar (IL-1 β).	72
Figura 9: Distribución de la muestra por pacientes y tratamiento.	79
Figura 10: Evolución del índice de placa según tratamiento.	85
Figura 11: Evolución de la media y la desviación típica del índice de placa según tratamiento.	86
Figura 12: Evolución de la media y la desviación típica de la profundidad de sondaje según tratamiento.	89
Figura 13: Evolución de la media y la desviación típica de la recesión clínica según tratamiento.	90
Figura 14: Evolución de la media y la desviación típica del nivel de inserción clínica según tratamiento.	92
Figura 15: Evolución de la media y la desviación típica del sangrado al sondaje según tratamiento.	94
Figura 16: Evolución del grado de movilidad dental según tratamiento	95
Figura 17: Evolución de la media y la desviación típica del grado de movilidad dental según tratamiento.	96
Figura 18: Evolución del grado de afectación de furca según tratamiento.	97
Figura 19: Evolución de la media y la desviación típica del grado de afectación de furca según tratamiento.	98

Figura 20: Evolución de la media y la desviación típica del volumen de fluido crevicular según grupo.	100
Figura 21: Evolución de la media y la desviación típica de <i>A. actinomycetemcomitans</i> según grupo.	104
Figura 22: Evolución de la media y la desviación típica de <i>P. gingivalis</i> según grupo.	107
Figura 23: Evolución de la media y la desviación típica de <i>T. forsythia</i> según grupo.	107
Figura 24: Evolución de la media y la desviación típica de <i>T. denticola</i> según grupo.	112
Figura 25: Evolución de la media y la desviación típica de <i>P. intermedia</i> según grupo.	112
Figura 26: Evolución de la media y la desviación típica de <i>C. rectus</i> según grupo.	113
Figura 27: Evolución de la media y la desviación típica de IL-1 β según grupo.	115
Figura 28: Evolución de la media y la desviación típica de IL-6 según grupo.	116
Figura 29: Evolución de la media y la desviación típica de TNF- α según grupo.	118
Figura 30: Evolución de la media y la desviación típica de RANK-L según grupo.	119
Figura 31: Evolución de la media y la desviación típica de OPG según grupo.	121
Figura 32: Evolución de la media y la desviación típica de cociente RANK-L/OPG según grupo.	122



CAPÍTULO I

Introducción



1. Definición y clasificación de periodontitis crónica

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial que afecta hasta un 30-50% de la población adulta.¹

Se asocia con factores locales relacionados con el acúmulo de placa bacteriana (principal factor etiológico), como el apiñamiento, perlas de esmalte, coronas sobrecontorneadas, etc.² y con enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus, la artritis o la enfermedad cardiovascular.³

Se inicia como una gingivitis, que consiste en una reacción inflamatoria de los tejidos que rodean el diente inducida por las bacterias que residen en la biopelícula de la placa bacteriana en la superficie dental. Si esta inflamación progresa puede causar la pérdida de la adherencia del epitelio de unión y reabsorción ósea, desarrollando bolsas periodontales y consecuentemente la pérdida de inserción periodontal. Mientras que la gingivitis es una lesión reversible con el tratamiento,⁴ la periodontitis crea una lesión tisular irreversible con pérdida de tejidos de inserción⁵ que rara vez pueden ser restaurados con el tratamiento periodontal a su estado original. La periodontitis se clasifica en periodontitis crónica y agresiva. Normalmente la periodontitis crónica, más dependiente de la placa bacteriana, es de progresión lenta con posibilidad de recurrencia⁶ y está relacionada con factores de riesgo como el consumo de tabaco,⁷ la afectación por enfermedades sistémicas,⁸ el estrés emocional⁹ y ciertos polimorfismos genéticos.¹⁰ La periodontitis agresiva es de progresión mucho más rápida, no está tan relacionada con la placa bacteriana, por lo que no responde tan bien como las crónicas al tratamiento periodontal básico. Se suele presentar en individuos más jóvenes y cursa con déficit en la funcionalidad de los polimorfonucleares.¹¹ Esta forma de enfermedad periodontal pese a ser más frecuente en adultos puede ocurrir en un amplio espectro de edades, tanto en la dentición temporal como permanente. La periodontitis crónica puede definirse como localizada o generalizada según

haya menos o más del 30% de sitios afectados en la boca, respectivamente.¹² El grado de severidad de la periodontitis se basa en la pérdida de inserción clínica. Consideramos que es leve cuando hay una pérdida de inserción de entre uno y dos milímetros (mm); moderada entre tres y cuatro mm; y avanzada cuando el valor es igual o superior a los cinco mm.¹³

2. Histopatogenia de las enfermedades periodontales

La supresión de las medidas de higiene oral inducen la aparición progresiva de signos de inflamación gingival. El retorno a las medidas de higiene oral y la eliminación de la placa bacteriana acumulada devuelven la encía a su estado inicial de salud. Estos resultados indican la importancia de la placa como elemento causal de la inflamación gingival.¹⁴

Según los cambios histológicos que se producen en los tejidos periodontales, la enfermedad periodontal se divide en cuatro fases: inicial, temprana, establecida y avanzada.¹⁵ La lesión inicial aparece entre los dos y los cuatro días tras la acumulación de placa bacteriana. Se corresponde con una gingivitis en estado precoz y se caracteriza por un aumento de la permeabilidad vascular con incremento del volumen de fluido crevicular, aumento de leucocitos polimorfonucleares y pérdida de colágeno perivascular.¹⁶ Esta lesión se caracteriza clínicamente por edema, enrojecimiento gingival y sangrado al sondaje. La lesión temprana se desarrolla en los siguientes cuatro a diez días, corresponde a una gingivitis en estado tardío con infiltrado leucocitario y multiplicación de las células basales del epitelio de unión y del surco. Aumentando en consecuencia la profundidad de las crestas epiteliales.¹⁷ La fase de enfermedad periodontal establecida se desarrolla a las dos o tres semanas y se caracteriza por ulceración del epitelio del surco e incremento de células plasmáticas. El periodo de latencia de la enfermedad en esta fase puede ser muy variable, y puede durar incluso años.¹⁵ La pérdida de inserción clínica y ósea

determina el comienzo de la fase avanzada que coincide con el inicio de la periodontitis.¹⁸ En esta fase se produce un aumento en la profundidad de sondaje dando lugar a una bolsa periodontal ya que el epitelio de unión no está adherido a la superficie dental y consecuentemente la placa bacteriana crea un nicho anaerobio cada vez más periodontopatógeno.¹⁹

En resumen, las enfermedades periodontales, en todas sus formas clínicas, son el resultado de la acumulación de microorganismos alrededor del diente y de la subsiguiente estimulación del sistema inmune, que al activar diversos mecanismos de defensa en el intento de detener la infección, cambia el metabolismo de los tejidos periodontales dando como consecuencia final la pérdida de soporte periodontal.²⁰

2.1. Surco periodontal

Durante la erupción dental se establece la unión dentogingival definitiva y se crea el surco periodontal, que es el espacio que rodea el diente y se sitúa entre el epitelio de la encía y la superficie radicular. En condiciones fisiológicas posee una profundidad entre uno y tres mm y constituye un reservorio de microorganismos.²¹ En ausencia de flora bacteriana, el surco periodontal es inexistente¹⁵ por lo que se cree que se origina como consecuencia a la acumulación de microorganismos.

Existen una serie de mecanismos de protección en el surco periodontal que ayudan a mantener la salud de los tejidos periodontales aun habiendo una acumulación constante de bacterias. El primer mecanismo de protección es el fluido crevicular que se origina a partir de la extravasación plasmática y del líquido intersticial. Su principal función es eliminar las bacterias mecánicamente (por lavado) y contribuir a la respuesta inmunitaria mediante su contenido en lisozimas, inmunoglobulinas (IgG, IgA) y neutrófilos polimorfonucleares.²² Un segundo mecanismo es la elevada tasa de renovación de las células epiteliales del surco que contribuye

a la eliminación de los microorganismos por descamación. Además, las células del epitelio son capaces de producir defensinas y citoquinas como interleuquina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α),²³ e IL-6²⁴ como respuesta a la producción de factores virulentos de origen bacteriano como lipopolisacáridos (LPS) y/o ácido lipoteicoico principalmente,²⁵ que mantienen un equilibrio entre las bacterias periodontales y la respuesta inmunitaria del hospedador, constituyendo un tercer mecanismo de protección del surco. Estos mecanismos mantienen una respuesta inmunitaria basal capaz de conservar un periodonto sano.^{26, 27}

2.2. Biopelícula bacteriana periodontal

Las bacterias periodontales residen en biopelículas localizadas sobre los dientes o sobre las superficies epiteliales lo cual provee un medio de cultivo idóneo para su desarrollo.²⁸ Esta organización en biopelículas controla la tasa de crecimiento, producción de toxinas y las propiedades invasivas de las bacterias confiriéndoles una protección eficaz frente a los mecanismos de defensa del hospedador.²⁹

La eliminación de la biopelícula y del cálculo de la raíz dental por desbridamiento mecánico constituyen herramientas útiles tanto en la prevención como en la terapia periodontal.^{30, 31} Sin embargo, el desbridamiento mecánico no es capaz de eliminar la totalidad de las bacterias periodontopatógenas, especialmente las que se encuentran en la luz de bolsas periodontales profundas³² o las localizadas en el interior de los tejidos y células de las bolsas periodontales,^{33, 34} favoreciendo la recolonización bacteriana³⁵ a partir de la placa subgingival no eliminada o a partir de otros reservorios orales.^{35, 36}

El potencial invasivo de algunas bacterias (*Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*)^{37,38} sobre las células epiteliales gingivales y el tejido conectivo subepitelial, su afinidad por introducirse en los túbulos dentinarios y en el cemento radicular expuesto al medio, y las zonas de difícil acceso a la instrumentación como las furcas o concavidades radiculares, limitan la erradicación bacteriana de la bolsa periodontal y por lo tanto influyen en el éxito del tratamiento de desbridamiento mecánico. Por lo tanto, para evitar la recolonización bacteriana son necesarias visitas regulares de mantenimiento periodontal del paciente y el uso de terapias coadyuvantes al desbridamiento mecánico.^{35, 39, 40} El desbridamiento mecánico suele combinarse con la terapia antibiótica, local o sistémica.^{41,42} Sin embargo, la aparición de resistencias bacterianas,⁴³ reacciones alérgicas y la alteración del equilibrio bacteriano pueden limitar sus indicaciones.^{44, 45}

2.3. Mediadores inflamatorios y del metabolismo óseo

La patogenia de la enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio que involucra la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.⁴⁶ La reacción inflamatoria local libera mediadores y citoquinas responsables de la propagación de la inflamación al tejido gingival subyacente mediante la activación de enzimas líticas entre los que cabe destacar las metaloproteasas (MPPs) que, mediante la eliminación de colágeno, producen la destrucción de tejido conjuntivo.^{46, 47} El fallo del encapsulamiento de la inflamación en el tejido gingival implicará la progresión de la inflamación afectando al hueso alveolar adyacente como consecuencia de la estimulación de la osteoclastogénesis.⁴⁸ La regulación del remodelado óseo es un proceso multifactorial complejo cuyo resultado final depende del balance entre factores inhibidores y estimuladores de la osteoclastogénesis. En este sentido, el eje RANK/RANK-L/OPG (Receptor

Activador para el Factor Nuclear κ B / Ligando del Receptor Activador para el Factor Nuclear κ B / Osteoprotegerina) se considera como el principal regulador de la diferenciación y activación de los osteoclastos.⁴⁹

2.3.1. Mediadores del proceso inflamatorio

IL-1: es un polipéptido sintetizado por macrófagos, monocitos, linfocitos, células endoteliales, epiteliales y fibroblastos. Presenta dos isoformas, a y b que se unen al mismo receptor presente en muchos tipos celulares.⁵⁰ La IL-1 aumenta la síntesis de procolágeno I, colagenasa, hialuronato, fibronectina y prostaglandina E2 por los fibroblastos y las células del ligamento periodontal⁵¹ a la vez que induce la síntesis de IL-6.⁵² Incrementa los niveles de MMPs⁵³ y estimula la proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, convirtiéndose en un componente regulador de la homeostasis de los tejidos periodontales. Además IL-1 activa osteoclastos y aumenta la producción de RANK-L por los osteoblastos, ambas acciones conducen al aumento de la reabsorción ósea.⁵⁴

IL-6: es una citoquina de naturaleza proteica, producida por macrófagos, monocitos, células T y B, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales.⁵⁵ La IL-6 induce la maduración de las células B en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. Estimula la síntesis de IL-1 β y TNF- α , amplificando la respuesta inflamatoria, con un aumento consecuente de las MMPs.⁵⁶ La IL-6 estimula la atracción y activación de neutrófilos al tejido periodontal inflamado y favorece la reabsorción ósea mediante la estimulación de osteoclastos⁵⁷ y el incremento de RANK-L por los osteoblastos.⁵⁶

TNF- α : es una proteína de naturaleza peptídica, se secreta principalmente por macrófagos, monocitos, linfocitos B y T, células *natural killer* (NK), así

como células no pertenecientes al sistema inmune como fibroblastos y queratinocitos.⁵⁸ El aumento en la producción de TNF- α aumenta la producción de otras citoquinas proinflamatorias de la inmunidad innata como son la IL-1 β y la IL-6.⁵⁹ Induce la secreción de colagenasa por los fibroblastos, prostaglandina E2 por los macrófagos y la reabsorción ósea por activación directa de los osteoclastos⁶⁰ e indirecta a través de la vía del RANK-L, además de incrementar los niveles de MMPs.⁶¹

En resumen, entre estos mediadores proinflamatorios se producen reacciones cruzadas tendentes a la amplificación de la respuesta inflamatoria.^{59, 62} Los mecanismos son similares en todos los casos e incluyen destrucción de colágeno por activación de metaloproteasas, e incrementos de la reabsorción ósea tanto por acciones directas sobre los osteoclastos como por acciones indirectas mediadas por RANK-L.

Todos estos mediadores de la inflamación se sintetizan en respuesta a los LPS de bacterias periodontales.^{63, 64} Sus niveles se encuentran incrementados en la enfermedad periodontal.⁶⁵⁻⁶⁸ La producción excesiva de sustancias proinflamatorias en el periodonto puede desencadenar daño tisular, mediante la estimulación de los fibroblastos, que a su vez aumentan la producción de otras citoquinas, prostaglandina E2 y del activador del plasminógeno que resulta en la generación de plasmina, activador de varias MMPs de la matriz extracelular. El daño tisular resultante consiste en la destrucción del tejido conectivo y la pérdida de inserción.⁵³ En la actualidad hay acuerdo en considerar que el tratamiento básico periodontal disminuye los niveles de estas sustancias proinflamatorias.⁶⁹⁻⁷²

2.3.2. Mediadores del metabolismo óseo

RANK-L: es una proteína producida por los osteoblastos, células del estroma, linfocitos T,⁷³ linfocitos B⁷⁴ y fibroblastos⁷⁵ en respuesta a

mediadores inflamatorios. Forma parte de la superfamilia de los factores de necrosis tumoral y se expresa como proteína soluble de linfocitos T y B o unida a la membrana de osteoblastos, células estromales y linfocitos T.^{76, 77} Entre los factores estimuladores de esta proteína destacan las interleuquinas, interferones y prostaglandinas.⁷⁷ Su función principal es activar la osteoclastogénesis,⁷⁸ mediante la estimulación, diferenciación y activación de osteoclastos al unirse al receptor transmembrana RANK presente en los preosteoclastos.⁷⁹

OPG: es una proteína soluble producida por los osteoblastos y los linfocitos B⁷³ que regula los niveles de RANK-L. Puesto que RANK-L tiene mayor afinidad de unión por OPG que por RANK, actúa como receptor señuelo modulando la actividad de los osteoclastos y por lo tanto regulando el remodelado óseo.^{79, 80}

El eje RANK/RANK-L/OPG constituye el principal factor regulador de la osteogénesis.⁴⁹ Las concentraciones de RANK-L y OPG determinadas en pacientes periodontales son muy heterogéneas. Se han descrito incrementos de RANK-L manteniendo los niveles de OPG,^{81, 82} disminución de los niveles de OPG, sin modificaciones de los niveles de RANK-L⁴⁸ y aumento de RANK-L acompañado de menores niveles de OPG.⁸³ A pesar de esta variación en los resultados de RANK-L y OPG, en todos ellos el cociente RANK-L/OPG es mayor en individuos con periodontitis que en controles sanos.^{84, 85}

En la mayoría de estudios, el tratamiento periodontal básico no modifica el cociente RANK-L/OPG.^{86, 87} Si bien en un estudio reciente con terapia fotodinámica como coadyuvante al tratamiento periodontal básico se ha descrito una disminución del cociente a las cuatro y ocho semanas del tratamiento.⁸⁸

2.4. Respuesta inmune periodontal

La respuesta inmunitaria se inicia al reconocer componentes bacterianos como LPS, ADN (ácido desoxirribonucleico) bacteriano, peptidoglicanos, etc., mediante los receptores tipo *Toll* (TLRs) de las células residentes (células epiteliales, fibroblastos), leucocitos y fagocitos (neutrófilos y macrófagos) que se encuentran en el periodonto.⁸⁹ Tras la activación de los TLRs se inicia una cascada de señalización intracelular que lleva a la expresión de citoquinas inflamatorias, migración leucocitaria y osteoclastogénesis.⁹⁰

En un tejido gingival clínicamente sano, citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α participan en el mantenimiento y renovación del tejido periodontal.⁵⁰ Las citoquinas son proteínas solubles con función autocrina y paracrina que se unen a receptores específicos de las células diana e inician la señalización intracelular.⁹¹ En un periodonto sano la IL-1 y el TNF- α generan cambios vasculares e inducen la expresión de proteínas de adhesión celular. Las células epiteliales también producen IL-8, citoquina con actividad quimiotáctica para polimorfonucleares. En consecuencia, en el surco periodontal se produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno y enzimas proteolíticas, que son citotóxicos para bacterias, aunque también lo pueden ser para los tejidos periodontales alterando el tejido conectivo adyacente al epitelio de unión.⁹² Además de estos mecanismos inmunitarios innatos, se ha demostrado la participación de linfocitos T-CD4 y B.²⁷ Los linfocitos T-CD4 producen diversas citoquinas como el Interferón gamma (IFN- γ) o la IL-2 que mejoran la actividad de los macrófagos y estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos neutralizantes tipo IgG e IgA⁹³ a la vez que RANK-L.⁹⁴ El resultado de este proceso es una respuesta inmunitaria que controla los microorganismos presentes en el surco periodontal sin signos clínicos inflamatorios detectables por el explorador.

Si la inflamación se cronifica, dañará el tejido del periodonto y producirá

patología periodontal.⁹⁵ La progresión de la inflamación a periodontitis, supone para el sistema inmune del hospedador un reto diferente a la mayoría de las condiciones infecciosas, debido a la diversidad, cantidad, virulencia y disposición de los periodontopatógenos en una compleja biopelícula. La presencia de patógenos periodontales es necesaria pero no suficiente para iniciar los mecanismos que producen la enfermedad periodontal, la respuesta del hospedador juega un papel importante tanto en la protección como en la destrucción periodontal.⁹⁶ La respuesta inmunoinflamatoria en la periodontitis se caracteriza por la infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, y por la gran concentración de citoquinas, eicosanoides y MMPs.⁹¹ Un aumento de TNF- α en el fluido crevicular y el tejido periodontal dañado, se relaciona con un aumento de los niveles de MMPs y RANK-L, y por lo tanto con la destrucción de tejido conectivo y hueso alveolar. Además la TNF- α aumenta la producción de la IL-1 β e IL-6, citoquinas proinflamatorias asociadas a la migración celular inflamatoria y a la osteoclastogénesis.⁶¹

Como protección, la respuesta inmunitaria del hospedador incrementa la producción de IL-10 e IL-4, citoquinas antiinflamatorias que interfieren en la producción de sustancias proinflamatorias,^{97, 98} modulando la destrucción del colágeno gingival por las MMPs⁹⁹ y disminuyendo la reabsorción ósea al incrementar OPG.^{100, 101} Recientemente se ha propuesto la participación de las células T reguladoras (T-reg) como una protección más del ambiente periodontal a través de mecanismos similares a los descritos para las interleuquinas IL-10 e IL-4.^{102, 103} Por otra parte, el incremento de eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos) en la respuesta inflamatoria también es responsable de inducir la producción de mediadores con actividad antiinflamatoria (lipoxinas, resolvinas y protectinas).¹⁰⁴

En conjunto estos mecanismos dependientes del hospedador, van encaminados a limitar la cantidad de leucocitos, disminuir la vasodilatación y la permeabilidad vascular, limitando la progresión del proceso inflamatorio

y por consiguiente moderando la progresión de la periodontitis.¹⁰⁴

El fallo de los mecanismos de protección descritos implica la progresión de la inflamación causando la pérdida del epitelio de unión en el surco y reabsorción ósea, desarrollando bolsas periodontales y consecuentemente degenerando en una periodontitis.

La presencia de antígenos bacterianos en la cavidad oral en la periodontitis es capaz de activar tanto linfocitos T *helper* 1 (Th1) como Th2. Los Th1 participan en la inmunidad celular y liberan sustancias proinflamatorias mientras que los Th2 son responsables de la inmunidad humoral y se asocian con citoquinas antiinflamatorias.¹⁰⁵ La citoquina proinflamatoria relacionada con Th1 es el IFN- γ , principal citoquina activadora de la fagocitosis que a su vez se asocia con la producción de TNF- α e IL-1.^{106, 107} Además, el IFN- γ estimula la formación de osteoclastos y la pérdida ósea mediante la atracción quimiotáctica de células RANK-L y la activación de las células T dirigidas por antígeno.¹⁰⁷ La citoquina antiinflamatoria relacionada con Th2 es la IL-4 que junto a la IL-6 contribuye a la diferenciación de las células B y a la producción de anticuerpos, contra los componentes de los tejidos periodontales como el colágeno.^{108, 109}

Posteriormente se han descrito dos nuevas subdivisiones de T-CD4, denominadas Th17 y T-reg, que presentan un papel antagonista, ya que los primeros son efectores y los segundos supresores.¹⁰⁶ Los linfocitos Th17 se consideran osteoclastogénicos,¹¹⁰ porque producen IL-17, que induce la producción de RANK-L y por lo tanto está involucrada en la destrucción ósea,¹¹¹ además de movilizar a macrófagos y neutrófilos contra patógenos intra o extracelulares.¹¹² Las células Th17 también producen otras interleuquinas como la IL-6 y aumentan los niveles de IL-1 β y TNF- α , amplificando la inflamación en la lesión periodontal y aumentando la expresión de MMPs y RANK-L.⁵⁶ Las células T-reg participan como una protección más del ambiente periodontal incrementando los niveles de IL-10 que actúan como antiinflamatorio.^{102, 103}

3. Tratamiento periodontal

Todo tratamiento periodontal debe ir encaminado a disminuir la carga bacteriana presente en la biopelícula. El tratamiento básico de la periodontitis implica la destrucción mecánica de la biopelícula mediante raspado y alisado radicular (RAR)^{36,113} para obtener una superficie radicular óptima y conseguir una inserción sana.⁴⁰ El resultado clínico depende de la destreza del operador, de la respuesta inmunitaria del paciente y de la higiene oral. Tras el tratamiento básico periodontal y una correcta higiene oral, se observa una mejoría significativa en los parámetros clínicos que se correlaciona con una reducción de la inflamación que permite la cicatrización de los tejidos periodontales.²⁰ Aunque el RAR sea el método más usado para controlar la progresión de la enfermedad periodontal, se pueden producir recolonizaciones del surco periodontal si el paciente no mantiene una correcta higiene oral o si se mantienen bolsas periodontales profundas difíciles de controlar. En estos casos es necesario un tratamiento de mantenimiento periodontal regular del paciente y el uso de terapias coadyuvantes al RAR.^{35,39}

4. Terapias coadyuvantes

Se han desarrollado numerosas estrategias terapéuticas coadyuvantes al RAR para el tratamiento de la enfermedad periodontal dirigidas todas ellas a la erradicación de los patógenos periodontales,¹¹⁴ entre las que se incluyen:

- Antisépticos en todas sus modalidades: pastas dentífricas, colutorios¹¹⁵ y aplicación en el interior de la bolsa periodontal¹¹⁶
- Antibióticos tanto a nivel sistémico¹¹⁷ como local¹¹⁸
- Probióticos sistémicos¹¹⁹ o locales¹²⁰
- Agentes antiinflamatorios, como los no esteroides (AINEs)¹²¹

- Inhibidores de interleuquinas, metaloproteinasas y RANK-L¹²²
- Láser¹²³
- Terapia fotodinámica (TFD)¹²⁴

5. Terapia fotodinámica

El uso de la TFD como agente antimicrobiano no es novedoso. Aunque se conoce desde hace más de un siglo los efectos letales del hidrocloreuro de acridina y la luz visible sobre la *Paramecia caudatum*,¹²⁵ su aplicación en el tratamiento de enfermedades infecciosas no se desarrolló debido al descubrimiento de los antibióticos. Posteriormente se reintrodujo la terapia fotodinámica en el tratamiento de lesiones virales¹²⁶ y en distintos procesos infecciosos¹²⁷ aunque los avances en el campo de la medicina han sido muy lentos.

En la actualidad, debido al aumento progresivo de la resistencia a los antibióticos, se ha renovado el interés por las terapias antimicrobianas como la TFD. La terapia fotodinámica además de no crear resistencias,¹²⁸ es efectiva en la eliminación de bacterias resistentes a fármacos,¹²⁹ sobre todo de las bacterias Gram positivas.¹²⁷ La membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas está rodeada por una capa porosa de ácido lipoteicoico, peptidoglicano que permite que el fotosensibilizante atraviese la membrana.¹³⁰ En cambio la membrana externa de las bacterias Gram negativas forma una barrera eficaz que restringe la penetración de muchos fotosensibilizantes.¹³¹

En el ámbito odontológico la TFD se ha utilizado para la esterilización de conductos radiculares,¹³² como prevención de la caries,¹³³ en el tratamiento de la periimplantitis¹³⁴ o para tratar la candidiasis oral¹²⁵ y además está siendo usada en el tratamiento de la periodontitis.¹³⁵

5.1. Fundamento y mecanismo de acción

La TFD como agente antimicrobiano se basa en el concepto de que un agente fotosensibilizador activado por la luz de una adecuada longitud de onda en presencia de oxígeno, genera oxígeno singlete y radicales libres que son citotóxicos para los microorganismos.¹²⁵ Se utiliza un láser de baja intensidad de 1-500 milivatios (mw) y 600-1000 nanómetros (nm) junto con un agente fotosensibilizador en forma de gel tópico, como el azul de toluidina o de metileno,¹³⁶ que se une a una célula diana.

La fuente de luz estimula al agente fotosensibilizante en un ambiente rico en oxígeno, lo que origina un estado excitado que, a su vez, entrega energía a las moléculas de oxígeno presentes en estado basal, convirtiéndolas en radicales libres y oxígeno singlete tóxico, ambos compuestos inducen daño celular (citotoxicidad) y destrucción selectiva de las células diana. El fotosensibilizador activado puede reaccionar con las biomoléculas circundantes por dos vías¹³⁷ (Figura 1):

1. La primera vía produce radicales libres, mediante una reacción de transferencia de electrones entre el fotosensibilizador activado y las moléculas de las células de alrededor. Estos radicales libres interactúan con moléculas de oxígeno produciendo especies reactivas del oxígeno (ROS), como superóxidos, hidroxilos y peróxido de hidrógeno, que dañan la integridad de las membranas celulares bacterianas causando alteraciones biológicas irreversibles como daño en el ADN por aceleración de la apoptosis celular, oxidación de proteínas y de ácidos grasos.^{138, 139}

2. La segunda vía genera oxígeno singlete (1O_2). La gran reactividad del oxígeno singlete le permite interactuar con un gran número de sustancias biológicas, desencadenando reacciones oxidativas que afectan a las membranas celulares produciendo efectos letales en las bacterias.^{138, 139}

Al parecer esta segunda vía es mayoritariamente responsable de los efectos citotóxicos de la TFD.¹⁴⁰ El hecho de que la vida media del oxígeno

singlete es muy corta, menor de 0,4 milisegundos (ms) y su radio de acción de 0,02 micrómetros (μm) muy limitado, repercute en una mayor selectividad del tratamiento.¹

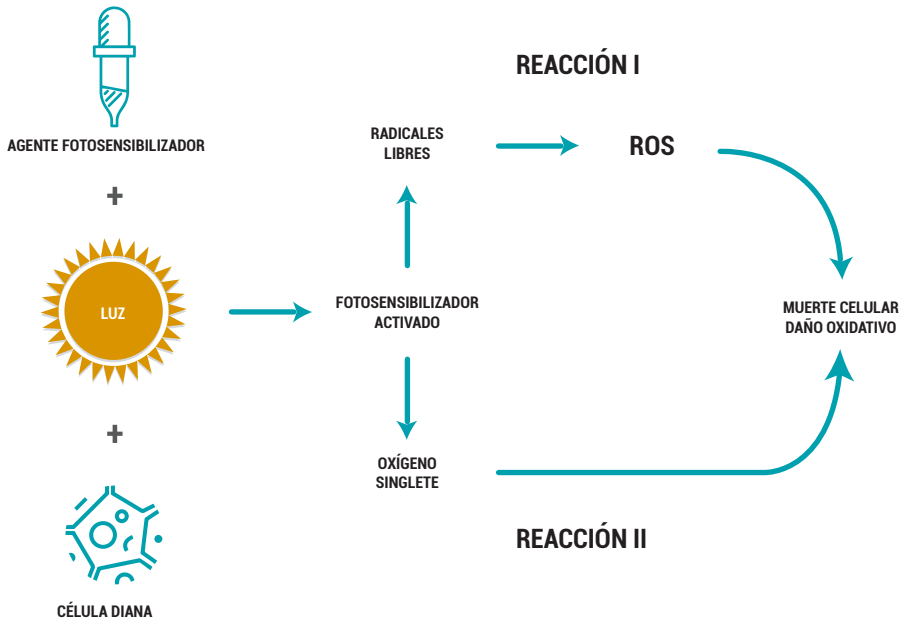


Figura 1: Esquema del mecanismo de acción de la TFD como agente antimicrobiano.

5.1.1. Agente fotosensibilizador

Los fotosensibilizadores más empleados son el azul de toluidina O, el azul de metileno, la eritrosina, la clorina e6 y la hematoporfirina. Por lo general, el azul de toluidina O y el azul de metileno son los fotosensibilizadores de referencia en el tratamiento de la periodontitis y la periimplantitis.¹⁴¹ Ambos colorantes poseen características químicas y fisicoquímicas similares y han demostrado su seguridad¹⁴² y efectividad en la inactivación de bacterias periodontales patógenas Gram positivas y Gram negativas.¹⁴³

5.1.2. Láser

La activación de fotosensibilizadores se ha realizado mediante el uso de distintos tipos de láser como fuentes de luz. En este sentido, se han utilizado el láser de helio-neón (633 nm), el láser diodo de galio-arsénico-aluminio (630 a 690 o 830 a 906 nm) y el láser de argón (488 a 514 nm).¹⁴¹

Son necesarios más estudios para dilucidar cuáles son las combinaciones óptimas de láser (longitud de onda, duración de la aplicación) y fotosensibilizante (concentración adecuada) para obtener una mayor efectividad en el tratamiento.

5.2. Terapia fotodinámica y periodontitis

Diversos factores como la susceptibilidad bacteriana o el epitelio gingival, pueden modificar la efectividad del tratamiento de la TFD en la periodontitis.

La susceptibilidad a la destrucción de bacterias por la terapia fotodinámica es diferente entre las especies Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la fotoinactivación que las bacterias Gram negativas debido a la mayor complejidad de su membrana externa que dificulta el acceso del agente fotosensibilizador a los sitios diana internos.¹⁴⁴ Sin embargo, la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas puede mejorarse bien, modificando la permeabilidad de su membrana celular, o bien mejorando la captación selectiva del agente fotosensibilizante por las bacterias. En el primer caso, la unión del agente fotosensibilizador a una molécula policatiónica (poli-L-lisina-cloro, polimixina B nonapéptido) o el uso conjunto con agentes tensioactivos como el tris-EDTA (tris-ácido atilendiaminotetraacético), desorganiza la estructura de la membrana celular incrementando su permeabilidad.¹⁴⁵ Otra posibilidad consiste en la conjugación del agente fotosensibilizador

a anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos de superficie celular específicos.¹⁴⁶ En el segundo caso, la captación selectiva del agente fotosensibilizante por las bacterias se puede mejorar mediante la conjugación con diversos péptidos. En este sentido, el conjugado de poli-L-lisina (pL)-cloro e6 destruye la *Porphyromonas gingivalis* sin afectar la viabilidad de las células epiteliales.¹⁴⁷

Otro factor consiste en el propio epitelio del área dentogingival que, si bien actúa como una barrera primaria para la invasión de estímulos nocivos, también puede actuar como una barrera para la penetración de los agentes fotosensibilizadores. Sin embargo, el epitelio del surco muestra una mayor penetración debido a su falta de queratinización.¹⁴⁸

Respecto a los beneficios que aporta la terapia fotodinámica como tratamiento coadyuvante en la periodontitis, los resultados descritos en la actualidad no son concluyentes. En varios ensayos clínicos se describe que la TFD induce una mejoría de los parámetros clínicos de profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica y sangrado al sondaje.^{124,135,149-151} En cambio otros estudios no observan diferencias entre los grupos test y control.¹⁵²⁻¹⁵⁶ En cuanto al impacto de la TFD sobre parámetros bacterianos Theodoro et al.,¹⁵³ obtuvieron una disminución significativa del porcentaje de sitios positivos para bacterias periodontopatógenas, pero la mayoría de estudios aleatorios controlados han obtenido resultados negativos al comparar grupo test y control.^{152,156-158} Por último respecto a los parámetros bioquímicos también existen estudios que han obtenido resultados favorables en el grupo test^{151,155} y otros como el de Gómez et al.¹⁵⁸ que no obtuvieron diferencias entre los grupos.

En el apartado siguiente se recoge una relación pormenorizada de los distintos estudios referentes a la terapia fotodinámica que existen en la bibliografía científica revisada y que guardan una estrecha relación con el desarrollo de nuestro estudio.

6. Antecedentes bibliográficos

Los resultados se han obtenido de las siguientes bases de datos: EMBASE, MEDLINE y COCHRANE LIBRARY y han sido publicados entre 2001 y 2015 y corresponden a ensayos clínicos aleatorizados y controlados.

Como términos de búsqueda se han utilizado: *“diodo laser AND periodontal therapy” OR “diodo laser AND periodontitis” OR “diodo laser AND periodontology” OR “photodynamic therapy AND periodontal therapy” OR “photodynamic therapy AND periodontitis” OR “photodynamic therapy AND periodontology”*.

6.1. Criterios de inclusión

- Estudios clínicos controlados aleatorizados que comparan la TFD más tratamiento periodontal no quirúrgico con RAR.
- Estudios en humanos mayores de 18 años, sanos sistémicamente, no fumadores y que presenten periodontitis crónica.
- Duración mínima del estudio de 4 semanas.
- Variable primaria: nivel de inserción clínica.
- Variables secundarias (debía presentar una o más de estas): profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, recesión clínica, índice de placa, cambios microbiológicos y bioquímicos.

6.2. Resultados

El total de estudios identificados fue de 244, se buscaron artículos potenciales por título o resumen. Se excluyeron 132 por no cumplir los criterios de inclusión y quedaron 112. Al realizar la búsqueda del texto completo se excluyeron 97 estudios y quedaron finalmente 15 (Figura 2).

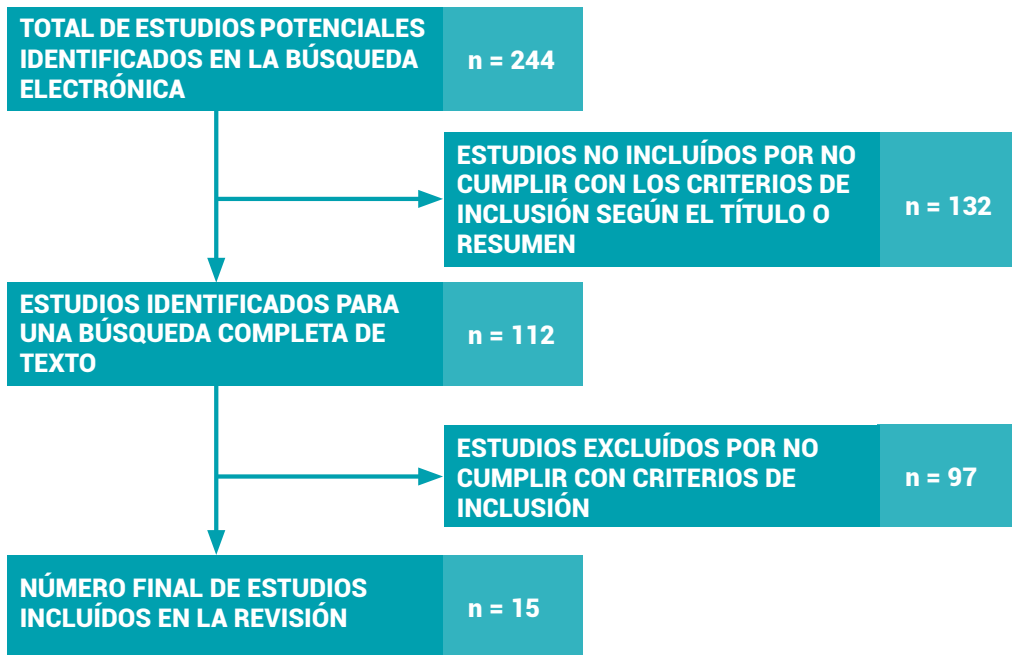


Figura 2: Diagrama de flujo para la estrategia de la búsqueda bibliográfica.

La tabla 1 recoge las principales características de cada estudio y su resultado en lo referente a la mejoría de los parámetros clínicos, microbiológicos y bioquímicos para el grupo de estudio que utiliza TFD como coadyuvante.

6.3. Siglas

- **ECA:** ensayo controlado aleatorizado
- **IHO:** instrucciones de higiene oral
- **λ :** longitud de onda
- **nm:** nanómetro; **mw:** milivatio
- **Cloruro de fenazationio:** Azul de metileno
- **PS:** profundidad de sondaje periodontal
- **CAL:** nivel de inserción clínica
- **Cloruro de Tolonio:** Azul de toluidina
- **SAS:** sangrado al sondaje
- **Er.Yag:** acrónimo del inglés *erbium-doped yttrium aluminium garnet*
- **TSP:** terapia de soporte periodontal
- **PTF:** (potasio-titanilo-fosfato)

Tabla 1: Revisión bibliográfica.

AUTOR y AÑO	nº PACIENTES	DURACIÓN	DISEÑO DEL ESTUDIO
YILMAZ et al. (2002) ¹⁵²	10	32 días	ECA: boca partida (4 cuadrantes) 1-RAR, 2-TFD, 3-RAR + TFD, 4-IHO
ANDERSEN et al. (2007) ¹	33	3 meses	ECA: grupos paralelos 1-TFD, 2-RAR, 3-RAR + TFD
CHRISTODOULIDES et al. (2008) ¹⁵⁷	24	6 meses	ECA: grupos paralelos 1-RAR + TFD, 2-RAR
BRAUN et al. (2008) ¹³⁵	20	3 meses	ECA: boca partida 1-RAR y 2-RAR + TFD
SIGUSCH et al. (2010) ¹⁵⁹	24	3 meses	ECA: grupos paralelos. RAR+ Cloruro de fenazonio 1- sin láser y 2- con láser
GÓMEZ et al. (2011) ¹⁵⁸	45	2 meses	ECA: grupos paralelos. 1-RAR, 2-RAR + TFD y 3-RAR+Er:YAG
THEODORO et al. (2012) ¹⁵³	33	6 meses	ECA: boca partida. 1-RAR, 2-RAR + Cloruro de tolonio y 3- RAR + TFD.
BERAKDAR et al. (2012) ¹⁶⁰	22	6 meses	ECA: boca partida (2 dientes). 1-RAR y 2-RAR + TFD
CAMPOS et al. (2013) ¹⁴⁹	13	3 meses	ECA: boca partida (TSP) 1-RAR y 2-RAR + TFD
DILSIZ et al. (2013) ¹⁵⁴	24	6 meses	ECA: boca partida 1-RAR, 2-RAR + TFD y 3- RAR + PTF
ALWAEI et al. (2013) ¹⁵⁰	16	12 meses	ECA: boca partida. 1-RAR, 2-RAR + TFD
POURABBAS et al. (2014) ¹⁵⁵	22	3 meses	ECA: boca partida. 1-RAR, 2-RAR + TFD
FRANCO et al. (2014) ¹⁵¹	15	3 meses	ECA: boca partida. 1-RAR, 2-RAR + TFD
BETSY et al. (2014) ¹²⁴	88	6 meses	ECA: grupos paralelos. 1-RAR, 2-RAR + TFD
CARVALHO et al. (2015) ¹⁵⁶	34	12 meses	ECA: grupos paralelos (TSP). 1-RAR, 2-RAR + TFD

λ Y POTENCIA DEL LÁSER	FOTOSENSIBILIZANTE	PARÁMETROS CLÍNICOS	PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS
685 nm 30 mW (6 aplicaciones)	Cloruro de fenazationio (enjuague)	NO	NO	-----
670 nm 150mW (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	PS, CAL resto NO	-----	-----
670 nm 75mW (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	SAS resto NO	NO	-----
660 nm 100mW (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	SI recesiones NO	-----	-----
660 nm 60mW/cm ² (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	SI recesiones NO	-----	-----
670 nm 200mW (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	NO	NO (cultivo microbiológico)	NO
660nm 30 mW (1 aplicación)	Cloruro de tolonio (irrigación de la bolsa)	NO	SI	-----
670 nm 150mW (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	PS resto NO	-----	-----
660 nm 60mW (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	SI	-----	-----
808 nm 100mW (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	NO	-----	-----
660 nm 100 mW (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	SI	-----	-----
638 nm 8-10 J/cm ² (1 aplicación)	Cloruro de tolonio (irrigación de la bolsa)	NO	-----	TNF- α resto NO
660 nm 60mW/ cm ² (4 aplicaciones)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	SAS resto NO	-----	OPG resto NO. (histología, PCR)
655 nm 1 w (1 aplicación)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	PS, CAL resto NO	-----	-----
660 nm 40mW (4 aplicaciones)	Cloruro de fenazationio (irrigación de la bolsa)	NO	NO	-----

La heterogeneidad en la metodología utilizada en cada estudio: número de pacientes, duración y diseño del estudio, parámetros del láser de diodos (longitud de onda y potencia, tipo de agente fotosensibilizante y número de aplicaciones de la TFD), puede ser el motivo por el que los resultados no sean concluyentes en cuanto a la mejora que pueda aportar la terapia fotodinámica en el tratamiento de la periodontitis.

CAPÍTULO II

Justificación y objetivos



Justificación y objetivos

El patrón de oro del tratamiento básico periodontal, sigue siendo el raspado y alisado radicular consistente en la eliminación mecánica de la placa y del cálculo de la superficie dental para obtener una superficie radicular biológicamente compatible con una nueva inserción.⁴⁰ Cuando los resultados obtenidos no son los deseados, se recurre a la cirugía periodontal.

Existen tratamientos coadyuvantes que mejoran los resultados del tratamiento básico periodontal evitando, en ocasiones, la cirugía periodontal. Aunque el más extendido es el uso de antibióticos sistémicos, la existencia de resistencias y efectos adversos, ha promovido la búsqueda de terapias antimicrobianas alternativas.

A pesar de que una de las terapias alternativas que se plantea en la actualidad es la terapia fotodinámica, no hay un acuerdo sobre cuáles son las características técnicas (agente fotosensibilizante a utilizar y en qué concentración; características del láser y elección de la longitud de onda o el tiempo de aplicación) que conduzcan a una mayor efectividad en el tratamiento. Como consecuencia, los resultados obtenidos en distintos estudios no presentan homogeneidad. Por lo tanto son necesarios más estudios que verifiquen la utilidad de la TFD como un tratamiento coadyuvante efectivo, que obtenga beneficios adicionales significativos.

En este sentido se ha planteado como objetivo general de este trabajo el estudio del efecto adicional de la terapia fotodinámica en el tratamiento básico de la periodontitis crónica. Los objetivos concretos que hemos planteado son los siguientes:

1. Evaluar los cambios que se producen en los parámetros clínicos periodontales.

1.1. Índice de placa

- 1.2. Profundidad de sondaje
- 1.3. Recesión clínica
- 1.4. Nivel de inserción clínica
- 1.5. Sangrado al sondaje
- 1.6. Grado de movilidad dental
- 1.7. Grado de afectación de la furca
- 1.8. Volumen de fluido crevicular

2. Evaluar los cambios que se producen en la expresión génica de bacterias periodontopatógenas.

- 2.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
(*A. actinomycetemcomitans*)
- 2.2. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)
- 2.3. *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*)
- 2.4. *Treponema denticola* (*T. denticola*)
- 2.5. *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)
- 2.6. *Campylobacter rectus* (*C. rectus*)

3. Evaluar los cambios que se producen en los parámetros bioquímicos.

- 3.1. Sustancias proinflamatorias:
 - 3.1.1. IL-1 β
 - 3.1.2. IL-6
 - 3.1.3. TNF- α
- 3.2. Sustancias reguladoras del metabolismo óseo:
 - 3.2.1. RANK-L
 - 3.2.2. OPG
 - 3.2.3. Cociente RANK-L / OPG

CAPÍTULO III

Material y métodos



1. Población de estudio

Este estudio se realizó mediante la toma de parámetros clínicos periodontales y de muestras de fluido crevicular procedentes de pacientes odontológicos reclutados en el servicio de Periodoncia de la Clínica Odontológica "Fundación Lluís Alcanyís" de la Universidad de Valencia durante el período comprendido entre septiembre 2011 y diciembre 2012. El estudio finalizó en julio 2013. Los pacientes fueron diagnosticados de periodontitis crónica moderada-avanzada¹² y cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión (*Clinical-Trials.gov ID*: NCT01532674). El protocolo se realizó en completo acuerdo con los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki de 1975, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. Este protocolo (VAL-11-01) fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación con muestras humanas de la Universidad de Valencia.

De un total de 60 pacientes, 40 diagnosticados con periodontitis crónica moderada-avanzada fueron divididos en dos grupos de estudio de 20 individuos según el tratamiento al que iban a ser sometidos. El grupo RAR correspondía a 20 pacientes con periodontitis crónica moderada-avanzada generalizada que recibirían el tratamiento periodontal básico consistente en raspado y alisado radicular. El grupo RAR+TFD correspondía a los otros 20 pacientes con periodontitis crónica moderada-avanzada generalizada que recibirían el tratamiento periodontal básico más la aplicación de terapia fotodinámica. La figura 3 recoge el diagrama de flujo a través de las fases del estudio. Los 20 restantes correspondían a individuos sanos sistémica y periodontalmente, reclutados en el mismo servicio en el transcurso de una revisión periodontal rutinaria. Este grupo se ha considerado como

grupo control. El diseño del proyecto corresponde a un estudio controlado aleatorizado simple ciego y cuenta con el consentimiento informado de todos los pacientes que intervinieron.

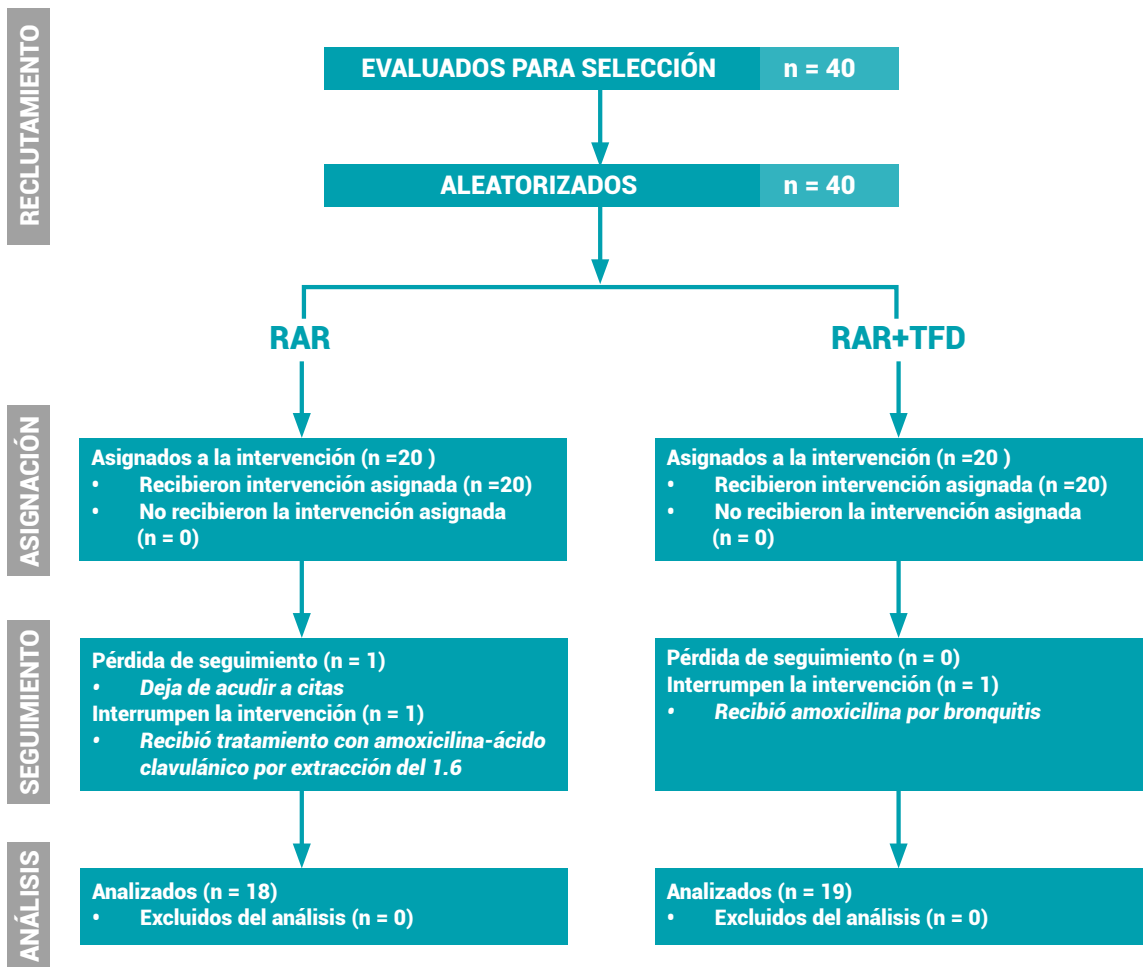


Figura 3: Diagrama de flujo a través de las fases del estudio.

2. Criterios de inclusión y exclusión

Los datos de los criterios de inclusión y exclusión se obtuvieron de la historia médica y bucal del paciente así como de la exploración periodontal.

Todos los pacientes se sometieron a un estudio radiológico previo al tratamiento para determinar la existencia de pérdida ósea presente en la periodontitis y el patrón de pérdida característico de la periodontitis crónica.¹⁶¹ La exploración radiológica se realizó como método auxiliar al examen clínico y no como sustitutivo de este.

Se consideraron como criterios de inclusión:

1. Paciente adulto diagnosticado de periodontitis crónica moderada o avanzada basado en el "Sistema de Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales".¹² El paciente debía presentar una afectación periodontal de al menos el 30% y una pérdida de inserción clínica igual o superior a tres mm (moderada = tres-cuatro mm, avanzada \geq cinco mm).

2. Paciente con cuatro o más bolsas periodontales con una profundidad de sondaje \geq cinco mm y sangrado al sondaje en al menos dos cuadrantes de la boca.

3. Paciente con al menos 18 dientes totalmente erupcionados y con un mínimo de tres dientes en cada cuadrante, de los cuales al menos uno ha de ser un diente posterior.

4. Paciente dispuesto a seguir las directrices del estudio y que adquiriera el compromiso de la continuidad del tratamiento.

Se consideraron como criterios de exclusión:

1. Paciente embarazada o en período de lactancia.

2. Paciente fumador.

3. Paciente con enfermedades tumorales o crónicas con manifestaciones concomitantes orales que pudieran interferir en el estudio.

4. Paciente con medicación pautada que pudiera interferir con la evaluación.

5. Paciente que presentase enfermedades bucales como absceso

periapical activo, absceso periodontal o historia de gingivitis necrosante aguda ulcerativa entre otras.

6. Paciente sometido a antibioticoterapia en los tres meses previos al estudio o durante el mismo, medicación fotosensibilizante, antisépticos o terapia anticoagulante.

7. Paciente con alergia a los componentes utilizados en los tratamientos.

8. Paciente que haya recibido tratamiento periodontal en los últimos seis meses.

9. Paciente con índice de placa de Løe y Silness (código dos), en más de un 30 % de los dientes.¹⁶²

3. Protocolo de estudio

El protocolo de estudio que se estableció constaba de ocho visitas para cada paciente periodontal, distribuidas a lo largo de un período de 175 días. Los pacientes requerían de tratamiento periodontal básico que se les realizaba mediante raspado y alisado radicular. En las visitas en las que el paciente recibía terapia fotodinámica, se aplicaba siguiendo las instrucciones del fabricante (Periowave™ HHL-1000 *Handheld Photodisinfection system*, Ondine Biomedical Inc.). El cronograma que se siguió se describe a continuación.

Visita 1: Visita *Pre-screening* (-30 días antes del tratamiento)

Una vez recogidos los datos demográficos y de la historia clínica del paciente, se realizaba la exploración periodontal y se analizaba el cumplimiento de los criterios de inclusión en el estudio. Tras informar detalladamente al paciente y la obtención del consentimiento informado,

el paciente quedaba incluido en el estudio. La exploración periodontal se realizaba mediante la elaboración de un periodontograma, en el que se recogían datos de: dientes perdidos, índice de placa, profundidad de sondaje, recesión clínica, nivel de inserción clínica, sangrado al sondaje, grado de afectación de furcas, dientes con movilidad, frémito y dientes pilares para prótesis removible o fija. Se completaba con un examen oral de tejidos blandos, presencia de restos radiculares, quistes y otras alteraciones.

Visita 2: Visita *screening* (-1 semana +/- 3 días antes del tratamiento)

Se realizaba la exploración radiológica para valorar la pérdida de inserción ósea, completando con ello el diagnóstico de periodontitis crónica moderada-avanzada. Puesto que el estudio se planteaba como un simple ciego, en esta visita se repetía el periodontograma por el examinador ciego.

Visita 3: Visita del primer tratamiento periodontal (RAR del 1^{er} y 4^o cuadrante, Semana 0)

Se realizaba la toma de muestras de fluido crevicular de los cuatro cuadrantes antes del inicio del tratamiento. A continuación y tras anestesia local, se realizaba el primer tratamiento periodontal consistente en el raspado y alisado radicular de dos cuadrantes (primero y cuarto) en todos los pacientes con periodontitis. Los pacientes recibían instrucciones sobre la técnica de cepillado y el uso de medidas de higiene interproximal.

Visita 4: Visita del segundo tratamiento periodontal (RAR del 2^o y 3^{er} cuadrante, Semana 0+24 horas) y aleatorización simple

Se continuaba con el tratamiento de raspado y alisado radicular de los otros dos cuadrantes (segundo y tercero) y se reforzaban las instrucciones

para mantener una higiene oral óptima. Personal externo al estudio llevaba a cabo la aleatorización del paciente asignándole el grupo de tratamiento (RAR, o RAR+TFD). Si el paciente entraba en el grupo RAR, se le citaba a las cinco semanas para la evaluación del tratamiento. Si el paciente queda incluido en el grupo RAR+TFD, se le citaba a la semana siguiente para recibir el tratamiento coadyuvante de TFD y posteriormente a las cinco semanas para evaluar el tratamiento.

Visita 5: TFD-1 (Semana 1 +/- 3 días)

Esta visita la recibían únicamente los pacientes del grupo RAR+TFD. Se procedía al tratamiento con TFD durante 60 segundos en cada una de las bolsas periodontales que, según el periodontograma realizado en la segunda visita, presentaban una profundidad de sondaje \geq cinco mm conjuntamente con sangrado.

Visita 6: Evaluación del tratamiento + TFD-2 (Semana 5 +/- 7 días)

Se procedía a la obtención de las muestras de fluido crevicular en las mismas localizaciones donde se tomaron las primeras (visita 3). A continuación se realizaba un periodontograma de seguimiento por el explorador ciego. A los pacientes del grupo RAR+TFD, se les aplicaba la segunda sesión de TFD (60 segundos por bolsa periodontal que presentaba una profundidad de sondaje \geq a 5 mm con o sin sangrado). En el caso de que existiera sangrado en las bolsas periodontales, la segunda sesión de TFD se posponía un periodo que oscilaba entre uno y siete días puesto que el sangrado disminuye la eficacia del tratamiento de la TFD al desplazar el agente fotosensibilizante fuera de la bolsa periodontal. A los pacientes del grupo RAR no se les realizaba ninguna maniobra. En todos los casos se reforzaban las instrucciones a los pacientes para mantener una higiene oral óptima.

Visita 7: Terapia periodontal de soporte +TFD-3(Semana 13 +/- 10 días)

Se procedía de nuevo a la toma de muestras de fluido crevicular y a la realización de un nuevo periodontograma de seguimiento por el examinador ciego. En este caso se realizaba la terapia periodontal de soporte para los pacientes del grupo RAR o terapia periodontal de soporte conjuntamente con terapia fotodinámica (60 segundos por bolsa periodontal que presentaba una profundidad de sondaje \geq a 5 mm con o sin sangrado), para pacientes del grupo RAR+TFD. De nuevo, para todos los pacientes se reforzaban las instrucciones para mantener una higiene oral óptima.

Visita 8: Terapia periodontal de soporte (Semana 25 +/- 10 días)

Se procedía de igual forma que la descrita en la visita siete pero no se aplicaba el tratamiento de TFD.

La figura 4 recoge un cronograma del protocolo de actuación.

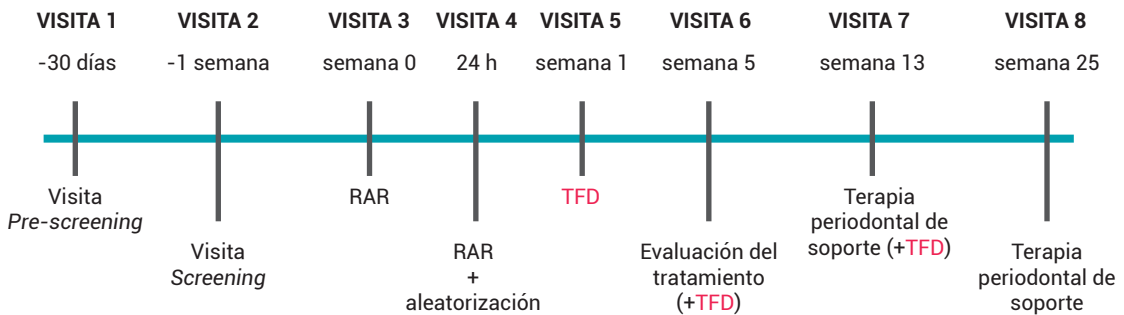


Figura 4: Cronograma.

Sujetos control (Sanos)

Paralelamente se realizó un estudio en pacientes sanos sistémicamente que no presentaban signos periodontales patológicos. Se tomaron muestras de fluido crevicular para la determinación de las variables bioquímicas y microbiológicas, en una sola ocasión.

Calibración del examinador y cegamiento

Todos los parámetros clínicos se recogieron por un único examinador, calibrado y ciego al tipo de tratamiento recibido por el paciente. La calibración se llevó a cabo en dos sesiones separadas 24 horas sobre cinco pacientes no relacionados con el estudio. En estas visitas se duplicaron mediciones de nivel de inserción clínica, profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, recesión clínica e índice de placa. La calibración fue aceptada si el porcentaje de coincidencias entre las mediciones tomadas al inicio y a las 24 horas era mayor del 95% con un margen de error en las mediciones lineales de ± 1 mm.

4. Metodología del tratamiento periodontal

4.1. Raspado y alisado radicular

El raspado y alisado radicular es una maniobra que se realiza para la eliminación de la placa y del cálculo supra y subgingival. Se realiza mediante el uso conjunto de ultrasonidos y curetas. Un único operador (independiente del explorador ciego) realizaba el RAR a todos los pacientes con independencia del grupo en el que iban a ser incluidos. Cada procedimiento se llevaba a cabo bajo anestesia local Ultracain® (Articaína hidrocloreuro con epinefrina 40/0,01 miligramos/mililitros (mg/ml), Normon®, Madrid, España).

Los materiales utilizados fueron:

- SONICflex 2003® / L y punta universal del nº 5 (Madrid, España).
- Cureta Gracey #1/2, 7/8, 11/12 y 13/14, mango #6 (Hu-Friedry®, Róterdam, Países Bajos).
- Cureta Vision Curvette #1/2 mango #6 (Hu-Friedry®, Róterdam, Países Bajos).

- Cureta Columbia #13/14 mango #6 (Hu-Friedry®, Róterdam, Países Bajos).

La sesión terminaba tan pronto como el operador consideraba que había eliminado todo el cálculo y placa supra y subgingival, en base a la exploración de la superficie radicular con sonda periodontal y visión directa y/o indirecta previo secado de la zona.

4.2. Instrucciones en higiene oral

Todos los pacientes fueron instruidos en el correcto cepillado de los dientes con un cepillo manual (Vitis® medio, Dentaïd, España) utilizando la técnica vertical o del rojo al blanco,¹⁶³ y en la higiene interdental utilizando cepillos interdentes (Interprox®, Dentaïd, España) adecuados para el tamaño de las troneras de cada paciente. En todas las visitas se reforzaban estas instrucciones.

4.3 Terapia fotodinámica

El agente fotosensibilizador utilizado ha sido a base de cloruro de fenazationio (Periowave™, Vancouver, Canada). El producto se aplicaba de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La aplicación del fotosensibilizador se realizaba utilizando una aguja roma sobre el fondo de la bolsa periodontal, realizando movimientos circulares para cubrir todo el perímetro de la bolsa periodontal. El láser se aplicaba mediante una punta flexible de 8.5 mm de longitud y 60 grados de curvatura durante 60 segundos en cada bolsa periodontal. Tras la aplicación, el exceso de agente fotosensibilizante se eliminaba mediante irrigación con agua. El tratamiento se aplicaba en los pacientes del grupo RAR+TFD en las visitas 5, 6 y 7 según se ha descrito en el procedimiento.

Los materiales utilizados fueron:

- Agente fotosensibilizador: 3,7-Bis (dimetil-amino) cloruro de trihidrato de fenazationio (azul de metileno) al 0,005%, suspendido en una solución tampón fosfato, con hidroximetilcelulosa como agente de viscosidad mucoadhesivo (Kit de tratamiento Periowave™, Ondine Biomedical Inc., Vancouver, Canadá).

- Láser de diodo (Periowave™, Ondine Biomedical Inc., Vancouver, Canadá), con una longitud de onda de 670 nm y una potencia máxima de 150 mW.

5. Toma de muestras del fluido crevicular

Se realizaba a partir de la tercera cita. Se tomaban cuatro muestras de fluido crevicular, siempre en las mismas localizaciones. Las muestras se tomaban del interior de las bolsas periodontales y se conservaban a -80°C (grados centígrados) hasta ser procesadas para su valoración. La elección de la bolsa era un proceso importante. Se elegía la bolsa periodontal más profunda de cada cuadrante (siempre que la profundidad de sondaje era \geq a cinco mm y estaba acompañada de sangrado al sondaje en la visita de *screening*). Si no existían bolsas periodontales de estas características en un cuadrante, se elegían en otro cuadrante. Por último, si existían varias bolsas periodontales de la misma profundidad máxima en un mismo cuadrante, elegíamos una al azar (mediante el programa *Custom Random Number Generator*). La toma de muestras correspondientes al grupo control se tomaban en el surco clínicamente sano. En este caso, la toma de muestras era única y se realizaba en dos localizaciones de dos dientes anteriores (disto-vestibular del 1.2 y del 2.2) y de dos dientes posteriores multirradiculares (mesio-vestibular del 1.6 y del 2.6).

La primera maniobra consistía en eliminar la placa y el sarro con ayuda de una cureta estéril (Columbia #13/14, Hu-Friedry®). Se aislaba

la bolsa periodontal y se protegía con rollitos de algodón para evitar la contaminación por saliva.

La segunda maniobra variaba ligeramente dependiendo de que el destino de la muestra fuera para la determinación de la expresión génica de bacterias mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) o para la determinación de parámetros bioquímicos mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En el primer caso la toma de muestras se realizaba mediante la inserción de una punta de papel de endodoncia estéril del nº 30 durante un tiempo de 10 segundos antes de su retirada. En el segundo caso se insertaba una tira de papel estéril (Periopaper®) cuidadosamente hasta el fondo de la bolsa. El Periopaper® absorbía el fluido crevicular durante 30 segundos tras los cuales se procedía a su retirada. Una vez obtenida la muestra, se medía el volumen de fluido crevicular en el Periotron 8000®, posteriormente se calculaba el volumen en microlitros (μl) mediante el Software Periotron profesional.

Con independencia del destino de la muestra, se descartaba si salía manchada de sangre o placa bacteriana, en cuyo caso se repetía la maniobra.

Una vez obtenidas, colocábamos las muestras en Eppendorff® estériles y las conservábamos en frío (-80°C) hasta su procesamiento en el laboratorio.

Materiales para la toma de muestras

- Puntas de papel nº 30 (Dentsply®, Madrid, España).
- Periopaper strips®: tiras de papel para recoger muestras de fluido crevicular de 0,1-2ml (Oraflow®, Nueva York, Estados Unidos de América).
- Periotron 8000®: micro-medidor de humedad electrónico

para valorar el fluido crevicular (Oraflow[®], Nueva York, Estados Unidos de América).

- Periotron profesional: Software diseñado para pasar los valores dados por el Periotron 8000[®] a μl (Oraflow[®], Nueva York, USA).
- Viales de reacción 1,5 ml (Ependorff[®], Madrid, España).

6. Variables del estudio

El estudio se planteaba desde tres puntos de vista. El primero consistía en la caracterización de los parámetros clínicos que definen la periodontitis. La segunda variable del estudio se centraba en la determinación de la expresión génica de bacterias que potencialmente están relacionadas con la periodontitis. Y por último y puesto que la periodontitis es un proceso inmuno-inflamatorio, se determinaron los niveles de marcadores proinflamatorios en el fluido crevicular. Además, puesto que la periodontitis conlleva la pérdida de inserción ósea, se han determinado los niveles de RANK-L y OPG como marcadores del metabolismo óseo. La determinación de las concentraciones de sustancias proinflamatorias y de los marcadores del metabolismo óseo, constituían la tercera de las variables en estudio.

6.1. Parámetros clínicos periodontales y exploración radiográfica

La determinación de los parámetros clínicos periodontales se realizaba mediante sondas periodontales. Las mediciones se realizaban en seis puntos (disto-vestibular, medio-vestibular, mesio-vestibular, disto-palatino, medio-palatino y mesio-palatino) de cada diente.

Los parámetros clínicos estudiados fueron:

- Índice de placa
- Profundidad de sondaje
- Recesión clínica
- Nivel de inserción clínica
- Sangrado al sondaje
- Grado de movilidad dental
- Grado de afectación de la furca
- Volumen de fluido crevicular

La sonda utilizada para el estudio fue la de Williams PQ-OW 208 396, Hu-Friedy® (Róterdam, Países Bajos) excepto para la medición del grado de afectación de la furca que se utilizó la sonda de Nabers #2N mango #7 Qulix 3-6-9-12 mm (Hu-Friedry®, Róterdam, Países Bajos). La presión ejercida para el sondaje era de aproximadamente 20 gramos y corresponde a la presión que se ejerce cuando se deja la sonda apoyada por su propio peso sobre una superficie. El nivel de inserción clínica fue considerada la variable primaria. El resto, se consideraron como variables secundarias.

Índice de placa:¹⁶⁴ Mide el grosor de la placa bacteriana depositada sobre la superficie del borde gingival de todos los dientes presentes en la boca. La puntuación de la placa se califica según la escala:

- **0:** Sin placa en la zona gingival.
- **1:** Una película de placa adherida al margen gingival libre y el área adyacente al diente. La placa puede ser vista *in situ* sólo después de la aplicación de un revelador o mediante el uso de la sonda sobre la superficie del diente.

- **2:** Acumulación moderada de depósitos blandos en la bolsa periodontal, en el diente o en el margen gingival, que pueden ser apreciados a simple vista.

- **3:** Abundancia de materia blanda, gruesa de uno a dos mm dentro de la bolsa periodontal y / o sobre el diente y el margen gingival.

Profundidad de sondaje: se define como la distancia en milímetros entre el margen gingival y el fondo de la bolsa periodontal.

Recesión clínica: se define como el desplazamiento apical del margen gingival con respecto al límite amelocementario, dejando la superficie radicular expuesta. Los resultados se expresan en mm entre la línea amelocementaria y el margen gingival.

Nivel de inserción clínica: se define como la distancia en milímetros entre la línea amelocementaria y el fondo de la bolsa o surco.

Sangrado al sondaje: Se calcula en base a las puntuaciones de la escala de *full mouth bleeding score* (FMBS).¹⁶⁵ Después de comprobar la profundidad de los sondajes, se mide el sangrado asignando un valor de cero cuando había ausencia de sangrado y de uno en presencia de sangrado, después de 30 segundos tras haber realizado el sondaje.

Grado de movilidad dental: Considera el desplazamiento del diente a nivel de la corona producido por pérdida de inserción y/o por trauma oclusal. La maniobra se realiza con la ayuda de dos instrumentos de extremos romos apoyados en la cara vestibular y lingual de cada diente presionando, primero en una dirección y luego en dirección contraria.¹⁶⁶ El grado de movilidad dental corresponde a:

- **Grado 0:** Movilidad fisiológica, el diente se mueve dentro del alveolo alrededor de 0,1-0,2 mm en sentido horizontal.
- **Grado I:** Aumento de la movilidad del diente de hasta un mm de recorrido en dirección horizontal
- **Grado II:** Aumento de la movilidad del diente mayor de un mm de recorrido en dirección horizontal
- **Grado III:** Movilidad excesiva tanto en dirección horizontal como vertical.

Grado de afectación de furca: Es un parámetro que clasifica las lesiones de la furca cuantitativamente según el grado de afectación del hueso furcal en dientes multirradiculares.¹⁶⁷

- **Grado I:** El nivel de pérdida ósea permite la inserción de la sonda periodontal de Nabers en la concavidad del tronco radicular. El defecto de furca es inferior a tres mm en sentido horizontal.
- **Grado II:** El nivel de pérdida ósea permite la inserción de una sonda periodontal de Nabers en la zona de la bifurcación entre las raíces. El defecto de furca es al menos de tres mm en sentido horizontal (en general supera la mitad del espesor vestibulo-lingual del diente) pero hay todavía algo de hueso interradicular unido en el ángulo de la bifurcación.
- **Grado III:** El nivel de pérdida de masa ósea permite atravesar con la sonda de Nabers la furca en su totalidad (de vestibular a lingual en los molares inferiores y de vestibular a mesio-palatino y disto-palatino en los molares superiores). El defecto abarca toda la anchura del diente, no existe hueso unido al ángulo de la furcación.

Volumen de fluido crevicular: La determinación se realizaba mediante el Periotron 8000®, de la forma descrita en el apartado de toma de muestras. En resumen, tras el calibrado del Periopaper®, se depositaba en la bolsa periodontal para la absorción del fluido crevicular durante 30 segundos tras los cuales se procedía a su retirada. Esta operación se realizaba en las visitas 3, 6, 7 y 8. Una vez obtenida la muestra, se medía el volumen de fluido crevicular en el Periotron 8000® un dispositivo electrónico que cuantifica el volumen de fluido de las tiras Periopaper®, que se utilizaban para el posterior análisis de las muestras bioquímicas. Previamente a la medida dicho equipo debe calibrarse con volúmenes conocidos de fluido,¹⁶⁸ para obtener una relación entre volumen y unidad Periotron. Las dos platinas metálicas de este dispositivo son sensibles a las tiras de papel impregnadas de fluido crevicular y según el volumen de fluido transfieren diferente intensidad de corriente eléctrica. Si se coloca una tira seca se registra cero en la lectura numérica, por el contrario, una tira impregnada aumenta la capacitancia proporcionalmente al volumen del fluido, que se reflejará con elevadas unidades Periotron. Unidades que podemos pasar a μl gracias a la calibración de volúmenes conocidos que hemos realizado al inicio del estudio. Además este método de medida, no afecta al volumen ni a la composición de la muestra del fluido crevicular, que se analizaban posteriormente en el laboratorio.¹⁶⁹

El valor proporcionado por el instrumento son unidades Periotron que se transforman a μl mediante la aplicación de la siguiente fórmula obtenida a partir de la calibración del dispositivo:

$$P = -19,44 + 276,515 V - 184,717 V^2 + 64,349 V^3$$

P = unidades Periotron

V = volumen (μl)

Exploración radiográfica

La exploración radiográfica se realizaba para determinar el grado de pérdida ósea inherente a la periodontitis.¹⁵ Consiste en la obtención de una serie completa de 18 radiografías de las cuales 14 eran periapicales de incisivos, caninos, premolares y molares de cada cuadrante y las cuatro restantes aletas verticales de mordida de premolares y molares. Se utilizaba una técnica paralelizada mediante O-Ring® (Densplay, Madrid, España) y un equipo de rayos X intraoral (sistema Durr dental®, Bietigheim-Bissingen, Alemania) con placas de fósforo digitales (E-wood®, Haigol-Dong, Corea).

En el grupo control sano sólo se realizaban dos aletas de mordidas horizontales para confirmar la ausencia de pérdida de ósea.

6.2. Variables microbiológicas

El estudio de las variables microbiológicas se realizaba en el fluido crevicular, determinando los niveles de expresión génica de bacterias implicadas en la periodontitis crónica. La determinación se realiza mediante RT-PCR. Las bacterias a analizar han sido *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forshytia*, *T. denticola*, *P. intermedia* y *C. rectus*.

6.2.1 Fundamento

La técnica se desarrolla en varias fases. La primera consiste en la extracción del ADN de las distintas bacterias. Tras cuantificar la concentración y comprobar la calidad del ADN extraído, se pasa a amplificar el ADN bacteriano mediante la técnica de PCR en tiempo real.

Extracción y cuantificación de ADN bacteriano

Las muestras se obtuvieron siguiendo el método descrito en el apartado 5. Las puntas conteniendo el fluido crevicular se sumergieron en 200 ml de tampón fosfato salino (PBS) durante 24 h a 4°C hasta su utilización para la extracción de ADN.

La extracción de ADN total bacteriano se realizó utilizando el *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche-applied-science®, Alemania). A las muestras obtenidas se añadieron 5 ml de lisozima durante 15 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 ml de tampón de unión y 40 ml de proteinasa K (reconstituida), se mezcló con la ayuda de un vórtex y se incubaron durante 10 minutos a 70°C. Posteriormente se añadieron 100 ml de isopropanol y se mezcló por pipeteo. La mezcla obtenida se trasvasa al tubo de filtro para su centrifugación a 8000 x g durante un minuto. Se añaden 500 ml de tampón para eliminar el inhibidor y se vuelve a centrifugar durante un minuto a 8000 x g. Para el lavado, se añaden 500 ml de tampón de lavado y se centrifuga durante un minuto a 8000 x g. El lavado se repite dos veces. Para extraer el ADN, se adiciona 50 ml de tampón de elución previamente calentado a 70°C y se centrifuga durante un minuto a 8000 x g. El ADN total extraído se almacena en un Eppendorf® para su posterior análisis.

Calidad y cuantificación de ADN

La calidad y concentración del ADN total extraído se determinó por espectrofotometría utilizando el Nanodrop 2000® y su respectivo software (Thermo Scientific®, Estados Unidos de América). Tras el calibrado, se añaden 2 µl de cada muestra en el lector y el software determina la calidad (rango 260/208) y concentración en nanogramos (ng)/µl de ADN en cada una de las muestras.

Amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa es actualmente el método más sensible para detectar niveles de ADN de cualquier origen. Se basa en la amplificación exponencial de una secuencia de ADN conocida.^{170, 171} La PCR utiliza dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o *primers* se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas de ADN. El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten:

- **Desnaturalización:** consiste en la separación de las cadenas complementarias del ADN. La temperatura a la cual se alcanza la desnaturalización depende de la composición de las bases de la doble hélice y es mayor cuanto mayor es el número de pares de bases del tipo G-C (guanina-citosina) que contenga la molécula.¹⁷²

- **Unión o *annealing*** de los cebadores o *primers* específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura a la que transcurre (de 40 a 60°C) es específica de la secuencia y longitud del cebador y se determina experimentalmente.

- **Extensión:** síntesis de la hebra complementaria a partir del primer respectivo (de 70 a 75°C). La síntesis de la hebra complementaria se realiza adicionando al extremo 3'OH (grupo hidroxilo) los desoxinucleótidos libres disponibles en la mezcla de reacción dATP (d adenosín trifosfato), dTTP (d timidina trifosfato), dCTP (d citidina trifosfato) y dGTP (d guanosina trifosfato), de tal forma que el crecimiento de la nueva hebra se realiza en sentido 5' → 3'.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana de ADN, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el número de ciclos) hasta que se

llega a un punto en que la reacción deja de ser exponencial.

El principio básico de la RT-PCR es la detección de los productos de la PCR mediante la generación de señales fluorescentes. La señal de fluorescencia en nuestro trabajo fue generada por unos fluoróforos que se encuentran unidos a sondas de hibridación, denominadas sistema SBYR Green Master (Roche-applied-science®, Alemania). La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR.

El sistema SYBR Green¹⁷³ incorpora a la reacción de PCR un oligonucleótido específico que hibrida en una región interna del producto de la PCR (secuencia diana). Esta sonda se localiza en una región intermedia entre el *forward primer* y el *reverse primer*, e incorpora en el extremo 5' un fluoróforo donante que emite fluorescencia al ser excitado y en el extremo 3' un apagador o que absorbe la fluorescencia liberada por el donante. Para que se absorba la fluorescencia emitida por el donante, las moléculas donante y aceptora deben estar muy próximas, además de solaparse el espectro de emisión de la primera con el espectro de absorción de la segunda, dando como resultado una baja señal de fluorescencia. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donante es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, el desplazamiento a lo largo de la cadena de la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda que ha hibridado con su cadena complementaria, produciéndose la liberación del fluoróforo donante. Como donante y aceptor están ahora alejados, la fluorescencia emitida por el primero ya no es absorbida por el aceptor y es captada por el lector. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto de amplificación.

6.2.2. Condiciones experimentales

La PCR en tiempo real se realiza en el termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System® (Applied Biosystems®, Estados Unidos de América) cuyo lector de fluorescencia detecta la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación. Se han usado cebadores específicos (TIB MOLBIOL®, Alemania) de longitud entre 18-27 pares de bases marcadas con el SYBR Green (Roche-applied-science®, Alemania) para la cuantificación de la expresión génica de las diferentes bacterias (Tabla 2).

Tabla 2: Secuencia de cebadores *reverse* y *forward* utilizados para cada bacteria.

Bacteria	Cebador Reverse	Cebador Forward
<i>P. gingivalis</i>	TGTAGATGACTGAAAACC	ACGTCATCCCCACCTTCCTC ¹⁷⁴
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ATTGGGGTTTAGCCCTGGTG	ACGTCATCCCCACCTTCCTC ¹⁷⁴
<i>T. forsythia</i>	TACAGGGGAATAAAATGAGATACG	ACGTCATCCCCACCTTCCTC ¹⁷⁴
<i>T. denticola</i>	TAATACCGAATGTGCTCATTTACA	TACAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA ¹⁷⁵
<i>P. Intermedia</i>	CGTGGACCAAAGATTCATCG	ATACGTTGCGTGCACTCA ¹⁷⁶
<i>C. rectus</i>	TTTCGGAGCGTAACTCCTTTTC	TTTCTGCAAGCAGACACTCTT ¹⁷⁷

[Adenina (A)/Guanina (G)/Timina (T)/Citosina (C)]

La composición del *master mix* utilizado se detalla en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3: Composición del reactivo *master mix*.

Reactivos	Cantidad por muestra (µl)
SYBR Green Master	5
Cebador Reverse (10 µM)	0.4
Cebador Forward (10 µM)	0.4
Agua libre de ADN/ARNasas	3.2

µM: micromolar

ARN: ácido ribonucleico

6.2.3. Procedimiento

Para la reacción de amplificación, cada pocillo contiene 1 µl de ADN procedente de la extracción y 9 µl del *master mix*. La desnaturalización se realiza a 50°C durante dos minutos. A continuación se someten las muestras a 95° C durante 10 minutos. La unión de los *primers* con el SYBR se realiza durante 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de un minuto a una temperatura que depende de la bacteria, de forma que *C. rectus*, *P. intermedia*, *T.denticola* y *T. forsythia* utilizan 55°C, *P. gingivalis* 45°C y *A. actinomycetemcomitans* 65°C (Figura 5).

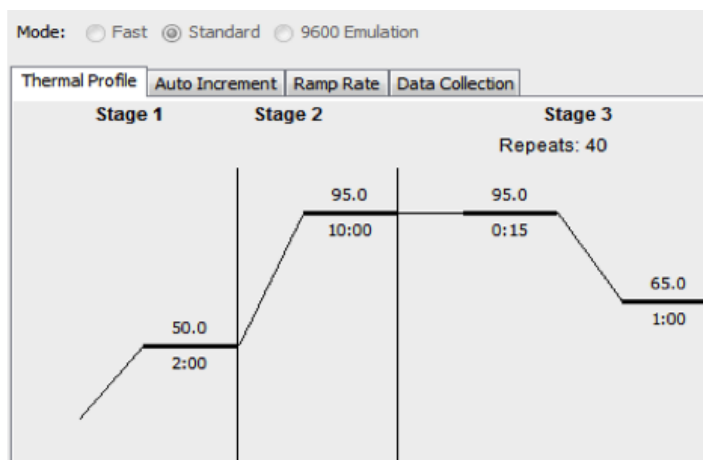


Figura 5: Condiciones del termociclador (*A. actinomycetemcomitans*).

Reactivos y materiales

- Kit para extracción de ADN bacteriano: High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche-applied-science®, Alemania).
- Lisozima (Roche-applied-science®, Alemania).
- Tris-Hcl (ácido clorhídrico) (10mM (milimolar), pH 8.0) .
- Isopropanol (Sigma Aldrich®, España).
- Centrifugadora de sobremesa estándar 5415R (Eppendorf®, Canada).
- Tubos para centrifugadora estériles Fisherbrand (Fisher Scientific®, Estados Unidos de América).
- Vortex TopMix FB15024 (Fisher Scientific®, Estados Unidos de América).
- Nanodrop 2000 y software (ThermoScientific®, Estados Unidos de América).
- Placa para PCR: MicroAmp® Optical 384-Well reaction plate with Barcode (Applied Biosystems – Life technologies®, China).
- Fluorocromo: Fast Star Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche-applied-science®, Alemania).
- Cebadores específicos (TIB MOLBIOL®, Alemania).
- Agua libre de ADN/ARNasas (Roche-applied-science®, Alemania).
- Termociclador 7900HT Fast *Real-Time* PCR System y el programa informático Sequence Detection Software (SDS v 2.4; Applied Biosystems®, Estados Unidos de América).

6.2.4. Cálculos

Básicamente una reacción de PCR se ajusta a la siguiente ecuación:

$$X_n = X_0 (1 + E_x)^n$$

X_n = Número de copias del gen de estudio en el ciclo n

X_0 = Número de copias iniciales del gen de estudio

E_x = Eficacia de amplificación del gen de estudio (X)

n = Número de ciclos

A partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos por el termociclador durante la reacción en tiempo real, mediante un programa informático SDS v 2.4 (Applied Biosystems®, Estados Unidos de América) se construyen las curvas de amplificación representando en el eje de ordenadas el logaritmo de la intensidad de la fluorescencia y en abscisas el número de ciclos transcurridos (Figura 6).

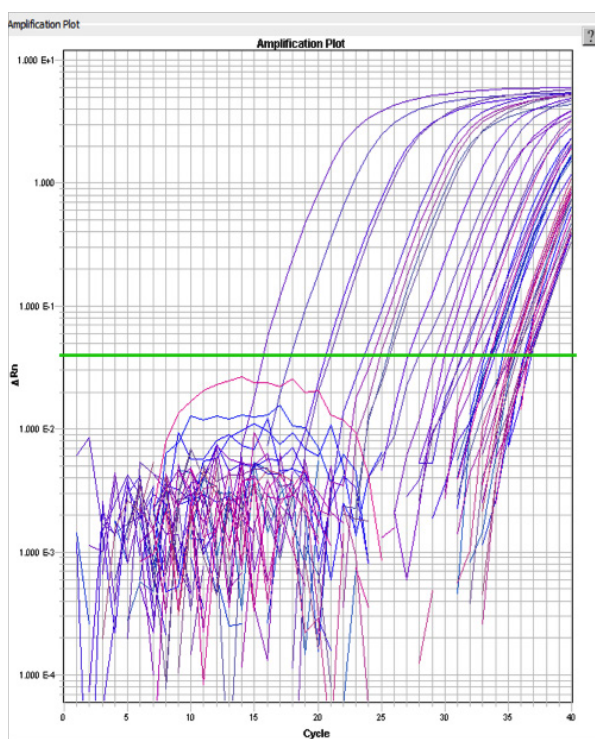


Figura 6: Curva de amplificación de *A. actinomycetemcomitans* por Real Time-PCR. La línea horizontal (verde) indica el umbral o *threshold* a partir del cual empieza la linealidad, se establece como umbral el valor de 0,04 para todos los grupos de estudio. ΔR_n = Incremento de fluorescencia. *Cycle* = número de ciclo en que se encuentra la reacción.

El parámetro de medida de la expresión de un determinado gen es el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (*threshold cycle*, Ct), a partir del cual la intensidad de fluorescencia empieza a ser apreciable. Cuantas más copias de ADN de partida del gen estudiado, más ADN se obtendrá en la transcripción inversa, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial. Los resultados se analizan por el método semi-cuantitativo $\Delta\Delta Ct$.¹⁷⁸ Las curvas estándar se realizan a partir de los datos de ΔCt obtenidos por PCR de ADN extraído de cultivos puros de las bacterias a diferentes diluciones (de 10^2 a 10^8 copias). Comparando el ΔCt de las muestras frente al ΔCt de la curva estándar podemos cuantificar la expresión del gen en la muestra (Figura 7). Cada muestra se estudió por duplicado.

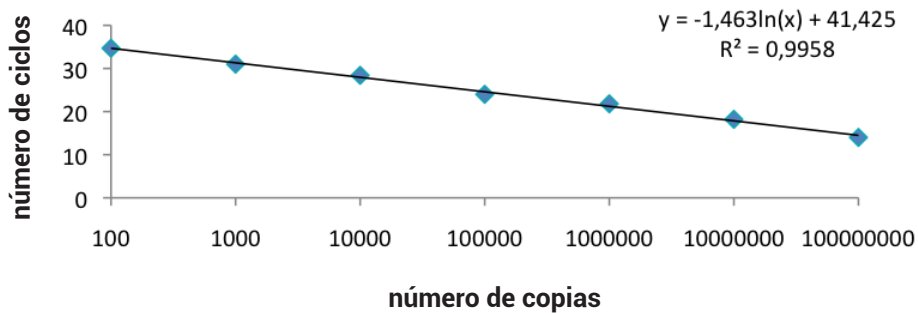


Figura 7: Curva estándar (*A. actinomycetemcomitans*).

6.3. Variables bioquímicas

La determinación de las variables bioquímicas, se realizó empleando el método ELISA. Se determinaron en el fluido crevicular los niveles de moléculas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) y los niveles de moléculas reguladoras del metabolismo óseo (RANK-L, OPG y el cociente RANK-L/OPG) implicadas en la periodontitis crónica.

6.3.1. Fundamento

La técnica ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático.^{179, 180} Se basa en la detección de un antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac), inmovilizado sobre una fase sólida de un soporte inmunoabsorbente, que reacciona directa o indirectamente con otros anticuerpos, inmunógenos o haptenos marcados con una enzima. El producto coloreado de esta enzima puede ser medido por espectrofotometría. Existen varios tipos de ELISAS: directo, indirecto y sándwich. Todos ellos necesitan de controles positivos y negativos. El ensayo ELISA se divide en cuatro fases:

1. Conjugación de un Ag o Ac con una enzima como la peroxidasa o fosfatasa alcalina.

2. Unión de un Ag o Ac a la superficie de los pocillos recubiertos de la placa.

3. Formación de una o varias capas de inmunocomplejos que serán detectados por métodos directos (no competitivos), indirectos (competitivos) o sándwich.

4. Revelado de la reacción enzimática tras un lavado en el que se eliminan todas las moléculas marcadas no fijadas. Se añade un sustrato enzimático en la solución, se incuba la reacción, esta se detiene y se lee la reacción enzimática mediante espectrofotometría.

En nuestros experimentos hemos utilizado ELISA indirectos (competitivos) comerciales para la detección de IL-1 β , TNF- α , IL-6 (Diacclone SAS[®], Francia) y para la detección de RANK-L y OPG (BioVendor[®], Laboratorni medicina A.S., Barcelona).

6.3.2. IL-1 β , IL-6 y TNF- α Humano (Diacclone SAS[®], Francia)

Material contenido en el kit

- Placa de 96 pocillos.
- Cubre de placa adhesiva.
- Solución estándar: IL-1 β (500 picogramo/mililitro (pg/ml)), IL-6 (200pg/ml) o TNF- α (800pg/ml).
- Diluyente estándar.
- Control positivo y negativo.
- Anticuerpo biotinilado anti- IL-1 β , anti- IL-6 o anti-TNF- α .
- Diluyente para el anticuerpo biotinilado.
- Reactivo de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano).
- Diluyente HRP.
- Tampón de lavado.
- Solución de sustrato TMB (tetrametil bendicina).
- Solución de finalización H₂SO₄ (ácido sulfúrico).

Todos los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de su uso.

Material necesario pero no proporcionado con el kit

- Agua destilada.
- Micropipeta (GILSON[®], Francia).
- Viales de reacción 1,5 ml (Ependorff[®], Canada).
- Vortex TopMix FB15024 (Fisher Scientific[®], Estados Unidos de América).

- Espectrofotómetro: Spectra Max PLUS 384® (Molecular Devices®, Estados Unidos de América).

Procedimiento

- Preparar las diluciones para la curva estándar siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 8).

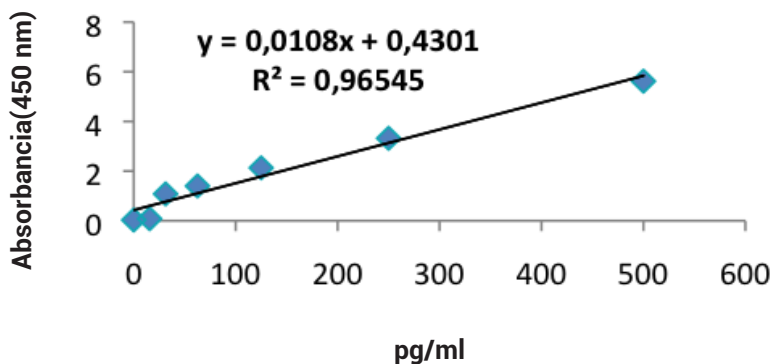


Figura 8: Curva estándar (IL-1 β).

- En cada pocillo se añade 50 μ l de la solución estándar, 50 μ l de muestra y 50 μ l del anticuerpo diluido para IL-1 β , IL-6 o TNF- α . Cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante tres horas.

Todas las muestras se realizaban por duplicado.

- Lavar tres veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 μ l del preparado de estreptavidina-HRP a cada uno de los pocillos, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Lavar tres veces los pocillos con tampón de lavado (1x).

- Añadir 100 µl de la solución de sustrato TMB a cada uno de los pocillos, guardar en oscuridad la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Finalizar la reacción añadiendo 100 µl de la solución de finalización (H_2SO_4) a cada uno de los pocillos.

Medir la absorbancia en espectrofotómetro a $\lambda=450$ nm.

6.3.3. RANK-L Humano (Biovendor®, Laboratori medicina A.S., Barcelona)

Material contenido en el kit

- Placa de 96 pocillos pre-recubierto con anticuerpo anti-RANK-L.
- Cubre de placa adhesiva.
- Anticuerpo biotinilado anti-RANK-L.
- Solución estándar.
- Diluyente estándar.
- Reactivo de estreptavidina-HRP.
- Control positivo y negativo.
- Tampón de lavado.
- Solución de lavado concentrada (10x).
- Solución de sustrato TMB.
- Solución de finalización.

Todos los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de su uso.

Material necesario pero no proporcionado con el kit

- Agua destilada.
- Micropipeta (GILSON®, Francia).
- Tubos de ensayo para la dilución de muestras 500 ml, Fischerbrand® (Fisher Scientific®, Estados Unidos de América).
- Material absorbente de secado.
- Vortex TopMix FB15024 (Fisher Scientific®, Estados Unidos de América).
- Agitador de microplacas orbital de 300 rpm (revoluciones por minuto): P-Selecta Agimatic-S® (J.P Selecta S.A, España).
- Material de vidrio para la solución de lavado Espectrofotómetro: Spectra Max PLUS 384® (Molecular Devices®, Estados Unidos de América).

Procedimiento

- Preparar las diluciones para la curva estándar siguiendo las indicaciones del fabricante.
- En cada pocillo se añade 50 µl de la solución estándar y 50 µl de muestra. Cubrir la placa con el adhesivo e incubar a 2-8°C durante 20 horas en agitación a 300 rpm en un agitador orbital de microplaca. Todas las muestras se realizan por duplicado.
- Lavar cinco veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 µl del anticuerpo anti-RANK-L en los pocillos cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante una hora en agitación a 300 rpm en un agitador orbital de microplaca.
- Lavar cinco veces los pocillos con tampón de lavado (1x).

- Añadir 100 µl de estreptavidina-HRP a cada uno de los pocillos, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante una hora en agitación a 300 rpm en un agitador orbital de microplaca.
- Lavar 5 veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 µl de la solución de sustrato a cada uno de los pocillos, guardar en oscuridad la placa a temperatura ambiente durante 25 minutos.
- Finalizar la reacción añadiendo 100 µl de la solución de finalización a cada uno de los pocillos.
- Medir la absorbancia en espectrofotómetro a $\lambda=450$ nm.

6.3.4. OPG Humano (Biovendor[®], Laboratori medicina A.S., Barcelona)

Material contenido en el kit

- Placa de 96 pocillos pre-recubierto con anticuerpo anti-OPG.
- Cubre de placa adhesiva.
- Anticuerpo biotinilado anti-OPG.
- Solución estándar.
- Diluyente estándar.
- Reactivo de estreptavidina-HRP.
- Control positivo y negativo.
- Tampón de lavado.
- Solución de lavado concentrada (10x).
- Solución de sustrato TMB.

- Solución de finalización.

Todos los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usar.

Material necesario pero no proporcionado con el kit

- Agua destilada.
- Micropipeta (GILSON®, Francia).
- Tubos de ensayo para la dilución de muestras 500 ml, Fischerbrand® (Fisher Scientific®, Estados Unidos de América).
- Material absorbente de secado.
- Vortex TopMix FB15024 (Fisher Scientific®, Estados Unidos de América).
- Agitador de microplacas orbital de 300 rpm: P-Selecta Agimatic-S® (J.P Selecta S.A, España).
- Material de vidrio para la solución de lavado.
- Espectrofotómetro: Spectra Max PLUS 384® (Molecular Devices®, Estados Unidos de América).

Procedimiento

- Preparar las diluciones para la curva estándar siguiendo las indicaciones del fabricante.
- En cada pocillo se añade 50 µl de la solución estándar y 50 µl de muestra. Cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente (25°C) durante una hora en agitación a 300 rpm en un agitador orbital de microplaca.

Todas las muestras se realizan por duplicado.

- Lavar tres veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 µl del anticuerpo Anti-OPG en los pocillos cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante una hora en agitación a 300 rpm en un agitador orbital de microplaca.
- Lavar tres veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 µl de estreptavidina-HRP a cada uno de los pocillos, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación a 300 rpm en un agitador orbital de microplaca.
- Lavar tres veces los pocillos con tampón de lavado (1x).
- Añadir 100 µl de la solución de sustrato a cada uno de los pocillos, guardar en oscuridad la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Finalizar la reacción añadiendo 100 µl de la solución de finalización a cada uno de los pocillos.
- Medir la absorbancia en espectrofotómetro a $\lambda=450$ nm.

6.3.5. Cálculos

Con los valores medios de absorbancia se construye una curva estándar frente a las concentraciones de IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANK-L y OPG. Las concentraciones de cada muestra se determinan por extrapolación de los valores de absorbancia en las respectivas curvas estándar.

6.4. Método estadístico

Justificación del tamaño de la muestra:

Se seleccionó un tamaño de muestra de 40 sujetos para este estudio utilizando una aleatorización 1:1 para obtener 20 sujetos por grupo. El tamaño de la muestra se seleccionó sobre la base de las estimaciones de covarianza para la respuesta de la variable primaria (nivel de inserción clínica) a las 6 y 12 semanas obtenidos de estudios anteriores.^{1,135} Se utilizó un test estadístico-F para calcular el tamaño de la muestra. Un tamaño de muestra de 17 individuos por cada brazo proporcionaba el 80% de potencia para un nivel de confianza del 95%. Una muestra de 20 sujetos por brazo o 40 sujetos totales se seleccionaron para permitir un potencial de abandono de varios pacientes en cada brazo.

El grupo de pacientes periodontales lo formaban 12 hombres y 28 mujeres de edades comprendidas entre 33 y 74 años, con una edad media de 55 ± 2 años (un hombre y dos mujeres se excluyeron del estudio).

El grupo de sujetos control periodontalmente sanos correspondía a 7 hombres y 13 mujeres de edades comprendidas entre 21 y 56 años, con una edad media de 28 ± 3 años.

6.4.1. Variables clínicas

La muestra de estudio está constituida por 40 individuos, distribuidos aleatoriamente en dos grupos según el tratamiento que vayan a recibir: terapia periodontal básica (RAR) o terapia periodontal básica más terapia fotodinámica (RAR+TFD). La aleatorización se realizaba con el programa Microsoft Excel 2010. Los pacientes nº 18, nº 27 y nº 28 han sido excluidos previamente al estudio estadístico ya que no finalizaron el seguimiento.

En seis puntos de cada diente y por paciente se tomaban registros

de las variables clínicas a lo largo de un seguimiento de 25 semanas, lo que constituía un total de 5228 puntos de medición sobre los que se determinaban los parámetros clínicos. Los tiempos de medición se corresponden con las visitas 2 (*screening*) 6, 7 y 8 (5, 13 y 25 semanas respectivamente). La comparación de tratamientos se realizaba en puntos críticos definidos como aquellos en los que la bolsa periodontal presente una profundidad \geq cinco mm y sangrado al sondaje en la visita 2 (*screening*) por lo que la muestra efectiva era de 809 datos (381 del tratamiento RAR y 428 del tratamiento RAR+TFD). La figura 9 recoge la distribución de la muestra por pacientes y tratamiento.

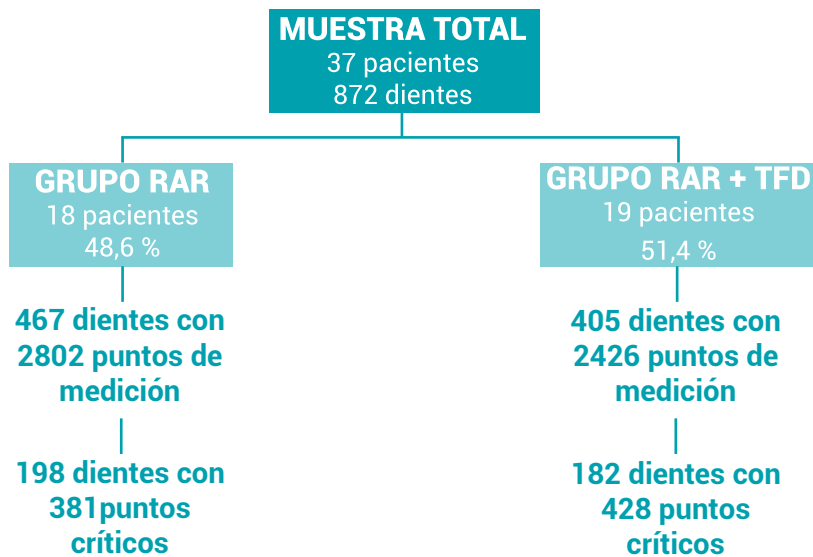


Figura 9: Distribución de la muestra por pacientes y tratamiento.

El análisis descriptivo contiene los datos estadísticos para las variable de frecuencias absolutas, medias y desviación estándar y aporta información de la evolución de los parámetros clínicos en los puntos críticos. Puesto que la movilidad del diente es un parámetro clínico que afecta al diente, la unidad de análisis deja de ser el punto de medición.

El análisis inferencial engloba el conjunto de test estadísticos desarrollados para contrastar las hipótesis definidas en los objetivos. Fundamentalmente se han estimado modelos de ecuaciones de estimación generalizadas (EEG) para analizar la evolución de las variables clínicas a lo largo del tiempo teniendo en cuenta el grupo de pertenencia del sujeto (RAR o RAR+TFD). Se evaluaron los efectos principales como cambios en el tiempo y diferencias en las respuestas según grupo y, especialmente, la interacción entre los grupos para averiguar si los cambios en el tiempo eran homogéneos en los dos tratamientos. Se utilizaban la prueba de LSD (mínima diferencia significativa) como test de comparaciones múltiples, para evaluar las diferencias entre pares de diferentes niveles de los factores.

El nivel de significatividad de referencia es el 5%. Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa.

6.4.2. Variables microbiológicas

En el estudio de las variables microbiológicas, la muestra era de 60 individuos, 20 correspondientes al grupo control (sanos) y los otros 40 seguían la misma distribución descrita en el apartado de variables clínicas. Se eliminaron los pacientes periodontales 18, 27 y 28 del estudio por no finalizar el seguimiento. En este caso la muestra efectiva era de 228 datos (20 del grupo control, 18 del grupo RAR y 19 del grupo RAR+TFD).

El análisis descriptivo contiene los datos estadísticos de los valores de la media y desviación estándar. Las tablas aportan información de la carga bacteriana a lo largo del tiempo del estudio para cada una de las bacterias. Debido a la particular distribución de valores de la carga bacteriana, donde las colonias se multiplican exponencialmente, se transformaron con logaritmos decimales sus valores y se representaron gráficamente.

El análisis inferencial engloba el conjunto de test estadísticos

desarrollados para contrastar las hipótesis definidas en los objetivos. La transformación logarítmica normaliza la variable y permite la aplicación de métodos estadísticos paramétricos si no se detectan desviaciones de gran magnitud respecto a las hipótesis básicas (normalidad, homocedasticidad). Se ha utilizado el test de Shapiro-Wilk para el contraste del ajuste a distribución normal y el de Levene para el de homocedasticidad. El análisis multivariante se realiza mediante la estimación de un modelo lineal general de medidas repetidas para la variable respuesta carga bacteriana (en logaritmos). Se analizaba el factor tiempo (*screening*, semana 5, 13 y 25) y el factor tratamiento (RAR y RAR+TFD). La comparación de la carga bacteriana entre los tres grupos se realizaba mediante ANOVA (análisis de la varianza) unifactorial y para las comparaciones múltiples (post-hoc) se utiliza el test de Bonferroni.

El nivel de significatividad de referencia es el 5%. Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Los resultados del test de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) y de la prueba de Levene ($p > 0,05$) confirman que se puede aplicar un modelo lineal generalizado en todas las bacterias estudiadas.

6.4.3. Variables bioquímicas

Se disponían de los mismos pacientes que las variables microbiológicas.

El análisis descriptivo contiene los datos estadísticos de los valores de la media y desviación estándar.

El análisis inferencial engloba el conjunto de test estadísticos desarrollados para contrastar las hipótesis definidas en los objetivos. Existen numerosos casos extremos en los distintos parámetros, lo que genera desviaciones importantes de la normalidad, incluso tras la transformación de las variables. Por tanto, se propone la utilización de

modelos de tipo no paramétrico. Se estima un modelo de Brunner-Langer para datos longitudinales, donde tiempo y grupo de paciente asumen el papel de factores inter e intraindividuo. Los efectos principales de estos factores y la interacción entre ambos se evaluaban mediante un test tipo ANOVA. Las comparaciones múltiples se basan en el test de Wilcoxon (para comparaciones entre visitas) y Mann-Whitney (para comparaciones entre grupos). La homogeneidad de un parámetro en la visita de *screening* en los tres grupos (control, RAR y RAR+TFD) se evaluaba mediante test de Kruskal-Wallis. La misma prueba se utilizaba para valorar la homogeneidad de los 2 grupos test a las 25 semanas respecto al control.

El nivel de significatividad de referencia es el 5%. Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa.

CAPÍTULO IV

Resultados



1. Variables clínicas

1.1. Índice de placa

Mayoritariamente la distribución del índice de placa en la visita de *screening* correspondía al valor de uno de la escala de Løe y Silness (Tabla 4 y figura 10) tanto en el grupo RAR como en el RAR+TFD. Estos resultados indican la homogeneidad de los grupos al inicio del estudio.

Tabla 4: Distribución de frecuencias del índice de placa.

ÍNDICE DE PLACA	<i>Screening</i>		Semana 5		Semana 13		Semana 25	
	RAR % (puntos críticos)	RAR+TFD % (puntos críticos)	RAR % (puntos críticos)	RAR+TFD % (puntos críticos)	RAR % (puntos críticos)	RAR+TFD % (puntos críticos)	RAR % (puntos críticos)	RAR+TFD % (puntos críticos)
0	12,6% (48)	18,0% (77)	32,5% (124)	53,3% (228)	41,4% (156)	38,8% (166)	52,3% (197)	47,6% (202)
1	64,0% (244)	58,6% (251)	63,8% (243)	40,4% (173)	55,4% (209)	52,3% (224)	46,4% (175)	47,2% (200)
2	23,1% (88)	20,3% (87)	3,7% (14)	6,3% (27)	2,9% (11)	7,9% (34)	1,3% (5)	4,5% (19)
3	0,3% (1)	3,0% (13)	0% (0)	0% (0)	0,3% (1)	0,9% (4)	0% (0)	0,7% (3)
Total	100% (381)	100% (428)	100% (381)	100% (428)	100% (381)	100% (428)	100% (381)	100% (428)

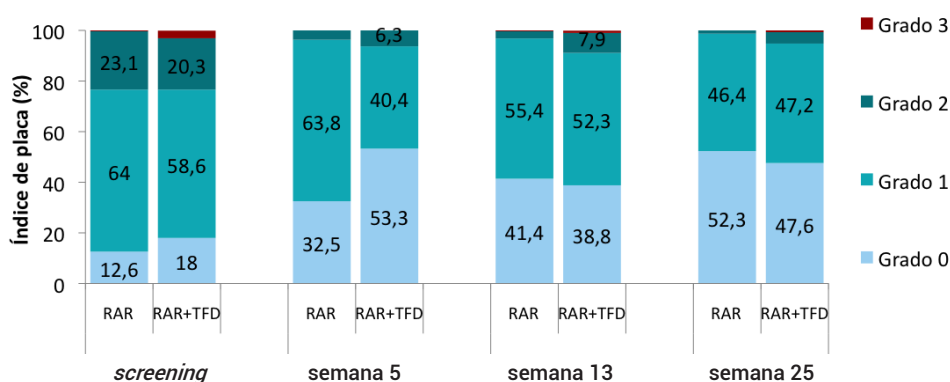


Figura 10: Evolución del índice de placa según tratamiento.

El valor medio (\pm desviación típica (DT)) de índice de placa en la visita

2 (*screening*) fue de $1,11 \pm 0,60$ para el RAR frente a $1,08 \pm 0,71$ para el RAR+TFD ($p>0,05$) (Tabla 5).

Tabla 5: Evolución de la media y la desviación típica del índice de placa según grupo.

ÍNDICE DE PLACA		GRUPO	
		RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de puntos críticos	381	428
	Media	1,11	1,08
	Desviación típica	0,60	0,71
semana 5	Número de puntos críticos	381	428
	Media	0,71	0,53
	Desviación típica	0,53	0,61
semana 13	Número de puntos críticos	377	428
	Media	0,62	0,71
	Desviación típica	0,56	0,65
semana 25	Número de puntos críticos	377	424
	Media	0,49	0,58
	Desviación típica	0,53	0,61

Desde el punto de vista inferencial longitudinal el índice de placa ha disminuido con el tiempo ($p<0,001$) independientemente del tratamiento realizado (Figura 11).

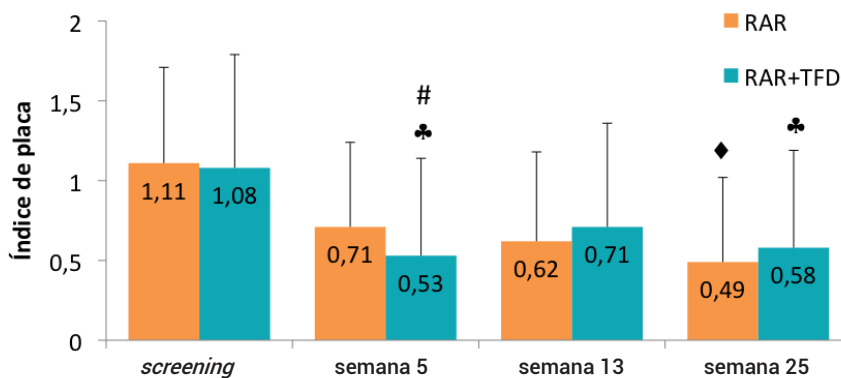


Figura 11: Evolución de la media y la desviación típica del índice de placa según tratamiento. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p<0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p<0,05$). (#) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la semana 5 ($p<0,05$).

Desde el punto de vista comparativo, los pacientes del grupo RAR+TFD presentaban un índice de placa más bajo a las 5 semanas ($p=0,024$) que los pacientes del grupo RAR. A partir de este punto se producía un repunte que ha conducido a una situación final similar en ambos grupos ($p=0,896$). Además, existían diferencias en el nivel de placa debidas a la posición del diente. A nivel del maxilar y tomando como referencia la situación de los incisivos centrales, se observaron valores similares de placa hasta el segundo premolar y a partir de ahí el índice de placa incrementaba significativamente ($p<0,001$). A nivel mandibular, los valores de índice de placa fueron significativamente mayores en todos los dientes respecto a los incisivos ($p<0,001$).

1.2. Profundidad de sondaje

La mayor frecuencia en la visita de *screening* correspondía al valor de 5 mm en ambos grupos (Tabla 6). Estos resultados indican la homogeneidad de los grupos al inicio del tratamiento.

Tabla 6: Distribución de frecuencias de la profundidad de sondaje (visita 2: *screening*).

PROFUNDIDAD DE SONDAJE (mm)	FRECUENCIA TOTAL	% TOTAL	RAR (%)	RAR+TFD (%)
5	451	55,7	59,6	52,3
6	177	21,9	20,5	23,1
7	129	15,9	14,2	17,5
8	37	4,6	4,2	4,9
>8	15	1,8	1,6	2,0
Total	809	100	100	100

El promedio (\pm DT) de la profundidad de sondaje en la visita 2 (*screening*) fue de $5,69 \pm 1,02$ mm para RAR y $5,83 \pm 1,11$ mm para RAR+TFD, ($p>0,05$) (Tabla 7).

Tabla 7: Evolución de la media y la desviación típica de la profundidad de sondaje según grupo.

PROFUNDIDAD DE SONDAJE (mm)		GRUPO	
		RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de puntos críticos	381	428
	Media	5,69	5,83
	Desviación típica	1,02	1,11
semana 5	Número de puntos críticos	381	428
	Media	4,34	4,38
	Desviación típica	1,39	1,53
semana 13	Número de puntos críticos	377	428
	Media	3,96	4,19
	Desviación típica	1,20	1,45
semana 25	Número de puntos críticos	377	424
	Media	3,62	3,93
	Desviación típica	1,15	1,36

La figura 12 representa la evolución de la profundidad de sondaje con el tiempo. Desde este punto de vista, la profundidad del sondaje ha disminuido significativamente con el tiempo en ambos tratamientos ($p < 0,001$).

Desde el punto de vista comparativo, a partir de las 13 semanas se observaba una mayor tendencia a la disminución de la profundidad de sondaje en el grupo RAR, si bien esta diferencia no es significativa ($p = 0,198$). Las diferencias debidas al diente ($p < 0,001$) sugieren que en los terceros molares se ha alcanzado el máximo sondaje frente a las piezas de referencia, los incisivos superiores.

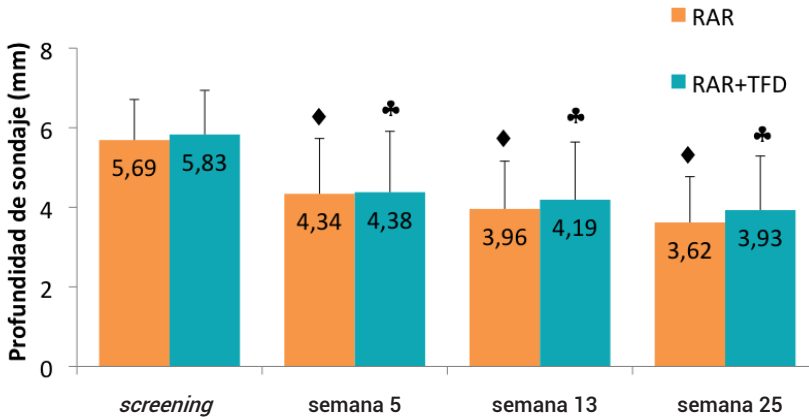


Figura 12: Evolución de la media y la desviación típica de la profundidad de sondaje según tratamiento. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$).

1.3. Recesión clínica

La mayor frecuencia en ambos grupos en la visita de *screening* correspondía al valor de 0 (Tabla 8).

Tabla 8: Distribución de frecuencias de la recesión clínica (visita 2: *screening*).

RECESIÓN CLÍNICA (mm)	FRECUENCIA TOTAL	% TOTAL	RAR (%)	RAR+TFD (%)
0	550	68,0	73,0	63,6
1	131	16,2	13,4	18,7
2	77	9,5	7,9	11,0
3	35	4,3	3,4	5,1
>3	16	2,0	2,4	1,6
Total	809	100	100	100

La recesión clínica media (\pm DT) en la visita 2 (*screening*) se cifraba en $0,50 \pm 1,00$ mm en el grupo RAR y en $0,63 \pm 1,01$ mm en RAR+TFD ($p > 0,05$) (Tabla 9).

Tabla 9: Evolución de la media y la desviación típica de la recesión clínica según grupo.

RECESIÓN CLÍNICA (mm)		GRUPO	
		RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de puntos críticos	381	428
	Media	0,50	0,63
	Desviación típica	1,00	1,01
semana 5	Número de puntos críticos	381	428
	Media	0,59	0,77
	Desviación típica	0,97	1,10
semana 13	Número de puntos críticos	377	428
	Media	0,63	0,87
	Desviación típica	1,04	1,16
semana 25	Número de puntos críticos	377	424
	Media	0,56	0,74
	Desviación típica	0,97	1,09

La gráfica con los valores medios de recesión (Figura 13) indica una evolución homogénea con el tratamiento. A la vista de la información descriptiva, hay que aceptar variaciones de la recesión media a lo largo del tiempo ($p=0,004$). Cualquiera de los tratamientos ha supuesto un aumento de la recesión.

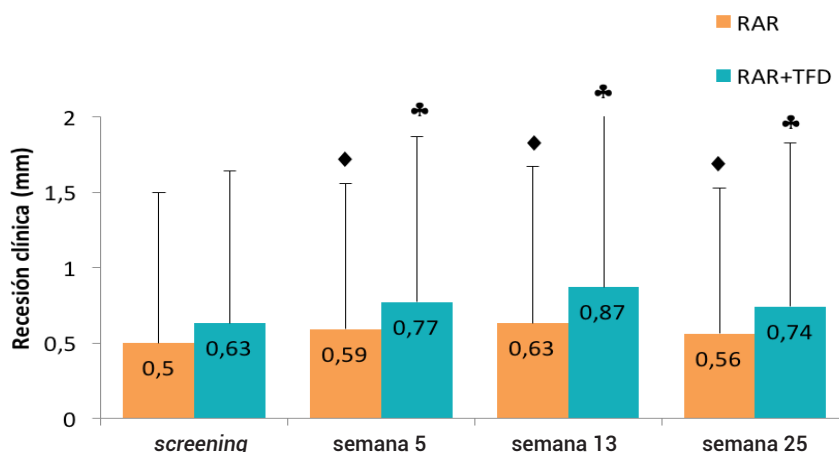


Figura 13: Evolución de la media y la desviación típica de la recesión clínica según tratamiento. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p<0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p<0,05$).

1.4. Nivel de inserción clínica

En ambos grupos la mayor frecuencia de distribución del nivel de inserción clínica fue de 5 mm en la visita de *screening* (Tabla 10).

Tabla 10: Distribución de la frecuencia del nivel de inserción clínica (visita 2: *screening*).

NIVEL DE INSERCIÓN CLÍNICA (mm)	FRECUENCIA TOTAL	% TOTAL	RAR (%)	RAR+TFD (%)
5	324	40,0	43,8	36,7
6	174	21,5	21,8	21,3
7	154	19,0	17,8	20,1
8	90	11,1	10,0	12,1
9	38	4,7	4,2	5,1
>9	29	1,2	2,4	4,7
Total	809	100	100	100

El nivel medio (\pm DT) de inserción clínica en la visita 2 (*screening*) fue de $6,19 \pm 1,42$ mm en el grupo RAR y de $6,47 \pm 1,60$ mm en RAR+TFD ($p>0,05$) (Tabla 11).

La gráfica (Figura 14) con los valores medios del nivel de inserción clínica indica bastante homogeneidad en la evolución de ambos grupos. Se ha producido una mejora del nivel de inserción clínica con el tiempo ($p<0,001$) sin diferencias entre los grupos de estudio ($p=0,275$).

Tabla 11: Evolución de la media y la desviación típica del nivel de inserción clínica según grupo.

NIVEL DE INSERCIÓN CLÍNICA (mm)		GRUPO	
		RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de puntos críticos	381	428
	Media	6,19	6,47
	Desviación típica	1,42	1,60
semana 5	Número de puntos críticos	381	428
	Media	4,93	5,15
	Desviación típica	1,66	2,02
semana 13	Número de puntos críticos	377	428
	Media	4,59	5,06
	Desviación típica	1,65	1,99
semana 25	Número de puntos críticos	377	424
	Media	4,19	4,67
	Desviación típica	1,60	1,83

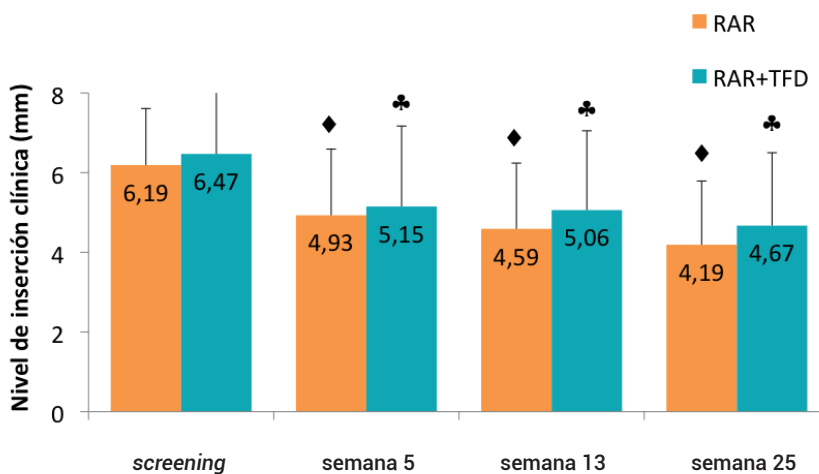


Figura 14: Evolución de la media y la desviación típica del nivel de inserción clínica según tratamiento. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$).

1.5. Sangrado al sondaje

La tabla 12 recoge la evolución de los valores de sangrado al sondaje con el tiempo para los dos tratamientos.

Tabla 12: Evolución de la frecuencia del sangrado al sondaje según grupo.

SANGRADO AL SONDAJE		GRUPO	
		RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	% (Número de puntos críticos)	100% (381)	100% (428)
	No	0,0% (0)	0,0% (0)
	Si	381 (100%)	428 (100%)
semana 5	% (Número de puntos críticos)	100% (381)	100% (428)
	No	50,7% (193)	63,6% (272)
	Si	49,3% (188)	36,4% (156)
semana 13	% (Número de puntos críticos)	100% (381)	100% (428)
	No	61,5% (232)	58,9% (252)
	Si	38,5% (145)	41,1% (176)
semana 25	% (Número de puntos críticos)	100% (381)	100% (428)
	No	59,4% (224)	63,0% (267)
	Si	40,6% (153)	37,0% (157)

La figura 15 representa el porcentaje de puntos que han presentado sangrado en las diferentes visitas y según el tipo de tratamiento.

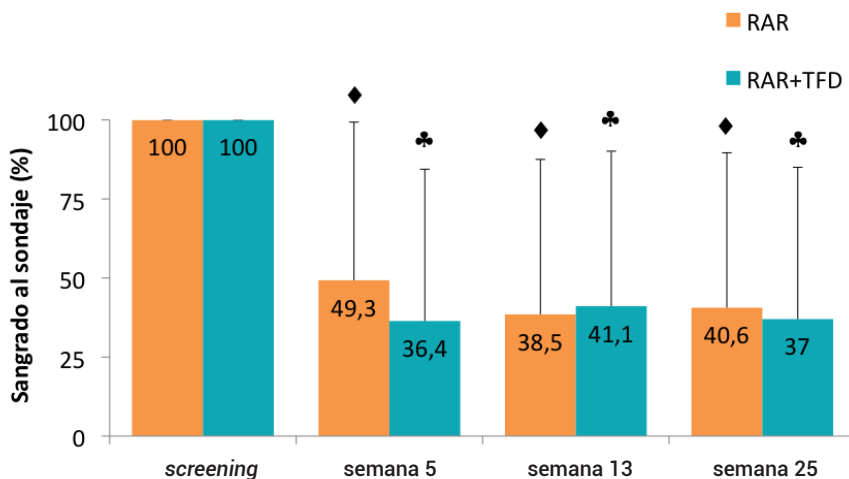


Figura 15: Evolución de la media y la desviación típica del sangrado al sondaje según tratamiento. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$).

En la visita de *screening* todos los puntos críticos, por definición, sangraron al sondaje. El sangrado al sondaje ha disminuido con el tiempo ($p < 0,001$) tanto en RAR como en RAR+TFD. A las 5 semanas del inicio del tratamiento ya se observaba una reducción significativa ($p < 0,001$) del porcentaje de puntos que sangraban. No habiendo diferencias respecto al tratamiento recibido ($p = 0,275$).

Mediante las pruebas de comparación múltiple (LSD), se ha determinado que en el grupo RAR+TFD, a las 5 semanas se alcanzaba su mayor porcentaje de reducción del sangrado, mientras que en el grupo RAR todavía existía un avance significativo ($p = 0,033$) entre las 5 y las 25 semanas. Respecto a la variable diente, el sangrado de los terceros molares ha sido mayor que el sangrado del diente de referencia (incisivo central superior derecho).

1.6. Grado de movilidad dental

El análisis de la movilidad dental se realizó sobre los 380 dientes que tenían algún punto crítico en la visita 2 (*screening*), la mayor frecuencia de distribución en la visita de *screening* fue el grado cero, es decir, la ausencia de movilidad (Tabla 13 y figura 16).

Tabla 13: Distribución de la frecuencia del grado de movilidad dental.

GRADO DE MOVILIDAD DENTAL	<i>Screening</i>		Semana 5		Semana 13		Semana 25	
	RAR % (dientes)	RAR+TFD % (dientes)	RAR % (dientes)	RAR+TFD % (dientes)	RAR % (dientes)	RAR+TFD % (dientes)	RAR % (dientes)	RAR+TFD % (dientes)
0	91,4% (181)	78,6% (143)	91,9% (182)	80,2% (146)	89,3% (176)	79,7% (145)	88,8% (175)	85,6% (155)
1	7,6% (15)	13,7% (25)	7,6% (15)	10,4% (19)	6,1% (12)	12,1% (22)	7,6% (15)	6,1% (11)
2	0,5% (1)	4,9% (9)	0,5% (1)	7,1% (13)	3,6% (7)	4,9% (9)	3,6% (7)	7,2% (13)
3	0,5% (1)	2,7% (5)	0,5% (1)	2,2% (4)	1% (2)	3,3% (6)	0% (0)	1,1% (2)
Total	100% (198)	100% (182)	100% (198)	100% (182)	100% (198)	100% (182)	100% (198)	100% (182)

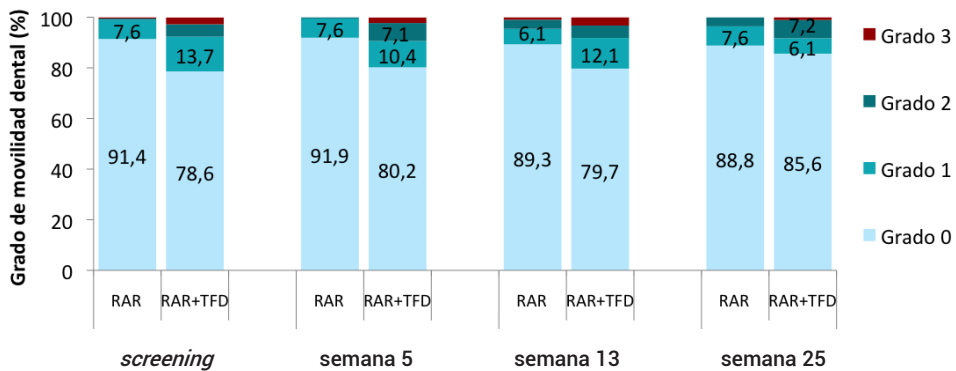


Figura 16: Evolución del grado de movilidad dental según tratamiento.

El grado de movilidad medio (\pm DT) en la visita 2 (*screening*) fue de $0,05 \pm 0,20$ en el grupo RAR y de $0,17 \pm 0,41$ en RAR+TFD ($p > 0,05$) (Tabla 14).

Tabla 14: Evolución de la media y la desviación típica del grado de movilidad dental según grupo.

GRADO DE MOVILIDAD DENTAL		GRUPO	
		RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Dientes con algún punto crítico	198	182
	Media	0,05	0,17
	Desviación típica	0,20	0,41
semana 5	Dientes con algún punto crítico	198	182
	Media	0,04	0,17
	Desviación típica	0,15	0,40
semana 13	Dientes con algún punto crítico	197	182
	Media	0,09	0,18
	Desviación típica	0,29	0,43
semana 25	Dientes con algún punto crítico	197	181
	Media	0,07	0,12
	Desviación típica	0,22	0,34

Se evaluó la movilidad de 198 dientes en el grupo RAR y 182 en el grupo RAR+TFD. En la figura 17 se representa la evolución temporal del valor medio del grado de movilidad dental para cada tratamiento.

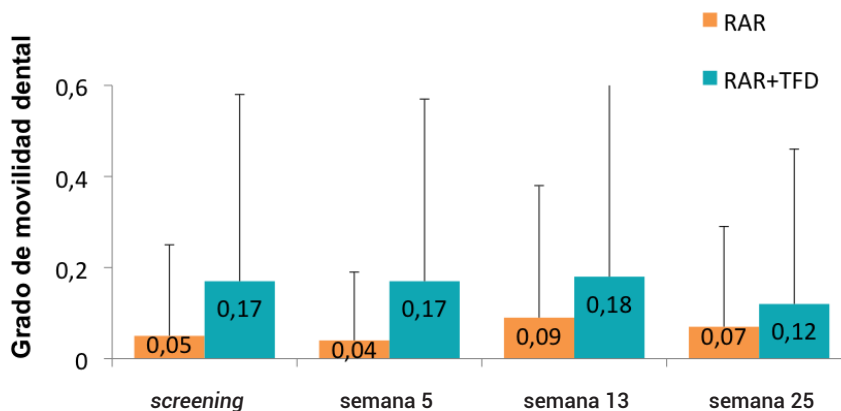


Figura 17: Evolución de la media y la desviación típica del grado de la movilidad dental según tratamiento.

No existen diferencias significativas en la movilidad dental a lo largo del tiempo ($p=0,228$) ni respecto al tratamiento utilizado ($p=0,104$).

1.7. Grado de afectación de furca

El análisis del grado de afectación de furca se realizó sobre 107 dientes que tenían algún punto crítico y que presentaban como mínimo grado 1 de afectación de furca en la visita 2 (*screening*). La distribución de frecuencias en la visita de *screening* indica que mayoritariamente existía grado 1 ó 2 de afectación de furca en ambos grupos (Tabla 15 y figura 18).

Tabla 15: Distribución de la frecuencia del grado de afectación de furca (visita 2: *screening*).

GRADO DE AFECTACIÓN DE FURCA	<i>Screening</i>		Semana 5		Semana 13		Semana 25	
	RAR % (dientes)	RAR+TFD % (dientes)	RAR % (dientes)	RAR+TFD % (dientes)	RAR % (dientes)	RAR+TFD % (dientes)	RAR % (dientes)	RAR+TFD % (dientes)
0	0% (0)	0% (0)	1,7% (1)	0% (0)	0% (0)	10,4% (5)	8,4% (5)	2,1% (1)
1	42,4% (25)	43,8% (21)	50,8% (30)	37,5% (18)	52,5% (31)	41,7% (20)	44,1% (26)	58,3% (28)
2	57,6% (34)	50% (24)	47,5% (28)	62,5% (30)	47,5% (28)	43,8% (21)	47,5% (28)	39,6% (19)
3	0% (0)	6,3% (3)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	4,1% (2)	0% (0)	0% (0)
Total	100% (59)	100% (48)	100% (59)	100% (48)	100% (59)	100% (48)	100% (59)	100% (48)

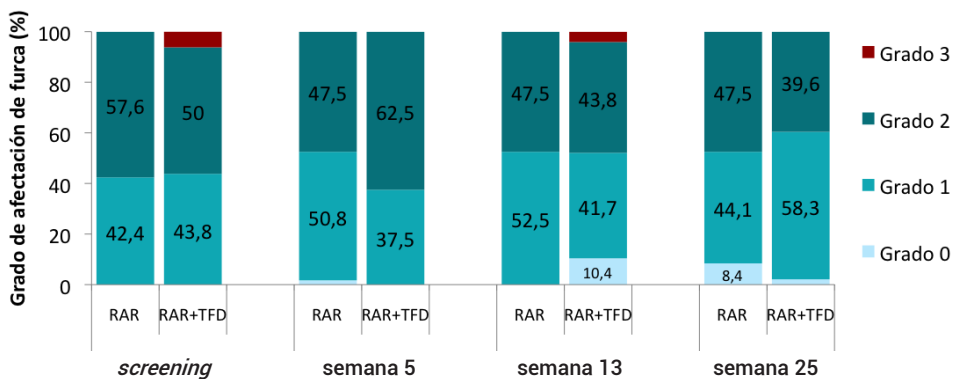


Figura 18: Evolución del grado de afectación de furca según tratamiento.

El grado de afectación de furca medio (\pm DT) en la visita 2 (*screening*) era de $1,58 \pm 0,50$ en el grupo RAR y $1,63 \pm 0,61$ mm en RAR+TFD ($p>0,05$) (Tabla 16).

Tabla 16: Evolución de la media y la desviación típica del grado de afectación de furca según grupo.

GRADO DE AFECTACIÓN DE FURCA		GRUPO	
		RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Dientes con algún punto crítico y afectación de furca en la visita 2	59	48
	Media	1,58	1,63
	Desviación típica	0,50	0,61
semana 5	Dientes con algún punto crítico y afectación de furca en la visita 2	59	48
	Media	1,46	1,63
	Desviación típica	0,49	0,48
semana 13	Dientes con algún punto crítico y afectación de furca en la visita 2	59	48
	Media	1,47	1,42
	Desviación típica	0,50	0,57
semana 25	Dientes con algún punto crítico y afectación de furca en la visita 2	59	48
	Media	1,39	1,38
	Desviación típica	0,49	0,49

En la figura 19 se representa la evolución temporal del valor medio del grado de afectación de furca dental para cada tratamiento.

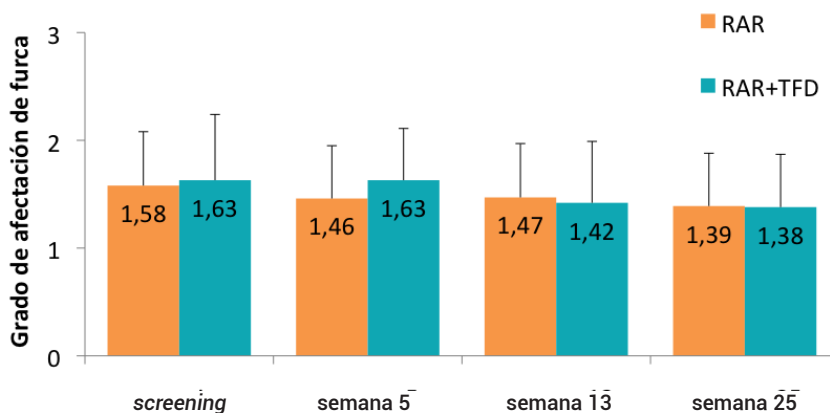


Figura 19: Evolución de la media y la desviación típica del grado de afectación de furca según tratamiento.

No existían diferencias significativas en el grado de afectación de furca a lo largo del tiempo ($p=0,180$) ni respecto al tratamiento utilizado ($p=0,100$).

1.8. Volumen de fluido crevicular

El volumen medio (\pm DT) de fluido crevicular en la visita 2 (*screening*) fue de $0,62 \pm 0,40 \mu\text{l}$ para el grupo RAR y de $0,55 \pm 0,37 \mu\text{l}$ para el grupo RAR+TFD ($p>0,05$). La determinación de la media (\pm DT) del volumen de fluido crevicular en individuos sanos fue de $0,18 \pm 0,05 \text{ ml}$ (Tabla 17).

Tabla 17: Evolución de la media y la desviación típica del volumen de fluido crevicular según grupo.

	VOLUMEN DE FLUIDO CREVICULAR (μl)	GRUPO		
		CONTROL	RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de muestras	20	18	19
	Media	0,18	0,62	0,55
	Desviación típica	0,05	0,40	0,37
semana 5	Número de muestras	0	18	19
	Media	-	0,33	0,41
	Desviación típica	-	0,22	0,32
semana 13	Número de muestras	0	18	19
	Media	-	0,35	0,36
	Desviación típica	-	0,23	0,29
semana 25	Número de muestras	0	18	19
	Media	-	0,33	0,38
	Desviación típica	-	0,25	0,27

La comparación entre los resultados en la visita 2 (*screening*) indica que los pacientes afectados de periodontitis presentaron un aumento significativo del volumen crevicular respecto a los controles sanos ($p < 0,001$). No habiendo diferencias entre el grupo RAR y el RAR+TFD ($p = 0,353$).

El tratamiento aplicado a los pacientes con periodontitis ha disminuido el volumen de fluido crevicular sin diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,193$) con el tiempo. Esta disminución ya era significativa en la visita 6 (semana 5) ($0,33 \pm 0,22 \mu\text{l}$ vs $0,41 \pm 0,32 \mu\text{l}$ para RAR y RAR+TFD respectivamente). Estos valores han permanecido estables a lo largo de todo el tratamiento. El volumen de fluido crevicular ha seguido siendo superior en los pacientes periodontales a tiempo 25 semanas respecto a los controles ($p = 0,003$) (Figura 20).

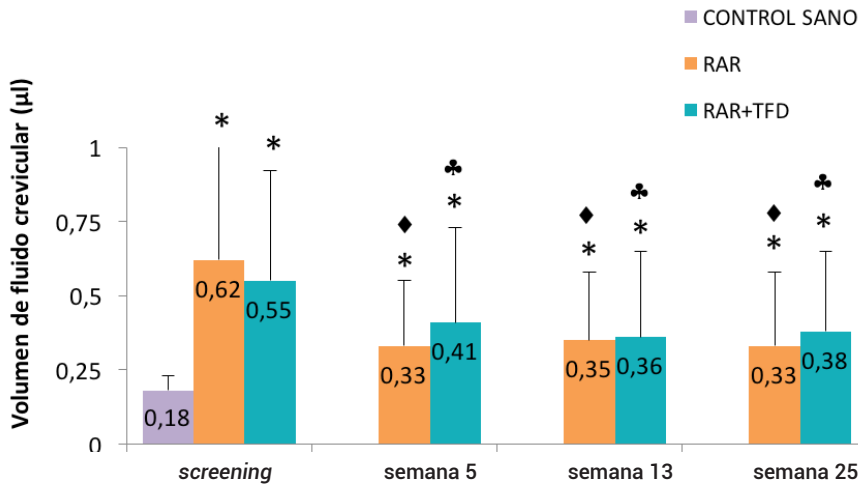


Figura 20: Evolución de la media y la desviación típica del volumen de fluido crevicular según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$).

Resumen

En resumen, los resultados del estudio de la evolución de las variables clínicas indican que ambos tratamientos han disminuido el índice de placa, el nivel de inserción clínica, la profundidad y el sangrado al sondaje, así como el volumen de fluido crevicular mientras que han aumentado la recesión clínica y no han modificado la movilidad de los dientes ni el grado de afectación de furca. Estos resultados se han observado con independencia del tratamiento aplicado sin diferencias significativas entre ellos.

2. Variables microbiológicas

2.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

La tabla 18 recoge los resultados descriptivos de la evolución de la carga bacteriana para *A. actinomycetemcomitans* a lo largo del tratamiento. Los valores de los pacientes con periodontitis aparecerían aumentados respecto a los controles en la visita de *screening* ($p < 0,001$). El tratamiento con RAR no modificó la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* a lo largo del tiempo. Sin embargo, el tratamiento RAR+TFD ha disminuido significativamente ($p < 0,001$) la carga bacteriana alcanzando niveles similares a los de la población control sana al finalizar el estudio (Figura 21). Estos resultados indican que el tratamiento RAR+TFD ha sido más efectivo en la disminución de la carga bacteriana correspondiente a *A. actinomycetemcomitans*.

Tabla 18: Evolución de la media y la desviación típica de *A. actinomycetemcomitans* según grupo

<i>A. actinomycetemcomitans</i> (nº DE COPIAS CUANTIFICADAS)		GRUPO					
		CONTROL SANO		RAR		RAR + TFD	
		VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS
<i>screening</i>	Número de muestras	20	20	18	18	19	19
	Media	193,74	1,70	22911,83	3,95	11871,78	3,33
	Desviación típica	259,26	0,79	22040,55	0,88	20514,11	1,03
semana 5	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	17705,16	3,80	3225,92	3,12
	Desviación típica	-	-	20673,75	0,91	3882,45	0,74
semana 13	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	30417,16	4,06	2085,54	2,69
	Desviación típica	-	-	32838,39	0,88	3442,09	0,83
semana 25	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	12838,43	3,63	627,96	2,25
	Desviación típica	-	-	18585,72	0,79	1029,73	0,74

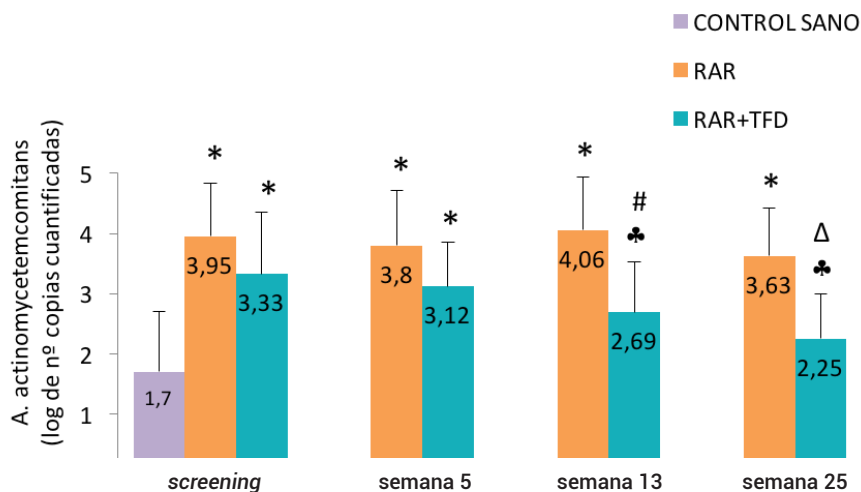


Figura 21: Evolución de la media y la desviación típica de *A. actinomycetemcomitans* según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano. (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (#) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la semana 13 ($p < 0,05$). (Δ) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la semana 25 ($p < 0,05$).

2.2. *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*

La tabla 19 y 20 recoge los resultados descriptivos de la evolución de la carga bacteriana para *P. gingivalis* y *T. forsythia* a lo largo del tratamiento. Los valores de los pacientes con periodontitis aparecían aumentados respecto a los controles en la visita de *screening* ($p < 0,005$). Ambos tratamientos RAR y RAR+TFD han disminuido la carga bacteriana de *P. gingivalis* y *T. forsythia* hasta alcanzar valores similares a los de la población control sana sin diferencias entre los tratamientos (Figura 22 y 23).

Tabla 19: Evolución de la media y la desviación típica de *P. gingivalis* según grupo.

<i>P. gingivalis</i> (nº DE COPIAS CUANTIFICADAS)		GRUPO					
		CONTROL SANO		RAR		RAR + TFD	
		VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS
<i>screening</i>	Número de muestras	20	20	18	18	19	19
	Media	3481,40	3,40	17613,07	3,91	18338,7	3,93
	Desviación típica	2434,31	0,43	30498,12	0,51	16286,81	0,67
semana 5	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	15114,45	3,85	21382,09	4,05
	Desviación típica	-	-	5	0,57	20884,4	0,59
semana 13	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	22111,08	3,97	14917,4	3,88
	Desviación típica	-	-	14765,15	0,47	21668,35	0,53
semana 25	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	6902,94	3,54	9632,41	3,69
	Desviación típica	-	-	12323,92	0,53	10089,2	0,56

Tabla 20: Evolución de la media y la desviación típica de *T. forsythia* según grupo.

<i>T. forsythia</i> (nº DE COPIAS CUANTIFICADAS)		GRUPO					
		CONTROL SANO		RAR		RAR + TFD	
		VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS
<i>screening</i>	Número de muestras	20	20	18	18	19	19
	Media	283,81	2,35	546,7	2,63	449,99	2,51
	Desviación típica	204,60	0,31	438,58	0,31	351,83	0,47
semana 5	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	393,25	2,39	267,50	2,37
	Desviación típica	-	-	371,06	0,47	191,91	0,81
semana 13	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	342,11	2,36	281,47	2,35
	Desviación típica	-	-	308,78	0,45	177,49	0,34
semana 25	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	288,68	2,32	369,99	2,38
	Desviación típica	-	-	283,36	0,35	348,09	0,46

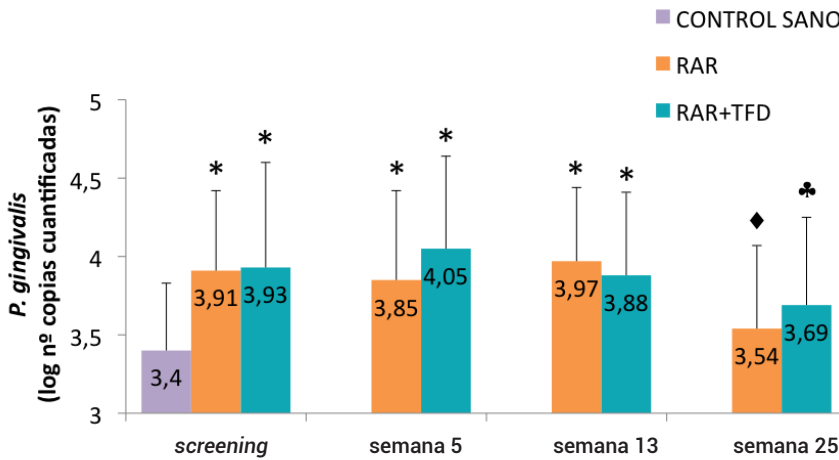


Figura 22: Evolución de la media y la desviación típica de *P. gingivalis* según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$).

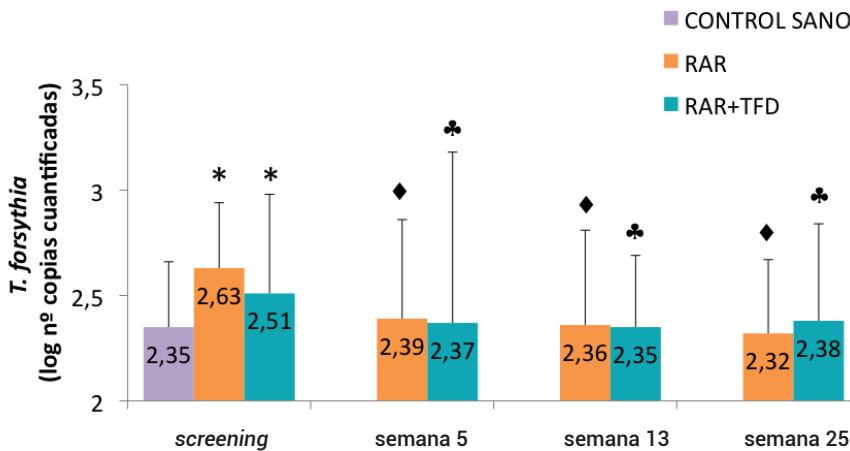


Figura 23: Evolución de la media y la desviación típica de *T. forsythia* según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$).

2.3. *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* y *Campylobacter rectus*

Las tablas 21, 22 y 23 recogen los resultados descriptivos de la evolución de la carga bacteriana para *T. denticola*, *P. intermedia* y *C. rectus* respectivamente a lo largo del tratamiento. En todos los casos, los valores de los pacientes con periodontitis aparecían aumentados respecto a los controles sanos en la visita de *screening* ($p < 0,001$). El tratamiento no ha modificado la carga bacteriana para *T. denticola*, *P. intermedia* y *C. rectus* a lo largo del estudio ni tampoco se han observado diferencias entre tratamientos (Figura 24, 25, y 26). Estos resultados indican que ninguno de los tratamientos ha sido efectivo para contrarrestar el aumento de carga bacteriana producida por estas bacterias en la periodontitis. Los valores finales después del tratamiento seguían siendo significativamente superiores a los controles sanos ($p < 0.001$).

Tabla 21: Evolución de la media y la desviación típica de *T. denticola* según grupo.

<i>T. denticola</i> (Nº DE COPIAS CUANTIFICADAS)		GRUPO					
		CONTROL SANO		RAR		RAR + TFD	
		VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS
<i>screening</i>	Número de muestras	20	20	18	18	19	19
	Media	0,93	0,09	903,86	2,63	573,52	2,32
	Desviación típica	1,80	0,24	860,66	0,74	649,67	0,82
semana 5	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	791,37	2,21	502,52	1,73
	Desviación típica	-	-	1429,50	1,05	769,71	1,41
semana 13	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	1045,97	2,29	1174,63	2,64
	Desviación típica	-	-	1651,73	1,05	1499,44	0,78
semana 25	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	-	-	421,34	2,33	2165,28	2,53
	Desviación típica	-	-	355,97	0,74	3150,87	1,21

Tabla 22: Evolución de la media y la desviación típica *P. intermedia* según grupo.

<i>P. intermedia</i> (nº DE COPIAS CUANTIFICADAS)		GRUPO					
		CONTROL SANO		RAR		RAR + TFD	
		VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS
<i>screening</i>	Número de muestras	20	20	18	18	19	19
	Media	157,40	1,78	14206,60	3,47	10840,10	3,28
	Desviación típica	203,88	0,67	17228,17	1,08	21996,23	0,89
semana 5	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	.	.	18626,68	3,35	13146,60	3,53
	Desviación típica	.	.	31394,96	1,11	21317,78	0,86
semana 13	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	.	.	13985,11	3,44	15194,46	3,55
	Desviación típica	.	.	21112,10	1,00	21466,33	0,94
semana 25	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	.	.	18326,34	3,65	23084,15	3,42
	Desviación típica	.	.	27948,03	0,86	28493,27	1,27

Tabla 23: Evolución de la media y la desviación típica de *C. rectus* según grupo.

<i>C. rectus</i> (nº DE COPIAS CUANTIFICADAS)		GRUPO					
		CONTROL SANO		RAR		RAR + TFD	
		VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS	VALORES SIN TRANSFORMAR	VALORES LOGARÍTMICOS
<i>screening</i>	Número de muestras	20	20	18	18	19	19
	Media	5,50	0,49	2467,46	2,62	1241,76	2,37
	Desviación típica	5,85	0,48	3092,23	1,17	2376,19	0,82
semana 5	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	.	.	2699,85	2,48	1295,83	2,18
	Desviación típica	.	.	4282,45	1,19	2824,18	0,99
semana 13	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	.	.	2433,32	2,49	1000,13	2,17
	Desviación típica	.	.	3539,79	1,20	1824,14	1,06
semana 25	Número de muestras	0	0	18	18	19	19
	Media	.	.	1431,45	2,51	854,79	2,10
	Desviación típica	.	.	1818,58	1,16	1905,36	0,96

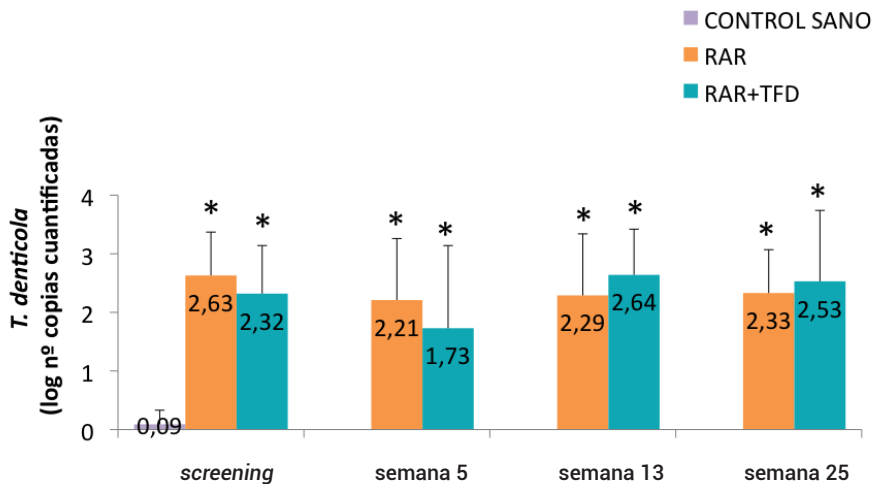


Figura 24: Evolución de la media y la desviación típica de *T. denticola* según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano.

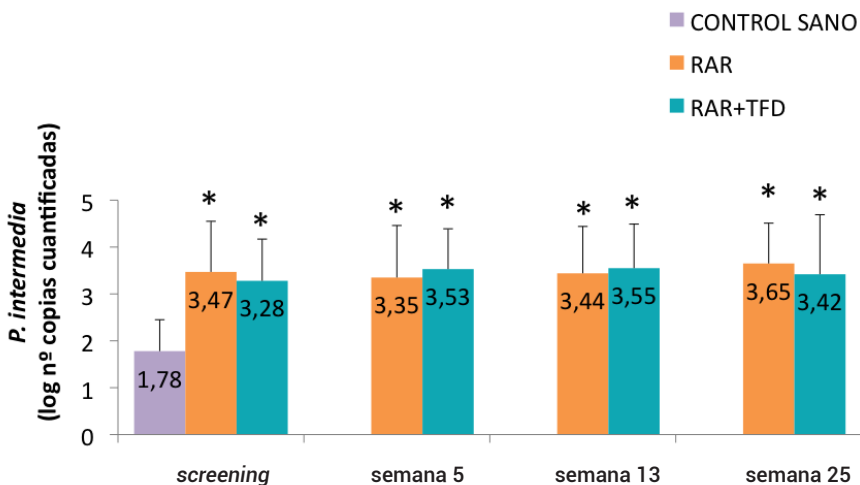


Figura 25: Evolución de la media y la desviación típica de *P. intermedia* según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano.

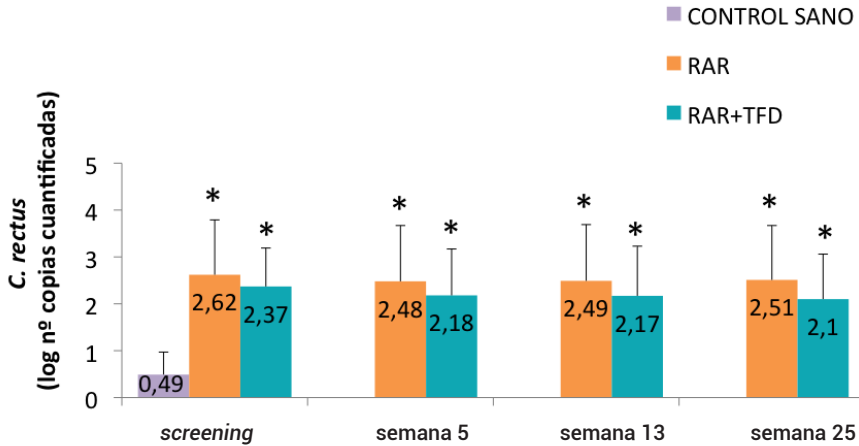


Figura 26: Evolución de la media y la desviación típica de *C. rectus* según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano.

Resumen

La periodontitis ha producido un aumento de la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia* y *C. rectus*. Mientras que el tratamiento RAR no ha modificado la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans*, cuando se ha combinado con TFD se ha reducido la carga hasta alcanzar los valores propios de los individuos sanos. Tanto el tratamiento RAR como RAR+TFD han sido efectivos en la disminución de la carga bacteriana de *P. gingivalis* y de *T. forsythia*.

Por último, ninguno de los dos tratamientos ha modificado la carga bacteriana de *T. denticola*, *P. intermedia* y *C. rectus*, que al final del estudio ha permanecido incrementada.

3. Variables bioquímicas

3.1. Sustancias proinflamatorias

3.1.1. IL-1 β

La tabla 24 recoge los resultados descriptivos de la evolución de la concentración de IL-1 β a lo largo del tratamiento. Los valores iniciales de los pacientes con periodontitis fueron más elevados al inicio del estudio que los controles sanos, con diferencias significativas ($p=0,05$). Ambos tratamientos han producido la disminución significativa de los valores de IL-1 β ($p<0,05$) sin diferencias entre ellos ($p=0,180$). Al final del periodo de estudio tanto los pacientes del grupo RAR como los del grupo RAR+TFD han reducido los valores de IL-1 β hasta alcanzar los valores similares a los del grupo control sano (Figura 27).

Tabla 24: Evolución de la media y la desviación típica de IL-1 β según grupo.

IL-1 β (pg/ml)	GRUPO			
	CONTROL SANO	RAR	RAR + TFD	
<i>screening</i>	Número de muestras	20	18	19
	Media	50,87	88,35	99,50
	Desviación típica	29,73	59,93	73,95
semana 5	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	62,76	59,47
	Desviación típica	.	60,45	42,91
semana 13	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	47,11	44,00
	Desviación típica	.	57,30	42,47
semana 25	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	43,99	48,91
	Desviación típica	.	78,31	48,63

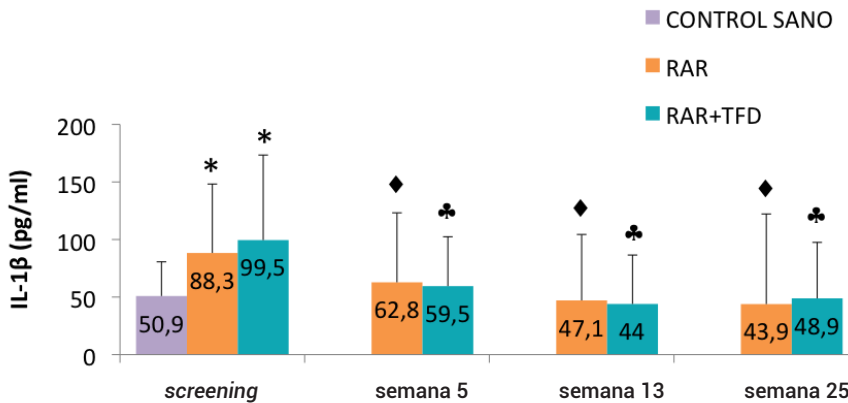


Figura 27: Evolución de la media y la desviación típica de IL-1 β según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$).

3.1.2. IL-6

La tabla 25 recoge los resultados descriptivos de la evolución de IL-6 a lo largo del tratamiento. Los valores iniciales de los pacientes con periodontitis aparecían aumentados respecto a los controles sanos ($p < 0,001$). El tratamiento periodontal no ha disminuido los valores de IL-6 y como consecuencia, al final del estudio los pacientes de ambos grupos seguían manteniendo valores de IL-6 significativamente superiores a los controles sanos ($p < 0,001$). No hay diferencias entre los distintos tratamientos ($p > 0,05$) (Figura 28).

Tabla 25: Evolución de la media y la desviación típica de IL-6 según grupo.

IL-6 (pg/ml)		GRUPO		
		CONTROL SANO	RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de muestras	20	18	19
	Media	10,11	31,18	34,00
	Desviación típica	5,94	7,32	10,91
semana 5	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	27,03	32,00
	Desviación típica	.	10,31	11,92
semana 13	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	29,22	31,70
	Desviación típica	.	7,30	9,89
semana 25	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	26,66	30,07
	Desviación típica	.	7,64	10,82

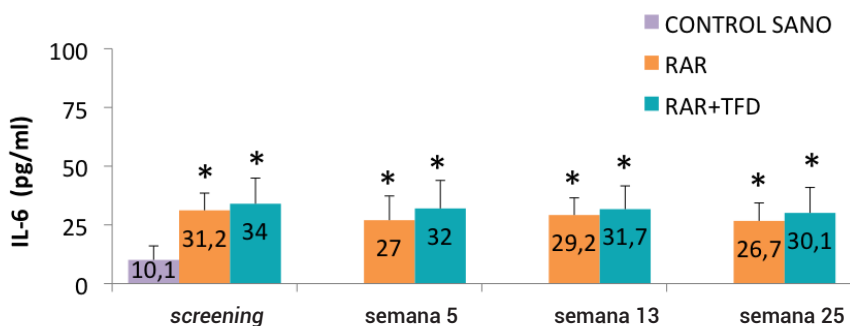


Figura 28: Evolución de la media y la desviación típica de IL-6 según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano.

3.1.3. TNF- α

La tabla 26 recoge los resultados descriptivos de la evolución de TNF- α a lo largo del tratamiento. Los valores iniciales de los pacientes con periodontitis fueron más elevados en la visita 2 que los controles sanos, con diferencias significativas ($p=0,003$). Dentro de cada grupo, se ha producido una disminución con el tiempo, que se ha hecho más patente al finalizar los tratamientos ($p<0,05$). La disminución de la TNF- α ha sido similar en los grupos RAR y RAR+TFD a lo largo del seguimiento ($p=0,410$), alcanzando en ambos casos valores similares a los controles sanos (Figura 29).

Tabla 26: Evolución de la media y la desviación típica de TNF- α según grupo.

TNF- α (pg/ml)		GRUPO		
		CONTROL	RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de muestras	20	18	19
	Media	127,51	168,78	217,20
	Desviación típica	27,85	74,19	114,62
semana 5	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	201,15	223,88
	Desviación típica	.	111,90	104,64
semana 13	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	175,66	212,68
	Desviación típica	.	105,49	112,57
semana 25	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	99,74	125,86
	Desviación típica	.	100,42	117,82

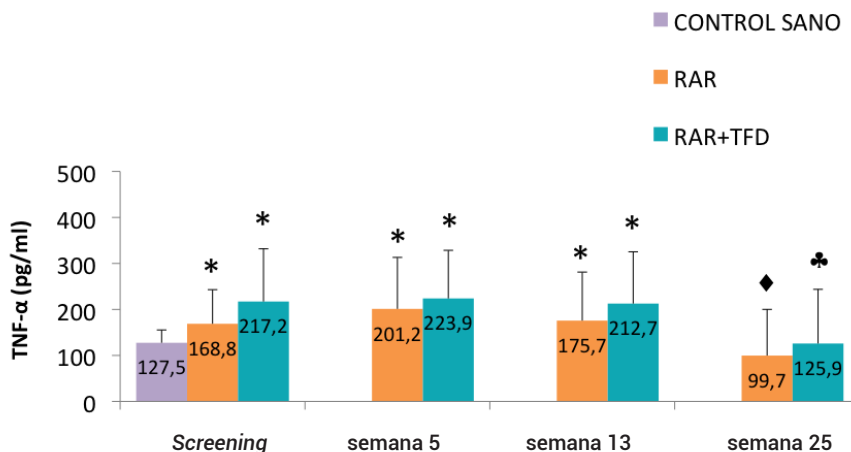


Figura 29: Evolución de la media y la desviación típica de TNF- α según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$).

3.2. Sustancias reguladoras del metabolismo óseo

3.2.1. RANK-L

La tabla 27 recoge los resultados descriptivos de la evolución de RANK-L a lo largo del tratamiento. En la visita de *screening* los valores de los pacientes con periodontitis aparecían aumentados respecto a los controles sanos ($p < 0,05$), sin presentar diferencias entre los grupos RAR y RAR+TFD ($p > 0,05$). Ambos tratamientos han disminuido los valores de RANK-L devolviéndolos a los niveles control, sin diferencias entre los grupos por lo que no hay evidencia estadística para hablar de una evolución distinta de los pacientes periodontales de uno y otro grupo ($p = 0,18$). En la semana 13 el tratamiento con TFD ha disminuido significativamente los valores de RANK-L ($p = 0,03$), respecto al valor inicial mientras que en RAR esta disminución no ha sido significativa (Figura 30).

Tabla 27: Evolución de la media y la desviación típica de RANK-L según grupo.

RANK-L (pg/ml)		GRUPO		
		CONTROL SANO	RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de muestra	20	18	19
	Media	627	842	789
	Desviación típica	132	411	431
semana 5	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	773	780
	Desviación típica	.	393	587
semana 13	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	705	473
	Desviación típica	.	559	355
semana 25	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	519	570
	Desviación típica	.	349	353

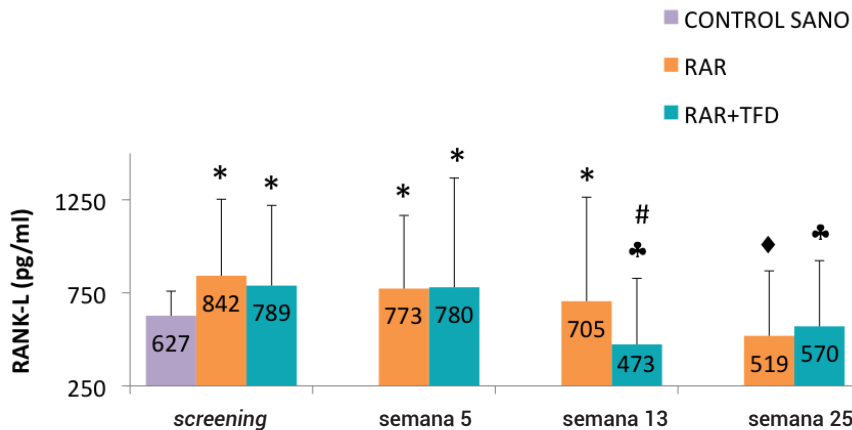


Figura 30: Evolución de la media y la desviación típica de RANK-L según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♣) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (#) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la semana 13 ($p < 0,05$).

3.2.2. OPG

La tabla 28 recoge los resultados descriptivos de la evolución de OPG a lo largo del tratamiento. Los valores iniciales de los pacientes con periodontitis aparecían disminuidos respecto a los controles sanos ($p < 0,05$) sin presentar diferencias entre los grupos RAR y RAR+TFD ($p > 0,05$). Tanto en el grupo RAR como en el de RAR+TFD, los valores de OPG han permanecido prácticamente constantes a lo largo del tiempo. Al finalizar el estudio los valores de OPG han sido significativamente menores que los niveles de los controles sanos en ambos tratamientos ($p < 0,05$) (Figura 31).

Tabla 28: Evolución de la media y la desviación típica de OPG según grupo.

	OPG (pg/ml)	GRUPO		
		CONTROL SANO	RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de muestras	20	18	19
	Media	2169	1304	1456
	Desviación típica	1092	787	805
semana 5	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	1678	1459
	Desviación típica	.	880	1004
semana 13	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	1532	1260
	Desviación típica	.	1153	768
semana 25	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	1209	1359
	Desviación típica	.	534	1023

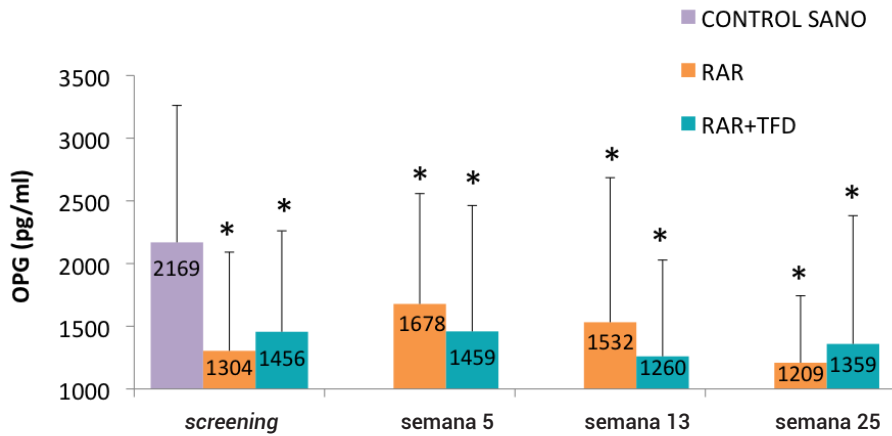


Figura 31: Evolución de la media y la desviación típica de OPG según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano.

3.2.3. Cociente RANK-L/OPG

La tabla 29 recoge los resultados descriptivos de la evolución de cociente RANK-L/OPG a lo largo del tratamiento. El valor del cociente RANK-L/OPG del grupo control sano fue menor que en pacientes con periodontitis, al inicio del estudio ($p < 0,05$). Sin presentar diferencias entre los grupos RAR y RAR+TFD ($p > 0,05$). En la semana 13, la variación del cociente en el grupo RAR+TFD ha sido mayor que en el grupo RAR. En este caso los valores del grupo RAR+TFD se han aproximado a los valores controles sanos ($p > 0,05$), mientras que en el grupo RAR han presentado diferencias significativas frente al control sano. El tratamiento ha producido una reducción significativa ($p < 0,05$) de patrón similar en RAR y RAR+TFD lo que ha llevado a una situación final de homogeneidad entre el grupo control sano y los grupos RAR y RAR+TFD ($p > 0,05$) (Figura 32).

Tabla 29: Evolución de la media y la desviación típica del cociente RANK-L/OPG según grupo.

RANK-L/OPG		GRUPO		
		CONTROL SANO	RAR	RAR + TFD
<i>screening</i>	Número de muestras	20	18	19
	Media	0,38	1,06	0,85
	Desviación típica	0,23	0,95	0,81
semana 5	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	0,85	0,86
	Desviación típica	.	1,03	0,78
semana 13	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	0,89	0,51
	Desviación típica	.	1,16	0,32
semana 25	Número de muestras	0	18	19
	Media	.	0,51	0,63
	Desviación típica	.	0,35	0,53

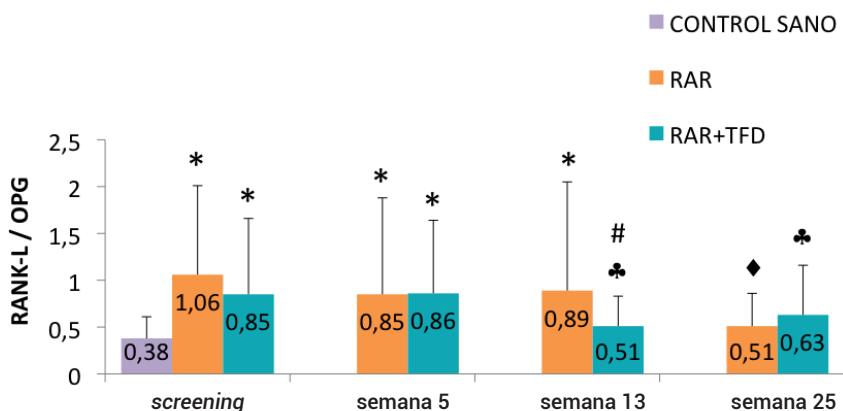


Figura 32: Evolución de la media y la desviación típica del cociente RANK-L/OPG según grupo. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control sano. (♦) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (♠) Indica diferencias significativas respecto a RAR+TFD en la visita de *screening* ($p < 0,05$). (#) Indica diferencias significativas respecto a RAR en la semana 13 ($p < 0,05$).

Resumen

En la periodontitis, los marcadores proinflamatorios: IL-1 β , IL-6 y TNF- α , poseían una concentración en fluido crevicular mayor que en sujetos sanos. Respecto a los marcadores del metabolismo óseo, mientras que RANK-L estaba incrementado, los niveles de OPG eran menores. Consecuentemente el valor del cociente RANK-L/OPG se encontraba incrementado respecto a los controles. Independientemente del tratamiento recibido, la concentración de TNF- α , IL-1 β disminuía, llegando a valores similares a los de los controles sanos sin modificaciones en los niveles de IL-6 que seguían siendo elevados al final del tratamiento.

Tanto el tratamiento con RAR como con RAR+TFD han disminuido los niveles de RANK-L, mientras que no se han modificado los de OPG. Consecuentemente, se ha producido una disminución del cociente RANK-L/OPG.

4. Valoración de los efectos adversos de la TFD

No se ha observado ningún efecto adverso como inflamación o tinción gingival atribuible al tratamiento coadyuvante de TFD sobre los tejidos periodontales de los pacientes del grupo RAR+TFD.

CAPÍTULO V

Discusión



1. Justificación de la muestra, de la terapia coadyuvante y de los parámetros estudiados

La muestra de pacientes periodontales del presente estudio, constituida por 40 individuos es muy similar a la del estudio Carvalho et al.,¹⁵⁶ aunque la inclusión de un tercer grupo de 20 pacientes sanos, es una variante que no hemos observado en ninguno de los estudios incluidos en nuestra revisión sistemática. Obtener este grupo control constituido por individuos sistémica y periodontalmente sanos, nos proporciona una ventaja a la hora de realizar comparaciones puesto que la metodología empleada es la misma que la que se ha utilizado en los pacientes periodontales y no está sujeta a comparaciones con otros estudios que presentan gran heterogeneidad en los resultados, bien por diferencias en los parámetros de estudio, o bien por el uso de diferentes métodos de determinación, unidades u otras variaciones metodológicas.

Se realizó el estudio en pacientes con periodontitis crónica por su alta prevalencia.¹⁸¹ A pesar de esto, la selección de la muestra fue difícil debido a los estrictos criterios de exclusión, que especificaban que los pacientes aunque periodontalmente afectados, debían estar sistémicamente sanos y no tomar o haber tomado ninguna medicación que alterase la evaluación del tratamiento o haber recibido RAR en los últimos seis meses, no ser fumador, o presentar una higiene oral deficiente. Todos estos criterios de exclusión se asocian normalmente a pacientes periodontales crónicos, ya que suelen ser fumadores,¹⁸² presentar una edad avanzada¹⁸³ que puede asociarse a la ingesta de algún tipo de medicación además de no presentar una higiene bucal adecuada.^{184, 185} Además, si los pacientes ya están incluidos en un programa de mantenimiento periodontal, es muy probable que hayan recibido RAR al menos cada 6 meses.¹⁸⁶ Estas limitaciones dificultaron encontrar los pacientes periodontales crónicos adecuados para nuestro estudio.

Decidimos utilizar como terapia coadyuvante al RAR la TFD por ser un método no quirúrgico, económicamente aceptable,¹⁸⁷ que no genera resistencias,¹²⁸ es inocuo sobre los tejidos dentales⁸⁸ y que ha demostrado ser eficaz ante patógenos periodontales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bacteria con capacidad de invasión de los tejidos periodontales,¹⁸⁸ debido a que el agente fotosensibilizante atraviesa el epitelio y el tejido conectivo.¹⁸⁹ La realización del RAR previo es fundamental porque la TFD no puede por sí sola eliminar cálculo subgingival residual, responsable de mantener una base para la nueva formación de biopelícula bacteriana.³¹ Además, el RAR permite una desorganización de la biopelícula subgingival (que supone un medio protector para los microorganismos), lo cual facilita las acciones de la TFD sobre las bacterias en estado planctónico.¹⁹⁰ Aunque el nuevo crecimiento y recolonización de las bolsas se produce de forma temprana, entre los tres y siete días postratamiento, la microflora subgingival esta alterada.¹⁹¹ Sin embargo, las bacterias periodontopatógenas no se reorganizan en una nueva biopelícula hasta aproximadamente 60 días tras el RAR,³⁹ de ahí la importancia de la terapia de mantenimiento periodontal. Puesto que la TFD se usa para evitar la reorganización de la biopelícula al erradicar los patógenos periodontales, es posible que su aplicación múltiple aumente la efectividad del tratamiento. Este es el motivo por el que en nuestro estudio utilizamos tres sesiones de TFD en vez de una única sesión utilizada en la mayoría de estudios.^{124, 135, 159}

A las ventajas anteriores, se les puede añadir efectos positivos sobre la inflamación, cicatrización de tejidos blandos y óseos, además de disminuir la hipersensibilidad dentaria y el dolor postratamiento.¹⁹² Por otra parte, en nuestro estudio se ha utilizado conjuntamente el fotosensibilizador y el láser ya que su uso individualizado no desencadena efectos suficientes para destruir las bacterias¹⁹³ ni producir cambios clínicos.¹⁹⁴

La elección de los parámetros clínicos, bioquímicos y microbiológicos en nuestro estudio obedece a que la periodontitis se considera una

enfermedad de origen inflamatorio producida por la respuesta de la inmunidad a la presencia de bacterias periodontopatógenas. En este sentido, nuestro estudio permitirá dilucidar si la terapia fotodinámica es capaz de mejorar alguno de estos parámetros respecto a la terapia periodontal básica.

La elección de las pautas de reevaluación es similar a la de estudios previos que utilizan la TFD como coadyuvante.^{1, 135}

2. Limitaciones del estudio

En cualquier estudio clínico controlado aleatorizado se debe tener en cuenta sus limitaciones, previamente al análisis de los resultados. Una de las limitaciones que se presentó en la selección de la muestra, fue que a pesar de controlar un número considerable de variables, no contemplábamos la predisposición genética del paciente a la enfermedad periodontal, basada por ejemplo en el polimorfismo de los genes que intervienen en la producción de citoquinas y que influyen en una mayor afectación o menor eficacia del tratamiento convencional, pudiendo establecerse diferencias entre los pacientes que desconocemos y que pueden variar el resultado global del estudio.¹⁹⁵

Otra limitación relacionada con los parámetros clínicos es la subjetividad de alguno de ellos como el análisis de la movilidad dental o el grado de afectación de furca. Sin embargo los resultados referentes a profundidad de sondaje, recesión y nivel de inserción clínica son más objetivos. En este caso, hay que considerar que no se ha utilizado una sonda de presión controlada (ejercida sobre el fondo de la bolsa periodontal) por lo que no tenemos la seguridad de que se ejerce la misma presión en cada medición. Con la sonda manual ejercemos una fuerza aproximada de 20 gramos, que aunque no está calibrada es fácil de controlar, pues es

igual a la presión que se ejerce cuando se deja la sonda apoyada por su propio peso sobre una superficie, si ejercemos más presión las medidas pueden cambiar y la evaluación del sangrado al sondaje puede dar falsos positivos.¹⁹⁶ Aunque posible, la cualificación de nuestro examinador, con un alto porcentaje de coincidencia entre los valores en la toma de mediciones, hace improbable que se cometa este error metodológico.

El estudio de las variables microbiológicas y bioquímicas se llevó a cabo mediante el análisis de la bolsa periodontal más profunda de cada cuadrante que asumimos como representativas de toda la boca. Dada la escasez de volumen de fluido crevicular, todas las muestras se procesaron conjuntamente por lo que perdemos la perspectiva del análisis y evolución individual a favor del global. El volumen real del fluido crevicular puede verse afectado por varios factores, como la velocidad de flujo,¹⁹⁷ el trauma gingival,¹⁹⁸ la evaporación de las muestras,¹⁶⁹ la repetición de la toma de muestra¹⁹⁹ y la contaminación por placa bacteriana, saliva o sangre.

3. Evolución de los parámetros en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica

El objetivo de este estudio clínico controlado aleatorizado simple ciego ha sido evaluar los efectos adicionales de la terapia fotodinámica como coadyuvante del RAR en el tratamiento de la periodontitis crónica. Para ello se ha determinado el efecto del RAR sobre los parámetros clínicos, microbiológicos y bioquímicos y se han comparado con los efectos logrados por la combinación del RAR y la TFD. Las determinaciones microbiológicas y bioquímicas se han realizado sobre muestras de fluido crevicular tomadas al inicio (visita de *screening*) y a las 5, 13 y 25 semanas del tratamiento siempre en las mismas localizaciones. A lo largo del protocolo del estudio de seis meses de duración, los pacientes han sido sometidos a tres sesiones de TFD.

3.1. Evolución de los parámetros clínicos en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica

Los parámetros clínicos constituyen un indicativo de la efectividad del tratamiento. En este sentido, nuestros resultados indican que los pacientes afectados de periodontitis crónica, presentan un aumento de la profundidad de sondaje, recesión clínica, sangrado al sondaje, índice de placa y volumen de fluido crevicular. De igual forma, estaban incrementados el grado de afectación de furca, el nivel de inserción clínica y la movilidad dental. El tratamiento periodontal básico producía una mejoría significativa en el índice de placa, la profundidad y el sangrado al sondaje y el volumen de fluido crevicular, sin cambios en la movilidad de los dientes y en el grado de afectación de furca y con aumento de la recesión clínica durante los seis meses de duración del tratamiento. Puesto que el aumento de la recesión era clínicamente irrelevante (una diferencia de 0,1 mm) la mejoría en el nivel de inserción se producía como consecuencia de una menor profundidad de sondaje,²⁰⁰ posiblemente debido a la formación de una adherencia epitelial larga.²⁰¹ Nuestros resultados coinciden con estudios previos^{202,203} en cuanto a la evolución del tratamiento periodontal básico. Los efectos del tratamiento sobre la profundidad de sondaje eran prácticamente inmediatos. La disminución de la profundidad de sondaje alcanzaba valores máximos ya en la quinta semana debido a la eliminación de los factores etiológicos (placa y cálculo subgingival) y su consecuente desinflamación. La terapia de soporte periodontal (13 semana) y una correcta higiene bucal, aunque no producen una mejoría adicional significativa sobre la profundidad de sondaje, son necesarias para que no se reproduzcan las condiciones periodontales iniciales. La reducción media de la profundidad de sondaje a lo largo del tratamiento era de 2.07 mm en el grupo RAR y de 1.9 mm en el grupo RAR+TFD en dientes con profundidad de sondaje inicial \geq de cinco mm. Estos resultados son cualitativamente similares a

los descritos en otros trabajos^{154,155} aunque cuantitativamente la reducción en nuestro caso es mayor (2 mm frente a 1 mm). Estas diferencias pueden ser debidas a diferencias metodológicas. Mientras que en nuestro estudio la TFD se aplicaba en tres sesiones, en estos estudios solo se aplicaba una vez.

Tanto el sangrado al sondaje como el volumen de fluido crevicular evolucionaban de forma similar a la profundidad al sondaje. En la semana cinco se obtenía una disminución del 44% en el sangrado al sondaje y del 37% en el volumen de fluido crevicular. Estos valores se mantenían constantes a lo largo de los seis meses de estudio. A pesar de estas disminuciones, no se llegaban a alcanzar los valores que presentan los sujetos sanos, lo que sugiere que el tratamiento periodontal básico no resuelve por completo la inflamación, debido posiblemente a la dificultad de un adecuado RAR en áreas de difícil acceso y a la recolonización desde otros reservorios bacterianos orales localizados en la lengua, mucosa, saliva, amígdalas o en el interior de los tejidos blandos.²⁰⁴ Además de esta transmisión entre nichos, puede darse una transmisión entre individuos y provocar la recolonización de las bolsas periodontales por periodontopatógenos.²⁰⁵

En general, los pacientes con periodontitis, con una pobre higiene bucal, presentan un índice de placa bacteriana más elevado que los pacientes de nuestro estudio (2-3 vs 1,09). Este menor índice de placa es la consecuencia de los criterios de exclusión puesto que se han excluido los pacientes con índice de placa (código dos) en más de un 30% de los dientes.

El tratamiento periodontal básico producía una reducción en el índice de placa bacteriana de un 36% en la quinta semana mientras que la combinación de RAR y TFD suponía una mejoría del 51%. A partir de este momento, los sucesivos tratamientos no suponían una mejora adicional del índice de placa. Esta mayor reducción puede ser debida a que la TFD evite la reorganización de la biopelícula, sin embargo, puesto que se ha

3. Evolución de los parámetros en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica

demostrado que la terapia coadyuvante de TFD no puede eliminar por ella misma toda la biopelícula en la que se organiza la placa bacteriana,¹⁹⁰ parece probable que las diferencias encontradas entre los grupos a la quinta semana sean debidas a un mayor grado de motivación por parte de los pacientes que reciben TFD (efecto *Hawthorne*), que se traduce en una mayor higiene.

La periodontitis crónica incrementa la movilidad dental ²⁰⁶ y el grado de afectación de furca respecto a la población sana.²⁰⁷ A pesar de que son los parámetros clínicos más subjetivos ya que pueden estar influenciados por la dificultad en la exploración o incluso la intervención de otros factores no analizados en este estudio (como la sobrecarga oclusal), el tratamiento con RAR o con RAR+TFD no modificaba estos parámetros.

Del análisis de los resultados de los parámetros clínicos, podemos deducir que en nuestras condiciones experimentales, la combinación de las sesiones de terapia fotodinámica con el tratamiento periodontal básico no mejoraban los parámetros clínicos estudiados. Estudios previos que combinan la TFD con el RAR presentan resultados contradictorios. Mientras que algunos estudios muestran que la TFD como tratamiento coadyuvante del RAR mejora los parámetros clínicos comparado con el RAR^{149,150} otros no encuentran beneficios adicionales.^{154, 155} A pesar de los numerosos estudios existentes, por ahora no es posible realizar una comparación entre todos ellos debido a las variaciones en las condiciones de aplicación de la TFD o en el diseño experimental.²⁰⁸

Existe un menor número de estudios en el que se realicen aplicaciones múltiples de TFD. Yilmaz et al.¹⁵² aplicaba seis sesiones de TFD en un periodo de 11 días y evaluaba los resultados a los 32 días. En estudios más recientes se aplicaban cuatro sesiones a intervalos de siete días y se evaluaban los resultados a los tres meses¹⁵¹ o cuatro sesiones a intervalos de tres meses y se evalúan a los 12 meses.¹⁵⁶ Excepto en el estudio de Franco et al.,¹⁵¹ donde se describe una mejoría significativa en el sangrado,

en el resto de parámetros clínicos estudiados no se observaba que la TFD produjera una mejoría adicional, a pesar de la aplicación múltiple de la TFD.

3.2. Evolución de los parámetros microbiológicos en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica

El estudio de las variables microbiológicas se realizó en el fluido crevicular, determinando los niveles de expresión génica de las bacterias implicadas en la periodontitis crónica.

Como cabe esperar, todos los pacientes periodontales presentaban un aumento de la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia* y *C. rectus*.²⁰⁹ A pesar de que nuestros resultados no revelaban diferencias en los parámetros clínicos entre los pacientes sometidos a RAR y los que además reciben TFD, sí que se observaba una disminución significativa de la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans*, bacteria con capacidad de invasión de los tejidos periodontales,¹⁸⁸ al combinar RAR+TFD, mientras que al aplicar el tratamiento RAR no se modificaba la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans*. Estas diferencias pueden ser debidas a que el agente fotosensibilizante utilizado en la TFD, atraviesa el epitelio y tejido conectivo y destruye la bacteria.¹⁸⁹ Puesto que la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* era resistente al tratamiento periodontal básico, esto podría justificar el uso de la TFD como terapia complementaria puesto que aumenta la efectividad. Inicialmente, estudios *in vitro* demostraron que el uso de fotosensibilizadores a una longitud de onda específica, reducían significativamente los niveles de bacterias orales.²¹⁰ Esta disminución de la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* se produce sin provocar daños en los tejidos periodontales.^{194, 211} Resultados similares se han descrito en un estudio a boca partida de seis meses de duración con una

3. Evolución de los parámetros en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica

sola aplicación de TFD.¹⁵³

La carga bacteriana de *P. gingivalis* y *T. forsythia* disminuía significativamente en ambos grupos hasta alcanzar los valores propios de los individuos sanos, sin diferencias entre ellos. Estudios *in vivo* en cultivos microbiológicos obtenían resultados similares.¹⁵⁸ Aunque para *P. gingivalis* y *T. forsythia* cabría esperar una respuesta similar a la de *A. actinomycetemcomitans* puesto que estas bacterias también son capaces de penetrar en los tejidos gingivales, en este caso parece que el uso exclusivo de RAR sería suficiente para disminuir la carga bacteriana de *P. gingivalis* y *T. forsythia*.^{212, 213} Una posibilidad consiste en que la penetración de la *P. gingivalis* y *T. forsythia* sea menor que para la *A. actinomycetemcomitans* por lo que solo el RAR es capaz de disminuir la carga bacteriana. En apoyo de esta idea, tanto el tratamiento con RAR como con RAR+TFD devuelven su carga bacteriana hasta niveles similares a los de la población sana.

La carga bacteriana de *T. denticola*, *P. intermedia* y *C. rectus* permanecía incrementada al final del estudio. Estos resultados indican que el RAR o el RAR+TFD no son tratamientos efectivos en la eliminación de estas bacterias y permanecen elevados respecto a la población sana. Puede que el motivo de que no bajen los niveles de estas bacterias sea debido a que las bacterias en general pueden encontrarse en otros reservorios: irregularidades de la superficie radicular, túbulos dentinarios, la superficie dorsal de la lengua, mucosa bucal, paladar y amígdalas;²¹⁴ por lo que la completa eliminación de las mismas mediante RAR o RAR+TFD es insuficiente ya que sólo se centra en eliminar las bacterias de la bolsa periodontal y no del resto de nichos. Son necesarios estudios complementarios para dilucidar el tratamiento más adecuado para la destrucción de estas bacterias. En un estudio reciente de grupos paralelos de Carvalho et al.,¹⁵⁶ se obtiene un resultado similar para *T. denticola*. (PCR), al aplicar TFD como coadyuvante al RAR en el grupo test en cuatro ocasiones y evaluar su efecto durante 12 meses.

En el presente estudio los niveles medios de carga bacteriana disminuían para *P. gingivalis* y *T. forsythia* pero no para *T. denticola*, *P. intermedia* y *C. rectus*, sin diferencias entre los grupos. Únicamente *A. actinomycetemcomitans* disminuía su carga cuando RAR se utilizaba conjuntamente con la TFD. Diversos estudios demuestran que las bacterias gram positivas son susceptibles a la inactivación fotodinámica, mientras que las bacterias gram negativas son resistentes a muchos de los fotosensibilizadores utilizados en TFD.²¹⁵ En nuestro estudio se ha utilizado el azul de metileno como fotosensibilizador por su seguridad y efectividad en la inactivación de bacterias periodontales patógenas gram positivas y gram negativas.^{142, 143} Este beneficio probablemente sea debido a que el azul de metileno activado produce radicales libres y oxígeno singlete, cuyas reacciones son responsables del daño irreversible en la membrana citoplasmática bacteriana, incluyendo la modificación de proteínas, la ruptura de la cadena respiratoria y alteraciones de ácidos nucleicos.¹³⁷ Puesto que las bacterias periodontopatógenas también pueden invadir el tejido periodontal tras el RAR, la combinación del RAR con TFD, como coadyuvante del tratamiento antimicrobiano puede ser muy útil sobre todo cuando la carga bacteriana de *A. actinomycetemcomitans* este incrementada.

Si bien estos resultados son difíciles de interpretar debido a la gran variedad de protocolos utilizados en estudios similares, nuestros resultados presentan ciertas analogías con estudios previos. Por ejemplo, Christodoulides et al.¹⁵⁷ en un estudio a seis meses de grupos paralelos y una sola aplicación de TFD no obtuvo ninguna diferencia en los resultados de PCR entre los grupos de tratamiento (RAR Y RAR+TFD) para ninguna de las bacterias periodontales estudiadas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *C. rectus*). Lo mismo ocurría en el estudio previo a boca partida de Yilmaz et al.,¹⁵² que valoraba seis aplicaciones de TFD como coadyuvante al RAR en seis ocasiones

durante 32 días.

Los cambios en la composición bacteriana después del tratamiento periodontal constituyen la base para la cicatrización periodontal que se expresa como reducciones en la profundidad de sondaje y mejorías en el nivel de inserción clínica.²⁰⁹ En nuestro estudio ambos tratamientos disminuían por igual la profundidad de sondaje y aumentaban de forma similar la ganancia del nivel de inserción clínica, lo cual significa que la TFD no aporta beneficios adicionales al tratamiento periodontal básico que se reflejen en una mejora de los parámetros clínicos.

3.3. Evolución de los parámetros bioquímicos en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica

Son pocos los estudios que relacionen la carga bacteriana periodontopatógena con el estado proinflamatorio que presenta el paciente periodontal y el uso de la TFD como coadyuvante al RAR. La reacción inflamatoria local libera citoquinas responsables de la propagación de la inflamación al tejido gingival y óseo. Desde este punto de vista, para valorar los efectos de la TFD sobre la inflamación y metabolismo óseo, hemos determinado las concentraciones de IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANK-L y OPG como marcadores representativos de los procesos inflamatorio y óseo respectivamente.

En nuestro estudio, los pacientes periodontales presentaban unas concentraciones de marcadores proinflamatorios, IL-1 β , IL-6, TNF- α mayores que los sujetos sanos, en respuesta a la carga de bacterias periodontopatógenas responsables de inducir y mantener la respuesta inflamatoria.²¹⁶ Estos resultados indicaban que IL-1 β , IL-6, TNF- α juegan un papel fundamental en la etiopatogenia de la periodontitis.²¹⁷ El tratamiento periodontal básico disminuía los niveles de TNF- α y de IL-1 β devolviendo los valores a los niveles de los sujetos sanos, indicando la efectividad

del tratamiento en la reducción de la inflamación. Nuestros resultados coinciden con trabajos previos y aportan datos indicativos de que la terapia periodontal básica es un método efectivo para la disminución de la inflamación.^{188, 218}

Dado que el aumento de IL-1 β y TNF- α se ha relacionado con una mayor producción de IL-6,^{52, 59} cabía esperar que la disminución de IL-1 β y TNF- α conllevara a una disminución de IL-6. Sorprendentemente, en nuestro estudio no se modificaban los niveles de IL-6 pese a la disminución de los niveles de IL-1 β y TNF- α . Estos resultados indican que la regulación de la secreción de IL-6 no parece que se encuentre bajo el control exclusivo de IL-1 β y TNF- α . En un ensayo clínico previo, tampoco se han descrito diferencias en los niveles de IL-6.²⁴

Puesto que IL-6 también es capaz de estimular la síntesis de IL-1 β y TNF- α además de aumentar la atracción y activación de neutrófilos al tejido periodontal inflamado, es posible que sus niveles no disminuyan debido a la carga bacteriana residual que no se ha logrado erradicar con el tratamiento. La eficacia de la TFD como tratamiento antibacteriano¹⁵⁹ cabría esperar que se tradujese en una mejoría del proceso inflamatorio y por consiguiente de los marcadores inflamatorios. Sin embargo, el hecho de que la reducción de estos marcadores era prácticamente la misma en RAR que en RAR en combinación con TFD, indica que la TFD no aporta una mejoría adicional en la inflamación.

Incluso teniendo en cuenta las diferencias metodológicas ya comentadas que afectan básicamente a las características de la aplicación de la TFD, los resultados previos no son concluyentes, es más, apuntan en algunos casos en sentido contrario. Pourabbas et al.,¹⁵⁵ observaron una mejoría adicional a los tres meses, con una reducción de las concentraciones de TNF- α , pero no de IL-1 β al aplicar TFD conjuntamente con RAR respecto al RAR. El uso combinado de terapia fotodinámica con láser de baja intensidad, reduce los niveles de IL-1 β en fluido crevicular.²¹⁹

3. Evolución de los parámetros en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica

La aplicación de RAR+TFD disminuye el incremento de los niveles de TNF- α producido tras RAR.¹⁵⁸ Nuestros resultados están más en consonancia con los descritos por Ramos de Oliveira et al.,¹⁸⁸ en periodontitis agresiva, donde el tratamiento con RAR+TFD no mejoraba los niveles de TNF- α respecto a la disminución producida con RAR.

La diversidad de resultados en diferentes estudios apoya la idea de que la producción de mediadores inflamatorios difiere con la localización de las bolsas periodontales y entre individuos, además de la influencia de factores genéticos²²⁰ y la composición de la flora periodontopatógena.²²¹

Las interleuquinas de la inmunidad innata inician la respuesta inflamatoria y conllevan a modificaciones del metabolismo óseo.⁶¹ El eje RANK/RANK-L/OPG es el principal regulador de la diferenciación y activación de los osteoclastos.⁴⁹ En nuestro estudio, los pacientes periodontales presentaban una concentración mayor de RANK-L y una menor concentración de OPG que los sujetos sanos. Por tanto, el cociente RANK-L/OPG estaba incrementado indicando que en la periodontitis hay un predominio de reabsorción ósea.⁴⁸

La unión de RANK con RANK-L activa la osteoclastogénesis y por tanto favorece la destrucción ósea. La unión de RANK-L con OPG disminuye la formación del complejo RANK-RANK-L y por tanto se considera un factor de protección frente a la osteoclastogénesis. Sustancias proinflamatorias, incrementadas en el fluido crevicular durante la periodontitis, aumentan los niveles de RANK-L y disminuyen los de OPG^{222, 223} favoreciendo la reabsorción ósea. Por tanto las alteraciones de los niveles de RANK-L y OPG en el líquido crevicular son un reflejo de la respuesta biológica que ocurre en la periodontitis.

A los tres meses de nuestro estudio, los valores de RANK-L disminuyen más en los pacientes con RAR+TFD que los del grupo RAR. Estas diferencias se igualan a los seis meses del tratamiento, de forma que en ambos casos

se produce una disminución de los valores de RANK-L sin diferencias entre los grupos, hasta alcanzar valores similares a los de la población control. Estos cambios no afectan a los valores de OPG que continúan siendo más bajos que en los individuos sanos durante todo el estudio, a pesar del tratamiento periodontal. OPG no varía, bien porque los niveles de RANK-L se normalizan o bien porque está unido al exceso de RANK-L y no se puede detectar.⁵⁴ En este sentido, Franco et al.,¹⁵¹ encuentran a los tres meses del tratamiento un aumento de los valores de OPG cuando el RAR se aplica con la TFD sin más diferencias en los marcadores del metabolismo óseo. Las diferencias con nuestros resultados pueden ser debidas a la metodología utilizada.

Por tanto, el tratamiento periodontal en nuestro estudio produce una disminución significativa del cociente RANK-L/OPG debido principalmente a la disminución de la concentración de RANK-L. En este caso la utilización de la TFD como coadyuvante al RAR ofrece una mayor protección en cuanto a la disminución temprana de la destrucción ósea. Es posible que un aumento del número de sesiones de TFD en nuestro protocolo, contribuya a minimizar la destrucción ósea inducida en la periodontitis.

En nuestra revisión encontramos un estudio clínico controlado aleatorizado sobre TFD en la periodontitis que evalúe al mismo tiempo parámetros clínicos, microbiológicos y bioquímicos. Además los resultados no siempre son comparables debido a la variedad en el número de pacientes, la duración del estudio y la ausencia de un protocolo eficaz para la TFD.

Los resultados de este estudio mostraron que el tratamiento coadyuvante con TFD en tres ocasiones durante un tratamiento periodontal básico con un seguimiento de 6 meses, no produjo mejoras clínicas adicionales, tan sólo disminuyó la carga de *A. actinomycetemcomitans*. significativamente respecto a RAR, y a los 3 meses hubo una disminución de RANK-L, que aumento posteriormente a los 6 meses. Necesitamos

3. Evolución de los parámetros en el tratamiento de la periodontitis: efecto de la terapia fotodinámica

de más estudios clínicos controlados aleatorizados a largo plazo para corroborar los efectos clínicos, microbiológicos y bioquímicos, de la aplicación de repetidas dosis de TFD, una vez establecidas las condiciones más apropiadas de aplicación de TFD, antes de llegar a una conclusión definitiva sobre la relevancia clínica de la TFD en el tratamiento de la periodontitis crónica. Hasta la fecha no existen investigaciones sobre la combinación más efectiva de las longitudes de onda y fotosensibilizadores, su concentración óptima y tiempo de actuación, la dosis óptima de energía del láser, la duración de la radiación y el número de aplicaciones de la TFD. Es necesario realizar un protocolo reglado que acote estos parámetros y nos proporcione unas pautas de actuación para utilizar la TFD de forma eficaz, como coadyuvante al RAR.

CAPÍTULO VI

Conclusiones



Conclusiones

1. El tratamiento básico periodontal disminuye el índice de placa, el sangrado al sondaje y el volumen del fluido crevicular sin producir cambios en la movilidad dental ni en el grado de afectación de furca. Además, mejora los niveles de inserción clínica debido a una disminución en la profundidad de sondaje y a un aumento en la recesión clínica. El uso de la terapia fotodinámica como coadyuvante, no aporta beneficios adicionales al tratamiento periodontal básico.

2. El tratamiento periodontal produce una disminución de la carga bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* sin modificar la de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* y *Campylobacter rectus*. El uso de la terapia fotodinámica coadyuvante disminuye la carga bacteriana de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

3. El tratamiento periodontal disminuye la concentración de TNF- α e IL-1 β sin modificar la de IL-6. La terapia fotodinámica no aporta beneficios adicionales al tratamiento periodontal básico.

4. El tratamiento periodontal disminuye el cociente RANK-L/OPG al disminuir los niveles de RANK-L sin modificar los de OPG. La terapia fotodinámica adelanta la reducción de los niveles de RANK-L y por consiguiente constituye una ventaja adicional al uso del tratamiento periodontal.

CAPÍTULO VII

Referencias bibliográficas



Referencias bibliográficas

1. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *J Clin Dent*. 2007;18(2):34-8.
2. Leknes KN. The influence of anatomic and iatrogenic root surface characteristics on bacterial colonization and periodontal destruction: a review. *J Periodontol*. 1997 Jun;68(6):507-16.
3. El-Shinnawi U, Soory M. Associations between periodontitis and systemic inflammatory diseases: response to treatment. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2013 Sep;7(3):169-88.
4. Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:130-1.
5. Flemming TF. Periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):32-8.
6. Marsch PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:7-15.
7. Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Sep;32(9):973-83.
8. Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):54-64.
9. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol*. 1999 Jul;70(7):711-23.
10. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005;39:91-117.

11. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):39-53.
12. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6.
13. Plancak D, Jorgic-Srdjak K, Curilovic Z. New classification of periodontal diseases. *Acta Stomatol Croat*. 2001;35(1):89-93.
14. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965 May-Jun;36:177-87.
15. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976 Mar;34(3):235-49.
16. Kinane DF, Adonogianaki E, Moughal N, Winstanley FP, Mooney J, Thornhill M. Immunocytochemical characterization of cellular infiltrate, related endothelial changes and determination of GCF acute-phase proteins during human experimental gingivitis. *J Periodontal Res*. 1991 May;26(3 Pt 2):286-8.
17. Schroeder HE. Quantitative parameters of early human gingival inflammation. *Arch Oral Biol*. 1970 May;15(5):383-400.
18. Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:87-107.
19. Grant PR, Mulvihill JE. The fine structure of gingivitis in the beagle. 3. Plasma cell infiltration of the subepithelial connective tissue. *J Periodontal Res*. 1972;7(2):161-72.
20. Botero JE. The immune response in the periodontium: from health to disease and therapeutic implications. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*. 2009;21(1):122-8.
21. Ten Cate AR. The development of the periodontium--a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:9-19.

22. Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*. 2003;31:55-76.
23. Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol 2000*. 2003;31:12-31.
24. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-6 and interleukin-8 levels in chronic periodontitis. *Int J Dent*. 2012; 2012:362905.
25. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000*. 2002;30:70-8.
26. Socransky SS, Manganiello SD. The oral microbiota of man from birth to senility. *J Periodontol*. 1971 Aug;42(8):485-96.
27. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:33-53.
28. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12–55.
29. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1466-77.
30. Westfelt E. Rationale of mechanical plaque control. *J Clin Periodontol*. 1996 Mar;23(3 Pt 2):263-7.
31. Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol*. 2003;30 Suppl 5:S7-9.
32. Kawashima H, Sato S, Kishida M, Ito K. A comparison of root surface instrumentation using two piezoelectric ultrasonic scalers and a hand scaler in vivo. *J Periodontal Res*. 2007 Feb;42(1):90-5.

33. Mombelli A, Cionca N, Almaghlouth A. Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery?. *Periodontol 2000*. 2011 Feb;55(1):205-16.
34. Mishima E, Sharma A. *Tannerella forsythia* invasion in oral epithelial cells requires phosphoinositide 3-kinase activation and clathrin-mediated endocytosis. *Microbiology*. 2011 Aug;157(Pt 8):2382-91.
35. Rams TE, Slots J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontol 2000*. 1996 Feb;10:139-59.
36. Mombelli A, Samaranayake LP. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. *Int Dent J*. 2004 Feb;54(1):3-14.
37. Iniesta M, Herrera D, Serrano J, Sanz M. Análisis de los factores de virulencia de los patógenos de asociación fuerte con la periodontitis: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. *Periodoncia y Osteointegración*. 2008;18(2):109-15.
38. Dorn BR, Leung KP, Progulské-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*. 1998 Dec;66(12):6054-7.
39. Ryan ME. Nonsurgical approaches for the treatment of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005 Jul;49(3):611-36, vii.
40. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2001;25:77-88.
41. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontal Res*. 2002 Oct;37(5):389-98.
42. Bassir SH, Moslemi N, Jamali R, Mashmouly S, Fekrazad R, Chiniforush N, et al. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2013 Jan;40(1):65-72.

43. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol*. 1990 Aug;17(7 Pt2):479-93.
44. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994 Jun;5:78-111.
45. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol*. 2002 Aug;29(8):724-35.
46. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin- 1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(3):391-401.
47. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Ávila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Feb;21(1):12-20.
48. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 Aug;79 (8 Suppl):1569-76.
49. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*. 2000 Nov 30;408(6812):535-6.
50. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(3):248-66.
51. Tewari DS, Qian Y, Tewari M, Pieringer J, Thornton RD, Taub R, et al. Mechanistic features associated with induction of metalloproteinases in human gingival fibroblasts by interleukin-1. *Arch Oral Biol*. 1994 Aug;39(8):657-64.
52. Guzmán CB, Correa BD, Caballase UE, Calderón C. Citocinas y otras moléculas involucradas en sepsis y en pacientes con sepsis y complicaciones de neutropenia. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*.

2004 Ene-Abr;13(1):15-23.

53. Havemose-Poulsen A, Holmstrup P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):217-36.

54. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev.* 2008 Jun;29(4):403-40.

55. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4 and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med.* 1994 Sep;23(8):347-53.

56. Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res.* 2007 Apr;86(4):347-51.

57. Ohasaki Y, Takahashi S, Scarcez T, Demulder A, Nishihara T, Williams R, et al. Evidence of an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone. *Endocrinology.* 1992 Nov;131(5):2229-34.

58. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1997 Jun;14:112-43.

59. Musacchio E, Valvason C, Botsios C, Ostuni F, Furlan A, Ramonda R, et al. The tumor necrosis factor- α -blocking agent infliximab inhibits interleukin 1beta (IL-1beta) and IL-6 gene expression in human osteoblastic cells. *J Rheumatol.* 2009 Aug;36(8):1575-9.

60. Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNF alpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology.* 2002 Mar;143(3):1108-18.

61. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008 Aug;79 (8 Suppl):1585-91.

62. van der Pluijm G, Most W, van der Wee-Pals L, de Groot H, Papapoulos S, Lowic C. Two distinct effects of recombinant human tumor necrosis factor- α on osteoclast development and subsequent resorption of mineralized matrix. *Endocrinology*. 1991 Sep;129(3):1596-604.
63. Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of the host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies. *J Periodontol*. 1993 Aug;64 (8 Suppl):792-806.
64. Hajishengallis G, Sojar H, Genco RJ, DeNardin E. Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptors. *Immunol Invest*. 2004 May;33(2):157-72.
65. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides lipopolysaccharides*. *Infect Immun*. 1991 Jan;59(1):295-301.
66. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1995 Nov;22(11):885-90.
67. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today*. 1997 May;18(5):231-40.
68. Dixon DR, Bainbridge BW, Darveau RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol 2000*. 2004;35:53-74.
69. Hou LT, Liu CM, Rossomando EF. Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *J Clin Periodontol*. 1995 Feb;22(2):162-7.
70. Alexander DC, Martin JC, King RJ, Powel JC, Caves J, Cohen ME. Interleukin 1-beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses

in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol.* 1996 Aug;67(8):755-62.

71. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* 2000 Oct;71(10):1535-45.

72. Holmund A, Hånström L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2004 Jun;31(6):475-82.

73. Ferrari-Lacraz S, Ferrari S. Do RANKL inhibitors (denosumab) affect inflammation and immunity?. *Osteoporos Int.* 2011 Feb;22(2):435-46.

74. Oliver-Bell J, Butcher JP, Malcolm J, MacLeod MK, Adrados Planell A, Campbell L, et al. Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody. *Mol Oral Microbiol.* 2015 Apr;30(2):160-9.

75. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of postmenopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006 Jul;85(7):596-607.

76. Kanamaru F, Iwai H, Ikeda T, Nakajima A, Ishikawa I, Azuma M. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human T cells. *Immunol Lett.* 2004 Jul 15;94(3):239-46.

77. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprogesterin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S1-7.

78. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):1329-37.

79. Ferrer Cañabate J, Tovar I, Martínez P. Osteoprotegerin and RANKL/

RANK system: is the future of bone metabolism?. *An Med Interna*. 2002 Aug;19(8):385-88.

80. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*. 2000 Sep;141(9):3478-84.

81. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006 Sep;169(3):987-98.

82. Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasadam A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2007 Jun;78(6):1062-9.

83. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003 Aug;38(4):380-7.

84. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*. 2007 May;34(5):370-6.

85. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2006 Aug;41(4):354-60.

86. Bostanci N, Saygan B, Emingil G, Atilla G, Belibasakis GN. Effect of periodontal treatment on receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin levels and relative ratio in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 2011 May;38(5):428-33.

87. Buduneli N, Buduneli E, Kütükçüler N. Interleukin-17, RANKL, and osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid from smoking and non-smoking patients with chronic periodontitis during initial periodontal treatment. *J Periodontol*. 2009 aug;80(8):1274-80.
88. Calderín S, García-Núñez JA, Gómez C. Short-term clinical and osteoimmunological effects of scaling and root planing complemented by simple or repeated laser phototherapy in chronic periodontitis. *Lasers Med Sci*. 2013 Jan;28(1):157-66.
89. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*. 2007;43:41-55.
90. Lima HR, Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH., Torres SA, Santos CF, et al. The essential role of toll like receptor-4 in the control of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *J Clin Periodontol*. 2010 Mar;37(3):248-54.
91. Hughes FJ. Cytokines and cell signalling in the periodontium. *Oral Dis*. 1995 Dec;1(4):259-65.
92. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:11-28.
93. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Effector mechanisms of cell mediated immunity. In: Schmidt W, editors. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 303-320.
94. Moreno CS, Contreras RA. Mecanismos moleculares implicados en la destrucción ósea en la periodontitis. Revisión de la literatura. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 203;6(3):142-7.
95. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis?. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:60-84.
96. Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontol*

2000. 2008;48:92-110.

97. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol*. 2003 May;23(3):147-61.

98. Naundorf S, Schröder M, Höflich C, Suman N, Volk HD, Grütz G. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *Eur J Immunol*. 2009 Apr;39(4):1066-77.

99. Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB, Martins W, Assis GF, et al. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol*. 2008 Dec;84(6):1565-73.

100. Saidenberg-Kermanac'h N, Bessis N, Lemeiter D, de Vernejoul MC, Boissier MC, Cohen-Solal M. Interleukin-4 cellular gene therapy and osteoprotegerin decrease inflammation-associated bone resorption in collagen-induced arthritis. *J Clin Immunol*. 2004 Jul;24(4):370-8.

101. Zhang X, Teng YT. Interleukin-10 inhibits gram-negative-microbe-specific human receptor activator of NF-kappaB ligand-positive CD4+-Th1-cell-associated alveolar bone loss in vivo. *Infect Immun*. 2006 Aug;74(8):4927-31.

102. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008 Nov;73(11):975-83.

103. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Junior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol*. 2008 Jul;84(1):311-8.

104. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual

anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):349-61.

105. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):933-44.

106. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2076-82.

107. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Ávila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect*. 2008 Apr;10(5):489-96.

108. Cronstein BN. Interleukin-6--a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007;65 Suppl 1:S11-5.

109. Koutouzis T, Haber D, Shaddox L, Aukhil I, Wallet SM. Autoreactivity of serum immunoglobulin to periodontal tissue components: a pilot study. *J Periodontol*. 2009 Apr;80(4):625-33.

110. Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, Kobashigawa T, Mogi M, Kamatani N, et al. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *J Cell Biochem*. 2009 Nov;108(4):947-55.

111. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2673-82.

112. Silva MT. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular

microbial pathogens. *J Leukoc Biol.* 2010 May;87(5):805-13.

113. Sender-Janeczek A, Ziętek M. Use of locally delivered antiseptics and antibiotics in the treatment of chronic periodontitis – review of literature. *Dent Med Probl.* 2007;44(3):396-402.

114. Krayer JW, Leite RS, Kirkwood KL. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2010 Jan;54(1):13-33.

115. Osso D, Kanani N. Antiseptic mouth rinses: an update on comparative effectiveness, risks and recommendations. *J Dent Hyg.* 2013 Feb;87(1):10-8.

116. Medaiah S, Srinivas M, Melath A, Girish S, Polepalle T, Dasari AB. Chlorhexidine chip in the treatment of chronic periodontitis - a clinical study. *J Clin Diagn Res.* 2014 Jun;8(6):ZC22-5.

117. Soares GM, Mendes JA, Silva MP, Faveri M, Teles R, Socransky SS, et al. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2014 Apr;41(4):366-76.

118. Bajaj P, Pradeep AR, Agarwal E, Kumari M, Naik SB. Locally delivered 0.5% clarithromycin, as an adjunct to nonsurgical treatment in chronic periodontitis with well-controlled type 2 diabetes: a randomized controlled clinical trial. *J Investig Clin Dent.* 2012 Nov;3(4):276-83.

119. Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol.* 2010 Nov 2;2:5344.

120. Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res.* 2014 Dec;49(6):785-91.

121. Salvi GE, Lang NP. The effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (selective and non-selective) on the treatment of periodontal diseases. *Curr Pharm Des.* 2005;11(14):1757-69.
122. Yu M, Chen X, Lv C, Yi X, Zhang Y, Xue M, et al. Curcumol suppresses RANKL-induced osteoclast formation by attenuating the JNK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 May 2;447(2):364-70.
123. Roncati M, Gariffo A. Systematic review of the adjunctive use of diode and Nd:YAG lasers for nonsurgical periodontal instrumentation. *Photomed Laser Surg.* 2014 Apr;32(4):186-97.
124. Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV, Prasanthila J, Subhash N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2014 Jun;41(6):573-81.
125. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011 Feb;55(1):143-66.
126. Bockstahler LE, Lytle CD, Hellman KB. A review of photodynamic therapy for herpes simplex: benefits and potential risks. *N Y J Dent.* 1975 May;45(5):148-57.
127. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin, MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* 2011 Sep;43(7):755-67.
128. Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Feb;54(2):637-42.
129. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem.* 2009 Jul;9(8):974-83.

130. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B*. 1992 Jul;14(3):262-6.
131. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Mar;44(3):522-7.
132. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):138-42.
133. Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):412-8.
134. Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Apr;12(2):104-8.
135. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):877-84.
136. de Paula Eduardo C, de Freitas PM, Esteves-Oliveira M, Aranha AC, Ramalho KM, Simões A, et al. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers Med Sci*. 2010 Nov;25(6):781-92.
137. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*. 1997 May;39(1):1-18.
138. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*. 1991 Nov;54(5):659.
139. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics:

basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*. 1999 Nov;4(11):507-17.

140. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998 Jul;42(1):13-28.

141. Sahm N, Schwarz F, Aoki A, Becker J. Uso de la terapia fotodinámica antimicrobiana en el tratamiento periodontal y periimplantario. *Periodoncia y Osteointegración*. 2011;21(2):105-15.

142. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*. 1991 Apr;53(4):549-53.

143. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol*. 1993 Jun;8(3):182-7.

144. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):436-50.

145. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev*. 1992 Sep;56(3):395-411.

146. Bhatti M, MacRobert A, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, Wilson M. Antibody-targeted lethal photosensitisation of *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Oct;44(10):2615-8.

147. Raghavendra M, Koregol A, Bholá S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S102-9.

148. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Oct;42(10):2595-601.

149. Campos GN, Pimentel SP, Ribeiro FV, Casarin RC, Cirano FR, Saraceni CH, et al. The adjunctive effect of photodynamic therapy for residual pockets

in single-rooted teeth: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan;28(1):317-24.

150. Alwaeli HA, Al-Khateeb SN, Al-Sadi A. Long-term clinical effect of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2013 Sept 15. [Epub ahead of print]. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10103-013-1426-y>

151. Franco EJ, Pogue RE, Sakamoto LH, Cavalcante LL, Carvalho DR, de Andrade RV. Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Mar;11(1):41-7.

152. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of galium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med.* 2002;30(1):60-6.

153. Theodoro LH, Silva SP, Pires JR, Soares GH, Pontes AE, Zuza EP, et al. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci.* 2012 Jul;27(4):687-93.

154. Dilsiz A, Canakci V, Aydin T. Clinical effects of potassium-titanyl-phosphate laser and photodynamic therapy on outcomes of treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2013 Mar;84(3):278-86.

155. Pourabbas R, Kashefimehr A, Rahmanpour N, Babaloo Z, Kishen A, Tenenbaum HC, et al. Effects of photodynamic therapy on the clinical and gingival crevicular fluid inflammatory biomarkers in chronic periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2014 Sep;85(9):1222-9.

156. Carvalho VF, Andrade PV, Rodrigues MF, Hirata MH, Hirata RD, Pannuti CM, et al. Antimicrobial photodynamic effect to treat residual

pockets in periodontal patients: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2015 May;42(5):440-7.

157. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: A randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2008 Sep;79(9):1638-44.

158. Gómez C, Domínguez A, García-Kass AI, García-Núñez JA. Aplicación complementaria de terapia fotodinámica y de la radiación láser de Er:YAG al tratamiento no quirúrgico de la periodontitis crónica: estudio comparativo de sus efectos clínicos, antiinflamatorios y antimicrobianos. *Av Odontoestomatol.* 2011;27(3):147-60.

159. Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpel A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol.* 2010 Jul;81(7):975-81.

160. Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Ross A, Willershausen B. Comparison between scaling-root-planning (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head Face Med.* 2012 Apr 5;8:12.

161. Lang NP, Hill RW. Radiographs in periodontics. *J Clin Periodontol.* 1977 Feb;4(1):16-28.

162. Persson GR, Falk H, Laurell L. A retrospective radiographic outcome assessment study of intra-bony defects treated by osseous surgery or by bone graft procedures. *J. Clin Peridontol.* 2000 Feb;27(2):104-8.

163. Leonard HJ. Conservative treatment of periodontoclasia. *J Am Dent Assoc.* 1939;26:1308.

164. Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* 1963 Dec;21:533-51.

165. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading

- symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta*. 1971 Oct;15(2),107-13.
166. Miller SC. Textbook of periodontia. 3rd ed. Philadelphia: The Blakeston Co Editors; 1950.
167. Hamp SE, Nyman S, Lindhe J. Periodontal treatment of multirrooted teeth. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*. 1975 Aug;2(3):126-35.
168. Chapple IL, Cross IA, Glenwright HD, Matthews JB. Calibration and reliability of the Periotron 6000 for individual gingival crevicular fluid samples. *J Periodontal Res*. 1995 Jan;30(1):73-9.
169. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*. 2003;31:32-42.
170. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.
171. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.
172. Ruano G, Kidd KK. Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. *PCR Methods Appl*. 1992 Nov;2(2):112-6.
173. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 12;32(12):e103.
174. Tran SD, Rudney JD. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16s rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*. 1999 Nov;37(11):3504-8.
175. Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12

years of age. *J Clin Periodontol*. 2001 Jun;28(6):576-82.

176. Violant Holz D. Clinical, histological and microbiological associations between atherosclerosis and chronic periodontitis [dissertation]. Barcelona: Universitat Internacional de Catalunya, Facultad de Odontología; 2010.

177. Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Fernandes CB, de Carvalho-Filho J, Franco GC, et al. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1322-9.

178. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

179. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971 Sep;8(9):871-4.

180. Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*. 1971 Jun 24;15(3):232-6.

181. Marshall-Day CD, Stephens RG, Quigley LF Jr. Periodontal disease: prevalence and incidence. *J Periodontol*. 1955;26:185-203.

182. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):356-65.

183. Scherp HW. Current concepts in periodontal disease research: epidemiological contributions. *J Am Dent Assoc*. 1964 May;68:667-75.

184. Fauchard P. Chap. XI. En: Pierre Jean Mariette, editores. *Le chirurgien dentiste, V1, ou traite des dents*. Paris: Kessinger Publishing; 1746, p. 177-82.

185. Lindhe J, Hamp SE, Löe H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontal Res*. 1975 Nov;10(5):243-55.

186. Knowles JW, Burgett FG, Nissle RR, Shick RA, Morrison EC, Ramfjord SP. Results of periodontal treatment related to pocket depth and attachment level. Eight years. *J Periodontol.* 1979 May;50(5):225-33.
187. Surco-Luna VJ, Cachaga-Villegas FE. Uso del láser diodo en el tratamiento de enfermedades periodontales. *Rev Act Clin Med.* 2013;31:1591-6.
188. de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol.* 2009 Jan;80(1):98-105.
189. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000 Nov;72(5):676-80.
190. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001 Jul;28(7):597-609.
191. Harper DS, Robinson PJ. Correlation of histometric, microbial, and clinical indicators of periodontal disease status before and after root planing. *J Clin Periodontol.* 1987 Apr;14(4):190-6.
192. Bjordal JM, Johnson MI, Iversen V, Aimbire F, Lopes-Martins RA. Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg.* 2006 Apr;24(2):158-68.
193. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2008 Apr;43(2):162-7.
194. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockman E. Efficacy of

photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol*. 2005 Jul;76(7):1100-5.

195. Shapira L, Wilensky A, Kinane DF. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:72-86.

196. Lang NP, Nyman S, Senn C, Joss A. Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health. *J Clin Periodontol*. 1991 Apr;18(4):257-61.

197. Challacombe SJ. Passage of serum immunoglobulins into the oral cavity. In: Lehner, editors. *Borderland between caries and periodontal disease*. London: Academic Press; 1980. p. 51-67.

198. Curtis MA, Griffiths GS, Price SJ, Coulthurst SK, Johnson NW. The total protein concentration of gingival crevicular fluid. Variation with sampling time and gingival inflammation. *J Clin Periodontol*. 1988 Nov;15(10):628-32.

199. Lamster IB, Harper DS, Goldstein S, Celenti RS, Oshrain RL. The effect of sequential sampling on crevicular fluid volume and enzyme activity. *J Clin Periodontol*. 1989 Apr;16(4):252-8.

200. Van der Weijden GA, Timmermann MF. A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:55-71.

201. Botero L, Botero A, Bedoya JS, Guzmán IC. Terapia periodontal no quirúrgica. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*. 2012 Jul;23(2):334-42.

202. Ewen SJ, Scopp IW, Witkin RT, Ortiz-Junceda M. A comparative study of ultrasonic generators and hand instruments. *J Periodontol*. 1976 Feb;47(2):82-6.

203. Christgau M, Männer T, Beuer S, Hiller KA, Schmalz G. Periodontal

healing after non-surgical therapy with a modified sonic scaler: a controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2006 Oct;33(10):749-58.

204. Heitz-Mayfield LJ, Trombelli L, Heitz F, Needleman I, Moles D. A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J Clinical Periodontol.* 2002;29 Suppl 3:92-102.

205. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomyetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol.* 2000 Jan;71(1):14-21.

206. Smith RG, Davis RM. Acute lateral periodontal abscesses. *Br Dent J.* 1986 Sep 6;161(5):176:8.

207. Gher ME, Vernino AR. Root morphology-clinical significance in pathogenesis and treatment of periodontal disease. *J Am Dent Assoc.* 1980 Oct;101(4):627-33.

208. Schwarz F, Aoki A, Becker J, Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35 (8 Suppl):29-44.

209. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134-44.

210. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003;18(1):51-5.

211. Kömerick N, Nakanish H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Mar;47(3):932-40.

212. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanism of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Dec;62(4):1244-63.
213. Noro Filho GA, Casarin RC, Casati MZ, Giovani EM. PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: a split-mouth, randomized clinical trial. *Lasers Surg Med*. 2012 Apr;44(4):296-302.
214. Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 2001 Jun;28(6):499-507.
215. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):165-73.
216. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1991 May;26(3 Pt 2):230-42.
217. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):821-78.
218. Toker H, Akpınar A, Aydın H, Poyraz O. Influence of smoking on interleukin-1beta level, oxidant status and antioxidant status in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients before and after periodontal treatment. *J Periodontal Res*. 2012 Oct;47(5):572-7.
219. Lui J, Corbet EF, Jin L. Combined photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011 Feb;46(1):89-96.
220. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997 Jan;24(1):72-7.
221. Gemmell E, Seymour GJ. Interleukin 1, interleukin 6 and transforming

growth factor-beta production by human gingival mononuclear cells following stimulation with Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum. J Periodontal Res. 1993 Mar;28(2):122-9.

222. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Sep 7; 275(3):768-75.

223. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs B.L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res. 2000 Jan,15(1):2-12.



DEPARTAMENT D'ESTOMATOLOGIA