

Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral



Sociedad de Periodoncia de Chile



Sociedad de Implantología Oral de Chile



Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile

Órgano oficial de difusión científica de la Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile.

Vol.

1
VOL 1 NUMERO 2

AGOSTO 2008



Sociedad de Periodoncia de Chile



Sociedad de Implantología Oral de Chile



Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile

Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral

Editor

Jorge Gamonal A.

Comité Editorial

- f. Dr. Javier Botero. Univ. del Valle, Colombia.
- f. Dr. Adolfo Contreras. Univ. del Valle, Colombia.
- f. Dr. Raúl De la Sotta Thenoux. Univ. de Chile, Chile.
- f. Dr. Néstor López Villarroel. Univ. de Chile, Chile.
- f. Dr. Hugo Romanelli. Univ. de Maimónides, Argentina.
- f. Dr. Mariano Sanz. Univ. Complutense de Madrid, España.
- f. Dr. Juan José Villavicencio Blanco. Univ. Mayor, Chile.
- f. Dr. Juan Carlos Carvajal. Univ. de Chile, Chile.
- f. Dr. Darío Miguez. USAL - AOA, Argentina.
- f. Dr. Fernando Romo Omazabal. Univ. de Chile, Chile.
- f. Dr. Ronald Motzfeld Espinosa. Univ. de Chile, Chile.
- f. Dra. María Angélica Torres. Univ. de Chile, Chile.
- f. Dr. Marcial Sierra Fuentes. Univ. Mayor, Chile.
- f. Dr. Jorge Marín Herrera. Univ. de Chile, Chile.
- f. Dr. Eduardo de Moraes, UNIFESO Teresópolis, Río de Janeiro, Brasil.
- f. Dr. Samy Alamo Alamo, Univ. de Chile, Chile.
- f. Dr. Enrique Torres Ojeda, Univ. de Chile, Chile.
- f. Dr. Enrique Kogan, Asociación Dental de México, México.

Revista Clínica de Periodoncia Implantol Rehabil. Oral Vol. 1 (2); 2008.

Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral (RCPIRO) publicará artículos de tipo científico o práctico sobre periodoncia, periodontitis, reintegración, rehabilitación y especialidades directamente relacionadas con ellas. Órgano oficial de difusión científica de la Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile.

© Derechos Reservados, Prohibida su Reproducción sin mencionar la fuente.

Representante legal: Dr. Jorge Gamonal A. **Publicación cuatrimestral:** Abril - Agosto - Diciembre. **Tiraje:** 1500 ejemplares, distribución nacional e internacional. Impresa en Santiago, Chile, en el mes de Agosto 2008, por Sociedad Impresora y Editora DIPRINT LTDA.

PIRO: Av. Santa María 1990. Providencia, Santiago, Chile. Fono (56 - 2) 335 7692.

Fax (56 - 2) 334 8233. revistaclinicapiro@gmail.com **Diseño:** Alejandra Pozo G.

ciemporciento@diseno@gmail.com. **Periodista:** Patricio Villablanca M. villadrid@yahoo.com

INDICE

VOL 1 NUMERO 2. AGOSTO 2008

ISSN 0718-5391

Trabajos de Investigación

Caracterización de Perfiles Proteicos y Peptídicos en Periodontitis Crónica.

Characterization of Protein and Peptide Profiles in Chronic Periodontitis.

Hernández M, Obregón F, Pozo P, Barriga A,

Valenzuela MA..... 53

Recuento de Células Infiltrantes CD4+, CD8+ y CD19+ en el Tejido Gingival de Individuos con Periodontitis Crónica.

Recount of CD4+, CD8+ and CD19+ Infiltrate Cells in Gingival Tissues of Subjects with Chronic Periodontitis.

Cisterna C, Rivera O, Dutzan N..... 57

Perfiles Antimicrobianos de Bacterias Subgingivales en Pacientes con Periodontitis en Colombia.

Antimicrobial Profiles of Subgingival Bacteria from Periodontitis Patients in Colombia.

Jaramillo Echeverri A, Betancourth Quiroz M, Mayorga-Fayad I, Castillo Perdomo DM, Aya Castañeda MR, Lafaurie Villamil GI,

Botero Torres JE, Contreras Rengifo A. 61

Reporte Clínico

Fibromatosis Gingival Hereditaria en Niños. Caso Clínico.

Hereditary Gingival Fibromatosis in Children. Case Report.

Taj-Taj P, Dolmestch C..... 66

Review

The TH17 vs. TREG Imbalance in the Pathogenesis of Periodontitis: New Approach for Dichotomy TH1 vs. TH2.

Dezerega A, Maggiolo S, Garrido M, Dutzan N..... 70

Caracterización de Perfiles Proteicos y Peptídicos en Periodontitis Crónica

Characterization of Protein and Peptide Profiles in Chronic Periodontitis

Hernández M^{1,3}, Obregón F¹, Pozo P¹, Barriga A², Valenzuela MA².

RESUMEN

La destrucción de los tejidos de soporte durante la periodontitis crónica está mediada por proteasas específicas. Producto de la actividad proteolítica se generarán cambios en la composición peptídica y proteica globales del fluido crevicular gingival (FCG). El objetivo de este estudio es evaluar la existencia de patrones de proteicos y peptídicos característicos en el FCG de pacientes con periodontitis crónica y sanos.

Materiales y métodos: Se seleccionaron 8 pacientes con periodontitis crónica moderada a severa y 5 sujetos controles y se obtuvieron muestras de FCG. Las muestras se eluyeron en 2 tampones, y se prepararon en 3 matrices distintas, y se obtuvieron los espectros peptídicos y proteicos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se procesaron 3 espectros de cada grupo para la obtención final de espectros diferenciales en enfermos.

Resultados: Se obtuvieron patrones proteicos y peptídicos reproducibles en el FCG. En pacientes con periodontitis crónica encontramos perfiles característicos representados por más de 100 proteínas que no fueron detectables en sujetos sanos.

Conclusiones: Demostramos la utilidad de la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el análisis de cambios cualitativos en la composición global del FCG y presentamos los perfiles proteicos y peptídicos característicos del FCG en periodontitis crónica y sujetos sanos.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 53-56, 2008.

Palabras claves: Periodontitis crónica, FCG, MALDI-TOF, perfiles proteicos.

ABSTRACT

Inflammatory response mediates periodontal tissue destruction occurring in chronic periodontitis. As result, qualitative changes in global peptide and protein GCF composition will generate.

Aim: To evaluate existence of characteristic peptide and protein profiles in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with chronic periodontitis and controls.

Methods: Patients with moderate to severe chronic periodontitis (n=8) and healthy controls (n=5) were selected and samples of GCF were obtained. Samples were eluted in 2 different buffers and prepared with 3 matrices to obtain peptide and protein spectra by MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Subsequently, 3 spectra from each group were processed to obtain final differential spectra.

Results: Reproducible peptide and protein profiles were obtained from both stages in GCF. In disease samples we found characteristic patterns represented by more than 100 proteins which were undetectable in controls.

Conclusions: We demonstrate for the first time the usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of qualitative global changes in GCF composition and we present protein and peptide characteristic GCF profiles associated with chronic periodontitis and healthy periodontium.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 53-56, 2008.

Key words: Chronic periodontitis, GCF, MALDI-TOF, protein profiles.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa caracterizada por la destrucción de los tejidos de inserción dentarios, es decir, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y cemento radicular⁽¹⁾. La inflamación gingival conlleva la formación de un exudado, el fluido crevicular gingival (GCF), cuya composición es similar a la del suero, aunque varía en función del proceso inflamatorio⁽²⁾.

El FCG presenta componentes derivados del plasma (albúmina, cadenas pesadas de IgG, transferrina), tejido conectivo, células hospederas del periodonto y placa subgingival. La formación del FCG en sitios libres de inflamación y de placa subgingival está mediada por la difusión pasiva del líquido extracelular de los tejidos periodontales, a través de la lámina basal y las células de los epitelios sulcular y de unión. En condiciones inflamatorias en cambio, aumenta la permeabilidad vascular y epitelial, de modo que la concentración de proteínas

del fluido queda modulada por la extensión del exudado plasmático, fundamentalmente albúmina y otras proteínas de mayor peso molecular. Durante la periodontitis, también aparecerán componentes no derivados del plasma, como mediadores y productos de la destrucción de matriz extracelular periodontal, principalmente colágenos I y III⁽³⁾.

Entre los mediadores de destrucción periodontal se encuentran proteasas específicas, que inducen la degradación de la matriz extracelular y la activación de otras enzimas en el tejido periodontal. Entre las principales enzimas involucradas, figuran las serina proteasas y las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)^(4,5,6). Su actividad proteolítica no se limita simplemente al catabolismo de proteínas: regulan el destino y actividad de muchas otras proteínas mediante el control de su localización intra o extracelular, liberándolas de la superficie celular, activando o inactivando proteasas u otras enzimas, citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, mediante la conversión de receptores agonistas en antagonistas y la exposición de

1. Laboratorio de Biología Periodontal, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

2. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Chile.

3. Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

proteínas crípticas^(5,7,8,10).

En síntesis, los cambios en la composición del FCG están mediados por la extravasación de proteínas desde el plasma, la síntesis y procesamiento de mediadores inflamatorios y productos de degradación del tejido⁽¹¹⁾. En estudios previos en geles SDS-PAGE se han determinado patrones regulares de composición del FCG entre los pacientes sanos y diferencias marcadas en la composición proteica del FCG de éstos, en relación con enfermos, observándose variaciones en la proporción de proteínas séricas como albúmina y transferrina.

La identificación de predictores de progresión representa una meta fundamental en periodoncia, debido a que resulta difícil predecir la evolución de las lesiones periodontales sobre los parámetros clínicos. Se han propuesto numerosos mediadores bioquímicos como indicadores de progresión de la enfermedad periodontal en el fluido crevicular gingival (FCG)⁽²⁾, como fosfatasa alcalina, MMP-8, Dipeptidil peptidasas II y IV, elastasa, calprotectina⁽¹²⁾ y MMP-13^(13,14); sin embargo, ninguno de ellos constituye en sí un indicador confiable que permita predecir nuevos episodios de pérdida de inserción⁽¹²⁾.

El análisis global de la composición del FCG permitirá caracterizar las alteraciones del sistema en la enfermedad. De este modo, el examen de la composición global del FCG y sus variaciones durante los estados de salud y enfermedad periodontal permitirán identificar perfiles proteicos y peptídicos característicos, reflejo de los procesos metabólicos asociados con la destrucción del tejido óseo y ligamento periodontal y a través del análisis de éstos, la identificación de marcadores y/o predictores de progresión en sitios específicos^(3,15).

El objetivo de este estudio es evaluar la existencia de patrones de proteicos y peptídicos característicos en el FCG de pacientes con periodontitis crónica y sanos.

METODOLOGÍA

Selección de pacientes

Los pacientes se seleccionaron en el Servicio de Recepción de Pacientes de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile y del SSMN, CDT Eloísa Díaz. Se incluyeron sujetos con periodontitis crónica moderada a severa según los siguientes criterios: presencia de un mínimo de 14 dientes, excluyendo los terceros molares, de los cuales al menos 6 eran dientes posteriores; de severidad moderada a avanzada: al menos 5-6 dientes con bolsas periodontales ≥ 5 mm, pérdida de inserción ≥ 3 mm y pérdida de hueso determinada en una radiografía; no haber recibido nunca tratamiento periodontal; sin enfermedad sistémica que pueda afectar la patología de la periodontitis y/o que requiera premedicación médica; sin medicación de antibióticos o de antiinflamatorios en los últimos 3 meses. Los sujetos del grupo control corresponden a voluntarios sin enfermedad periodontal. El protocolo del estudio previamente evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología, se explicó a todos los pacientes, quienes firmaron el consentimiento informado.

Recolección de Fluido Crevicular Gingival (FCG)

Las muestras de FCG se obtuvieron a partir de sacos periodontales de 8 pacientes con periodontitis crónica y 5 controles. Las piezas seleccionadas se aislaron con rollos de algodón, previa remoción de la placa bacteriana supragingival. El sitio fue secado cuidadosamente con una jeringa de aire y el fluido se recolectó con tiras de papel Periopaper® (ProFlow, Amityville, New York) introducidas dentro de un tubo eppendorf estéril y se almacenaron a -80°C hasta su elución.

Análisis del fluido gingival crevicular

Después de recolectado el fluido, 3 muestras correspondientes a enfermos y 3 a sanos se extrajeron desde las tiras de papel en un tubo eppendorff con 100 μL de amortiguador de elución Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 5 mM, Tritón X-100 al 0,01%, mientras que otras 7 muestras (5 enfermos y 2 controles) se extrajeron en ácido fórmico al 0,02% y centrifugación a 10.000 g por 5 min a 4°C . Las muestras se mantuvieron a -80° hasta su posterior utilización.

Espectrometría de masas

Las muestras se prepararon en tres matrices: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v 1:1 para el análisis de péptidos de masa molecular menor a 10 kDa; ácido sinapínico (SA) para péptidos y proteínas de masa molecular mayor a 10 kDa y una tercera matriz, ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (DHB) para análisis de péptidos y/o glicopéptidos, proteínas y/o glicoproteínas, polímeros y carbohidratos. Las matrices SA y DHB se prepararon a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v 1:2.

Para la obtención de los espectros, se mezcló 1 μL de cada muestra con 9 μL de cada matriz (dilución 1:10) y se depositó 1 μL en una placa porta muestra micro scout. Los espectros se obtuvieron en un equipo Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc. MA-USA). Previo a la obtención de espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo para cada intervalo de m/z examinado. Para la obtención de los espectros se trabajó en modo ion positivo y detección en reflexión para el intervalo de m/z 0-4000 y en modo ion positivo y detección lineal para los intervalos de m/z de 5000-20000 y 10000-25000 (se usaron los parámetros por defecto). Los espectros finales corresponden a espectros sumados correspondientes a 10 barridos de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar.

Los espectros obtenidos fueron procesados (eliminación de línea base) y exportados utilizando el programa flexAnalysis v2.2 (Bruker Daltonik GmbH, Germany). Se generaron espectros promedio para las muestras y controles utilizando el programa SpecAlign v2.2.1 (University of Oxford, England). A partir de éstos, mediante el mismo programa se generaron los espectros diferenciales y los listados m/z. Finalmente, la visualización de los espectros diferenciales y sus respectivas señales m/z se realizó mediante el programa mMass v2.4 (Institute of Chemical Technology, Rep Checa).

El análisis estadístico de las características clínicas de los sujetos y controles se realizó empleando el programa Intercooled Stata V8.1 (Stata Corp. Texas, USA), y se aplicó el test de Mann Whitney. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se analizaron los espectros peptídicos y proteicos de FCG provenientes de 13 sujetos, de los cuales 8 presentaban periodontitis crónica severa a moderada y 5 correspondientes a controles. Las características clínicas de los sujetos se presentan en la tabla 1; no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a edad y género, mientras que todos los parámetros clínicos variaron significativamente entre ambos grupos.

Las muestras de FCG se eluyeron en dos tampones, correspondientes a Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 5 mM y Tritón X-100 al 0,01% y en ácido fórmico 0,02%, para establecer cuál de ellos era más apropiado para realizar el análisis por MALDI-TOF. Los espectros obtenidos a partir de muestras eluidas en tampón Tris demostraron una mayor sensibilidad y menor ruido que aquellas eluidas en ácido fórmico (datos no mostrados).

Para evaluar qué tipo de matriz es era más apropiada para la obtención de espectros correspondientes a los distintos rangos de masas de péptidos y proteínas detectables en el FCG, según sensibilidad y resolución de éstos, las muestras se prepararon con tres matrices distintas. La matriz CHCA demostró mayor sensibilidad para péptidos entre 2-4 kDa (Figura 1), mientras que para los péptidos de masa mayor, el ácido sinapínico (Figuras 2 y 3).

El espectro correspondiente al intervalo de péptidos menores a 2000 Da no se pudo analizar debido a la presencia de un polímero no identificado (resultados no mostrados).

Al analizar los espectros obtenidos entre sujetos con periodontitis y entre sujetos sanos, observamos patrones proteicos y peptídicos repetidos y por tanto reproducibles, para todos los rangos de peso molecular analizados (4-250 kDa). Al comparar los espectros entre sujetos enfermos y sanos se observaron notables variaciones en los perfiles peptídicos y proteicos y por tanto, cambios en la composición del FCG correspondiente a cada grupo. El grupo con periodontitis, muestra un aumento de las proteínas y péptidos que componen el FCG en relación con los controles, fundamentalmente entre 2500 y 7500 Da (Figuras 1, 2 y 3).

Mediante la obtención de los espectros promedio correspon-

dientes a cada grupo, se obtuvieron espectros diferenciales y a partir de éstos, los listados m/z, que representan el conjunto de proteínas y péptidos detectables en todas las muestras enfermas y a la vez, ausentes en todos los controles estudiados (Tabla 2).

Tabla 1. Parámetros clínicos de los sitios estudiados de pacientes con periodontitis crónica y controles.

	Controles (n = 5)	Periodontitis (n = 8)
Edad (años)	37,2±5,16	45,6±10,92
Mujeres	3	5
Profundidad de saco (mm)	1,72±0,51*	6,33±0,57*
Nivel de inserción (mm)	0,52±0,21*	6,28±1,88*
% sitios con placa	0	100%
% sitios con sangramiento al sondaje	0	100%

*Valores expresados como promedios±DS. *p<0.05

Tabla 2. Espectro diferencial Intervalo de masas 5-20 kDa y 10-250 kDa (Matriz SA).

5 - 20 kDa			10 - 250 kDa		
#	m/z	intensity	#	m/z	intensity
1	10636.50	0.67	1	5006.39	153.56
2	10875.20	40.33	2	5049.68	132.07
3	11085.90	33.33	3	5113.92	147.38
4	11824.90	232.33	4	5140.46	72.67
5	12704.80	1226.00	5	5160.80	75.41
6	13279.40	1483.67	6	5225.22	66.16
7	13300.40	1486.66	7	5315.96	106.28
8	13441.90	1311.66	8	5420.86	355.67
9	15141.80	17296.70	9	5630.46	141.05
10	15341.40	5911.34	10	5725.75	108.67
11	15895.80	7159.33	11	5773.69	140.09
12	16051.40	4183.00	12	5864.61	95.17
13	30276.20	518.00	13	5941.67	191.57
14	31044.00	650.33	14	6074.04	54.66
15	31204.70	588.00	15	6105.80	51.56
16	32062.30	329.67	16	6131.95	95.44
17	66429.30	304.00	17	6350.11	134.18
18	66433.10	327.00	18	8397.23	95.09
19	81532.40	54.00	19	6450.70	79.62
20	92157.30	21.67	20	6469.98	66.79
			21	6493.96	82.61
			22	6650.68	1776.99
			23	6730.34	100.68
			24	6767.95	209.26
			25	6856.13	203.80
			26	6969.12	197.28
			27	7061.64	59.92
			28	7272.67	87.01
			29	7438.46	109.78
			30	7493.72	58.66
			31	7572.57	1916.87
			32	7678.64	408.95
			33	7717.45	669.87
			34	7782.07	68.44
			35	7838.59	53.25
			36	7880.47	69.25
			37	7943.17	966.33
			38	7997.02	81.27
			39	8047.14	202.48
			40	8100.69	121.34
			41	8317.98	60.42
			42	8875.16	55.27
			43	9067.21	93.90
			44	9178.97	95.85
			45	9207.54	83.45

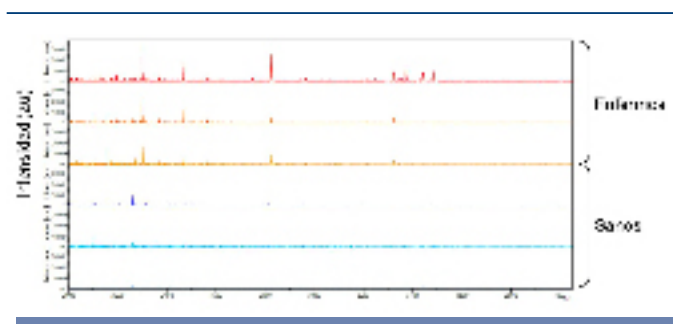


Figura 1. Espectro de péptidos del FCG entre 2-4 kDa (matriz CHCA).

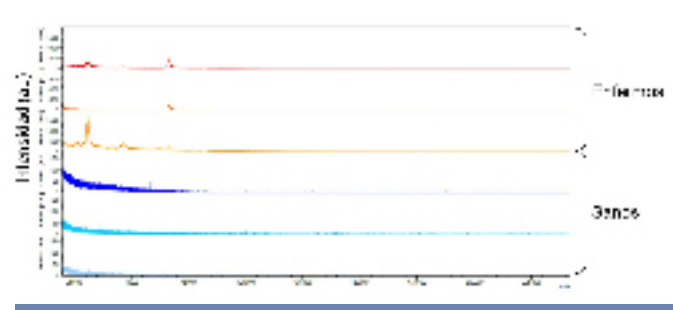


Figura 2. Espectro de péptidos y proteínas del FCG entre 2-20 kDa (matriz SA).

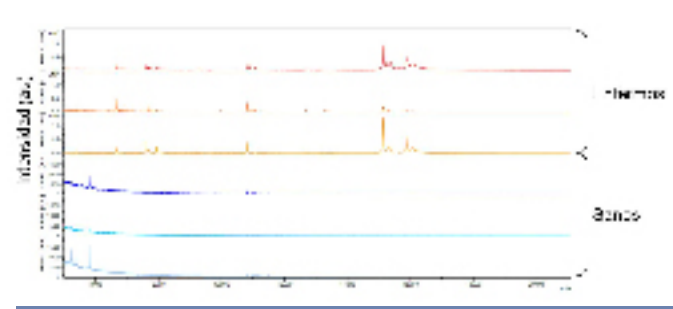


Figura 3. Espectro de proteínas del FCG entre 20-250 kDa (matriz SA).

DISCUSIÓN

Las enfermedades periodontales son un grupo de patologías multifactoriales que involucran destrucción de los tejidos duros y blandos periodontales, como resultado principalmente de la activación de la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero frente a la infección bacteriana, que incluye la producción de citoquinas, eicosanoides y MMPs⁽¹⁶⁾. La destrucción de los tejidos de soporte es el hecho característico de la periodontitis crónica y ocurre durante la progresión de la enfermedad⁽¹⁷⁾.

Hasta la fecha se han analizado más de 100 componentes del FCG y su potencial utilidad en la detección de la periodontitis⁽¹²⁾; sin embargo, considerando que los sistemas de proteasas trabajan en forma sinérgica y son altamente redundantes⁽⁵⁾, el análisis de los cambios globales en la composición del FCG podría ser de mayor utilidad en la caracterización de los distintos estados de salud-enfermedad del periodonto.

Nuestros resultados demuestran la existencia de patrones proteicos y peptídicos característicos en el FCG de pacientes con periodontitis crónica que difieren sustancialmente de los patrones obtenidos en sujetos sanos.

Estudios previos han descrito cambios en la composición del FCG entre individuos sanos y con periodontitis crónica. Mediante electroforesis en geles SDS-PAGE se ha determinado la existencia de patrones regulares en la composición del FCG en sujetos sanos y enfermos, demostrando diferencias marcadas entre ambos; principalmente con respecto a la proporción de proteínas séricas como albúmina y

transferrina, que aumentan considerablemente en enfermos. En modelos de periodontitis inducida por ligaduras en perros, el análisis del FCG mediante electroforesis bidimensional ha demostrado aumentos de proteínas con masas inferiores a 64 kDa en comparación con gingivitis, fenómeno que podría atribuirse al aumento de la actividad proteolítica en el crévice gingival⁽³⁾.

Además de los cambios cualitativos, en estudios recientes hemos observado aumentos considerables en la concentración de proteínas totales de pacientes con periodontitis v/s sanos y en sitios activos v/s inactivos de pacientes con periodontitis progresiva⁽¹⁴⁾.

En conformidad con estos antecedentes, mediante análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF, en el presente estudio hemos detectado patrones reproducibles en la composición del FCG de sujetos enfermos y controles. Adicionalmente, observamos cambios característicos en la composición del FCG de los sujetos con periodontitis crónica en comparación con los sanos, representados por la detección de más de 100 proteínas que no se encuentran en los controles. De este modo, la identificación de estas variaciones en el FCG podría representar una herramienta de utilidad en el diagnóstico de los estados de salud y enfermedad periodontal producto de la periodontitis crónica.

El rango donde se observó la mayor variabilidad entre ambos grupos, se encontró entre los 2500 y 75000 Da, lo que concuerda con estudios previos, donde el área de mayor PM correspondería fundamentalmente a proteínas extravasadas desde el suero, como albúmina, transferrina y α -1 antitripsina⁽²⁾.

Por otro lado, las proteínas de menor peso molecular y péptidos, podrían reflejar en parte la actividad proteolítica de los tejidos periodontales, caracterizada por la degradación de matriz extracelular y la activación de otras enzimas⁽⁵⁾.

Consecuentemente, se ha propuesto que estas proteínas y péptidos podrían corresponder fundamentalmente a productos y media-

dores de destrucción tisular local o de origen bacteriano^(10,18), entre los cuales se han identificado defensas HNP-1, -2 y -3^(19,20) y calprotectinas-A y -B⁽²⁾.

El estudio de la periodontitis crónica a través del análisis del FCG representa un método no invasivo⁽¹⁹⁾; sin embargo, un inconveniente en la caracterización de este fluido está representada por los escasos volúmenes posibles de obtener a partir del surco gingival o saco periodontal, limitando el análisis a la detección de un sólo analito⁽²⁰⁾. Por esta razón, la utilización de la espectrometría de masas MALDI-TOF en este estudio, ha demostrado ser un método útil y relativamente sensible para el análisis de los cambios en la composición global del FCG. Sin embargo, se requieren estudios posteriores que conduzcan a la identificación de las proteínas de interés, mediante análisis de electroforesis bidimensional, determinación de masas por huellas peptídicas y secuenciación MS/MS, para comprender en mayor profundidad la patogenia de la enfermedad y proponer nuevos marcadores de destrucción periodontal.

Como conclusión, en este trabajo se demuestra por primera vez la utilidad de la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el análisis de cambios cualitativos en la composición global del FCG y presentamos los perfiles proteicos y peptídicos característicos del FCG en periodontitis crónica y sujetos sanos.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Proyecto DI MULT 06/05-2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl. 6):132-158.
- Kojima T, Andersen E, Sanchez JC, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Pralong WF, Cimasoni G. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (A100A9), two calcium binding proteins of the S100 family. *J Dent Res* 2000;79(4):740-747.
- Curtis MA, Sterne J, Price SJ, Griffiths GS, Coulthurst SK, Wilton JM, Johnson NW. The protein composition of gingival crevicular fluid sampled from male adolescents with no destructive periodontitis: Baseline data of a longitudinal study. *J Periodont Res* 1990;25:6-16.
- Ingman T, Tervahartala T, Ding Y, Tsesche H, Haerian A, Kinane DF, Kontinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127-1132.
- López-Otín C, Overall C. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 509-519.
- Puente X, Sánchez L, Overall C, López-Otín C. Human and Mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003;4:544-556.
- Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:383-388.
- VanSaun MN, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease. *Birth Defects Res (part C)* 2006;78:69-79.
- Overall CM, Dean RA. Degradomics: Systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:69-75.
- Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular Res* 2006;69:614-624.
- Overall C, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000,2003;31:77-104.
- Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol* 2000. 2005;39:53-72.
- Hernández M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, Gamonal J. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*. 2006 Nov;77(2):1863-70.
- Hernández M, Martínez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007 Sep;34(11):729-35.
- Adonogianaki E, Mooney J, Kinane DF. Detection of stable and active periodontitis sites by clinical assesment and gingival accute.phase protein levels. *J Periodont Res* 1996;31(4):135-143.
- Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 108-129.
- Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor κ B ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2004, 75:1586-1591.
- Mäkelä M, Söderling E, Paunio K, Talonpoika J, Hyypä T. Protein composition of crevicular fluid before and after treatment. *Scand J Dent Res*. 1991 Oct;99(7):413-23.
- Lundy FT, Orr DF, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ. Detection of individual human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in unfraktionated gingival crevicular fluid -a MALDI-MS approach. *Mol Immunol*. 2005 Mar;42(7):575-9.
- Pisano E, Cabras T, Montaldo C, Piras V, Inzitari R, Olmi C, Castagnola M, Messina I. Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS. *Eur J Oral Sci*. 2005 Dec;113(8):462-8.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Marcela Hernández Ríos

mhernandezrios@gmail.com

Trabajo recibido el 31/03/2008.

Aprobado para su publicación el 13/05/2008.

Recuento de Células Infiltrantes CD4+, CD8+ y CD19+ en el Tejido Gingival de Individuos con Periodontitis Crónica

Recount of CD4+, CD8+ and CD19+ Infiltrate Cells in Gingival Tissues of Subjects with Chronic Periodontitis

Cisterna C¹, Rivera O¹, Dutzan N¹.

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria del tejido periodontal, iniciada por el biofilm subgingival, que genera la destrucción progresiva de las estructuras de inserción dentaria. La naturaleza de la respuesta inflamatoria, determinaría el carácter destructivo de la enfermedad, considerándose un importante modelo para investigar el potencial patológico del infiltrado celular. En la periodontitis, este infiltrado incluye linfocitos T y B. Los linfocitos T CD4+ y T CD8+, efectores de la inmunidad celular, son claves en la inmunorregulación, pues pueden generar una respuesta celular o humoral. La relación T CD4+/CD8+ es considerada un indicador de la función del sistema inmune. Para determinar los porcentajes de células CD4+, CD8+ y CD19+ en el tejido gingival de individuos con periodontitis crónica y periodonto sano, y el valor de la razón entre las células CD4+/CD8+, tomamos biopsias de tejido gingival a 17 sujetos con periodontitis crónica y 11 periodontalmente sanos. Las muestras fueron digeridas en colagenasa, inmunotipificadas y analizadas mediante citometría de flujo, obteniendo que los porcentajes de todas las poblaciones estudiadas, así como, el valor de la razón CD4+/CD8+ aumentaron en las muestras de tejido enfermo respecto al tejido sano. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Concluimos que las células CD4+, CD8+ y CD19+, son las más abundantes dentro del infiltrado celular de la periodontitis crónica, y suponemos que las células CD4+ serían claves en la regulación de la respuesta inmune de la enfermedad, dado que su población registró el mayor aumento en el tejido enfermo.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 57-60, 2008.

Palabras claves: Periodontitis crónica, linfocitos, infiltrado celular.

ABSTRACT

The periodontitis is an inflammatory disease of the periodontal tissues, initiated by subgingival biofilm, that result in the progressive destruction of the structures that support the teeth. The nature of inflammatory response, could determine the destructive character of disease, and provides an important model for investigation of the pathological potential of cellular infiltrates. In the periodontitis, the infiltrates includes lymphocytes T and B. The lymphocytes T CD4+ and T CD8+, effectors of cellular immunity, are key cells in immunoregulation because they can lead to cellular or humoral response. The ratio of CD4+/CD8+ is considered to be an important indicator for immune system functions. For determinate the percentages of CD4+, CD8+ and CD19+ cells in the gingival tissues of periodontal and healthy subjects, and evaluate the CD4+/CD8+ cells ratio, were obtained biopsies of gingival tissues from 17 chronic periodontitis patients and 11 periodontally healthy subjects. The samples were incubated in collagenase, immunolabeling and analyzed using flow cytometry. The obtained percentages in every studied cell population, as well, the ratio CD4+/CD8+ were increased in the periodontitis biopsies respect to healthy tissues. Every difference was statistically significant. We conclude that CD4+, CD8+ and CD19+, are the most abundant cells in the chronic periodontitis cellular infiltrate, and we suspect that CD4+ cells could be key on the immune response regulation to the disease, since this population recorded the higher increase in sick tissues.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 57-60, 2008.

Key words: Chronic periodontitis, lymphocytes, cellular infiltrates.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad de etiología bacteriana y de naturaleza inflamatoria que afecta a los tejidos de inserción del diente, generando la destrucción del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar⁽¹⁻²⁾.

Los mecanismos de defensa del hospedero frente a la infección pueden ser locales o sistémicos, específicos o inespecíficos, y humorales o celulares⁽³⁾.

En periodontitis, y específicamente en el infiltrado celular de la lesión periodontal establecida y avanzada, los linfocitos del tipo T (LT) y B (LB), jugarían un rol clave, dadas sus funciones inmunorreguladoras y efectoras del sistema inmune⁽³⁻⁴⁾. No obstante, se ha observado también que estas células están involucradas en la patogénesis de la enfermedad exacerbando la respuesta inflamatoria frente al biofilm subgingival y favoreciendo la destrucción tisular⁽³⁾, principalmente mediante la síntesis de citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina (IL)-6 y el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL),

las que contribuyen a la destrucción que caracteriza a la periodontitis⁽⁵⁻⁶⁾. Asimismo, la razón entre las células TCD4+ y las células TCD8+ (CD4+/CD8+) es considerado un importante indicador del carácter de la respuesta inmune, puesto que cada subpoblación celular puede guiar hacia una respuesta particular, pudiendo ser esta predominantemente celular o predominantemente humoral⁽⁷⁻⁸⁾. Estudios han determinado los niveles sanguíneos de células T y B en individuos con periodontitis⁽⁹⁾. No obstante, son pocos los estudios que registran localmente, en los tejidos afectados, la representación que alcanzan estas células⁽⁸⁾. Más aún, los trabajos existentes emplean en su mayoría para el conteo celular técnicas semicuantitativas⁽⁹⁾. Tampoco se han encontrado estudios que simultáneamente cuantifiquen las poblaciones de linfocitos T y B.

El determinar diferencias en la distribución porcentual de estas células, entre individuos periodontalmente sanos y otros enfermos, podría relacionarse con la fisiopatología de la periodontitis crónica⁽⁹⁾.

El propósito de este estudio es determinar y comparar el por-

1. Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

centaje de células CD4+, CD8+ y CD19+, así como el valor de la razón CD4+/CD8+ en el tejido gingival de individuos con periodontitis crónica e individuos periodontalmente sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de individuos

Los sujetos incluidos en este estudio solicitaron tratamiento periodontal, en el Centro de Diagnóstico y Tratamiento Dra. Eloisa Díaz, correspondiente al Servicio de Salud Metropolitano Norte, Santiago.

Para conformar el grupo de individuos con periodontitis crónica, se examinaron 56 sujetos, de los cuales 17 cumplieron con los criterios de inclusión, he ingresaron al estudio. Dichos criterios fueron: edad ≥ 35 años, 14 o más dientes presentes sin contabilizar los terceros molares, de los cuales al menos 6 debían ser molares. Presentar al menos 4 sacos periodontales con PS ≥ 5 mm, 6 sitios periodontales con NIC ≥ 3 mm y evidencia radiográfica de reabsorción ósea. Los criterios de exclusión comprendieron: terapia periodontal previa, condiciones médicas que ameritaran premedicación antibiótica, ingesta de antibióticos, anti-inflamatorios esteroidales o no esteroidales y/o hormonas 6 meses antes del comienzo del estudio, embarazo, fumar 10 o más cigarrillos diarios, o enfermedades que afecten el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Como grupo control se estudió a 11 individuos, de edad ≥ 35 años, con al menos 14 dientes sin contabilizar los terceros molares, y de periodonto sano. Los criterios de exclusión para este grupo fueron los mismos que se utilizaron para el grupo de individuos con periodontitis.

Previo al inicio del estudio, todos los participantes firmaron un consentimiento informado, aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los sujetos enfermos ingresaron a un programa de tratamiento y mantención de enfermedades periodontales.

Evaluación clínica

En todos los individuos, un investigador calibrado efectuó mediciones dicotómicas respecto a la presencia de placa, tras lo cual realizó una profilaxis supragingival, para facilitar el uso de los instrumentos de medición. Luego se tomaron mediciones replicadas de profundidad al sondaje (PS) y nivel de inserción clínica (NIC), y una medición dicotómica respecto del sangramiento al sondaje, todo en seis sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual, mesiolingual).

Para estas mediciones se utilizó una sonda periodontal milimetrada, tipo Carolina del Norte (Hu Friedy, Gracey, USA).

A los individuos con periodontitis crónica se les tomó una biopsia de tejido gingival, seleccionándose un sitio periodontal con una PS ≥ 5 mm y una pérdida de inserción clínica ≥ 3 mm. En tanto, las biopsias de individuos periodontalmente sanos, provinieron de sitios sometidos a cirugía periodontal por motivos de alargamiento coronario de indicación protésica.

Recuento de células mediante citometría de flujo

Inmediatamente después de su obtención, las biopsias fueron sumergidas en 5 ml de medio de transporte RPMI 1640 suplementado con 50 μ g/mL de Penicilina, 50 μ g/mL de Estreptomicina y 0,1% de L-Glutamina⁽¹⁰⁾, manteniéndolas a 4°C hasta ser procesadas. Al momento de su procesamiento, las muestras fueron lavadas en amortiguador PBS estéril, eliminando detritus y restos de sangre. Luego, fueron pesadas en una balanza analítica (AFA 120 LC, ADAM®) y seccionados, empleando un bisturí de hoja número 15. Después se incubaron en un medio de digestión compuesto por: RPMI 1640, 0,1% L-glutamina, 290 ui/mL de colagenasa clostridial tipo IV, 50 μ g/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina, en una relación de 1 mL de solución de digestión por cada 50 mg de tejido⁽¹⁰⁾, durante 12 horas ("overnight") en baño termostático (mod. LC3 0155, DAIHAN LAB TECH Co., LTDA. Korea) a 37°C, y agitación constante. Posteriormente las muestras fueron tamizadas utilizando un cell strainer de nylon (BD FalconTM, Ma USA) y lavadas tres veces en PBS estéril mediante centrifugación (Gosheimerser 56. Hermle Labortechnik GMBH®, Germany) a 2.500 r.p.m., durante 10 minutos y a 4°C, y se resuspendieron en 500 μ l de medio de cultivo completo, compuesto por

medio RPMI 1640 suplementado con 50 μ g/mL de Penicilina, 50 μ g/mL de Estreptomicina y 100 μ l/ml de suero bovino fetal al 10%. Luego se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer (EM, Hirschmann Techcolor) mediante microscopio de contraste de fases (Axiovert 100, Zeiss Co., Germany) donde se evaluó la viabilidad fisiológica celular por exclusión del colorante azul de tripán.

Las células obtenidas, fueron divididas en cinco tubos, con 200.000 células por tubo, suspendidas en 100 μ l de muestra cada uno, tras lo cual se agregó a cada tubo 3 μ l del anticuerpo conjugado o isotipo correspondiente, y durante 30 minutos se les mantuvo en un ambiente protegido de la luz y a 4°C. Para este proceso se utilizaron los anticuerpos: anti-CD4 humano de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para identificar los linfocitos T cooperadores (CD4+), anti-CD8 humano de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) para inmunotipificar a los linfocitos T citotóxicos (CD8+), y anti-CD19 humano de ratón conjugado con FITC para identificar la población de linfocitos B (CD19+) (BD Pharmingen™). Como controles de la emisión de fluorescencia se usaron los isotipos FITC y PE.

Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSsort Becton Dickinson (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, Ca, USA).

Análisis de datos

Los datos obtenidos por citometría de flujo fueron graficados en software WinMDI® versión 2.8 y analizados en software estadístico Graph Pad Instat®, versión 3.06 (graph Pad software, Inc. Ca, USA).

Para el análisis de las variables de PS, NIC y la edad de los sujetos, se empleó la prueba estadística Welch's corrected t-test. Las variables dicotómicas sangramiento al sondaje y presencia de placa al igual que el género se analizaron utilizando la prueba estadística Fisher's test. En tanto, los porcentajes de células CD4+, CD8+, y CD19+, así como el valor de la razón CD4+/CD8+ del grupo estudio y del grupo control, se les comparó individualmente aplicando la prueba estadística Welch's corrected t-test.

RESULTADOS

Características clínicas

El grupo de individuos con periodontitis crónica, quedó constituido por un 64,71% de mujeres y un 35,29% de hombres (11 mujeres y 6 hombres), de un rango etario entre los 35 y los 73 años (promedio = 51,93 \pm 11,53 años). En el grupo control, el 54,54% fueron mujeres y el 45,45% hombres (6 mujeres y 5 hombres) cuyas edades fluctuaron entre los 35 y los 59 años (promedio = 45,3 \pm 9,01 años). No existieron diferencias significativas entre los grupos experimental y control para estas variables ($p > 0,05$).

El promedio de PS y NIC de los individuos con periodontitis respecto de los individuos periodontalmente sanos fue de 4,24 \pm 0,77 mm versus 1,45 \pm 0,19 mm ($p < 0,0001$) y de 5,14 \pm 1,33 mm versus 1,55 \pm 0,25 mm ($p < 0,0001$) respectivamente. Mientras que, el porcentaje promedio de sitios con sangramiento al sondaje y con presencia de placa bacteriana fueron de 62,25% \pm 10,41 y 54,78% \pm 6,7 en individuos con periodontitis y de 16,4% \pm 3,42 ($p < 0,0001$) y 13,57% \pm 8,85 ($p = 0,0378$) en individuos con periodonto sano.

Recuento celular

Tal como se puede observar en la tabla 1, el porcentaje de células CD4+, CD8+ y CD19+, fue mayor en las muestras de individuos con periodontitis que en las de individuos periodontalmente sanos. Todas estas diferencias porcentuales en el número de las células estudiadas, fueron estadísticamente significativas.

Tabla 1. Porcentaje de células CD4+, CD8+ y CD19+, y valor de la razón CD4+/CD8+, en el tejido gingival de individuos con periodontitis e individuos sanos. (Promedio ± desviación estándar).

	Periodontitis n = 17	Sanos n = 11
Células CD4+ (%)	31,37 ± 15,28	5,29 ± 2,05 €
Células CD8+ (%)	15,4 ± 4,71	3,67 ± 1,58 ¥
Células CD19+ (%)	34,35 ± 16,01	10,87 ± 4,38 ¢
Razón CD4+/CD8+	2,03 ± 0,65	1,44 ± 0,93 ₣

€ Porcentaje de células CD4+ en sujetos con periodontitis v/s sanos, p value < 0,0001.
 ¥ Porcentaje de células CD8+ en sujetos con periodontitis v/s sanos, p value < 0,0001.
 ¢ Porcentaje de células CD19+ en sujetos con periodontitis v/s sanos, p value = 0,005.
 ₣ Razón de células CD4+/CD8+ en sujetos con periodontitis v/s sanos, p value = 0,018.

Recuento de células CD4+

En la figura 1 podemos observar, que el porcentaje de células CD4+ en las muestras de individuos con periodontitis fue de 31,37% ± 15,28 respecto del total de células analizadas, mientras en el grupo control el valor fue de 5,29% ± 2,05 (p<0,0001). Comparativamente, fue en esta población celular donde se constató la mayor diferencia porcentual entre el tejido sano y enfermo (tabla 1).

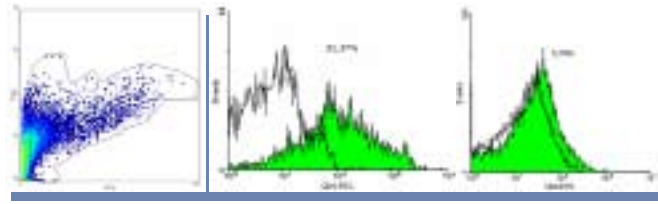


Figura 1. Density Plot e histogramas de una muestra representativa para la determinación del porcentaje de células CD4+ a) Density plot que relaciona tamaño (eje ordenadas) v/s complejidad (eje abscisas) de los eventos registrados por el citómetro de flujo. El área delimitada abarca las células presentes en la muestra y que luego fueron graficadas; b) y c) histogramas del número de células (eje de ordenadas) v/s la intensidad de fluorescencia de estas (eje de abscisas). En blanco se observa el control y en verde de la muestra inmunotipificada con anti hCD4-FITC. Se indica el porcentaje promedio de células positivas para el marcaje. b) Individuos con periodontitis crónica; c) individuos sanos.

Recuento de células CD8+

Tal como se aprecia en la figura 2, en el tejido gingival del grupo de individuos enfermos el porcentaje de células CD8+ ascendió al 15,4% ± 4,71 del total de células de la muestra, mientras que en individuos sanos las células CD8+ representaron el 3,67% ± 1,58 (p < 0,0001). Recuento de células CD19+.

Como muestra la figura 3, en el tejido gingival del grupo de estudio, el porcentaje promedio de células CD19+ llegó al 34,35% ± 16,1 versus el 10,87% ± 4,38 del grupo control (p = 0,005).

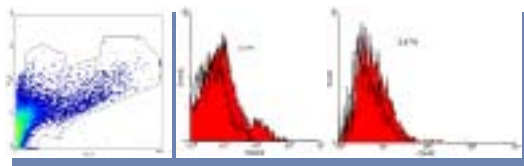


Figura 2. Density Plot e histogramas de una muestra representativa para la determinación del porcentaje de células CD8+ a) Density plot que relaciona tamaño (eje ordenadas) v/s complejidad (eje abscisas) de los eventos registrados por el citómetro de flujo. El área delimitada abarca las células presentes en la muestra y que luego fueron graficadas; b) y c) histogramas del número de células (eje de ordenadas) v/s la intensidad de fluorescencia de estas (eje de abscisas). En blanco se observa el control y en rojo la muestra inmunotipificada con anti hCD8-PE. Se indica el porcentaje promedio de células positivas para el marcaje. b) Individuos con periodontitis crónica; c) individuos sanos.

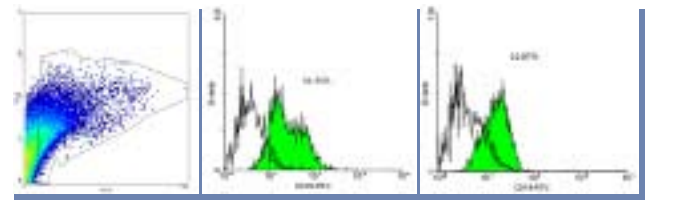


Figura 3. Density Plot e histogramas de una muestra representativa para la determinación del porcentaje de células CD19+ a) Density plot, que relaciona tamaño (eje ordenadas) v/s complejidad (eje abscisas) de los eventos registrados por el citómetro de flujo. El área delimitada abarca las células presentes en la muestra y que luego fueron graficadas; b) y c) histogramas del número de células (eje de ordenadas) v/s la intensidad de fluorescencia de estas (eje de abscisas). En blanco se observa el control y en verde la muestra inmunotipificada con anti hCD19-FITC. Se indica el porcentaje promedio de células positivas para el marcaje. b) Individuos con periodontitis crónica; c) individuos sanos.

Recuento de células CD19+

Como muestra la figura 3, en el tejido gingival del grupo de estudio, el porcentaje promedio de células CD19+ llegó al 34,35% ± 16,1 versus el 10,87% ± 4,38 del grupo control (p = 0,005).

Relación células CD4+/CD8+

El valor de la razón CD4/CD8, tuvo un promedio mayor en el grupo de estudio que en el grupo control (tabla 1). El valor promedio para la razón correspondió en los individuos con periodontitis a 2,03 ± 0,65, y en los individuos periodontalmente sanos a 1,44 ± 0,93 (p = 0,018).

Correlación clínica

Los resultados en lo relativo a los porcentajes de células CD4+, CD8+ y CD19+, no guardaron correlación con respecto a las características clínicas de los individuos incluidos en este estudio.

DISCUSIÓN

La predominancia de los linfocitos en el infiltrado celular del tejido afectado por periodontitis, de manifiesto en este trabajo, avala la idea que este segmento del infiltrado celular es responsable de la regulación de la respuesta inmune en los tejidos periodontales⁽¹¹⁾. Además, los cambios en la composición del infiltrado celular, entre el tejido sano y enfermo, dan señales de una alteración local en los eventos inmunorregulatorios del huésped⁽¹²⁾.

En cuanto a los valores que obtuvimos para las células CD4+ y CD8+, estos se asemejan a los disponibles en la literatura. En biopsias de tejido gingival los trabajos existentes muestran que la cantidad de células CD4+ y CD8+ aumentan en el tejido enfermo respecto al tejido sano⁽¹³⁻¹⁴⁾. Entre los estudios que utilizan citometría de flujo para analizar biopsias de tejido enfermo, se puede establecer un rango para las células CD4+ que fluctúa entre el 21,63 % ± 8,17⁽⁷⁾ y el 30,7 % ± 3,9⁽¹⁵⁾ del total de células. Mientras que para las células CD8+ este rango va desde el 8,58% ± 3,92⁽⁸⁾ al 14,6% ± 1,6⁽¹⁵⁾.

En cuanto a la cantidad de células CD19+, fenotipo expresado por los LB, Cobb et al 1989⁽¹⁶⁾ mediante inmunohistoquímica determinó que estos incrementan su número 20 veces en el tejido enfermo respecto al sano. Este tipo celular en conjunto con su forma celular diferenciada, la célula plasmática, constituyen según otros estudios, el tipo celular predominante del infiltrado celular en periodontitis crónica⁽¹⁷⁻²⁰⁾. No obstante, el hecho que los LB se encuentren en mayor proporción que los LT en periodontitis, no es consistente en todos los estudios, existiendo reportes que señalan un predominio de LT por sobre LB⁽²¹⁾, o al menos una relación de igualdad en sus proporciones⁽²²⁾. Esto último, se asemeja a la relación entre LT y LB que nosotros encontramos.

En tanto, los estudios que han investigado la razón entre células CD4+/CD8+ parecen variar dependiendo del método de evaluación y el lugar de obtención de la muestra^(8,23). Orbak et al 2003⁽⁷⁾, determinó mediante citometría de flujo un valor promedio de la razón CD4+/CD8+ en periodontitis crónica de 2,93 ± 1,68. Semejante al valor de Erciyas et

al 2006⁽⁶⁾, que con un protocolo similar, determinó que el promedio para esta razón era $2,80 \pm 1,26$. No obstante, Seymour et al 1997⁽¹⁵⁾, en biopsias de tejido gingival y empleando citometría de flujo, determinó un valor de la razón CD4+/CD8+ igual a $1,0 \pm 0,1$ en individuos con periodontitis crónica y de $1,8 \pm 0,2$ en individuos periodontalmente sanos. Valores que además contrastó con análisis en sangre periférica, donde obtuvo $2,1 \pm 0,1$ para individuos con periodontitis, y $2,1 \pm 0,1$ para individuos sanos.

Otros trabajos que compararon biopsias de tejido gingival de sitios activos, inactivos y sanos, observaron que en los sitios activos existía una mayor proporción de LB que en los sitios estables⁽²⁴⁾. Asimismo, Liljenberg et al 1994⁽¹⁴⁾, encontró que LT y LB están en mayor proporción en sitios activos que en sitios inactivos, aunque no registró diferencias entre sitios enfermos y sitios inactivos.

Esta información podría explicar la alta desviación estándar que obtuvimos en el recuento de las células CD4+ y CD19+. Esto porque, tomamos biopsias de tejido gingival enfermo, sin conocer si los sitios estaban activos o inactivos. A la luz de la información, existiría una diferencia en el recuento de estas células dependiendo del estado de progresión de la enfermedad^(14,24), por lo que sería de esperar que la cantidad de linfocitos variara marcadamente entre las muestras de periodontitis, y en consecuencia, registrar una alta desviación estándar en nuestros datos, tal como sucedió.

Las diferencias existentes entre los resultados obtenidos por otros investigadores y nuestros hallazgos se deben en parte al tipo de muestra analizada. En los estudios previos, las muestras estudiadas se obtuvieron posterior a la fase no quirúrgica del tratamiento periodontal, lo que produce una disminución en la cantidad y calidad del biofilm subgingival y por tanto una disminución de la inflamación y de la cantidad de células infiltrantes en los tejidos afectados. En nuestro trabajo, las muestras de los individuos con periodontitis se recolectaron antes de que

el sujeto fuese sometido a tratamiento, lo que en nuestra opinión, refleja con mayor exactitud los procesos inmunológicos desarrollados durante la patología.

Es destacable que algunos estudios al evaluar el infiltrado celular en el tejido gingival, antes y después del tratamiento periodontal no quirúrgico, determinaron que la densidad de células T y B declina después del tratamiento^(7-8,24), lo cual se aproxima a lo encontrado en el tejido sano.

CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra que existe un aumento estadísticamente significativo en la proporción de células CD4+, CD8+ y CD19+ en el tejido gingival de individuos con periodontitis crónica, comparado con el tejido gingival de individuos periodontalmente sanos, al igual que en el valor de la razón entre células CD4+/CD8+.

Este trabajo enfocado en las células que protagonizan la respuesta inmune adquirida, junto a nuevas investigaciones, en el futuro puede facilitar el entendimiento acerca de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la periodontitis. Esto a su vez, puede llevar al desarrollo de nuevas modalidades de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio de investigación fue financiado por el Proyecto Fondecyt 1050518.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Socransky S, Haffajee A. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J periodontol.* 1992; 63(4): 322-331.
- Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 134-144.
- Kornman K, Page R, Tonetti M. The Host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 33-53.
- Page R, Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976; 34(3): 235-249.
- Vernal R, Dutzan N, Hernández M y cols. High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol.* 2006; 77: 1772-1780.
- Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontol Res.* 2005; 40: 287-293.
- Orbak R, Erciyas K, Erzurum H. Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets after different treatment methods in smokers and non smokers with chronic periodontitis. *Int Dent J.* 2003; 53: 159-164.
- Erciyas K, Orbak R, Kavrut F, Demir T, Kaya II. The changes in T lymphocyte subsets following periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. *J Periodont Res.* 2006; 41: 165-170.
- Malberg K, Molle A, Streuer D, Gangler P. Determination of lymphocyte populations and subpopulations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 155-158.
- Stoufi ED, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Preparation and characterization of human gingival cells. *J Periodontol Res.* 1987; 22(2): 144-149.
- Han X, Kawai T, Eastcott J, Taubman M. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *The journal of immunology.* 2006; 176: 625-631.
- Teng Y. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(4): 237-252.
- Reinhardt RA, Bolton RW, McDonald T, DuBois LM, Kaldahl WB. In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol.* 1988; 59: 656-670.
- Liljenberg B, Lindhe J, Berglundh T, Dahlen G, Jonsson R. Some microbiological, histopathological and immunohistochemical characteristics of progressive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 720-727.
- Seymour G, Taubman M, Eastcott J, Gemmell E, Smith D. CD29 expression on CD4+ gingival lymphocytes supports migration of activated memory T lymphocytes to diseased periodontal tissue. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12 (3): 129-134.
- Cobb CM, Singla O, Feil P, Theisen, F, Schultz R. Comparison of NK-cell (Leu-7+ and Leu-11b+) populations in clinically healthy gingiva, chronic gingivitis and chronic adult periodontitis. *J Periodontol Res.* 1989; 24(1):1-7.
- Seymour G, Greenspan J. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodontol Res.* 1979; 14: 39-46.
- Lindhe J, Liljenberg B, Listgarten M. Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J Periodontol.* 1980; 51(5): 264-269.
- Okada H., Kida T, Yamagami H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infection and Immunity.* 1983; 41: 365-374.
- Passo S, Reinhardt RA, DuBois LM, Cohen D. Histological characteristics associated with suppurating periodontal pockets. *J Periodontol.* 1988; 59(11): 731-740.
- Modeer T, Dahllof G, Axio E, Sundqvist K. Subpopulations of lymphocytes in connective tissue from adolescents with periodontal disease. *Acta Odontologica Scandinavica.* 1990; 48: 153-159.
- Berglundh T, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. Local and systemic TCR V gene expression in advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 125-133.
- Taubman M, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(2): 125-135.
- Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (6): 87-107.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Nicolás Dutzan Muñoz

Olivos 943. Independencia. Santiago. Chile.

ndutzan@gmail.com

Trabajo recibido el 27/02/2008.

Aprobado para su publicación el 01/07/2008.

Perfiles Antimicrobianos de Bacterias Subgingivales en Pacientes con Periodontitis en Colombia

Antimicrobial Profiles of Subgingival Bacteria from Periodontitis Patients in Colombia

Jaramillo Echeverri A^{1,2}, Betancourth Quiroz M^{3,2}, Mayorga-Fayad I^{4,5}, Castillo Perdomo DM^{4,5}, Aya Castañeda MR^{4,5}, Lafaurie Villamil GI^{4,5}, Botero Torres JE^{1,2}, Contreras Rengifo A^{1,2}

RESUMEN

Introducción: La sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de las bacterias asociadas a periodontitis es diferente entre distintas poblaciones. En América Latina, pocos estudios han descrito la sensibilidad a los antimicrobianos de los periodontopatógenos. Este estudio determinó la sensibilidad de bacterias periodontopáticas aisladas de pacientes colombianos sanos y con periodontitis, frente a 6 antimicrobianos usados comúnmente como terapia adjunta para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Materiales y métodos: Se estudiaron aislados de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (n=23), *Porphyromonas gingivalis* (n=74), *Prevotella intermedia/nigrescens* (n=38), *Tannerella forsythia* (n=8), Enterobacteriaceas (n=89) y bacilos Gram negativos no fermentadores (n=26) cultivados a partir de muestras subgingivales de 127 pacientes colombianos con periodontitis crónica, 68 con periodontitis agresiva y 11 sanos o con gingivitis. Se realizó la prueba de E-test® para establecer la concentración inhibitoria mínima a tetraciclina, ciprofloxacina, amoxicilina, metronidazol, azitromicina y clindamicina.

Resultados: Se encontró sensibilidad de los periodontopatógenos a la mayoría de los antimicrobianos. Aunque *A. actinomycetemcomitans* mostró resistencia al metronidazol, amoxicilina y clindamicina y *P. intermedia/nigrescens* fue resistente a varios de los antimicrobianos probados. Las demás bacterias anaerobias fueron sensibles a la mayoría de ellos. No se observaron diferencias entre los perfiles de sensibilidad de las bacterias en pacientes con enfermedad periodontal y en pacientes sanos. Los bacilos Gram negativos entéricos fueron resistentes a la amoxicilina y sensibles a la ciprofloxacina.

Conclusión: La terapia antimicrobiana adjunta al tratamiento periodontal de pacientes colombianos con periodontitis debe ser administrada cuidadosamente, pues existe una gran variabilidad en la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias periodontopatógenas.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 61-65, 2008.

Palabras claves: Periodontitis crónica, periodontitis agresiva, sensibilidad antibiótica, E-test, bacterias periodontopáticas.

ABSTRACT

Background: *In vitro* antimicrobial susceptibility of microorganisms associated to periodontitis has showed different results among world populations. In Latin America, few studies have described antimicrobial susceptibility of periodontopathogens. This study determined antimicrobial susceptibility of some bacteria isolated from healthy and periodontitis Colombian patients for six commonly used antimicrobials as adjunctive therapy for periodontal disease treatment.

Methods: Isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (n=23), *Porphyromonas gingivalis* (n=74), *Prevotella intermedia/nigrescens* (n=38), *Tannerella forsythia* (n=8), *Enterobacteriaceae* (n=89) and non fermenters Gram negative rods (n=26) from subgingival samples of 127 patients with chronic periodontitis, 68 with aggressive periodontitis and 11 healthy/gingivitis patients were tested by means of the E-test®. The minimal inhibitory concentration (MIC) of tetracycline, ciprofloxacin, amoxicillin, metronidazole, azythromycin and clindamycin was tested for each isolate.

Results: High antimicrobial susceptibility of periodontopathogens was found to most of tested antimicrobials. However, *A. actinomycetemcomitans* showed resistance to metronidazole, amoxicillin and clindamycin and *P. intermedia/nigrescens* showed resistance to most of tested antimicrobials. No differences of susceptibilities to antimicrobials were observed between periodontal diagnoses. Gram negative rods were resistant to amoxicillin and susceptible to ciprofloxacin.

Conclusions: Antimicrobial supportive therapy for the treatment of Colombian patients affected with periodontitis should be carefully administered considering that there is a great variability of susceptibility to antimicrobial agents among periodontopathic species.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 61-65, 2008.

Key words: Chronic periodontitis, aggressive periodontitis, antimicrobial susceptibility, E-test, periodontopathic bacteria.

INTRODUCCIÓN

El uso de antimicrobianos sistémicos como coadyuvantes en la terapia periodontal es controversial. No existe en la actualidad un consenso con respecto a su uso, al tipo de antimicrobiano o a la condición clínica periodontal a la cual se debe aplicar. En pacientes con periodontitis agresivas, fumadores o poco respondedores a la terapia mecánica, el uso de los antibióticos puede mejorar el pronóstico del tratamiento. Sin embargo, aun en estos casos es poco claro el tipo de fármaco a usar, las dosis y el tiempo de duración del tratamiento⁽¹⁾.

Dos de los criterios más importantes en la elección del agente antimicrobiano para el tratamiento de la enfermedad periodontal son la identificación de la microbiota subgingival y la de su perfil de sensibili-

dad antimicrobiana⁽²⁾. La sensibilidad a los antibióticos de los microorganismos asociados a enfermedad periodontal puede variar entre países, debido en gran parte a razones socioculturales (alto consumo de antibióticos, poca adherencia a una correcta dosificación) lo que ayuda a aumentar la resistencia a los antimicrobianos seleccionados usados comúnmente en la terapia periodontal⁽³⁾.

Las bacterias asociadas a la etiología de enfermedades periodontales comprenden un grupo heterogéneo de microorganismos capnófilos y anaerobios estrictos, dentro de los que se cuentan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, entre otros⁽⁴⁾.

1. Escuela de Odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Escuela de Bacteriología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
5. Grupo UIBO, Unidad de Investigación Básica Oral.

2. Grupo Medicina Periodontal.
4. Facultad de Odontología, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Estas bacterias exhiben diversos comportamientos frente a los antibióticos disponibles para su tratamiento. En España, en pacientes con periodontitis, se reporta un porcentaje de resistencia de *P. intermedia* de 33% a la amoxicilina, 16.7% a la tetraciclina y 11.1% a la clindamicina; siendo estos niveles de resistencia son mucho más elevados que los observados en Holanda⁽³⁾. También se ha encontrado resistencia de aislados de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis agresiva a antibióticos como clindamicina (13%) y ciprofloxacina (73%)⁽⁵⁾. Estos últimos resultados no se observaron en otro estudio donde la sensibilidad a la clindamicina y ciprofloxacina fué total⁽⁶⁾. En España también se describe una resistencia mayor de *A. actinomycetemcomitans* a la amoxicilina y azitromicina (33.3%), en comparación con Holanda, no obstante en ambos países la resistencia a la clindamicina y al metronidazol es similarmente alta⁽³⁾.

De otro lado, en el tratamiento de la enfermedad periodontal se ha observado que el uso de algunos antimicrobianos puede facilitar la colonización de especies inusuales en el surco y bolsa periodontal. Existen reportes que indican que después del tratamiento sistémico con eritromicina y doxiciclina, se presenta un aumento en el aislamiento de bacilos Gram negativos entéricos^(7,8). Los bacilos Gram negativos entéricos son aislados frecuentemente en pacientes con enfermedad periodontal. En pacientes con periodontitis crónica se ha reportado que hasta un 14% pueden tener organismos de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* y que estos en particular son resistentes a antibióticos como los betalactámicos y las tetraciclinas. Sin embargo, también se describe la gran sensibilidad que presentan frente a la ciprofloxacina gracias a los ensayos *in vitro* de sensibilidad⁽⁹⁾.

Este estudio busca determinar los perfiles de susceptibilidad de cinco patógenos periodontales y de otros microorganismos inusuales encontrados en pacientes colombianos con periodontitis crónica, agresiva y en pacientes sanos, lo cual puede sentar las bases de las diferencias en la conducta terapéutica con respecto a otros países.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se estudiaron 258 cepas de microorganismos aislados de surcos o bolsas periodontales de 127 pacientes con Periodontitis Crónica, 68 con periodontitis agresiva y 11 pacientes periodontalmente sanos o con gingivitis. Las muestras fueron tomadas en las diversas clínicas de periodoncia de las universidades participantes: Universidad del Valle, Universidad El Bosque, Instituto de Ciencias de la Salud CES, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Universidad Santo Tomás, Universidad de Antioquia, Universidad de Cartagena, Universidad Autónoma de Manizales.

Diagnóstico periodontal

Los diagnósticos periodontales de periodontitis crónica (PC), periodontitis agresiva (PA) e individuos sanos o con gingivitis, fueron realizados por los periodoncistas tratantes, previamente calibrados, siguiendo los estándares del último consenso de la Asociación Americana de Periodoncia sobre Clasificación⁽¹⁰⁾. El taller de calibración en los criterios diagnósticos comprendió el examen clínico de 15 pacientes en los que se midieron los parámetros clínicos, se revisaron las historias clínicas, exámenes de laboratorio, radiografías y fotografías, y posterior a ello se realizó una discusión. Los resultados de la calibración fueron >91% de acuerdo en las mediciones de profundidad al sondaje y >82% para el nivel de inserción clínica.

Aislamiento e identificación de microorganismos

Las muestras subgingivales se tomaron de los 6 sitios más profundos en los pacientes con enfermedad periodontal y de un sitio por cada sextante en los pacientes con gingivitis o sanos. Se removió la placa supragingival y se insertó una punta de papel estéril en el surco o bolsa durante 20 segundos, y las puntas se transfirieron a un frasco tapa rosca con el medio de transporte VMGA III para luego ser procesadas máximo

después de 48 horas de obtenidas, en dos laboratorios de microbiología que usaron técnicas estandarizadas para el procesamiento microbiológico de identificación y pruebas de susceptibilidad.

Se utilizó el agar TSBV, incubado a 36°C por 3 a 5 días en una atmósfera de 5% de CO₂ para la recuperación de *A. actinomycetemcomitans*, mientras que el agar sangre Brucella incubado a 36°C por 10 días se usó para la recuperación de los organismos anaerobios estrictos que fueron estudiados. La identificación se hizo de acuerdo a las características morfológicas de las colonias y pruebas bioquímicas adicionales⁽¹¹⁾, así como el sistema comercial Rapid Ana II[®]. Para el aislamiento de los bacilos Gram negativos entéricos se utilizó el agar MacConkey incubado por 24 horas a 37°C en aerobiosis y para su identificación se utilizó el sistema comercial Crystal E/NF[®].

Pruebas de sensibilidad

Con el fin de obtener cultivos puros de *P. gingivalis*, *P. intermedia/nigrescens*, y *Tanarella forsythia* las colonias fueron subcultivadas en agar sangre Brucella. De igual manera, se obtuvieron subcultivos puros de *A. actinomycetemcomitans* en agar TSBV y de los bacilos Gram negativos entéricos en agar MacConkey. El método usado para evaluar la sensibilidad fue el E-test[®], siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe brevemente: Se prepararon los inóculos por separado de bacterias anaerobias y microaerófilas con el estándar 1.0 de McFarland, y de los bacilos entéricos con el estándar 0.5. Luego se sembró 0.1 ml de cada inóculo de bacterias anaerobias en agar sangre Brucella utilizando una varilla de vidrio estéril, mientras que para los bacilos Gram negativos entéricos la siembra se realizó con un hisopo estéril en agar Mueller-Hinton. Se dejó secar el inóculo durante 15 minutos y se colocaron dos tiras de E-test[®] en cada caja. Los siguientes antimicrobianos fueron probados en bacterias anaerobias y capnófilas: Amoxicilina, Tetraciclina, Ciprofloxacina, Metronidazol, Clindamicina y Azitromicina. Para los bacilos Gram negativos tipo Enterobacteriaceae se probaron Amoxicilina, Tetraciclina, y Ciprofloxacina mientras que en los no fermentadores sólo se probaron los dos últimos.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad fueron determinados a las 24 horas para bacterias entéricas y 48 horas para anaerobias, interpretando el valor de la concentración en µg/ml obtenido de la intersección entre la concentración dada por la tira reactiva y el crecimiento bacteriano que forma una elipse. A partir de estos datos, se interpretó la sensibilidad de los microorganismos de acuerdo a las tablas del CLSI (NCCLS) o a estudios previos^(3,12,13).

El control de calidad de las tiras E-test[®] fue realizado con las cepas ATCC *Bacteroides fragilis* 25285, *Escherichia coli* 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* 27853.

Análisis estadístico

La base de datos se realizó en Excel[®] y se importó en el paquete estadístico SPSS 10.0[®]. Se realizó análisis univariado para establecer las frecuencias de los organismos en la microbiota subgingival y bivariado para realizar las comparaciones por diagnóstico periodontal.

Las concentraciones a las cuales el 50% y el 90% de las cepas fueron susceptibles a los antibióticos se definieron como concentración inhibitoria mínima (CIM) 50 y 90. Los resultados de acuerdo al diagnóstico se compararon mediante la prueba de Wilcoxon.

Se calculó la proporción de cepas resistentes a cada antimicrobiano con relación a cada diagnóstico periodontal y se realizó la prueba χ^2 de Pearson para verificar si existían diferencias en los perfiles de sensibilidad con respecto al diagnóstico clínico.

RESULTADOS

En la tabla 1 se describe la frecuencia de los microorganismos aislados a los cuales se les realizaron pruebas de sensibilidad. Dentro de los anaerobios y capnófilos estudiados, fueron más prevalentes *P. gingivalis* y *P. intermedia/nigrescens* que predominaron en los pacientes con perio-

don'titis. Con respecto a los bacilos Gram negativos facultativos, fueron más frecuentes bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* que las no fermentadoras. En los pacientes con gingivitis o sanos fue muy baja la frecuencia de aislamiento de las bacterias periodontopáticas y Gram negativas entéricas estudiadas.

Los perfiles de resistencia de los organismos evaluados frente a los antimicrobianos, de acuerdo al diagnóstico periodontal se presentan en la tabla 2. *A. actinomycetemcomitans* fue notablemente sensible a la mayoría de los antibióticos, exceptuando el metronidazol y la clindamicina. Los microorganismos anaerobios estrictos mostraron poca resistencia a los antimicrobianos, aunque con la amoxicilina se encontró resistencia de las especies de *Prevotella*. La mayoría de los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* fueron resistentes a la amoxicilina, mientras que a la tetraciclina cerca de la cuarta parte presentaron resistencia. En contraste, la ciprofloxacina fue altamente efectiva en las pruebas in vitro contra todos los bacilos Gram negativos entéricos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de bacterias resistentes según el diagnóstico periodontal (prueba χ^2 de Pearson).

La tabla 3 presenta los rangos de CIM, la CIM50 y CIM90 de cinco patógenos periodontales contrastado de acuerdo al diagnóstico de periodontitis crónica o agresiva. *P. gingivalis* y *T. forsythia* exhibieron una gran sensibilidad a los fármacos probados, pues se observan CIM muy bajas. *A. actinomycetemcomitans* mostró CIM90 altas frente a amoxicilina, metronidazol y clindamicina. *P. intermedia/nigrescens* presentó altas CIM90 para ciprofloxacina y metronidazol.

La tabla 4 muestra los rangos de CIM, la CIM50 y CIM90 de *Enterobacteriaceae* y de los bacilos Gram negativos no fermentadores a los antimicrobianos. La ciprofloxacina exhibió los mejores resultados al inhibir el 50 y el 90% de los aislados de estos organismos con unas concentraciones muy bajas. En contraste, las especies de *Enterobacteriaceae* mostraron CIM50 y CIM90 muy altas, lo que indica la alta resistencia de estos organismos a la amoxicilina. En los bacilos Gram negativos no fermentadores no se probó la amoxicilina ya que presentan una resistencia constitutiva a este betalactámico⁽¹⁴⁾.

En la tabla 5 se presentan algunas de las especies de *Enterobacteriaceae* resistentes a dos de los antibióticos probados. *Enterobacter cloacae* y las especies de *Klebsiella* además de haber sido las más prevalentes entre todos los inusuales, tuvieron los niveles de resistencia más altos a la amoxicilina.

Tabla 2. Perfil de Resistencia de microorganismos periodontopáticos e inusuales de acuerdo al diagnóstico periodontal.

Microorganismo	Tetraciclina			Ciprofloxacina			Ciprofloxacina		
	PC	PA	Sano	PC	PA	Sano	PC	PA	Sano
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1/13 (7.7)	0/7 (0)	0/3 (0)	0/13 (0)	0/7 (0)	0/3 (0)	0/13 (0)	0/7 (0)	0/3 (0)
<i>P. gingivalis</i>	1/48 (2.1)	1/26 (3.8)	0	0/48 (0)	1/26 (3.8)	0	0/48 (0)	1/26 (3.8)	0
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	3/22 (13.6)	2/14 (14.3)	0/2 (0)	2/22 (9.1)	2/14 (14.3)	0/2 (0)	2/22 (9.1)	2/14 (14.3)	0/2 (0)
<i>T. forsythia</i>	0/4 (0)	0/4 (0)	0	0/4 (0)	0/4 (0)	0	0/4 (0)	0/4 (0)	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	10/55 (18.2)	7/29 (24.1)	1/5 (20)	0/55 (0)	0/29 (0)	0/5 (0)	0/55 (0)	0/29 (0)	0/5 (0)
Bacilos Gran negativos no fermentadores	10/16 (62.5)	3/9 (33.3)	0/1 (0)	1/16 (6.3)	0/9 (0)	0/1 (0)	1/16 (6.3)	0/9 (0)	0/1 (0)

Microorganismo	Metronidazol			Azitromicina			Clindamicina		
	PC	PA	Sano	PC	PA	Sano	PC	PA	Sano
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	13/13 (100)	5/7 (71.4)	3/3 (100)	4/13 (30.8)	1/7 (14.3)	0/3 (0)	11/13 (84.6)	3/7 (42.9)	3/3 (100)
<i>P. gingivalis</i>	1/48 (2.1)	1/26 (3.8)	0	1/48 (2.1)	1/26 (3.8)	0	0/48 (0)	1/26 (3.8)	0
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	2/22 (9.1)	2/14 (14.3)	0/2 (0)	1/22 (4.5)	3/14 (21.4)	1/2 (50)	0/22 (0)	0/14 (0)	0/2 (0)
<i>T. forsythia</i>	0/4 (0)	0/4 (0)	0	1/4 (25)	0/4 (0)	0	0/4 (0)	0/4 (0)	0

En todos los casos, $p > 0.05$, prueba χ^2 cuadrado de Pearson.

PC: Periodontitis Crónica, PA: Periodontitis Agresiva.

Los valores para cada microorganismo se presentan en n resistentes/n total (% de resistencia).

*Los bacilos Gram negativos no fermentadores no fueron probados contra la amoxicilina debido a su naturaleza resistente a este antimicrobiano.

Tabla 3. Concentraciones Inhibitorias Mínimas ($\mu\text{g/ml}$) de los antibióticos probados contra microorganismos periodontopáticos de pacientes con Enfermedad Periodontal.

Microorganismo	RANGO CIM CIM 50 CIM 90	Tetraciclina		Ciprofloxacina		Amoxicilina	
		PC	PA	PC	PA	PC	PA
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		<0.016 ->256 0.29 231.2	<0.016 - 0.38 0.19 0.38	<0.002 - 0.47 0.016 0.434	<0.002 - 0.023 0.008 0.023	0.047 ->256 0.38 235.2	0.125 ->256 0.29 >256
<i>P. gingivalis</i>		<0.016 - 12 0.016 0.335	<0.016 - 8 0.016 1.3	<0.002 - 1.5 0.0125 0.651	<0.002 - 32 0.024 1.5	<0.016 - 2 0.016 0.3	<0.016 ->256 0.016 0.65
<i>P. intermedia/nigrescens</i>		<0.016 - 16 0.1573 13.6	<0.016 ->256 0.592 196	<0.002 ->32 0.19 >32	<0.002 - 32 0.375 32	<0.016 ->256 0.1573 3.7	<0.016 - 16 0.1092 16
<i>T. forsythia</i>		<0.016 <0.016 <0.016	<0.016 <0.016 <0.016	<0.002 <0.002 <0.002	<0.002 - 0.002 <0.002 <0.002	<0.016 - 2 0.016 2	<0.016 <0.016 <0.016

Microorganismo	RANGO CIM CIM 50 CIM 90	Metronidazol		Azitromicina		Clindamicina	
		PC	PA	PC	PA	PC	PA
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		8 ->256 >256 >256	4 ->256 12 >256	0.032 ->256 0.5 235.2	<0.016 - 12 1 12	2 ->256 0.29 >256	0.38 ->256 >256
<i>P. gingivalis</i>		<0.016 ->256 <0.016 0.034	<0.016 ->256 <0.016 0.304	<0.016 - 2 <0.016 0.775	<0.016 - 8 <0.016 1.075	<0.016 - 0.75 <0.016 0.016	<0.016 ->256 <0.016 0.2306
<i>P. intermedia/nigrescens</i>		<0.016 ->256 <0.016 268.83	<0.016 ->256 0.094 196	<0.016 - 3 0.064 1.5	<0.016 - 24 0.142 15	<0.016 - 0.5 <0.016 0.2125	<0.016 - 0.19 <0.016 0.127
<i>T. forsythia</i>		<0.016 <0.016 <0.016	<0.016 <0.016 <0.016	<0.016 - 4 <0.016 4	<0.016 <0.016 <0.016	<0.016 <0.016 <0.016	<0.016 <0.016 <0.016

En todos los casos, $p > 0.05$, prueba χ^2 cuadrado de Pearson.

PC: Periodontitis Crónica, PA: Periodontitis Agresiva.

Tabla 1. Microorganismos estudiados para sensibilidad *in vitro* de acuerdo al diagnóstico periodontal.

Microorganismo	Periodontitis Crónica n=127	Periodontitis Agresiva n=68	Sanos y/o Gingivitis n=11	Total
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	13	7	3	23
<i>P. gingivalis</i>	48	26	0	74
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	22	14	2	38
<i>T. forsythia</i>	4	4	0	8
<i>Enterobacteriaceae</i>	55	29	5	89
Bacilos Gran negativos no fermentadores	16	9	1	26

Tabla 4. Concentraciones Inhibitorias Mínimas (µg/ml) de los antibióticos probados contra microorganismos inusuales de pacientes con Enfermedad Periodontal.

Microorganismo		Tetraciclina		Ciprofloxacina		Amoxicilina	
		PC	PA	PC	PA	PC	PA
Enterobacteriaceae	RANGO	0.16 ->256	0.38 ->256	<0.002 ->32	<0.002 ->0.47	0.96 ->256	1 ->256
	CIM	2	2	0.06	0.012	96	>256
	CIM 50 CIM 90	9.6 2	>256	0.338	0.064	>256	>256
Bacilos Gram negativos no fermentadores	RANGO	1 ->256	1 ->256	<0.002 -1.5	0.006 -0.125		
	CIM	6	3	0.1575	0.125	*	*
	CIM 50 CIM 90	137.6	>256	1.15	0.125		

En todos los casos, p > 0.05, prueba χ² cuadrado de Pearson.

PC: Periodontitis Crónica, PA: Periodontitis Agresiva.

*Los bacilos Gram negativos no fermentadores no fueron probados contra la amoxicilina debido a su naturaleza resistente a este antimicrobiano.

Tabla 5. Especies de Enterobacteriaceae resistentes a Amoxicilina y Tetraciclina.

Microorganismo	Amoxicilina	Tetraciclina
<i>Enterobacter cloacae</i> (23)	20 (87%)	3 (13%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (17)	17 (100%)	4 (23.5%)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (11)	11 (100%)	3 (27.2%)
<i>Enterobacter gergoviae</i> (11)	2 (18.1%)	1 (9%)
<i>Serratia liquefaciens</i> (6)	4 (66.6%)	2 (33.3%)

DISCUSIÓN

El tratamiento antimicrobiano de la enfermedad periodontal requiere de la evidencia científica que demuestre su eficacia clínica⁽¹⁵⁾. Los efectos de un determinado tratamiento antimicrobiano pueden presentarse mejor en unos pacientes que en otros y en este punto es importante resaltar el tipo de microbiota subgingival que tienen los pacientes. Winkel ha demostrado en un estudio previo, que el tratamiento con amoxicilina mas metronidazol parece ser mas efectivo en pacientes con periodontitis crónica por *P.gingivalis*⁽¹⁶⁾. Sin embargo no sólo conocer la microbiota presente sino el perfil de sensibilidad que presentan los microorganismos a determinados antimicrobianos puede aportar mayor claridad acerca de la conducta terapéutica a seguir.

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias periodontopáticas ha sido evaluada por otros autores y se ha discutido la diferencia entre los perfiles de sensibilidad de algunas de estas bacterias en diferentes poblaciones⁽¹⁷⁾. En el presente estudio se usó el E-test® para la determinación de la CIM de los antimicrobianos probados, pues este método ha sido ampliamente usado y validado en bacterias aisladas de la microbiota subgingival^(9,18).

En este estudio se encontró una baja prevalencia de cepas de *A. actinomycetemcomitans* resistentes a tetraciclina, hallazgo que coincide con el estudio de van Winkelhoff en el que se compararon las proporciones de resistencia entre periodontopáticos de Holanda y España⁽³⁾. Resultados similares se encontraron para la amoxicilina y para la azitromicina, pues cerca de la tercera parte de los aislados en ambos estudios fueron resistentes a estos antibióticos. En contraste, para el metronidazol y la clindamicina se encontró una mayor proporción de resistencia de este microorganismo en el presente estudio que en el europeo. Esta misma observación fue reportada por otro grupo⁽⁶⁾. La alta resistencia al metronidazol de este microorganismo ha sido explicada por el hecho de que el metabolito hidroxilado de este fármaco es 3 a 4 veces más activo contra anaerobios estrictos que contra este tipo de bacteria capnófila^(19,20).

Al comparar la CIM90 del *A. actinomycetemcomitans* reportada en un estudio con 25 pacientes brasileiros con periodontitis agresiva⁽²¹⁾ con la de este estudio (tabla 3), se observó una mayor CIM90 en los aislados colombianos para amoxicilina (2 en Brasil, vs. >256 en Colombia), tetraciclina (1.5 vs. 3), clindamicina (8 vs. >256) y metronidazol (>32 vs >256). Esto muestra que en nuestro país, a pesar de presentar unas condiciones socioculturales semejantes a Brasil, hay una mayor resistencia

de este microorganismo a los antibióticos probados, lo que se explicaría por el uso de antibióticos de forma indiscriminada, o por el hecho de que este estudio es más reciente, y el tiempo juega un papel importante en la evolución de los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias, mas aún en las que crecen en biopelículas como es el caso de la microbiota subgingival.

En una investigación publicada recientemente, se evaluó la resistencia de 5 bacterias periodontopatógenas a 10 antimicrobianos en 20 pacientes con periodontitis crónica, mediante las técnicas de difusión de disco y microdilución en caldo. En ese estudio se encontró que el 25% de 8 aislados de *T. forsythia* fueron resistentes a la ciprofloxacina⁽⁵⁾. En contraste, no se encontró resistencia de *T. forsythia* a la ciprofloxacina, esta bacteria mostró alta sensibilidad a los antimicrobianos probados y sólo una cepa fue resistente a la azitromicina (tabla 2).

Se encontró una baja prevalencia de resistencia de *P. gingivalis* a tetraciclina, metronidazol, amoxicilina y azitromicina y se encontraron proporciones similares de cepas sensibles de *P. gingivalis* comparadas con los hallazgos de un estudio previo en población colombiana, en abscesos periodontales⁽²²⁾. Similares resultados fueron reportados en el estudio España-Holanda⁽⁹⁾. Sin embargo en un estudio que evaluó la sensibilidad por otros métodos pruebas (difusión de disco y microdilución en caldo) se reportó una alta resistencia de este microorganismo a la clindamicina y la ciprofloxacina⁽⁵⁾. Aunque las técnicas no son comparables, es importante señalar que las CIM cuando son determinadas por técnicas de E-test son más bajas que cuando lo son por otros métodos de prueba⁽²³⁾.

En comparación con resultados previos del estudio de abscesos periodontales en Colombia⁽²²⁾, en este se obtuvieron mayores proporciones de cepas resistentes de *P. intermedia/nigrescens* a tetraciclina, metronidazol y azitromicina. Se encontró en pacientes con periodontitis crónica 13% de resistencia para Tetraciclina, 5% para Azitromicina y 9% para Metronidazol contra 0% en el reporte de abscesos. En el caso de la amoxicilina los resultados fueron similares (13.6% en periodontitis crónica contra 14.2% en el reporte de abscesos). *P. intermedia/nigrescens* son señaladas en varios estudios con resistencia a los betalactámicos debido a la presencia de enzimas betalactamasas^(3,5), y en algunos países esto ha conducido a sugerir terapias combinadas de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (amoxicilina/ácido clavulánico). Aunque los resultados de este estudio nos muestran una resistencia baja a la amoxicilina, es importante continuar vigilando el comportamiento de este antimicrobiano en las especies de *Prevotella* aisladas.

Los bacilos Gram negativos entéricos estudiados mostraron altos niveles de sensibilidad a la ciprofloxacina y variados a la amoxicilina y tetraciclina tal como se ha visto previamente^(9,24,25). En este estudio se encontraron especies de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* resistentes a la amoxicilina, lo que es frecuente en estos géneros debido a la producción de betalactamasas que degradan activamente este antibiótico. Es por esto que las CIM observadas en este tipo de aislados fueron muy altas y son comparables a las observadas en cepas asociadas a infecciones nosocomiales^(26,27). Aunque el papel que juegan los bacilos Gram negativos entéricos en la enfermedad periodontal aún no está claramente dilucidado, algunos autores han sugerido que la presencia de estas bacterias en la bolsa periodontal no sólo podrían retrasar el tratamiento de la enfermedad periodontal sino que también podría tener importancia como foco de infecciones para el hombre⁽²⁸⁾. El hallar este tipo bacterias y tan resistentes a antibióticos comúnmente usados en enfermedad periodontal, debe ser tema de estudios mas profundos en nuestra población.

Los hallazgos de los resultados *in vitro* no necesariamente representan lo que debe ocurrir en el tejido *in vivo*. Sin embargo, sugieren que la terapia combinada de amoxicilina y metronidazol tiene un soporte para su uso como terapia coadyuvante en pacientes con periodontitis asociada a microorganismos anaerobios, mientras que cuando existen organismos inusuales el uso de la ciprofloxacina sería más efectivo.

AGRADECIMIENTOS

Manifestamos nuestros agradecimientos a los odontólogos periodoncistas participantes en los diferentes Centros: Alexandra Barón,

Universidad El Bosque; Astrid Giraldo, Instituto de Ciencias de la Salud; Sergio Mantilla y Luz Elena Archila, Universidad Santo Tomás; Ferney González, Universidad Metropolitana; Antonio Díaz, Universidad de Cartagena; Alejandro Botero, Universidad de Antioquia y Tatiana Chacón, Universidad Autónoma de Manizales.

Este estudio fue financiado parcialmente por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, Francisco José de Caldas - COLCIENCIAS, No. 1308-04-13001.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Haffajee AD. Systemic antibiotics: to use or not to use in the treatment of periodontal infections. That is the question. *J Clin Periodontol* 2006; 33:359-361.
- Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2004; 75:1553-1565.
- van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005; 32:893-898.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5:78-111.
- Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M. Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:244-252.
- Eick S, Pfister W, Straube E. Antimicrobial susceptibility of anaerobic and capnophilic bacteria isolated from odontogenic abscesses and rapidly progressive periodontitis. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12:41-46.
- Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5:166-168.
- Helovu H, Hakkarainen K, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8:75-79.
- Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5:149-154.
- 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol* 1999; 4:i, 1-112.
- Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1:48-57.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Anaerobic Bacteria - Approved Standard Fifth Edition. NCCLS Document M11-A5. 2001. Ref Type: Generic.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement (M100-S15). 2005. Ref Type: Generic.
- Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol* 2005; 8:518-524.
- van Winkelhoff AJ. Antibiotics in periodontics: are we getting somewhere? *J Clin Periodontol* 2005; 32:1094-1095.
- Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van d, V, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2001; 28:296-305.
- van Winkelhoff AJ, Herrera GD, Winkel EG, Iemijn-Kippuw N, Vandembroucke-Grauls CM, Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2000; 27:79-86.
- Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2197-2203.
- Pavicic MJ, van Winkelhoff AJ, de GJ. In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2634-2638.
- Walker CB. Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontol* 2000 1996; 10:12-28.
- Tinoco EM, Beldi MI, Campedelli F, Lana M, Loureiro CA, Bellini HT, et al. Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. *J Periodontol* 1998; 69:1355-1363.
- Jaramillo A, Arce RM, Herrera D, Betancourth M, Botero JE, Contreras A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. *J Clin Periodontol* 2005; 32:1213-1218.
- Eick S, Schmitt A, Sachse S, Schmidt KH, Pfister W. In vitro antibacterial activity of fluoroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:553-556.
- Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16:306-310.
- Sedgley CM, Samaranyake LP. Antimicrobial susceptibility of oral isolates of *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* from a southern Chinese population. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13:315-321.
- Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis* 2005; 9:216-224.
- Paniara, Platsouka E, Dimopoulou H, Tzelepi E, Miriagou V, Tzouveleki LS. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Chemother* 2000; 12:204-207.
- Barbosa FC, Irino K, Carbonell GV, Mayer MP. Characterization of *Serratia marcescens* isolates from subgingival biofilm, extraoral infections and environment by prodigiosin production, serotyping, and genotyping. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:53-60.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Adriana Jaramillo Echeverri.
inv-odon@univalle.edu.co

Trabajo recibido el 18/03/2008.

Aprobado para su publicación el 09/07/2008.

Fibromatosis Gingival Hereditaria en Niños. Caso Clínico

Hereditary Gingival Fibromatosis in Children. Case Report

Taj-Taj P¹, Dolmestch C²

RESUMEN

La Fibromatosis Gingival Hereditaria (FGH) es un agrandamiento de los tejidos gingivales poco frecuente, asociado a un componente genético, que se hace evidente en el momento del recambio dentario. Puede generar diastemas, maloclusiones, dolor a la masticación, caries, enfermedad periodontal, retardo en el recambio dentario, complicaciones fonéticas, de deglución y un importante compromiso estético y psicológico.

Paciente sexo femenino, 6 años de edad, con aumento de volumen gingival generalizado que compromete la estética y la función. Presenta retraso en la erupción de dientes permanentes. Con antecedentes familiares de agrandamiento gingival. Se realiza el tratamiento periodontal quirúrgico y odontopediátrico bajo anestesia general.

El diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno de la FGH, son fundamentales para evitar complicaciones posteriores, más aún considerando la alta tasa de recidiva de FGH en pacientes jóvenes.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 66-69, 2008.

Palabras clave: Fibromatosis gingival hereditaria, agrandamiento gingival en niños.

ABSTRACT

Hereditary Gingival Fibromatosis (HGF) is a rare gingival enlargement associated to a genetic condition. The onset of the disease it makes evident during the eruption of permanent dentition. It could bring complications like diastemas, malocclusions, painful mastication, dental caries, periodontal diseases, delayed eruption, phonetic difficulties, swallow complications and important esthetic and psychological problems.

A six years old female child shows a generalized gingival increase volumen that involves the esthetic and function. She shows a delayed eruption of permanent incisors. There are familiar antecedents of gingival enlargement. Surgical Periodontal and Odontopediatric treatment under general anesthetic are made.

The early diagnosis and the opportune treatment of FGH are fundamental to avoid future complications, even more considering the high relapse rate of FGH in young patients.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 66-69, 2008.

Key words: Hereditary gingival fibromatosis, gingival enlargement in children.

INTRODUCCIÓN

Se utiliza el término "agrandamiento gingival" para describir un incremento del tamaño gingival que puede ser causado por factores inflamatorios, consumo de medicamentos, enfermedades sistémicas o por condiciones genéticas⁽¹⁾.

La FGH, es una hiperplasia gingival idiopática, y se considera como un tipo de agrandamiento gingival de baja prevalencia (1:750.000)^(2,6). Según la actual clasificación de las enfermedades periodontales se enmarca dentro de las lesiones gingivales no asociados a Placa bacteriana de origen genético⁽³⁾.

Está asociada a un componente autosómico dominante o recesivo. Puede presentarse como un cuadro aislado o como parte de varios síndromes. Se han reportados casos de FGH como parte de los síndromes Zimmerman-Laband, Murray-Puretic-Drescher, Cowden, Cross, y Rutherford entre otros^(1,2). Puede presentarse asociada a hipertricosis, retraso mental y epilepsia, pero en ocasiones, la única manifestación clínica es el agrandamiento gingival^(1,4).

La FGH se hace evidente durante la erupción de las piezas permanentes especialmente los incisivos, pero en ocasiones se puede manifestar en la dentición temporal^(1,2).

El tejido gingival se presenta aumentado de volumen, de color rosado, firme y que puede llegar a cubrir la totalidad de la corona y caras oclusales de las piezas dentarias. No existe sangramiento al sondaje ni presencia de exudado, presentando la encía su punteado característico. El tejido puede ser tan firme y fibroso que a la palpación su consistencia es similar al tejido óseo. La encía libre e insertada están afectadas, pero el agrandamiento no excede más allá de la unión

mucogingival⁽²⁾.

En base a su expresión clínica se han descrito la forma nodular, que se caracteriza por múltiples agrandamientos localizados a nivel de las papilas interdentarias y la forma simétrica, la más común, que es un agrandamiento gingival más uniforme⁽¹⁾.

La FGH puede generar alteraciones que van desde dificultades fonéticas, alteraciones en la deglución, dolor a la masticación, presencia de diastemas y maloclusiones, retardo en el recambio dentario y un importante compromiso estético. La retención de placa bacteriana generada por el agrandamiento gingival, puede contribuir también a la presencia de caries y de enfermedad periodontal. No menos importantes son los efectos en el desarrollo emocional y psicológico del niño^(1,2,5,7).

Histopatológicamente se observa un aumento del tejido conectivo fibroso, con gruesas fibras de colágeno, con fibroblastos jóvenes y escasos vasos sanguíneos. El epitelio es denso, con prolongaciones papilares e hiperqueratosis. Se observan pequeñas partículas calcificadas con tejido óseo metaplásico aislado y, ocasionalmente, se pueden observar zonas de ulceración e inflamación. Las características histológicas no son específicas, por lo que el diagnóstico se basa en la historia y manifestaciones clínicas⁽⁴⁾.

El tratamiento de la FGH dependerá de la severidad del caso. Si el agrandamiento es mínimo, el debridamiento y cuidadoso control de placa bacteriana pueden ser suficientes⁽¹⁾. En casos severos, el tratamiento de elección es la extirpación quirúrgica mediante gingivectomía. La restauración del contorno gingival fisiológico permite un mejor control de placa bacteriana y con ello, una menor recurrencia y mejores resultados en el largo plazo^(1,2).

1. Cirujano Dentista, Especialista en Periodoncia. Servicio Especialidades Odontológicas, Hospital San Carlos, Servicio Salud Ñuble. Ejercicio privado de la profesión. Chile.

2. Cirujano Dentista, Especialista en Odontopediatria. Clínica Dental, Fundación Coanil, Chillán. Ejercicio privado de la profesión. Chile.

Algunos autores plantean que el mejor momento para realizar el tratamiento es una vez que la toda dentición permanente está presente, pues existe alta probabilidad de recurrencia en pacientes jóvenes⁽²⁾. Sin embargo, el tratamiento precoz a temprana edad tiene con principal fundamento la prevención de consecuencias funcionales, estéticas y psicológicas en el niño^(1,2,5). Puede ser necesario repetir el tratamiento quirúrgico debido a la alta recurrencia del cuadro, lo que generalmente ocurre dentro de los 2 primeros años posteriores a la gingivectomía^(1,2).

Si bien la FGH es una patología de baja prevalencia, el odontólogo debe estar capacitado para realizar un diagnóstico precoz y una derivación oportuna, a fin de evitar futuras complicaciones.

CASO CLÍNICO

Paciente sexo femenino de 6 años de edad. Asiste en compañía de su madre, consultando por aumento de volumen progresivo de las encías y retraso en la erupción de incisivos permanentes. El aumento de volumen gingival comenzó al erupcionar las piezas temporales, pero se ha hecho más evidente en el último tiempo, presentando actualmente molestias y dolor a la masticación.

La madre se muestra preocupada por el severo compromiso estético que sufre la niña, lo que la hace blanco de constantes burlas por parte sus pares, afectando seriamente sus relaciones interpersonales.

No presenta antecedentes médicos de importancia ni consume ningún tipo de medicamentos. Su desarrollo sicomotor es normal. Existe el antecedente familiar de agrandamiento gingival (tío paterno).

Al examen clínico la encía se presenta aumentada de volumen en forma generalizada. De color rosado pálido, con presencia de punteado, de consistencia firme y textura fibrosa, bordes redondeados con pérdida del bisel característico y ubicación coronal al LAC cubriendo casi totalmente las piezas anteriores permanentes en proceso de erupción (Figuras 1 y 2). Ausencia de sangramiento al sondaje, supuración y signos de destrucción periodontal (movilidad, pérdida de inserción, compromiso de furcación, migración y recesión gingival). Presencia de pseudo saco periodontal generalizado. Índice de placa bacteriana de un 80%.

Presenta poliobturaciones, caries de surco en primeros molares permanentes en erupción, absceso vestibular en relación a la pieza 5.5 con dolor intenso a la percusión, movilidad dentaria pieza 5.2 por pronta exfoliación. Se solicitan radiografías retroalveolares totales para confirmar la presencia y grado de desarrollo de las piezas permanentes bajo el tejido gingival.



Figura 1. Imagen frontal, donde se observa una gruesa capa de tejido gingival, que impide la erupción de los incisivos permanentes.



Figura 2. Vista oclusal maxilar, nótese la impronta de los incisivos inferiores en el tejido gingival maxilar.

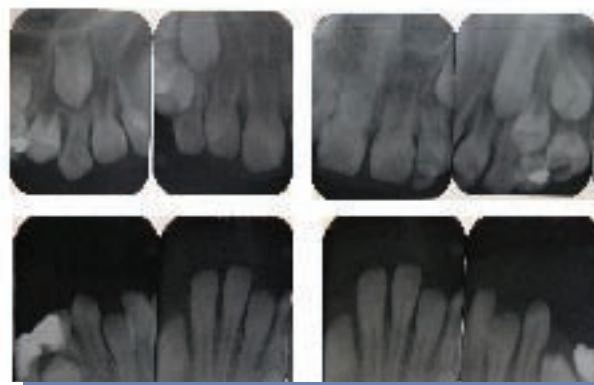


Figura 3. Radiografías retroalveolares que confirman la presencia de las piezas dentarias permanentes bajo el tejido gingival.

DIAGNÓSTICO: Fibromatosis Gingival Hereditaria Simétrica.

TRATAMIENTO

La paciente fue derivada a especialista Odontopediatra para la resolución de la urgencia dental, efectuándose la exodoncia de la pieza 5.5. Debido a la complejidad del caso y a que la paciente era altamente aprehensiva, de difícil manejo y toleraba sesiones de muy corta duración, se decide realizar el tratamiento periodontal quirúrgico y odontopediátrico bajo anestesia general.

Se efectúa tratamiento periodontal no quirúrgico mediante instrucción de higiene oral a la niña y a la madre y el debridamiento maxilar y mandibular.

Posteriormente, bajo anestesia general, se procede al tratamiento de operatoria dental planificado, seguido del tratamiento periodontal quirúrgico. Se realiza gingivectomía a bisel externo. El tejido se presenta de consistencia muy firme y fibroso, lo que dificulta y prolonga el procedimiento. Se priorizan los sectores anteriores maxilar y mandibular por consideraciones funcionales y estéticas para permitir, además, la erupción de la piezas definitivas.

Para finalizar, la zona quirúrgica es protegida mediante cemento quirúrgico periodontal.

El postoperatorio fue satisfactorio. Se mantuvo a la paciente hospitalizada por 12 hrs. y posterior a ello, es dada de alta. Se prescribe colutorio de CHX. 0,12 % y analgesia en base a Ibuprofeno 400 mg. Se realiza un control a los 7 días con buena evolución, cicatrización normal de los tejidos periodontales y sin mayores molestias.

Son realizados controles semanales periódicos durante 2 meses, tras lo cual la paciente es reevaluada y dada de alta. Se establece terapia de soporte periodontal a los 6 meses, reiterando la necesidad de realizar un buen control de placa bacteriana durante este período.



Figuras 4 y 5. Imagen a las 4 semanas posterior a la cirugía, en que se observa la presencia de los incisivos permanentes.



Figura 6. Vista frontal al control 1 año posterior a la cirugía, en la que se observa recidiva en menor grado del agrandamiento.

La paciente no asiste al control semestral programado y lo hace después de de 1 año (6 meses de inasistencia). En esa oportunidad la encía se observa aumentada de volumen, pero en menor grado que al inicio del tratamiento. Presenta un índice de Placa bacteriana (75 %). Se diagnostica recidiva parcial y leve de FGH y Gingivitis asociada a placa bacteriana, por lo que la paciente es reingresada a tratamiento periodontal.

DISCUSIÓN

La FGH es una proliferación fibrosa de los tejidos gingivales poco frecuente, asociado a un componente genético, que se hace más evidente, como en este caso, en el momento del recambio dentario.

La FGH no es un cuadro agudo, ni representa una urgencia odontológica real, pero en casos como este, en que el excesivo agrandamiento gingival afecta a una niña en etapa de crecimiento activo, tanto físico como psicológico, pueden verse afectados seriamente el desarrollo normal de los maxilares, la oclusión, las funciones de fonación, masticación, deglución y la estética, siendo este último un componente importante en el desarrollo de la autoestima y consecuente estabilidad psicológica y emocional.

Es por todo lo anterior, que la detección y derivación oportuna por parte del odontopediatra y el diagnóstico precoz y tratamiento adecuado, con un manejo correcto de las técnicas quirúrgicas por parte del periodoncista, son fundamentales para conseguir resultados estéticos y funcionales óptimos en el tratamiento de un caso de FGH.

La manifestación temprana de la FGH y todos los efectos que ella conlleva, justifica la intervención temprana del caso.

La edad de la niña, su difícil manejo para la atención, lo extensa y compleja de la intervención quirúrgica periodontal, además de la necesidad de tratamiento odontopediátrico, hacen necesario su manejo bajo anestesia general. Esta última, muestra ser una importante herramienta en la resolución de problemas periodontales que requieren un manejo especial.

Pese a que los resultados obtenidos en el tratamiento de este caso fueron óptimos inicialmente (estéticos y funcionales), la recidiva parcial del agrandamiento gingival después de un año de control, hace evidente la necesidad de una terapia de mantención periodontal con intervalos de menor tiempo a los establecidos en un principio, a fin de lograr un mayor compromiso del paciente y mantener un adecuado control y seguimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Deangelo S, Murphy J, Claman L, Kalmar J. Hereditary Gingival Fibromatosis- A Review. *Compendium* 2007. 28:138-144.
2. Coletta R, Graner E. Hereditary Gingival Fibromatosis: A Systematic Review. *J. Periodontol* 2006. 77:753-764.
3. International Workshop for Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999.4:30.
4. Doufexi A, Mina M, Ioannidou E. Gingival Overgrowth in Children: Epidemiology, Pathogenesis, and Complications. A Literature Review *J Periodontol* 2005.76:3-10.
5. Baptista IP. Hereditary Gingival Fibromatosis a Case Report. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 871-874.
6. Ramer M, Marrone J, Stahl B, Burakoff R. Hereditary Gingival Fibromatosis: Identification, Treatment, Control. *JADA* 1996.27:493-495.
7. Bozzo L, Machado MA, de Almeida OP, Lopes MA, Colletta RD. Hereditary Gingival Fibromatosis: Report of three cases. *J Clin Pediatr Dent* 2000; 25:41-46.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Pablo Taj-Taj Caballero
Centro Especialidades Odontológicas CEO.
Av. Libertad 845 of. 506, Chillán. Chile.
ptajtaj@hotmail.com

Trabajo recibido el 22/05/2008.

Aprobado para su publicación el 09/07/2008.

The TH17 vs. TREG Imbalance in the Pathogenesis of Periodontitis: New Approach for Dichotomy TH1 vs. TH2

Dezerega A¹, Maggiolo S¹, Garrido M¹, Dutzan N²

ABSTRACT

For decades several authors have directed their efforts to elucidate the nature of the immune response in periodontitis. The subject has been matter of controversy, and answers remain unclear. The present review intends to summarize the character of the inflammatory response in periodontitis, with emphasis on the T helper imbalance produced during the development of the disease.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 70-72, 2008.

Key words: Periodontitis, immune response, Th1, Th2, Th17, Treg.

Nature of the inflammatory response in periodontitis

Periodontitis encompass multifactorial diseases involving bacterial biofilms and the generation of an inflammatory response⁽¹⁾. Periodontitis, chronic and aggressive subtypes, is usually related to polybacterial infection and three specific pathogens have been repeatedly identified as etiologic agents in the periodontal destruction: *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) y *Tannerella forsythia* (Tf)⁽²⁾. Bacterial biofilms have been shown to be the primary aetiological factor in the initiation of gingival inflammation and subsequent destruction of periodontal tissues⁽³⁾. Although chronic bacterial and endotoxin exposure is a prerequisite for gingival inflammation and periodontal tissue destruction to occur, its presence alone accounts for a relatively small proportion (i.e. 20%) of the variance in disease expression⁽⁴⁾. According to a novel model of pathogenesis of periodontitis, this is not sufficient to explain disease initiation and progression^(5,6,7). The major component of soft- and hard-tissue destruction associated with periodontitis is the result of activation of the host's immune-inflammatory response to the bacterial challenge, it is the nature of the inflammatory responses which determines the destructive character of the disease⁽⁸⁾.

Based upon histopathological features, inflammatory processes developed in the periodontitis may be divided into three phases: an acute phase, an immune response and a chronic phase⁽⁶⁾. The transition process from gingival health to early inflammatory changes is characterized by a local increase in vascular permeability, redness, swelling and by the recruitment and activation of polymorphonuclear granulocytes (PMNs)⁽⁹⁾. In the course of this acute phase, several products modulate vasodilatation (e.g. bradykinin and prostaglandins), vascular permeability (e.g. histamine and leukotriene) and additional recruitment of inflammatory cells through chemotaxis (e.g. complements products and chemokines)⁽⁵⁾. The subsequent immune response starts when antigen-presenting cells become involved presenting the foreign microorganisms or antigens to immunocompetent cells such as T lymphocytes. This leads to the expansion of antibody-secreting plasma cells and the development of a chronic lesion⁽¹⁰⁾.

Response TH1 vs. TH2 in periodontitis

Based on their pioneer work, Mosmann and Coffman proposed that T helper cells could be divided into two distinct subsets, T helper type 1 (TH1) and TH2, characterized by distinct cytokine profiles and effectors functions⁽¹¹⁾. TH1 cells secrete interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which are critical for the eradication of intracellular pathogens, while Th2 cells produce interleukin-4, -5, -6, and -13, which are essential for optimal antibody production and

elimination of extracellular microorganisms, including helminths and nematodes⁽¹²⁾.

Immunohistological studies have clearly established that a T-cell/macrophage lesion identical to a delayed hypersensitivity reaction⁽¹³⁾ occurs within 4 to 8 days of plaque accumulation in an experimental gingivitis study⁽¹⁴⁾. This synonymous with the early lesion described by Page and Schroeder⁽¹⁵⁾ and with the putative stable lesion⁽¹⁶⁾. The striking similarities between this early/stable periodontal lesions and delayed-type hypersensitivity prompted the suggestion that cells with a TH1 cytokine profile are the major mediators. Such a concept is consistent with the proposal that a strong innate immune response leads to the production of IL-12, which in turn leads to this TH1 response⁽⁸⁾. The dominance of B-cells/plasma cells in the advanced/progressive lesion would suggest a role for TH2 cells. Clearly, if the innate response is poor, low levels of IL-12 would be produced and a poor TH1 response may occur which may not then contain the infection⁽¹⁷⁾.

To test this hypothesis, several investigators have attempted to delineate the TH1/TH2 profile in periodontal disease. Pilon et al.⁽¹⁸⁾ demonstrated lower levels of IL-2 in the gingival crevicular fluid of periodontitis sites compared with healthy sites, and Fujihashi et al.⁽¹⁹⁾ have shown that gingival mononuclear cells from adult periodontitis patients produce IL-4 and IL-5 but not IL-2. Peripheral blood mononuclear cells from periodontitis patients stimulated with mitogens resulted in reduced IFN- γ secretion and mRNA expression of IFN- γ and IL-2. At the same time, significantly higher levels of IL-5 and granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) were observed⁽²⁰⁾. Significantly less IL-2 activity was also found in peripheral blood mononuclear cell cultures stimulated with *P. gingivalis* and *F. nucleatum*⁽²¹⁾. Increased Th2 response in periodontitis has also been reported. Memory T-cells from the peripheral blood of adult periodontitis patients with high anti-*P. gingivalis* titers stimulated *in vitro* with *P. gingivalis* have been shown to produce higher amounts of IL-4 than cells from healthy subjects⁽²²⁾. Yamazaki et al.⁽²³⁾ demonstrated an increase percentage of IL-4+ cells proportional to an increasing B-cell/T-cell ratio. Another study suggested a role for IL-4 and TH2 responses in periodontitis lesions by the demonstration of concentrations of IgG4 many times higher in sites of active periodontitis than in serum, as well as significantly elevated concentrations compared with stable lesions⁽²⁴⁾. Seymour et al.⁽²⁵⁾ proposed that due to the shift in lymphocyte populations in the inflammatory infiltrate from predominantly T-cells in gingivitis to an increased proportion of B-cells in periodontitis, susceptibility to periodontal disease progression may involve a predominantly TH2-like response. In contrast to these studies, Ebersole and Taubman⁽²⁶⁾ found that IFN- γ message was prominently expressed by disease gingival tissue cells. Cytokine profiles of cells extracted from six patients were consistent with TH1 cells in that they were IL-2 and IFN- γ -positive but negative for IL-4 and IL-5.

Another study comparing the local and systemic responses in periodontitis patients with so-called terminal dentition periodontitis dem-

1. Instructor Área de Endodoncia, Depto. de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

2. Ayudante Área de Periodoncia, Depto. de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

onstrated reduced TH2 responses. Levels of prostaglandin E2 (PGE2), IL-1 β and IL-2 in the gingival crevicular fluid samples were highest, followed by lower levels of TNF- α and IFN- γ and even lower of IL-4 and IL-6⁽²⁷⁾.

TH17 cells and IL-17

In light of recent data, the TH1/TH2 dichotomy is now being revisited. The discovery of the IL-17 family of cytokines and the analysis of IL-23-mediated effector functions on T cells have suggested the existence of an additional subset of CD4+ T cells that produce IL-17^(28,29). During the past few years, it has become apparent that IL-12, STAT4 and IFN- γ , and therefore Th¹ cells, are not the primary instigators of model inflammatory diseases⁽³⁰⁾. Rather, the pathogenic cells in these models of disease are induced in response to signals provided *in vivo* by the IL-12-like cytokine IL-23, and characterized by production of a suite of cytokines, chemokines, effector molecules and transcription factors distinct from that of TH1 cells^(29,30,31). One of the genes most highly expressed in these effector cells is the proinflammatory cytokine IL-1⁽²⁹⁾. Consequently, they have been termed TH17 cells. These TH17 cells have been recognized as key mediators of inflammation and tissue damage in several animal models of human diseases^(29,30,31). Analogous to the central roles played by T-bet and GATA3 in generating TH1 and TH2 cells, respectively⁽³²⁾, ROR γ t is considered to be the transcription factor responsible for guiding the development of TH17 cells⁽³³⁾. Transforming growth factor β (TGF- β) and IL-6 are cytokines that also guiding the development of TH17 cells⁽³⁴⁾. The role of TH17 cells is very important for responses against specific pathogens that are poor eliminated by TH1 and TH2 responses (Korn et al. 2007).

Recent studies showed that IL-21 also controls the generation of TH17 cells^(35,36,37). They showed that IL-21, in combination with TGF- β , induces IL-17 production from naive CD4+ T cells. These papers also demonstrated that IL-6 or IL-21 could induce TH17 cells themselves to produce IL-21. Such endogenous production of IL-21 by TH17 cells appeared to be biologically significant, because the number of IL-17-producing cells generated by TGF- β and IL-6 was reduced in the absence of IL-21/IL-21R signalling^(35,36). Thus, IL-6 can elicit IL-21 production by CD4+ cells, which then functions in an autocrine loop to amplify the TH17 response in a similar way to IL-4 for Th2 and IFN- γ for TH1. It is possible that TH17 cells induced by TGF- β and either IL-6 or IL-21 make qualitatively different contributions to the development of inflammation depending on the pathogen and affected tissue⁽³⁸⁾.

IL-17, or IL-17A, is the founding member of a six-member family of cytokines (IL-17 A-F)^(39,40). IL-17A and IL-17F are proinflammatory cytokines, and have important action over different cells, inducing expression of cytokines (e.g. IL-6, GM-CSF, G-CSF, IL-1 β , TNF), chemokines (e.g. IL-8, MCP-1) and MMPs (41). IL-17 plays a particularly significant role in regulating neutrophil recruitment and granulopoiesis^(39,42).

TH17 and Treg cells

Recently, CD4+ CD25+ regulatory T cells (Treg) have been described as one distinct subset from T cells⁽⁴³⁾. Pathogenic autoimmunity is controlled in healthy individuals by a specialized subset of T cells named Treg cells⁽⁴⁴⁾. Treg cell differentiation and function are driven by the transcription factor Foxp3 and they have an anti-inflammatory role in maintaining tolerance to self components by contact-dependent suppression or releasing anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β ⁽⁴³⁾. Treg cell development is closely related to the generation of TH17 cells. TGF- β induces the differentiation of Treg cells⁽⁴⁵⁾, whereas TGF- β in combination with IL-6⁽⁴⁶⁾ or IL-21⁽³⁵⁾ results in the differentiation of TH17 cells.

The participation of TGF- β , secreted by Treg cells, in the differentiation of TH17 cells has been recently evaluated⁽³⁵⁾. Subsequently, it was shown that IL-17 production by naive CD4+ T cells could be driven by TGF- β and IL-6⁽⁴⁷⁾. It is clear that TGF- β is readily available

in mucosa associated lymphoid tissue, while in secondary lymphoid organs, TGF- β may be provided by T cells themselves as suggested by recent findings⁽⁴⁸⁾. The role of TGF- β in the development of these cells is particularly interesting, as TGF- β is also important for driving the generation of Treg cell. Thus, TGF- β will promote the differentiation of inhibitory Treg; however, in the presence of additional inflammatory signals such as IL-6, TH17 cells will be generated. Thus, IL-6 represent a crucial switch for controlling the differentiation of CD4+ T cells to the TH17 or Treg lineages⁽³⁴⁾.

The relationship between TH17 and Treg cells, suggest that there is not only a functional antagonism but there is a dichotomy in their generation as well⁽³⁴⁾. Therefore, Treg cells and TH17 effector arise in a mutually exclusive fashion, depending on whether they are activated in the presence of TGF- β or TGF- β plus IL-6. At the steady-state level or in the absence of any inflammatory insult, TGF- β produced by the immune system will suppress the generation of effector T cells and will induce Foxp3+ regulatory T cells thereby maintaining self-tolerance. However, on infection or inflammation, IL-6 induced by the activated innate immune system will suppress the generation of TGF- β -induced Treg cells and will induce a pro-inflammatory T-cell response predominated by TH17 cells. This is consistent with the *in vivo* observation that destructive arthritis in IFN- γ -deficient mice can be treated with anti-IL-17, and neutralization of IL-17 results in the generation of CD24+CD25+ regulatory T cells⁽⁴⁹⁾. So the balance between TH17 and Treg may be important in the development/prevention of inflammatory and autoimmune diseases⁽⁵⁰⁾.

TH17, Treg cells and IL-17 in periodontitis

The infiltrate present in periodontal diseases contains mononuclear cells, mainly transmigrated mononuclear phagocytes and lymphocytes⁽⁵¹⁾. Previous studies demonstrated the presence and the role of IL-17 in the pathogenesis of periodontitis^(52,53,54). Vernal et al.⁽⁵⁵⁾ studied the levels of IL-17 in patients with chronic periodontitis and found that they were significantly increased in both gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue, compared with the control group. Johnson et al.⁽⁵²⁾ demonstrated a positive correlation between levels of IL-17 within solubilised gingival biopsies and the progression of gingivitis to periodontitis. IL-17 treatment of human gingival fibroblast has also been observed to lead to IL-6 production, which may contribute to local inflammation⁽⁵⁵⁾. Takahashi et al.⁽⁵³⁾ suggest that tissue destruction in periodontitis lesion results from major secretion of IL-6, induced by IL-17. The above findings have led to the suggestion that IL-17 may play a pivotal role in the initiation or maintenance of an inflammatory response.

Natural Treg are key regulators of immune responses, express CD4 and CD25 surface markers, and regulate the activation, proliferation, and effector function of activated conventional T cells. Previous studies found that many of the CD4+ T-cell clones derived from either gingival tissue or peripheral blood express the Foxp3 gene^(56,57). Okui et al.⁽⁵⁸⁾ showed that Foxp3+ cells were also identified in periodontitis lesions. The cells were restricted to the CD4+ populations.

Final Considerations

Several investigators have tried to establish the predominant T helper profile during periodontitis. Although there has not been consensus about it, in the majority of the literature it was accepted that a Th1 profile could be mediator of the early/stable lesion, and a Th2 profile could be responsible of the progression of the disease. With the discovery of the Th17 response, new insights have been made in the pathogenesis of the periodontitis, suggesting that Th17 population may play a major role in the initiation and maintenance of the inflammatory response typical of this disease.

REFERENCES

- Salvi G., Lang N. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl. 6):108-129.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1994;5:78-111.
- Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65:260-267.
- Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;1:821-878.
- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: and introduction. *Periodontol* 2000 1997;14:9-11.
- Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal diseases. *Microbes Infect* 2000;2:1181-1192.
- Gemmel E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:17-34.
- Delina AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000;31:55-76.
- Gemmel E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2004;35:21-41.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.
- Poulter LW, Seymour GJ, Duke O, Janossy G, Panayi G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell Immunol* 1982;74:358-369.
- Seymour GJ, Gemmel E, Walsh LJ, Powell RN. Immunohistological analysis of experimental gingivitis in humans. *Clin Exp Immunol* 1988;71:132-137.
- Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976;34:235-249.
- Seymour GJ, Greenspan JS. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodontol* 1979;14:29-46.
- Gemmel E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Dent Res* 1998;77:16-26.
- Pilon M, Williams-Miller C, Cox DS. Interleukin-2 levels in gingival crevicular fluid in periodontitis. *J Dent Res* 1991;70:550.
- Fujihashi K, Kono Y, Yamamoto M et al. Interleukin production by gingival mononuclear cells isolated from adult periodontitis patients. *J Dent Res* 1991;70:550.
- Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol* 1998;69:1098-1104).
- Gemmel E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol* 1994;28:38.
- Aoyagi T, Sugawara-Aoyagi M, Yamazaki K, Hara K. Interleukin 4 (IL-4) and IL-6-producing memory T-cells in peripheral blood and gingival tissues in periodontitis patients with high serum antibody titers to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:304-310.
- Yamazaki K, Nakajima T, Aoyagi T, Hara K. Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *J Periodont Res* 1994;28:324-334.
- Reinhardt RA, Bolton RW, McDonald TL, DuBois LM, Kaldahl WB. IgG subclasses in gingival crevicular fluid from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol* 1989;60:44-50.
- Seymour GJ, Gemmel, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodont Res* 1993;28:478-486.
- Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:112-141.
- Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1B and TNF-a responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol* 1998;3:40-50.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421:744-748.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-240.
- Kastlein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:221-242.
- Weaver CT, Hattori RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-852.
- Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000;14:1693-1711.
- Ivanov I, McKenzie BS, Zhou L et al. The orphan nuclear receptor ROR γ T directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-1133.
- Betteli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal development pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.
- Korn T, Betteli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484-487.
- Nurieva, Yang XO, Martinez G et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007;448:480-483.
- Zhou L, Ivanov I, Spolski R et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;10:1038-1488).
- Deenick EK, Tangye SG. IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 2007;85:503-505.
- Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 2002;71:1-8.
- Kawaguchi M, Adachi M, Oda N et al. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1265-1273.
- Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467-476.
- Moseley TA, Haudenschild Dr, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:155-174.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8-27.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-562.
- Chen W et al. Conversion of peripheral CD4+CD25+ naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-1886.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179-186.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn et al. Transforming growth factor- β induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-234.
- Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007;26:579-591.
- Nardelli DT et al. Association of CD4+ CD25+ T cells with prevention of severe destructive arthritis in *Borrelia burgdorferi*-vaccinated and challenged gamma interferon-deficient mice treated with anti-interleukin-17 antibody. *Clin Diag Lab Immunol* 2004;11:1075-1084.
- Homey B. After TH1/TH2 now comes Treg/TH17: significance of T helper cells in immune response organization. *Hautarzt* 2006;57:730-732.
- Zappa V, Reinking-Zappa M, Garf H, Espeland M. Cell populations and episodic periodontal attachment loss in humans. *J Clin Periodontol* 1991;18:508-515.
- Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2004;75:37-43.
- Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2005;32:369-374.
- Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from persons with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:383-389.
- Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gurgan C, Sorsa T, Kontinen YT. MMPs, IL-1 and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res* 2007;86:347-351.
- Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T et al. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res* 2005;84:639-643.
- Ito H, Honda T, Domon H et al. Gene expression analysis of the CD4+ T-cell clones derived from gingival tissues of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:382-386.
- Okui T, Ito H, Honda T, Amanuma R, Yoshie H, Yamazaki K. Characterization of CD4+ Foxp3+ T-cell clones established from chronic inflammatory lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:49-54.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Andrea Dezerega Piwonka

Laboratorio de Biología Periodontal, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile. Olivos 943, Independencia. Santiago – Chile.

Fono: 56 2 978 18 33

Fax: 56 2 978 18 39

adezerega@odontologia.uchile.cl

Trabajo recibido el 30/06/2008.

Aprobado para su publicación el 09/07/2008.