

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS DE LAS CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD PERIODONTAL ESTIMULADAS CON *AGGREGATIBACTER
ACTYNOVICETECOMITANS* Y SU REGULACIÓN POR EL
METRONIDAZOL Y LA TETRACICLINA.**

Por

Dr. Mario Antonio Chalhoub Moreno

Como requisito parcial para obtener el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas

en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

Junio 2020

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS DE LAS CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD PERIODONTAL ESTIMULADAS CON *AGGREGATIBACTER*
ACTYNOVICETECOMITANS Y SU REGULACIÓN POR EL METRONIDAZOL Y
LA TETRACICLINA.

Comité de tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS DE LAS CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD PERIODONTAL ESTIMULADAS CON *AGGREGATIBACTER*
ACTYNOMICETECOMITANS Y SU REGULACIÓN POR EL METRONIDAZOL Y
LA TETRACICLINA.

Mario A. Chalhoub M.

TESISTA

Comité de Tesis

Dra. C. Alma Yolanda Arce Mendoza, Q.C.B.,MSC., P.H.D.

Director de Tesis

Dra. Gloria Martínez Sandoval

Co-director de Tesis

Dra. María Gabriela Chapa Arizpe

Asesor Metodológico

Agradecimiento

Un profundo agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Alma Yolanda por su incondicional apoyo y por guiarme durante la elaboracion de esta investigacion, a todos mis profesores de maestria que de alguna manera se involucraron y me apoyaron para la realizacion de esta tesis y por ultimo y no menos importante a mis padres quienes siempre an estado apoyandome .

Gracias al Posgrado de Periodoncia e Implantología Oral de la UANL, por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de él.

TABLA DE CONTENIDO

SECCIÓN

AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVO GENERAL.....	17
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
6. MATERIALES	18
6.1. MATERIAL BIOLÓGICO	18
6.2. EQUIPO.....	18
6.3. REACTIVOS QUÍMICOS.....	19
7. METODOLOGÍA	21

7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	21
7.2 OBTENCIÓN DE LA MASA BACTERIANA DE <i>AGGREGATIBACTER</i> <i>ACTINOMYCETEMCOMITANS</i>	21
7.3 DILUCIÓN DE ANTIBIÓTICOS	22
7.4 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS.....	23
7.5 PROCEDIMIENTO PARA MEDIR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF α)	24
7.6 CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	26
8.RESULTADOS.....	29
9.DISCUSIÓN	35
10.CONCLUSIÓN	46
11.BIBLIOGRAFÍA.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1. Producción de citocinas proinflamatorias estimuladas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre células de sujetos sanos y de pacientes con enfermedad periodontal.

Grafico 2. Producción de citocinas proinflamatorias estimuladas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre células de sujetos sanos y de pacientes con enfermedad periodontal ambas tratadas con Metronidazol.

Grafico 3. Producción de citocinas proinflamatorias estimuladas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre células de sujetos sanos y de pacientes con enfermedad periodontal ambas tratadas con Tetracicl

1. INTRODUCCIÓN

Como resultado de la exhaustiva investigación, se ha visto que la enfermedad periodontal es iniciada por la biopelícula, pero la severidad y la progresión de la enfermedad están determinadas por la respuesta del huésped a la biopelícula bacteriana. Aunque las bacterias de la biopelícula son capaces de causar daño directo a los tejidos periodontales, ahora se reconoce que la respuesta inmuno-inflamatoria del huésped a las bacterias de la biopelícula producen citoquinas y enzimas destructivas que inducen destrucción del tejido periodontal. La respuesta del huésped es esencialmente protectora de intención, pero puede también ocasionar daño tisular. Las bacterias y sus productos metabólicos inducen al epitelio de unión a proliferar; esta infección también aumenta la permeabilidad del epitelio de unión y permite a los microbios y a sus productos ganar acceso al tejido conectivo subepitelial. Las células del tejido epitelial y conectivo son estimuladas a producir mediadores inflamatorios que provocan una respuesta inflamatoria dentro de los tejidos. En personas que no son susceptibles a la periodontitis, el mecanismo primario de defensa controla la infección, y la inflamación crónica (gingivitis crónica) puede persistir. Sin embargo, en individuos susceptibles a la periodontitis, el proceso inflamatorio anterior eventualmente se extenderá para involucrar tejidos conectivos más profundos y hueso alveolar. Dentro de las células del tejido epitelial y conectivo están los monocitos y macrófagos que son activadas por las

endotoxinas bacterianas induciendo la producción de niveles altos de prostaglandinas PGE2, interleuquinas (IL-1, IL-1 B, IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) por parte de las células de huésped. Estas citoquinas han sido asociadas con la enfermedad periodontal activa.

A la fecha estos marcadores bioquímicos en el fluido crevicular gingival aún están siendo investigados. Será de utilidad para los clínicos y los investigadores, que uno o más de estos marcadores puedan ser desarrollados como una herramienta en el consultorio para medir la periodontitis activa. El desarrollo de estos marcadores también ayudará a facilitar la detección de las enfermedades periodontales por profesionales médicos o aún más por los mismos pacientes, para lograr prontas remisiones al consultorio odontológico para una evaluación clínica. En el pasado los tratamientos que se enfocaban a la reducción de la carga microbiana, eran básicamente la única consideración para la terapia periodontal; actualmente, gracias a un mejor entendimiento de la respuesta del huésped, las terapias moduladoras de la respuesta del huésped han sido usadas como complementos tanto a los tratamientos quirúrgicos como no quirúrgicos. Parece que los abordajes terapéuticos más efectivos incluirán terapias sinérgicas, múltiples, de modulación de la respuesta del huésped, combinadas con tratamientos que atacan la etiología microbiana.

Los antibióticos sistémicos pueden ser usados como adjuntos a la terapia mecánica convencional ya que no se ha desarrollado una evidencia sólida para su uso como monoterapia. El metronidazol y la tetraciclina pueden ser usadas para tratar la periodontitis agresiva asociadas con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

El objetivo de este estudio es determinar la capacidad de *A. Actinomycetencomitans* de estimular a las células mononucleares de sangre periférica de producir citocinas que están altamente relacionados con la destrucción de los tejidos de soporte de la estructura dentaria en pacientes con enfermedad periodontal y en pacientes sanos, asimismo, evaluar si la tetraciclina y el metronidazol a pesar de su efecto antimicrobiano tienen algún efecto modulador de las citocinas.

2. ANTECEDENTES

La enfermedad periodontal es una de las enfermedades más comunes en el hombre y es responsable de la mayor pérdida de dientes en adultos. Esta enfermedad oral ha recibido considerable atención en décadas pasadas y ahora está surgiendo un nuevo entendimiento de la misma. Las causas microbianas de la Enfermedad Periodontal, los mecanismos a través de los cuales los tejidos periodontales son destruidos, el efecto del huésped en la expresión de la enfermedad periodontal, y el impacto que la enfermedad periodontal tiene en la salud general han sido sujetos de intenso estudio. Entender la interacción compleja entre las infecciones crónicas como la enfermedad periodontal, y condiciones sistémicas tales como la enfermedad cardiovascular, ha llevado a una nueva forma de pensamiento sobre la importancia de la enfermedad periodontal en la salud general.

El papel de la bacteria como una causa de enfermedad periodontal fue demostrada por un serie de estudios determinantes realizados desde los 60s hasta los 80s. Los estudios clásicos de Løe y cols claramente demostraron que la formación de la placa bacteriana en los dientes estaba asociada con la aparición de gingivitis, y que la remoción de la placa microbiana resultaba en la resolución de la gingivitis.^{1,2}

Estos estudios proporcionaron evidencia irrefutable de que la formación de la placa bacteriana, más que otros agentes sospechosos como el cálculo dental, eran responsables de la gingivitis. En los 70s y los 80s, Socransky y cols realizaron estudios mostrando que algunos microorganismos específicos estaban asociados con enfermedad periodontal.³

Estos estudios identificaron varias categorías, desde colonizadores tempranos, que son comensales y no virulentos, hacia organismos moderadamente virulentos, que conectan los colonizadores tempranos y los interconectan a los patógenos específicos tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*. El trabajo de muchos investigadores encontró que los patógenos específicos, en combinación con los colonizadores tempranos y los organismos moderadamente virulentos, forman una microflora compleja que existe como una biopelícula dentro de la bolsa periodontal.

Otro investigadores comenzaron a explicar la patogénesis de la enfermedad periodontal describiendo cómo el huésped de hecho era el responsable de la destrucción tisular. Empezamos entonces a entender que la respuesta inicial a la bacteria en el diente y subgingivalmente incluye todo una serie de acciones inmunopatológicas.

Los anticuerpos que se forman como respuesta a estas bacterias, sumados a los neutrófilos, proporcionan protección importante^{4,5} Se ha visto que si los neutrófilos están bloqueados, ocurre una enfermedad periodontal más severa. Poco después se estableció el papel del macrófago, esta célula invade el tejido gingival y una vez es estimulada por los productos bacterianos tales como endotoxinas, produce citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas de la matriz que destruyen los tejidos conectivos del periodonto. Son los mediadores inflamatorios tales como la prostaglandina E2, y la interleuquina1, los que inducen la reabsorción ósea alveolar. Entendiendo más el papel del huésped, es claro que la inflamación puede explicar mucho de la destrucción de los tejidos causada por la enfermedad periodontal.^{6,7}

Los exámenes clínicos básicos para diagnosticar periodontitis son el sangrado gingival al sondaje, la pérdida de inserción clínica, y las bolsas profundas acompañadas por pérdida ósea radiográfica. Estos tipos de mediciones clínicas pueden ser un tanto subjetivas. A

medida que nuestro conocimiento sobre la patogénesis aumenta, nuevos marcadores de diagnóstico de la enfermedad pueden emerger para ayudar a un mejor diagnóstico. Las citoquinas inflamatorias, las enzimas y los productos de la destrucción periodontal liberados en el fluido crevicular gingival pueden reflejar la respuesta del huésped al desafío bacteriano. Estos marcadores bioquímicos prometen ser buenos candidatos como nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Un número de citoquinas han sido asociadas con la enfermedad activa, incluyendo la prostaglandina E2 (PGE2), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1 beta (IL1 - β) y otros⁸⁻⁹.

Enzimas como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y productos de destrucción como el telopeptido de colágeno han sido también estudiados. A la fecha estos marcadores bioquímicos en el fluido crevicular gingival aún están siendo investigados. Será de utilidad para los clínicos y los investigadores que uno o más de estos marcadores puedan ser desarrollados como una herramienta en el consultorio para medir la periodontitis activa. El desarrollo de estos marcadores también ayudará a facilitar la detección de las enfermedades periodontales por profesionales médicos o aún más por los mismos pacientes, para lograr prontas remisiones al consultorio odontológico para una evaluación clínica.

La complejidad del desarrollo de la lesión periodontal avanzada se hace evidente cuando se aprecia que los cuatro tipos de reacciones inmunes están implicadas¹⁰.

En la inmunopatología de la enfermedad periodontal participan los linfocitos T y B, los macrófagos y células de Langerhans, estos últimos procesan y presentan los antígenos. Otra de las funciones de los macrófagos es la producción de IL-1 la cual estimula la

ploriferación de células T. La IL-1, tiene muchos efectos sobre el tejido conectivo, ocasiona la producción de colagenasa por parte de los fibroblastos y reabsorción ósea.^{12,13,14} Un gran número de microorganismos inducen a los macrófagos para que produzcan IL-1^{14,15}. Además, los macrófagos liberan prostaglandinas las cuales afectan la respuesta inmune, y juegan un papel importante en la fagocitosis y muerte de bacterias liberando enzimas lisosomales y causando daño local^{16,17}.

La respuesta inmune celular puede ser suprimida por células supresoras, por los macrófagos, por componentes del sistema de complemento etc.^{18,19} La propia placa dentobacteriana contiene agentes inmunoreguladores de los cuales los mejor conocidos son los lipopolisacáridos, el ácido lipoteicoico, dextranos y levanos^{18,20}. Algunas bacterias de la placa son capaces de producir proteinasas específicas que catabolizan ciertas clases de inmunoglobulinas^{17,21}.

Los pacientes que son tratados con drogas inmunosupresoras tienen niveles disminuidos de enfermedad gingival y periodontal²². Esto puede deberse al efecto anti-inflamatorio de los corticoesteroides utilizados, no obstante; la supresión de la inmunidad celular por los corticoesteroides pudieran ser responsables de la disminución de la enfermedad periodontal en estos pacientes.

Muchas interacciones fundamentales entre las células del sistema inmune son controladas por mediadores solubles llamados citocinas.¹⁹ Durante los últimos 3 decenios se ha aprendido mucho sobre la naturaleza molecular y los efectos biológicos de estas importantes moléculas reguladoras. Las citocinas son un grupo diverso de proteínas extracelulares de bajo peso molecular biológicamente activas que inician diversas señales de activación intracelular, que regulan no solo las respuestas inmunitarias e inflamatorias locales y sistémicas, sino también la reparación de heridas,

hematopoyesis y muchos procesos biológicos²³. Las citocinas pueden dividirse en parácrinas cuando actúan sobre otras células adyacentes, autócrina cuando actúa en la propia célula que las produce, y endócrina cuando actúa a distancia²³. Otro aspecto importante es que una citocina puede inducir la secreción de otras citocinas o mediadores, lo que ocasiona una cascada de efectos biológicos²⁴.

Entre las citocinas más importantes en la enfermedad periodontal se encuentran IL-1, TNF α e IL-2 las cuales se ha reportado que se encuentran elevadas en sitios con enfermedad periodontal^{13,14}. Las células mononucleares producen citocinas después de ser estimuladas por antígenos. Muchas citocinas se encuentran en altas concentraciones después de estimular las células mononucleares de sangre periférica con inductores de citocinas, además; se les encuentra en fluido crevicular y en tejido gingival de pacientes con periodontitis^{15,25}.

Bacterias periodontipáticas especialmente *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, así como sus lipopolisacáridos, pueden estimular a los monocitos para que produzcan citocinas tales como IL-1 α y β así como TNF α las cuales poseen la habilidad de modular la respuesta inmune e inducen destrucción ósea y de tejido conectivo²⁶.

IL-1 es una potente citocina multifuncional que parece ser el regulador central de la inflamación y la respuesta inmune. Casi cualquier tipo de célula la produce o responde a ella. Existen dos formas de IL-1 y ambas poseen las propiedades originales atribuidas a IL-1 a pesar de que tienen diferente estructura¹⁹. Los efectos biológicos de IL-1 incluyen la activación de linfocitos, activación de macrófagos, estimulación de células natural killer, formación de prostaglandina, inducción de fiebre, anorexia, liberación de

corticoesteroides, expresión del gen de la citosina, activador del plasminógeno y activador del inhibidor de la expresión del gen de la citosina²⁴. También tiene efectos importantes sobre células del tejido conectivo. La potencia que presenta IL-1 como estimuladora de la reabsorción de hueso la hace un mediador muy importante en la destrucción del periodonto¹³. En 1982 Charon y col. fueron los primeros en demostrar que el fluido crevicular proveniente de sitios inflamados con gingivitis presentaba niveles elevados de IL-1. Por su parte, Massada y col. mostraron que el fluido crevicular tenía niveles elevados de IL-1 detectable en 90% de las muestras¹⁵.

La evidencia que implica a la IL-1 con la enfermedad periodontal ha motivado a los investigadores para examinar si las células mononucleares periféricas provenientes de pacientes con enfermedad periodontal producen más IL-1 que células provenientes de pacientes control sin enfermedad periodontal²¹. Los resultados disponibles son conflictivos probablemente por los métodos estadísticos. Basados en la evidencia de la fuente celular de IL-1 en la encía enferma, la habilidad de los monocitos periféricos para producir IL-1 puede ser un factor importante²¹.

La IL-1 puede actuar como un agente tumoricida, como adyuvante, como factor de crecimiento hematopoyético. Estas actividades sugieren que la IL-1 posee unos efectos terapéuticos bajo ciertas circunstancias²⁷. Sin embargo, el potencial proinflamatorio y sus funciones catabólicas han recibido mucho más atención como blancos para el desarrollo de agentes terapéuticos en contra de esta citocina. Otra citocina importante en la enfermedad periodontal es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), el cual también es secretado por monocitos y células T y B, una de sus características más importantes es que tiene la capacidad de producir reabsorción ósea pero es menos potente que IL-1,

otras actividades incluyen aumento de permeabilidad vascular, modificador de la función de los neutrófilos, angiogénesis en el tejido de granulación, y activación de diversos tipos celulares¹¹. Al igual que a IL-1 también se ha detectado TNF α en líquido crevicular, en un 21% de los casos, y pudiera ser marcador de actividad inflamatoria temprana. La IL-6 participa en la diferenciación de las células B activadas en células plasmáticas, tiene un papel importante en la producción incrementada de IgG e IgA en el tejido periodontal enfermo¹¹, esta citocina es producida por monocitos, células T y B fibroblastos, además induce la producción de IL-2 por parte de células T e induce la diferenciación de las células T citotóxicas²¹. Estudios sobre IL-6 y la enfermedad periodontal han demostrado que las biopsias gingivales de sitios con enfermedad periodontal contienen más IL-6 que aquellos obtenidos de sitios sanos. En el líquido crevicular de estos sitios también se ha encontrado en cantidades elevadas esta citocina. Otra citocina implicada en la enfermedad periodontal es el interfeon gama (IFN- γ), este proviene principalmente de linfocitos T y células NK, la cuales lo secretan después de estimulación antigénica. Otras células que lo producen son los monocitos, el INF γ induce a las células a expresar la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y tiene efecto regulador sobre la liberación de macrófagos y fibroblastos, además suprime la liberación de IL-1, pero favorece la secreción de ésta inducida por lipopolisacáridos y TNF α .

Durante los años 70s y 80s hemos obtenido una gran cantidad de nueva información acerca de las vías de destrucción de los tejidos de soporte del diente. Estos conocimientos han servido de base para tratar la enfermedad periodontal y hoy sabemos que los medicamentos pueden modificar la respuesta del hospedero²⁸. Los macrófagos

que se encuentran en los tejidos activados por las bacterias de la bolsa periodontal y sus productos producen una gran cantidad de metabolitos del ácido araquidónico conocidos como prostaglandinas, especialmente la PGE₂, la cual está íntimamente relacionada con la destrucción del hueso alveolar²⁸. La familia de los anti-inflamatorios no esteroideos pueden bloquear la producción de prostaglandinas y por lo tanto se puede esperar que detengan la destrucción de hueso alveolar²⁹. La activación de los macrófagos y otras células que encontramos en la bolsa periodontal también producen una gran cantidad de enzimas llamadas metaloproteinasas las cuales son responsables de la destrucción del ligamento periodontal y de los tejidos gingivales; estas enzimas dependen de un catión divalente para su actividad.

Golub y col. han demostrado que antibióticos como la tetraciclina no solo ataca a las bacterias sino que también quelan los cationes bivalentes y por lo tanto bloquean la actividad de las enzimas (metaloproteinasas)³⁰. Dichos autores han sintetizado modificaciones químicas de las tetraciclinas que no tienen actividad antibacteriana pero tienen la capacidad de inhibir las metaloproteinasas. Estos modificadores químicos de la tetraciclinas son efectivos reduciendo las colagenasas y otras metaloproteinasas en un modelo experimental en animales y en humanos con periodontitis suprimiendo la destrucción de fibras de colágeno²⁸.

Las bacterias anaeróbicas y otros microorganismos son usualmente suprimidos por la instrumentación mecánica, sin embargo, el raspado y el alisado radicular no pueden controlar los patógenos en bolsas profundas y en furcaciones, si los microorganismos han invadido los tejidos periodontales debemos considerar la terapia con antibióticos como una terapia adjunta para detener la enfermedad periodontal³¹.

Podemos decir que en la década de los 90s la terapia periodontal consta de 3 componentes principales:

1. Raspado y alisado radicular con o sin cirugía.
2. Antibióticos y antimicrobianos dirigidos especialmente a la destrucción de las bacterias presentes en la bolsa periodontal y dentro de los tejidos periodontales.
3. Uso de medicamentos dirigidos a modificar el mecanismo de respuesta del hospedero; suprimir o inhibir las prostaglandinas que median la reabsorción del hueso y de las metaloproteinasas que también median la destrucción de los tejidos²⁸.

En la práctica periodontal se tienen un gran arsenal de medicamentos ya sea para contrarrestar el dolor o la infección, algunos de ellos tienen ciertos efectos sobre la producción de citocinas en especial sobre IL-1^{20,22}.

La producción de esta citocina puede ser suprimida por corticoesteroides, prostaglandinas y otras citocinas. Algunos compuestos conocidos por sus propiedades anti-inflamatorias han mostrado inhibición de la síntesis de IL-1^{22,32}. Por ejemplo la taurolidina, ha sido utilizada en humanos como un agente anti-inflamatorio y se ha encontrado que inhibe la producción de IL-1 por parte de los mononucleares periféricos. Tenidap también ha demostrado inhibición de IL-1 por parte de los monocitos periféricos. El naproxeno, un anti-inflamatorio no esteroideo ha demostrado inhibición de IL-1. El flurbiprofen es otro de los medicamentos que tienen la capacidad de inhibir la producción de citocinas por parte de las células mononucleares, deteniendo la progresión de la enfermedad periodontal, es por esto que es de gran interés investigar

qué efectos pudieran tener otros medicamentos como los antibióticos, u otro tipo de anti-inflamatorios sobre la enfermedad periodontal^{22,32,33}.

Uno de los antibióticos más ampliamente utilizados en la terapia periodontal es la tetraciclina, se ha demostrado que ésta no solo es efectiva contra las bacterias periodontales sino que también puede suprimir la actividad de las metaloproteinasas³⁴.

Para que un antibiótico se considere efectivo en el tratamiento periodontal, éste debe penetrar bien en el fluido crevicular y alcanzar altas concentraciones con la mínima concentración inhibitoria de los patógenos sospechosos³⁵.

La tetraciclina es el único antibiótico que alcanza niveles en el fluido crevicular más altos que en la sangre,³⁵ una posible explicación a esto podría ser que este medicamento se adhiere a las superficies radiculares y cuando se libera está aún biológicamente activo. Esta propiedad ayuda a crear un reservorio de antibiótico activo que no es fácil de ser eliminado por el fluido crevicular. Con las concentraciones alcanzadas en el fluido crevicular (2 a 4 veces más alta que los alcanzados en la sangre) muchas investigaciones *in vitro* han mostrado que el 90 a 94 % de la flora subgingival es susceptible^{36,37,38,39}.

Se ha demostrado que en concentraciones de la tetraciclina reducen la adherencia y la congregación de ciertas especies bacterianas incluyendo *B. gingivalis* y *B. Intermedius*^{40,41}. También podemos decir que este medicamento favorece la regeneración aumentando la inserción de los fibroblastos que inhibe la actividad de la colagenasa⁴². La tetraciclina es muy eficaz para erradicar una de las bacterias más patógenas de la enfermedad periodontal como el *A. actinomycetemcomitans*. Este microorganismo está implicado en el desarrollo de la periodontitis juvenil y se ha encontrado elevado en sitios que son refractarios al tratamiento periodontal así como en

sitios de destrucción periodontal avanzada en periodontitis del adulto. La dificultad de eliminar el *A. actinomycetemcomitans* en la periodontitis del adulto con el solo alisado y raspado radicular fue demostrado por Renvert y col^{43,44} por lo que administrar tetraciclina en la enfermedad periodontal del adulto pudiera estar justificado.

Otro medicamento empleado es el metronidazol, este se caracteriza por presentar muy buena respuesta clínica cuando se emplea para controlar la enfermedad periodontal. El descubrimiento de la azomicina (2-nitroimidazol) fue desarrollado en Francia durante 1950 para tratar infecciones causadas por protozoarios⁴⁵. En 1962, Shinn⁴⁶ observó que cuando esta droga era utilizada para tratar infecciones vaginales por trichomonas, la gingivitis ulcerativa era resuelta. Posteriormente, Davies y col.⁴⁷ reportaron la eficacia del metronidazol contra las espiroquetas y a comienzos de los 70s los investigadores confirmaron que este medicamento actuaba como bactericida contra las bacterias anaerobias. Ya que la enfermedad periodontal esta frecuentemente asociada con bacterias anaerobias el metronidazol fue evaluado solo y en combinación con las terapias convencionales para determinar si su uso pudiera mejorar las condiciones periodontales^{48,49,50,51}. Si realizamos una revisión sobre los efectos adversos del metronidazol nos indican que este medicamento posee poco riesgo en inducir una reacción toxica aguda, poco riesgo de ocasionar mutaciones y producir cáncer, siempre y cuando se utilice de acuerdo al régimen de dosificación recomendada^{52,53,54,55}.

Los estudios nos demuestran que la utilización de este medicamento en una variedad de condiciones clínicas no mejoran el raspado y alisado radicular, pero es muy efectivo como una terapia adjunta en los tratamientos de los sitios donde el raspado y alisado radicular por sí solos no han tenido éxito. Puesto que no es posible diferenciar entre infecciones inducidas por un solo o múltiples microorganismos o averiguar si son

tolerantes al oxígeno por la simple inspección clínica de la enfermedad; dependiendo de la sintomatología se indica antibióticos de forma empírica.

El metronidazol es un bactericida que actúa a bajas concentraciones principalmente contra anaeróbicos como los bacteroides, pero es más eficaz contra bacilos anaerobios gram negativos⁵⁶. Usualmente es efectivo a concentraciones de .25 a 4 ug/ml pero existe una gran variabilidad entre los diversos estudios.⁵⁶

Es posible que tanto el metronidazol como las tetraciclinas, tengan efectos moduladores de la liberación de citocinas proinflamatorias. No se sabe también si el *A. actinomycetemcomitans* es capaz de contribuir a la producción de IL-6, TNF α , e INF α , por lo que el conocer más acerca de la participación directa del *A. actinomycetemcomitans* sobre la producción de las citocinas proinflamatorias y su posible inhibición por los antibióticos más utilizados en la infección del periodonto, hace que este estudio sea importante para el mejor entendimiento y manejo de la enfermedad periodontal.

3. HIPÓTESIS

1. El *A.actynomicetemcomitans* es capaz de estimular la producción de citocinas proinflamatorias producidas por las células mononucleares de sangre periférica tanto de pacientes con enfermedad periodontal como de sujetos sanos, y el tratamiento con metronidazol y tetraciclinas, inhiben su producción.

4. OBJETIVO GENERAL

1. Determinar si el *A. actinomycetemcomitans* estimula la producción de citocinas proinflamatorias producidas por las células mononucleares de sangre periférica; y evaluar si el metronidazol y la tetraciclina tienen efecto sobre la producción de citocinas proinflamatorias por células mononucleares de sangre periférica.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad periodontal avanzada por gradiente de centrifugación con Ficoll-Diatrizoato.
2. Estudiar la producción de IL-1, IL-6, TNF α , INF γ por parte de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con enfermedad periodontal estimuladas por el *A.actinomycetemcomitans*.
3. Estudiar el efecto del metronidazol *in vitro* sobre la producción de IL-1, IL-6, TNF α , INF γ producidas por células mononucleares en pacientes con enfermedad periodontal.
4. Estudiar el efecto *in vitro* de las tetraciclinas sobre la producción de las citocinas antes mencionadas producidas por células mononucleares en pacientes con enfermedad periodontal.

6. MATERIALES

6.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Muestras de sangre de sujetos sanos y de pacientes con enfermedad periodontal de avanzada a moderada.
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

6.2. EQUIPO

- Jeringas de 20 ml.
- Equipo auxiliar para venoclisis (mini-flebotek, agujas #23).
- Tubos cónicos de plástico estériles de 15 y 50 ml.
- Tubos estériles de polipropileno con fondo redondo y con tapa de 6 ml 12 x 75 mm. (FALCON).
- Tubos eppendorf de 1.5 ml (BECTON DICKINSON).
- Gradillas para tubos.
- Campana de flujo laminar (control de contaminación incorporada CCI Bio Hazard Hood).
- Lámpara de luz ultravioleta (GELMAN SCIENCES).
- Autoclave.
- Pipeta Auxiliar con filtro (FALCON).
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas volumétricas de 1,5 y 10 ml.

- Micropipetas automáticas de 10, 50, 200, y 1000 ml. (OXFORD).
- Puntillas para micropipetas.
- Centrifuga refrigerada (BECKMAN).
- Centrifuga refrigerada (EPPENDORF).
- Contador de células (BAXTER).
- Porta objetos.
- Cubre objetos.
- Cámara de Neubauer (BAXTER).
- Microscopio óptico (ZEISS).
- Incubadora de 37°C con control de CO₂ (LAB-LINE INSTRUMENT).
- Refrigerador de 2-4° C.
- Refrigerador Ultra low Freezer (-65°C)
- Lector espectrofotométrico de ELISA.
- Magnetos.
- Placa mezcladora (NOUVSII).
- Filtros desechables de 45 µm (GELMAN SCIENCES).
- Balanza Granataria (SARTORIUS).
- Balanza analítica (SARTORIUS).
- Matracas (ERLENMEYER).

6.3. REACTIVOS QUÍMICOS

- Tetraciclina.
- Metronidazol.

- Acido acético.
- Agua destilada.
- Azul tipiado (SIGMA).
- Diatrizoato de sodio (SIGMA).
- Ficoll tipo 400 (SIGMA).
- Heparina (PiSA).
- Medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA).
- Sistemas de ELISA (ENDOGEN) para medir IL-1, TNF α , IL-6 e INF γ
- Albúmina sérica bovina (SIGMA).
- Fenol (BAKER).

7. METODOLOGÍA

7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Se seleccionaron 40 pacientes de los cuales 20 fueron diagnosticados con Periodontitis Estadio I y II, generalizada, Grado A y los 20 restantes no poseían enfermedad periodontal.
2. Los pacientes no sufrían de ninguna enfermedad sistémica y no habían ingerido ningún tipo de antimicrobianos por lo menos durante los últimos 6 meses.
3. Los pacientes no habían recibido tratamiento periodontal.
4. A toda los pacientes se les midió la profundidad de bolsas y los niveles de inserción clínica y se les tomó una serie completa de radiografías periapicales.

7.2 OBTENCIÓN DE LA MASA BACTERIANA DE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS*

7.2.1 CEPA DE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS*

La cepa del microorganismo fue donada por el Dr. Stanley C. Holt, PhD de la Universidad de Texas en San Antonio. ATCC 29523, NCTC 9710.

7.2.2 CULTIVO DE *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS*

Para obtener la muestra de bacteria se utilizó un medio de cultivo líquido de Tioglicolato de sodio y se incubó 7 días a 37°C; posteriormente se utilizó una micropipeta y se extrajeron 15 µl del fondo del tubo.

7.2.3 CUENTA DE BACIOS Y ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS.

Se tomó 1 µl con la pipeta automática y se colocó en un área marcada del portaobjetos y se procedió a realizar la cuenta de las bacterias por medio de la tinción Gram.

Para determinar el número de bacterias se tomo en cuenta el factor de dilución y el volumen total de la suspensión. A partir de la cuenta total la población bacteriana se estandarizó a 2×10^8 bact/ml. De esta concentración celular se tomó 20 µl para ser añadido a una suspensión celular de 2×10^6 células mononucleares por ml; quedando una concentración final de 2000 bacterias por célula.

7.3 DILUCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

7.3.1 TETRACICLINA (TETREX 500 mg)

Se molió 500 mg de tetraciclina y se le agregó 10 ml de PBS; luego se agitó y se centrifugó por 10 minutos.

Se colocó el sobrenadante en un tubo estéril y se obtuvo la solución estandar de 500 mg por ml. De esta solución se tomó 1 ml y se diluyó con 4 ml de PBS y se obtuvo la solución de trabajo de 10 mg / ml

7.3.2 METRONIDAZOL (FLAGYL 500 mg)

Se molió 500 mg de metronidazol (flagyl 500 mg) y se le agregó 10 ml de PBS; luego se agitó y se centrifugó por 10 minutos.

Se colocó el sobreenadante en un tubo estéril y se obtuvo la solución estandar de 500 mg por ml. De esta solución se tomó 1 ml y se diluyó con 4 ml de PBS y se obtuvo la solución de trabajo de 10 mg / ml.

7.4 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS.

Se obtuvieron 20 ml de sangre venosa periférica con 0.5 ml de heparina de sujetos sanos y pacientes con enfermedad periodontal, haciéndose posteriormente una dilución de 1:2 con medio cultivo RPMI 1640. De la sangre diluida se tomaran 10 ml y se colocaran en tubos cónicos que contenían 5 ml de ficoll-diatrizoato (dilución 2:1) y se centrifugaron a 1,300 rpm/30 min.

Después de ese tiempo se recolectó la monocapa de células mononucleares con pipetas Pasteur, y se agregó RPMI en exceso (se realizaron 3 lavados con RPMI y dencantando y se tiró el sobrenadante) a 1200 rpm 10 minutos cada lavado.

Por último se agregó 1 ml de medio de cultivo RPMI y se contaron las células para hacer una suspensión final de 2×10^6 células/ ml.

7.4.1. CONTEO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.

Se colocaron 10 μ l de células mononucleares y 90 μ l de ácido acético al 2% dilución 1:10 y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml; luego se colocó con una micropipeta automática una pequeña muestra en la cámara de Neubauer y se procedió a contar las células en el microscopio de luz.

Se realizó una dilución igual con azul tripano para observar viabilidad celular.

7.4.2 TRATAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES CON LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES.

En este estudio transversal se tomaron muestras de sangre de 40 pacientes (20 con enfermedad periodontal y 20 sanos) y se colocó 1 ml de una suspensión de 2×10^6 cel/ml a cada uno de los 4 tubos de polipropileno (de 6ml – 12x75 mm) estériles.

TUBO NÚMERO 1: Fue etiquetado como control.

TUBO NÚMERO 2: Se le agregó 20 μ l de la cepa bacteriana de *A. actynomicetemcomitans* como estímulo.

TUBO NÚMERO 3: Se le agregó 5 μ l de una concentración de 3 mg/ml de metronidazol para obtener una concentración final de 15 mg equivalente a la concentración sérica.

TUBO NÚMERO 4: Se le agregó 5 μ l de una concentración de 4mg/ml de tetraciclina; para obtener una concentración final de 15mg equivalente a la concentración sérica.

Las células se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% CO₂, en humedad relativa del 95%, pasado este tiempo los tubos se centrifugaron a 1,300 rpm en centrífuga refrigerada y el sobrenadante fue recolectado en tubos eppendorf y se guardaron a -70°C hasta la medición de las citocinas.

7.5 PROCEDIMIENTO PARA MEDIR EL FACTOR DE NECROSIS

TUMORAL ALFA (TNF α)

1. Se tomaron 50 microlitos de muestras y se colocaron en cada pozo de placa de ELISA.
2. Se colocaron 50 microlitos de anticuerpo biotinilado

3. La placa se cubrió con ooo y se incubó a temperatura ambiente durante dos horas.
4. La placa fue lavada 3 veces (cada una de las cuales debe durar 10 minutos).
5. Se añadieron 100µl de una solución de Streptavidina HRP en solución buffer a cada pozo.
6. La placa se incubó a una temperatura ambiente durante 30 min.
7. Se lavó por tres veces.
8. Se añadió 100 microlitros de solución sustrato TMB premezclado a cada pozo.
9. Se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 min.
10. La reacción se detuvo añadiendo 100 microlitros de la solución en cada pozo.
11. Se leyó la absorvencia a 450 – 600 mm.
12. Se calcularon los resultados.

El procedimiento de laboratorio fue el mismo para ING γ , IL-6 e IL-1 solo cambió el tiempo de incubacion (3 horas) – IL-1B.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

7.6 Consentimiento informado

Estimado Sr. o Sra.

Soy estudiante del Programa de Especialidad y Maestría de Periodoncia de la Universidad Autónoma de Nuevo León y estoy llevando a cabo un estudio sobre la **PRODUCCIÓN DE CITOCINA PROINFLAMATORIAS DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERISFÉRICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL ESTIMULADAS CON *AGGREGATIBACTER ACTYNOMICETECOMITANS* Y SU REGULACIÓN POR METRINIDAZOL Y TETRACICLINAS** como requisito para obtener mi Maestría en Periodoncia.

El objetivo del estudio es investigar si

1. El *A.actynomicetemcomitans* estimula la producción de citocinas proinflamatorias producidas por la células mononucleares de sangre periférica.
2. Evaluar si el metronidazol y la tetraciclina tienen efecto sobre la producción de citocinas proinflamatorias por células mononucleares de sangre periférica.

Solicito su autorización para que participe voluntariamente en este estudio y poder obtener 20 ml de sangre venosa periférica de usted.

El proceso será estrictamente confidencial y el nombre no será utilizado.

La participación es voluntaria y usted tienen el derecho de retirar el consentimiento para la participación en cualquier momento. El estudio no conlleva ningún beneficio personal y no recibirá ninguna compensación por participar.

Como ya hemos comentado, para la realización de los análisis se recogen muestras del paciente. Esto no conlleva ningún riesgo.

Es frecuente, sobre todo si acude a nosotros por primera vez, que pueda sentir algo de

angustia o temor. Es normal y no debe preocuparle. Coméntelo con el profesional de enfermería que va a tomarle la muestra. Esta acostumbrado a esos temores y puede ayudarle a superar esa tensión.

En el momento del pinchazo, puede sentir una pequeña molestia. En algunas ocasiones, unas horas después puede presentar una discreta hinchazón o hematoma. Estas molestias menores son poco frecuentes y no requieren tratamiento ni medicación específica.

El material utilizado para extraer su sangre es estéril y desechable por lo que no existe riesgo de infección

Si tiene alguna pregunta sobre esta investigación, se puede comunicar con el investigador Dr. Mario A. Chalhoub Moreno o con mi directora de investigación Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza.

Si desea participar, favor de llenar el talonario de autorización y devolverlo.

AUTORIZACIÓN

Yo, _____

certifico que he leído y he comprendido el procedimiento descrito arriba; el investigador me ha explicado el estudio y ha contestado mis preguntas. Voluntariamente doy mi consentimiento para la obtención de 20 ml de sangre para poder participar en el estudio del Dr. Mario Chalhoub, estudiante del programa de especialidad y maestría de Periodoncia sobre **PRODUCCIÓN DE CITOCINA PROINFLAMATORIAS DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERISFÉRICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL ESTIMULADAS CON AGGREGATIBACTER ACTYNOMICETECOMITANS Y SU REGULACIÓN POR METRONIDAZOL Y TETRACICLINAS**

He recibido copia de este procedimiento.

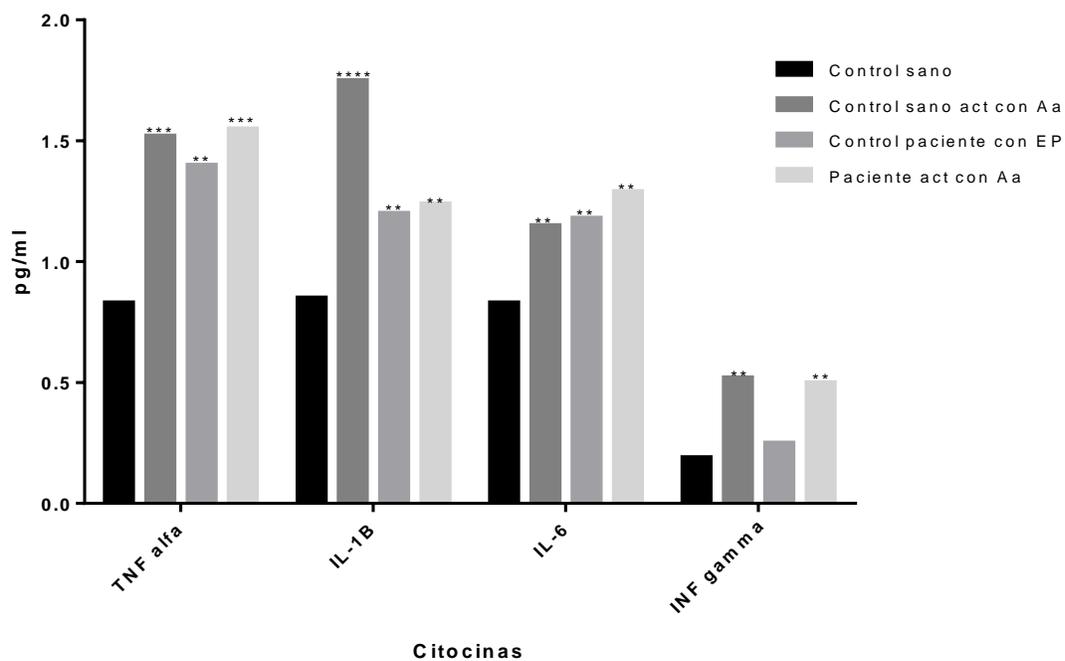
FIRMA Y NÚMERO DE CÉDULA

FECHA

8. RESULTADOS

GRÁFICO 1.

Producción de citocinas proinflamatorias estimuladas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre células de sujetos sanos y de pacientes con enfermedad periodontal



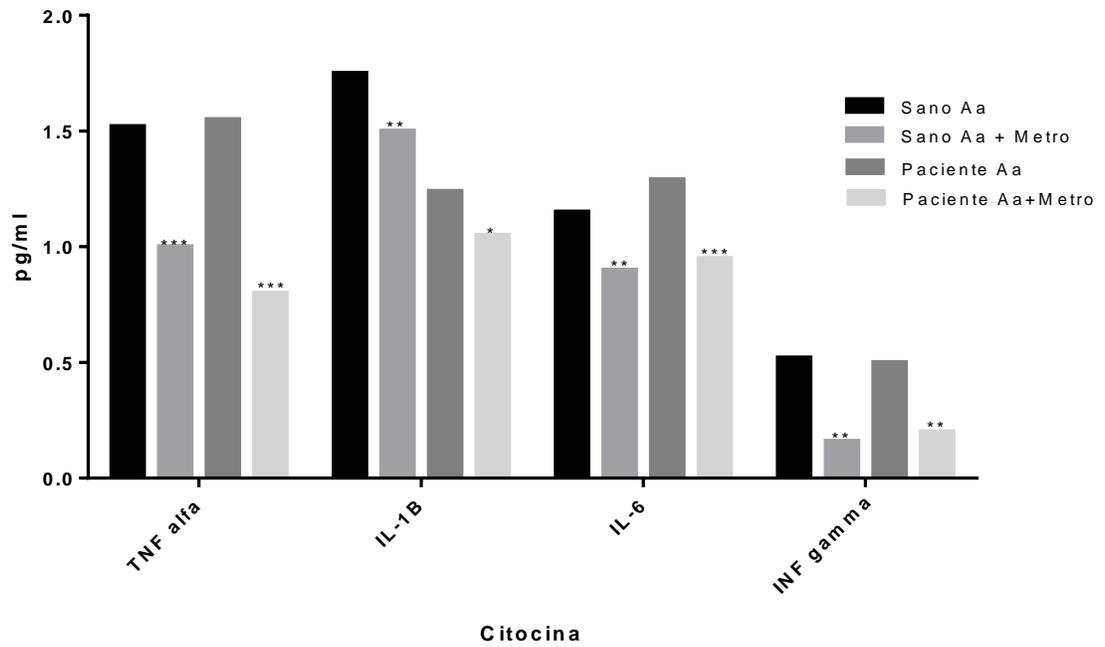
Grafica 1. Comparación de la producción de citocinas proinflamatorias de las células de sujetos sanos y pacientes con enfermedad periodontal con y sin estímulo por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Anova test $p < 0$.

Citosina pg/ml	Sujetos Sanos	Sujetos sanos con Aa	Prueba estadística
TNf- α	0.83	1.52	Significativo p< 0.001
IL-1 β	0.85	1.75	Significativo p< 0.001
IL-6	0.83	1.18	Significativo p< 0.005
INF- γ	0.19	0.52	Significativo p< 0.01

Citosina pg/ml	Pac. E.P. sin estímulo	pac. Con E.P. estim. Aa.	Prueba estadística
TNF-a	1.39	1.52	Significativo p< 0.05
IL-1 β	1.25	1.27	No significativo p> 0.05
IL-6	1.24	1.28	No significativo p> 0.05
INF- γ	0.25	0.54	Significativo p< 0.05

GRÁFICA 2

Producción de citocinas proinflamatorias estimuladas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre células de sujetos sanos y de pacientes con enfermedad periodontal ambas tratadas con Metronidazol



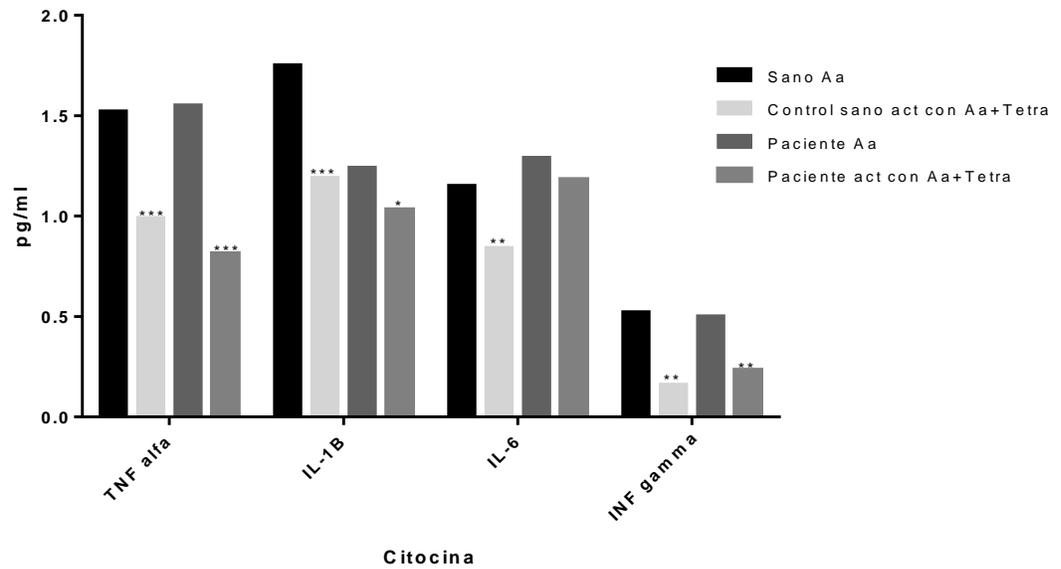
Grafica 2. Comparación de la producción de citocinas proinflamatorias de las células de sujetos sanos y pacientes con enfermedad periodontal con estímulo por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y tratados con Metonidazol. Anova test $p < 0.05$

Citosina pg/ml	Sano estimulado Aa	Sano Aa + Metro	Prueba estadística
TNf- α	1.52	1.0	Significativa p< 0.001
IL-1 β	1.75	1.50	Significativa p< 0.01
IL-6	1.18	0.9	Significativa p< 0.01
INF- γ	0.52	0.16	Significativa p< 0.01

Citocina	Paciente Aa	Paciente Aa + Metro	Prueba estadística
TNf- α	1.55	0.8	Significativa p< 0.001
IL-1 β	1.27	1.05	No significativa p> 0.05
IL-6	1.28	0.95	Significativa p< 0.01
INF- γ	0.54	0.2	Significativa p< 0.01

GRÁFICA 3

Producción de citocinas proinflamatorias estimuladas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre células de sujetos sanos y de pacientes con enfermedad periodontal ambas tratadas con tetraciclinas



Grafica 3. Comparación de la producción de citocinas proinflamatorias de las células de sujetos sanos y pacientes con enfermedad periodontal con estímulo por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y tratados con tetraciclinas Anova test $p < 0.05$

Citocina	Sano Aa	Sano Aa + Tetra	Prueba estadística
TNf- α	1.52	0.99	Significativa P< 0.001
IL-1 β	1.75	1.19	Significativa p< 0.001
IL-6	1.18	0.84	Significativa p< 0.005
INF- γ	0.52	0.16	Significativa p< 0.01

Citocina	Paciente Aa	Paciente Aa + Tetra	Prueba estadística
TNf- α	1.55	0.81	Significativa p< 0.001
IL-1 β	1.27	1.03	No significativa p> 0.05
IL-6	1.28	0.80	Significativa p< 0.01
INF- γ	0.54	0.23	Significativa p< 0.01

9. DISCUSIÓN

La infección bacteriana induce una reacción inmunológica destructiva dominada por células inflamatorias mononucleares y células tisulares, todas produciendo citoquinas proinflamatorias que interfieren con el proceso de regeneración. Los patrones moleculares de bacterias gramnegativas anaeróbicas en la biopelícula subgingival como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Tannerella forsythia*, son reconocidos por los fagocitos. Los macrófagos producen citocinas proinflamatorias, como la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), lo que mejora la respuesta inmune.⁵⁹

La IL-1 β es un potente estimulador de la hematopoyesis y de la respuesta inmune adaptativa, que junto con el TNF- α , son moduladores sistémicos de la respuesta inflamatoria de fase aguda y activan la producción de mediadores inflamatorios secundarios como quimiocinas y cicloxigenasas inductoras de prostaglandinas. La etiopatogenia de la periodontitis la han estudiado ampliamente múltiples autores⁶⁰⁻⁶⁶, y con base en los resultados de tales estudios se han construido hipótesis sobre el papel de las diferentes células de la respuesta inmune en la progresión del daño, tema que aún es controvertido.⁶⁷

Los resultados obtenidos en esta investigación revelan que el comportamiento de las citosinas en cada tratamiento por separado fue muy parecido cuando se compararon los sujetos sanos con los pacientes y se estimularon con el *A.actinomycetemcomitans*, Metronidazol y Tetraciclina.

Tanto los sujetos sanos como los pacientes con EP que se estimularon con *A. actinomycetemcomitans* aumentaron la producción de citocinas proinflamatorias producidas por células mononucleares de sangre periférica. Siendo la producción de estas citocinas mayor en los pacientes con EP que en los sujetos sanos. A pesar de que hubo un aumento en todas las citocinas tanto en los sujetos sanos como en los pacientes con EP; este aumento fue no significativo para la IL-1 β y para la IL-6 para los pacientes con EP.

Cuando se estimuló a los sujetos sanos como a los pacientes con EP con metronidazol y tetraciclina pudimos observar lo estimado en nuestra hipótesis; que era una disminución de las citocinas proinflamatorias; a pesar de que hubo una disminución, esta fue no significativa en los pacientes con la IL-1 β .

El TNF- α y la IL-1 β son producidas por monocitos y macrófagos en las etapas tempranas de la respuesta inflamatoria. Ambas citoquinas proinflamatorias estimulan directamente a los osteoclastos para inducir la reabsorción ósea y promueven la liberación de enzimas tisulares y metaloproteinasas de la matriz (MMP), responsables de la degradación de la matriz extracelular, ligamento periodontal y hueso alveolar.⁶⁸⁻⁷⁰

Nuestros resultados coinciden con los reportados por Becerik y cols.⁷¹ cuya investigación tuvo como objetivo detectar citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-11) en plasma y en fluido crevicular (GCF) en 80 pacientes que se dividieron en 4 grupos (PC: 20 pacientes con periodontitis crónica, GAgP: 20 pacientes con periodontitis agresiva, G: 20 pacientes con gingivitis y H: 20 sujetos sanos). Los resultados revelaron que se detectó

IL-1 β en todas las muestras de plasma analizadas. Se detectó IL-6 en el 70% de las muestras de plasma en el grupo de GAgP, el 80% en el grupo de PC, el 75% en el grupo G y 70% en el grupo H. Los niveles de IL-1 β , IL-6 e IL-11 en GCF se elevaron en las formas crónicas y agresivas de periodontitis en comparación con los controles H.

Por su parte, Górska y cols.⁷² realizaron una investigación con el objetivo de analizar la expresión de citoquinas (IL-1 β , TNF α , IFN- γ , IL-2 IL-4 e IL-10) en pacientes con periodontitis y sujetos sanos. El estudio se realizó en muestras de suero y biopsias de tejidos gingivales recogidos simultáneamente en 25 pacientes con enfermedad periodontal crónica severa y 25 sujetos periodontalmente sanos. Este estudio demostró que las citoquinas inflamatorias, tales como IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IFN- γ , dominaron la respuesta a bacterias en el tejido gingival inflamado de pacientes con periodontitis crónica severa y otra observación consistente fue la asociación entre altas proporciones de IL-1 β y TNF α , IL-4 e IL-10, y valores aumentados de profundidades sondeables, pérdida de inserción clínica y sangrado al sondaje, marcadores clínicos de la actividad de la enfermedad periodontal. Estos resultados indican que la alta variabilidad de las concentraciones de citoquinas y la baja frecuencia de su detección en muestras de suero de pacientes con periodontitis hacen que estas determinaciones sean inútiles para la detección de la presencia de la enfermedad y/o su gravedad. En contraste, los altos niveles absolutos de IL-1 β , TNF α , IL-2 e IFN- γ y, especialmente sus altas relaciones a IL-4 e IL-10 que se encuentran en las biopsias de tejido inflamado, se asociaron estrechamente con la gravedad de la enfermedad periodontal.

Numerosos estudios⁷³⁻⁷⁷ donde se registraron las concentraciones de IL-1 β en fluido crevicular tanto en pacientes con enfermedad periodontal como en sujetos sanos, fueron capaces de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Observándose la IL-1 β más elevada en el grupo con enfermedad periodontal activa. Estas concentraciones eran aproximadamente del doble en el grupo con enfermedad periodontal.⁷⁸

Diversos autores expresan que la IL-1 β está fuertemente relacionada con la condición inflamatoria del periodonto, tal es el caso de Stashenko y col.⁷⁹ en un estudio longitudinal, observaron que aquellos lugares que presentaban una pérdida de inserción > 2.5 mm en un intervalo de dos meses, poseían los niveles más elevados de IL-1 β . Estos niveles eran 2.5 veces mayores que en las localizaciones enfermas sin una pérdida de inserción tan marcada, y de 4.6 veces mayores que en las localizaciones sanas.

Asimismo, nuestros resultados contrastan con los reportados por Suarez y cols.⁶⁷ quienes estudiaron la producción de IL-1 β por linfocitos B (LB) y monocitos (Mo) de sangre periférica de individuos con enfermedad periodontal y sin ésta en presencia de lipopolisacárido (LPS). Para ello tomaron células de 5 individuos con diagnóstico sano/gingivitis, 5 pacientes con periodontitis crónica (PC) y 5 con periodontitis agresiva (PAg). Sus resultados revelaron que las concentraciones basales de IL-1 β producidas por LB fueron menores en sujetos con PC comparados con sujetos con PAg e individuos sanos. En presencia del estímulo, se incrementaron sin encontrarse diferencias entre los grupos. La IL-1 β producida por los Mo a nivel basal y frente al estímulo fue similar entre los sujetos, pero mayor comparada con la liberada por los LB en pacientes con periodontitis. Por lo tanto este estudio concluye que la producción de IL-1 β por LB en el

estado basal está significativamente disminuida en pacientes con PC, comparado con sanos y PAg, pero una vez estimulados con LPS, la respuesta es similar en los tres grupos. En general, la presencia de enfermedad periodontal agresiva o crónica se ha asociado con concentraciones elevadas de IL-1 β localmente en la encía y sistémicamente en la sangre periférica; pero los hallazgos de este estudio mostraron que en los pacientes con periodontitis crónica los LB de la sangre periférica tenían cantidades de citocina más bajas en ausencia del estímulo, comparado con los otros grupos de estudio.

Frente a este hallazgo es posible proponer posibles hipótesis y una de ellas es la reprogramación celular, en este caso en el LB, sustentada por el hecho de la cronicidad de la infección y generada por el continuo contacto de la endotoxina de la bacteria que alcanza el torrente circulatorio.⁶⁷

En el presente estudio el *Aa* estimuló la producción de IL-1 β , IL-6, FNT α y del IFN γ , esto coincide con el estudio reportado por Rogers y cols.⁸⁰ realizado con el objetivo de establecer un modelo de pérdida ósea alveolar inflamatoria agresiva en ratas utilizando LPS derivado de *Aa*. Para ello, seleccionaron 18 ratas *Sprague-Dawley* y las dividieron en grupos de prueba de LPS (N = 12) y control de solución salina (N = 6). Todos los animales recibieron inyecciones de *Aa* durante 8 semanas. Se evaluó la prevalencia de infiltrado inflamatorio, citoquinas proinflamatorias y osteoclastos. El examen histológico reveló un aumento del infiltrado inflamatorio, un aumento significativo de la inmunotinción para interleucina IL-6 y -1 β y FNT α en el grupo de LPS en comparación con los controles. Concluyendo que las inyecciones orales de LPS derivadas del

patógeno periodontal *Aa* pueden inducir una pérdida ósea alveolar severa y producción de citocinas proinflamatorias en ratas a las 8 semanas.

Esto es similar a otros estudios de modelos de pérdida ósea inducida por patógenos orales^{81,82} y es consistente con la capacidad de *Aa* para inducir TNF α e IL-1 β y 6 *in vitro*. Otros datos *in vitro* han demostrado que *Aa* puede estimular la expresión de RANKL, IL-6 y MMP-13, así como varias células periodontalmente relevantes, incluidos los fibroblastos, osteoblastos y macrófagos del ligamento periodontal.⁸⁰

Las citocinas proinflamatorias con potentes acciones proresortivas, incluido el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-1 e IL-6 están altamente reguladas por incremento por *Aa* y así promueven la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea. En humanos, los pacientes positivos a *Aa* tuvieron una pérdida ósea periodontal significativamente mayor que los sujetos negativos a *Aa* lo que respalda el notable impacto de esta bacteria en la enfermedad periodontal y sobre la acción de citocinas que desencadenan la reabsorción ósea.⁸³

Duante la periodontitis, el IFN γ se ha detectado en elevados niveles de lesiones progresivas o severas y estos elevados niveles también se han asociado a un incremento en la secreción de IL-1 β , IL-6, FNT α , y a la pérdida de inserción conectiva y reabsorción ósea alveolar.⁸⁴ estos resultados pudiesen explicar porque no se aumento tanto el INF gamma cuando se estimulo con el A . Agregobacter ya que no tuvo influencia de las otras citocinas .

En el presente estudio el comportamiento en cada tratamiento fue muy parecido cuando se compararon los sujetos sanos con los pacientes y se estimularon con el

A.actinomycetemcomitans, Metronidazol y Tetraciclina. El *A. actynomicetemcomitans* estimuló la producción del IFN γ en citocinas proinflamatorias producidas por células mononucleares de sangre periférica en pacientes o sujetos sanos con estímulo basal en comparación con los no estimulados; pero el metronidazol y la tetraciclina no tuvieron un efecto significativo en la producción del IFN γ en citocinas proinflamatorias producidas por células mononucleares de sangre periférica en pacientes o sujetos sanos con estímulo basal en comparación con los no estimulados.

El IFN- γ tiene múltiples efectos inmunorreguladores, media la defensa del huésped contra la infección y es un potente activador de los fagocitos mononucleares. El IFN- γ , liberado durante las etapas tempranas y tardías de la respuesta inmune por las células *natural killers* y las células T activadas, respectivamente, regula varios aspectos de la respuesta inmunitaria. Nuestros resultados del análisis de IFN γ en pacientes con periodontitis coincide con lo reportado por Dutzan y cols.⁸⁵ quienes realizaron un estudio con el objetivo de determinar la expresión de IFN- γ en tejido gingival y suero de pacientes con periodontitis crónica. Los investigadores seleccionaron 106 pacientes con periodontitis crónica moderada o avanzada. Recogieron muestras de fluido crevicular (GCF), muestras de suero y biopsias gingivales de pacientes. Los autores informaron que la concentración de IFN γ fue significativamente mayor en muestras de suero y biopsias de tejido gingival de pacientes con periodontitis que de controles sanos por lo tanto concluyen que considerando los niveles de IFN- γ encontrados en los sitios activos, esta citoquina está involucrada en el desarrollo de la respuesta inflamatoria gingival al mediar su activación. Sus hallazgos demostraron que la cantidad total y la concentración de IFN- γ son significativamente mayores en los sitios activos en comparación con los sitios inactivos.

Los resultados del presente estudio son consistentes con los hallazgos de Teng y cols.⁸⁶ quienes describieron el papel de IFN- γ (en humanos y ratones) en la modulación del activador del receptor del factor nuclear kappa B (RANKL) y pérdida ósea alveolar mediada por células Th bajo condiciones inflamatorias postmicrobianas *in vivo*. En algunos estudios,^{87,88} el IFN- γ parece ser la citoquina predominante producida por las células T en las enfermedades periodontales, y el aumento de las células productoras de IFN- γ se correlacionó con la progresión de la enfermedad.⁸⁴

Estudios han demostrado que el metronidazol (MTZ) tiene múltiples efectos en diferentes aspectos de la inmunidad. El MTZ ha estado involucrado en la disminución de los niveles de citoquinas. El tratamiento con MTZ oral y vaginal indujo una disminución en los niveles de citoquinas en mujeres embarazadas con vaginosis bacteriana. De manera similar, otro estudio informó que el tratamiento con MTZ en niños con giardiasis complicada y no complicada por alergia desempeñó un papel en la conversión de niveles altos de TNF- α , IL-2R, IL-1 β , IL-6, IL-8, y óxido nítrico a niveles normales.^{89,90}

En el estudio realizado por Shakir y cols.⁹⁰ el porcentaje de monocitos de sangre periférica circulante se redujo significativamente con el MTZ. La concentración de TNF α también se redujo significativamente por MTZ de una manera dependiente de la dosis. En un estudio *in vitro*⁹¹ con células mononucleares de sangre periférica humana, el MTZ mostró una inhibición considerable de la generación de TNF α estimulada por endotoxinas. Sobre la base de estos hallazgos, la inmunosupresión por MTZ es evidente en la función de macrófagos.

A través de estos estudios observamos que el MTZ muestra múltiples acciones en el sistema inmunológico e induce la inmunosupresión al ejercer diferentes efectos en las células inmunitarias. Lo anteriormente expuesto coincide con la investigación realizada por Rizzo y cols.⁹² con el objetivo de simular las condiciones *in vivo* que ocurren en sitios periodontales enfermos y evaluar los efectos de la MTZ sobre la viabilidad de las células del ligamento periodontal (HPLC) aisladas, también fue evaluado la capacidad del MTZ para modular la liberación de interleucinas (IL-1 β ,

IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α en HPLC, tratada o no con LPS de *Porphyromonas gingivalis*. Los resultados obtenidos mostraron que MTZ no tenía efecto citotóxico en la HPLC y fue capaz de inhibir la producción de citoquinas pro inflamatorias analizadas. Los resultados mostraron que el tratamiento de HPLC con MTZ inhibió significativamente la producción de TNF- α e IL-1 β inducida por LPS de *P. gingivalis*, y la inhibición de estas citoquinas por MTZ puede contribuir a reducir el impacto de los procesos destructivos del tejido mediados por citoquinas en la periodontitis. El posible mecanismo por el cual los efectos del MTZ influyen en la producción de citoquinas se debe probablemente a una sensibilidad alterada de las HPLC aisladas inducidas por el LPS de *P. gingivalis*; no se puede excluir que la reducción de citoquinas podría ser causada por intermediarios tóxicos que atacan múltiples sitios en las células objetivo.

Por su parte Sun y cols.⁹³ realizaron un estudio para medir la producción de citoquinas y quimiocinas después del tratamiento con tetraciclina de células THP-1 inducidas por lipopolisacáridos (LPS). Tres tetraciclinas suprimieron significativamente la expresión de citoquinas y quimiocinas inducidas por LPS. Se agregaron minociclina (50 μg / ml), tigeciclina (50 μg / ml) o doxiciclina (50 μg / ml) después del tratamiento con LPS. El

TNF- α se redujo a 16%, 14% y 8%, respectivamente, después de 60 minutos en comparación con el tratamiento con LPS sin agentes. Aunque las tres tetraciclinas mostraron algunas diferencias en el curso del tiempo, inhibieron la producción de citoquinas y quimioquinas y suprimieron significativamente la expresión de TNF- α e IL-8 en células THP-1 estimuladas con LPS. Por lo tanto, más de una vía de señalización puede estar involucrada en la regulación por disminución de tetraciclinas de la expresión de citoquinas y quimioquinas inducidas por LPS en células THP-1. Y entre las tres vías de señalización, la vía de NF- κ B podría ser la vía dominante en la modificación de tetraciclinas de la producción de citoquinas inducida por LPS en células THP-1.

Finalmente, Bostanci y cols.⁹⁴ demostraron en su estudio que la doxiciclina inhibe la producción de varias citoquinas proinflamatorias en células monocíticas humanas estimuladas con sobrenadantes de cultivo de *Aa*. La importancia de estos hallazgos es que, aparte de su efecto inhibitorio sobre la actividad de la MMP, la doxiciclina también parece ejercer efectos antiinflamatorios más generales, que se manifiestan como una reducción de la producción de citocinas proinflamatorias por monocitos en presencia de *Aa*. Por lo tanto, este antibiótico puede tener efectos moduladores marcados en la respuesta inflamatoria a través de una amplia gama de acciones. Por ejemplo, la inhibición de IL-1 β , TNF- α e IL-6 puede resultar en una disminución de la actividad de resorción ósea, mientras que la inhibición de IL-8 puede atenuar la afluencia de células inflamatorias en el área afectada. Los autores concluyen que la doxiciclina atenúa la producción de una amplia gama de citoquinas proinflamatorias por monocitos humanos, inducida por el principal patógeno periodontal *Aa*. Por lo tanto, dentro de la limitación de este trabajo *in vitro*, los hallazgos pueden apoyar que los beneficios clínicamente

probados de este medicamento pueden estar relacionados con su capacidad para regular la liberación de mediadores inflamatorios por parte de las células monocíticas, y no solo debido a la atenuación de la actividad de MMP.

10. CONCLUSIÓN

Las citoquinas y mediadores inflamatorios actúan solos o en conjunto para estimular la degradación periodontal. El desafío constante de las células inmunes ante los periodontopatógenos y sus factores de virulencia producen una secreción no controlada de citoquinas que puede verse modificada por algunos medicamentos como el metronidazol y la tetraciclina.

A.actynomicetemcomintans es capaz de estimular la producción de citocinas (FNT ∞ , IL-1 β , IL-6 y IFN γ) proinflamatorias producidas por las células mononucleares de sangre periférica tanto de pacientes con enfermedad periodontal y como en los obtenidos de sujetos sanos. El tratamiento con tetraciclinas, disminuye la producción de citocinas (FNT ∞ , IL-1 β , y IFN γ) con respecto a la disminución de la IL6 esta disminución no es altamente significativa. El tratamiento con metronidazol disminuye la producción de citocinas (FNT ∞ , IL-1 β , IL-6) La disminución de la IL-6 no fue altamente significativa. Nuestra hipótesis de que el Metronidazol y la Tetraciclina inhiben la producción de todas las citocinas proinflamatorias fue comprobada en esta investigación; pero se necesitan aun mucho mas investigaciones para poder entender los mecanismos por los cuales existen estas disminuciones .

BIBLIOGRAFÍA

1. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965; 36:177-187.
2. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodontol – 12 tal Res 1966; 1:1-13.
3. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000 2005;38:135-187
4. Genco RJ, Slot J, Mouton C, Murray P. Systemic 13. Immune responses to oral anaerobic organisms. In : Anaerobic Bacteria: Selected Topics, Lambe DW Jr, Genco RJ Mayberry-Carson KJ, eds., Plenum Publishing Corp., New York, 277, 1980
5. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ, Genco RJ, 14. Frey DE. Human immune responses to oral micro- organisms. I. Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with serum antibody responses to Actinobacillus actinomycetemcomitans. Clin Exp Immunol 1982; 47:43-52
6. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: 16. Current concepts. J Periodontol 1992; 63 (Suppl) : 338 .355.
7. Page RC, Offenbacher S Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of 17. Periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000 1997; 14:216-248
8. Page RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases . J. Periodontol 1992 ; 63 (Supl.): 356- 366.

9. Offenbacher S, Collins JG, Yalda B, Haradon G. Role of prostaglandins in high – risk periodontitis patients. In :Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J. Mergenhausen S, eds. Molecular Pathogenesis of periodontal disease . Washington DC: American Society for Microbiology; 1994: 203-213.
10. Carranza F. Periodontologia clinica de Glickman 4th edition. Ed. Interamericana 1998.
11. Kjeldsen M, Holmstrup P, Bendtzen K. Marginal periodontitis and cytokines: A review of the literature J. periodontol. 1993; 64: 1013-1022.
12. Perala G., Chapman R. et al. Relative production of IL.B and TNF alfa by mononuclear cells after exposure to dental implants.
13. Tatakis D. Interleukin- 1 and bone metabolism: A review. J. periodontol 1993; 64: 426.431.
14. Holmstrup R. Lindemann R, Bendtzen K. Bacterial - stimulated cytokine production of Perpheral mononuclear cells from patientes of varios Periodontitis categories. J. periodontol 1995; 66: 139-144.
15. Dagmar S., Joerg M. Interleukin 1.B concentration of gingival crevicular fluid.J. periodontol 1994; 65: 423-428.
16. Haffajee AD, Dibart S, Kent Jr, Socransky SS: Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctive systemically administered agents in the treatment of pediodontal infections. J. C. Clin periodon 1195; 22: 618-627.
17. Hafajee AD, Socransky SS, Dzink JL: Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal desease. J. Clin Periodontol 1988; 15: 240-246.
18. Basic and Clinical Immunology, Appleton and Lange, 8th edition, 1994.

19. J.G. Caton, C.R. Quiñones. etiology of periodontal diseases. *Current Opinion in Dentistry.* 1:17-28, 1991.
20. Goene R, Winkel E, Rodenburg J. Microbiology in diagnosis and treatment of severe periodontitis. a report of 4 cases. *J. periodontol* 1990; 61: 61-64.
21. Fujihashi K, Kono Y, Beagley K, et al. Cytokines and periodontal disease: Immunopathological role of interleukins for B cells responses in chronic inflamed gingival tissues. *J. periodontol.* 1993; 64: 400-406.
22. Jeffcoat M, Reddy M, Haigh B et al. A comparison of topical Ketorolac, systemic flurbiprofen, and placebo for the inhibition of bone loss in adult periodontitis. *J. periodontol* 1995; 66: 329-338.
23. K. Kornman, H. Loe. The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. *Periodontology 2000. Vol. 2, 1993, 83-97.*
24. W. B. Clark, H. Loe. Mechanism of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontology* 2000. Vol. 2, 1993, 72-82.
25. Lee H, Kang I, Chung C. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J. Clin Periodontol.* 1995; 22: 885-890.
26. Van Dyke T., Lester M.A. Shapira L. The role of host responses in periodontal disease progression: Implications for future treatment strategies. *J. periodontol* 1993; 64: 792-404.
27. Haffajee AD, Dibart S, Kent Jr, Socransky SS: Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctive systemically administered agents in the treatment of periodontal infections. *J. C. Clin periodon* 1995; 22: 618-627.
28. Roy C. Page. Periodontal Therapy: Prospect for the future. *J. periodontal* 1993; 64: 744-753.

29. . Jeffcoat MK, Page R, Reddy M, et al. Use of digital radiography to demonstrate the potential of naproxen as an adjunct in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J. Periodontol Res* 1991; 26: 415-421.
30. Schulger S, Yuodelis R, Page RC, Johnson RH. *Periodontal diseases*, 2nd edition. Philadelphia: Lea and Febiger; 1990: 251-254.
31. Greenstein G. The role of metronidazole in the treatment of periodontal disease. *J. periodontol* 1993; 64: 1-15.
32. Howell H. Blocking periodontal disease progression with anti-inflammatory agents. *J. periodontol* 1993; 64: 828-833.
33. Williams R, Jeffcoat M, Howell H. Altering the progression of human alveolar bone loss with the non-steroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen. *J. periodontol* 1989; 60: 485-490.
34. . Harrel J, Stein S. Prostaglandin E2 regulates gingival mononuclear cell immunoglobulin production. *J. periodontol.* 1993; 66: 222-227.
35. Jeffrey M. Gordon and Clay B. Walker. Current Status of Systemic Antibiotic Usage in Destructive Periodontal Disease. *J. periodontol* 1993; 64: 760-771.
36. . Genco RJ. Antibiotics in the treatment of human periodontal disease. *J. periodontol* 1981; 52: 545-558.
37. Cianco SG, Slots J, Reynolds HS, Zambon JJ, McKenna JD. The effect of short-term administration of minocycline HCl on gingival inflammation and subgingival microflora. *J. periodontol* 1982; 53: 557-561.
38. Sutter VL, Jones JM, Ghoniem AT. Antimicrobial susceptibilities of bacteria associated with periodontal disease. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 23: 483- 486.
39. O'Connor BC, Newman HN, Wilson M. Susceptibility and resistance of plaque

- bacteria to minocycline. J. Periodontal 1990; 61: 228-233.
40. . Peros WJ, Etherden I, Gibbons RJ, Skobe Z. Alteration of fibrin and cell hydrophobicity by sublethal concentration of tetracycline. J. Periodont Res 1985; 20: 24-30.
41. Lantz MS, Ray T, Krischnasami S, Pearson DE. Subinhibitory concentration of tetracycline alter fibrinogen binding by *Bacteroides intermedius*. Antimicrob Agent Chemother 1987; 31: 1915-1918.
42. Somerman MJ, Foster RA, Vorsteg DM, Progebin K, Wynn RL. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. J Clin Periodontol 1990; 17: 345-350.
43. Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. J Clin Periodontol 1990; 17: 345-350.
44. Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. J Clin Periodontol 1990; 17: 351-355.
45. Scully BE. Metronidazole. Med Clin N Am 1998; 72: 613-621.
46. Shinn DLS. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis (letter to the editor). Lancet 1962; 1: 1191.
47. Davies AH, McFadzen JA, Squires S. Treatment of Vincent's stomatitis with metronidazole. Br Mer J 1964; 1: 1149-1150.
48. . Van Osten MA, Mikx FH, Renggli HH. Microbial and clinical measurements of periodontal pockets during sequential periods of non - treatment, mechanical

- debridement and metronidazole therapy. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 197-204.
49. Jenkin WMM, Mac Farlane TM, Gilmour WN, Ransay I, Mackenzie D. Systemic metronidazole in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 443-450.
50. Lundstrom A, Johansson LA, Hamp SE. Effect of combined systemic antimicrobial therapy and mechanical plaque control in patients with recurrent periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 321-330.
51. Loesche WJ, Giordano JR, Hujuel P., et al. Metronidazole in periodontitis: Reduced need for surgery. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 103-112.
52. Roe FJC. The safety of metronidazole: a few clouds, but no rain. In: Finegold SM, ed. *First United States Metronidazole Conference*, 1982; Section II: 113-123.
53. Beard CM, Noller KM, O'Fallon WM, et al. Cancer after exposure to metronidazole. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 147-153.
54. Robbie MO, Sweet RL. Metronidazole use in obstetrics and gynecology. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 865-881.
55. Friedman GD, Ury HK. The initial screening for carcinogenicity of 53 commonly used drugs. *J Nat Cancer Inst* 1980; 65: 723-731.
56. Sutter VL, Jones MJ, Ghoneim ATM. Antimicrobial susceptibilities of bacteria associated with periodontal disease. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23: 483-486.
57. Arce Mendoza A.Y *Inmunología e inmunopatología oral.. Primera edición . Editada por el manual moderno 2010, Mexico.*
58. Marcela Y Martinez- Guzman, Manuel A. De la Rosa Ramirez, Alma Y. Arce Mendoza, Adrian G. Rosas Teraco. Detection of IgG, IgA and IgM antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in gingival crevicular fluid and saliva in patients with chronic periodontitis. *Journal of infectious diseases and immunity* 2012 vol 4 10-15.

- 59.- Borilova Linhartova, P., Poskerova, H., Tomandlova, M., Bartova, J., Kankova, K., Fassmann, A., & Izakovicova Holla, L. (2019). Interleukin-1 Gene Variability and Plasma Levels in Czech Patients with Chronic Periodontitis and Diabetes Mellitus. *International journal of dentistry*, 2019, 6802349. doi:10.1155/2019/6802349
- 60.- Page R, Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976 Mar; 34(3): 235-49.
- 61.- Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(1): 17-34.
- 62.- Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996 Nov; 1(1): 821-78.
- 63.- Kormman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997 Jun; 14: 33-53.
- 64.- Fransson C, Mooney J, Kinane DF, Berglundh T. Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1999 Jul; 26(7): 453-60.
- 65.- Lins RD, Figueiredo CR, Queiroz LM, da Silveira EJ, Freitas R de A. Immunohistochemical evaluation of the inflammatory response in periodontal disease. *Braz Dent J*. 2008; 19(1): 9-14.

- 66.- Fujita S, Takahashi H, Okabe H, Ozaki Y, Hara Y, Kato I. Distribution of natural killer cells in perio- dontal diseases: an immunohistochemical study. *J Periodontol.* 1992 Aug; 63(8): 686-9.
- 67.- Suárez M, Bernal M, Salazar J, Roa N, Fonseca A, Cuellar A, Rodriguez A. Comparación de la síntesis de interleucina- 1 β por monocitos y linfocitos B estimulados con lipopolisacárido en pacientes con enfermedad periodontal *Univ Odontol.* 2012 Ene-Jun; 31(66): 25-29.
- 68.- Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, Graves DT. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(3):233-40. Takashiva S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontology 2000.* 2006;40 (1): 94-106.
- 69.- Thompson BM, Mundy GR, Chambers T. TNF alpha y beta induce osteoclastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *Journal of Immunology,* 1987;138:775-79.
- 70.- Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 1998; 160(1): 403-9.
- 71.- Becerik S, Öztürk VÖ, Atmaca H, Atilla G, Emingil G. Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. *J Periodontol.* 2012 Oct;83(10):1304-13. Epub 2012 Jan 16. PubMed PMID: 22248224.

72.- Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 1046–1052.

73.- Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 885-90.

74.- Ishihara Y, Nishihara T, Koroyanagi T, Shirozu N, Yamagishi E, Ohguchi M, Koide M, Ueda N, Amano K, Noguchi T. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodont Res* 1997; 32: 524-9.

75.- Pongsawat Suwatanapongched, Penpan Laohapand, Rudee Surarit, Yasukazu Ohmoto, Kiat Ruxrungtham. Interleukin-1 β level in gingival crevicular fluid of patients with active periodontitis. *Asian Pacific J of allergy and immunology* 2000;18: 201-7.

76.- Gamonal J, Jorge O, Silva A. Interleukina-1 β e interleukina-8 en pacientes adultos con periodontitis destructiva: efectos del tratamiento periodontal. *Av. Periodon Implantol O* 1999; 11: 183-93.

77.- Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fischer RG, Gustafson A. Increased interleukin-1 beta concentration in gingival crevicular fluid as a character of periodontitis. *J Periodontol* 1999; 70: 1457-63.

78.- Valderrama G, Vijande F, Escribano JM, Garrido-Pertierra A, Bascones A. *La IL-1 y su eventual asociación con la enfermedad periodontal crónica. Una revisión de la literatura (I)*. Av Periodon Implantol. 2005; 17, 2: 89-95.

79.- Stashenco P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 α in tissue from sites of active periodontal disease. J Clin Periodontol 1991; 18: 548-54.

80.- Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, Kirkwood KL. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. J Periodontol. 2007 Mar;78(3):550-8.

81.- Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: Patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. Microbes Infect 2005;7: 738-747.

82.- Hong CY, Lin SK, Kok SH, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med 2004;33:162-169.

83.- Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. Mol Oral Microbiol. 2016 Jun;31(3):207-27. doi: 10.1111/omi.12119.

84.- Díaz-Zúñiga J y cols. Variabilidad de la síntesis de citoquinas por células dendríticas humanas estimuladas con los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 6(2); 57-62, 2013.

85.- Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, Aguillon JC, Puente J, Pozo P, Gamonal J. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. J Periodontol. 2009 Feb;80(2):290-6.

86.- Teng YT, Mahamed D, Singh B. Gamma interferon positively modulate *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific RANKL+ CD4+ Th-cell-mediated alveolar bone destruction in vivo. Infect Immun 2005;73: 3453-3461.

87.- Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohisto- logical study of interferon-gamma and interleukin-4- bearing cells in human periodontitis gingiva. Arch Oral Biol 2001;46:901-908.

88.- Roberts FA, McCaffery KA, Michalek AM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodon- titis. J Dent Res 1997;76:1833-1839.

89.- Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R (2005) Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. Acta Trop 95: 116–122.

90.- Shakir L, Javeed A, Ashraf M, Riaz A. Metronidazole and the immune system. Pharmazie. 2011 Jun;66(6):393-8. Review

91.- Krehmeier U, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Obertacke U, Schade FU, Majetschak M (2002) Effects of antimicrobial agents on spontaneous and endotoxin-induced cytokine release of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Chemother* 8: 194–197.

92.- Rizzo A, Paolillo R, Guida L, Annunziata M, Bevilacqua N, Tufano MA. Effect of metronidazole and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. *Int Immunopharmacol*. 2010 Jul;10(7):744-50.

93.- Sun, J., Shigemi, H., Tanaka, Y., Yamauchi, T., Ueda, T., & Iwasaki, H. (2015). Tetracyclines downregulate the production of LPS-induced cytokines and chemokines in THP-1 cells via ERK, p38, and nuclear factor- κ B signaling pathways. *Biochemistry and biophysics reports*, 4, 397-404. doi:10.1016/j.bbrep.2015.11.003

94.- Bostanci N, Akgül B, Tsakanika V, Allaker RP, Hughes FJ, McKay IJ. Effects of low-dose doxycycline on cytokine secretion in human monocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Cytokine*. 2011 Dec;56(3):656-61.

