



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE GRADUADOS

MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA

**Caracterización clínica y niveles de TNF- α durante la reparación
periodontal en fumadores**

Javier Patricio Rojas Cortez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Tutor principal:

Dr. Patricio Smith Ferrer

Tutores asociados:

Dr. Rodrigo López

Dr. Rodrigo Hidalgo

Santiago Chile 2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE GRADUADOS

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA**

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato

JAVIER PATRICIO ROJAS CORTEZ

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Periodontología en examen rendido el 14 de Mayo del 2015.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Dra. Blanca Urzúa O.

Dr. Rolando Vernal A.

Dr. Alejandro Escobar A.

Agradecimientos

Entrego mis más sinceros agradecimientos a Dios que me permitió finalizar mi tesis y también al gran apoyo de mi familia, tutor y novia en los momentos más difíciles.

Ha pasado mucho tiempo y he aprendido no solamente cosas científicas sino también a que debo ser más meticuloso en las cosas que hago, más reflexivo y dedicar más tiempo a las cosas que ameritan mayor importancia.

Sé que de todo trabajo se pueden sacar conclusiones positivas, independiente de los resultados de ese trabajo. Yo me quedo con la gran admiración por quienes saben de su oficio, el gran apoyo entregado y la paciencia a quienes dieron todo porque me vaya bien.

ÍNDICE

Introducción	5
Aspectos teóricos	8
Fases o etapas de la reparación tisular	8
Tabaquismo	13
Terapia periodontal en fumadores	14
Hipótesis	17
Objetivo general y específicos	17
Materiales y métodos	19
Resultados	24
Discusión	38
Resumen	46
Referencias	48
Anexos	63

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria iniciada por la acción de microorganismos presentes en el biofilm dentogingival y que lleva a la destrucción del aparato de inserción periodontal (Offenbacher *et al.*, 2008). Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de periodontitis es el hábito de fumar (Barbour *et al.*, 1997; Tonetti, 1998; Bergström, 2004). El tabaquismo no sólo incrementa el riesgo de desarrollo de periodontitis sino que también afecta de manera significativa la respuesta a la terapia periodontal, tanto quirúrgica como no quirúrgica (Johnson & Guthmiller, 2007; WHO 2011). En Chile, datos del Minsal (CONACE 2004) indican que la prevalencia de tabaquismo en la población de 12 y 64 años es de 42,5%, distribuyéndose en 40,4% para las mujeres y 44,8% para los hombres, con un consumo promedio de 6-7 cigarrillos al día. Por otro lado la población mayor de 45 años es la que presenta el mayor consumo promedio alcanzando los 9 cigarrillos al día. La exposición al humo de tabaco puede alterar no sólo la reparación de los tejidos periodontales sino que también la respuesta inflamatoria (Lee *et al.*, 2012). La reparación de los tejidos periodontales es un proceso en el cual participan diferentes poblaciones celulares tales como queratinocitos, fibroblastos, osteoblastos y células inflamatorias. Los fibroblastos constituyen la población

celular predominante en el tejido de granulación periodontal y participan activamente secretando la matriz colágena necesaria para permitir la reparación del tejido periodontal afectado por periodontitis. El factor de crecimiento transformante beta1 (TGF- β 1) es un polipéptido que cumple un papel crucial en la reparación de heridas, ya que favorece la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos e induce la producción de la matriz colágena necesaria para la reparación de heridas (Barrientos *et al.*, 2008). Por otro lado, el factor de necrosis tumoral de tipo alfa (TNF- α) es una citoquina inflamatoria que es secretada principalmente por macrófagos del tejido gingival y que ha sido vinculada a la destrucción del tejido periodontal gracias a su capacidad para inducir la producción de enzimas proteolíticas tales como metaloproteasas de matriz (MMPs) (Smith *et al.*, 2009) Estudios recientes han mostrado que en fibroblastos gingivales la exposición a TNF- α puede disminuir la respuesta “pro-reparativa” activada en fibroblastos gingivales por TGF- β 1 tales como la producción de colágeno, fibronectina, periostina y la diferenciación hacia el fenotipo miofibroblástico (Arancibia *et al.*, 2012).

Dado que la citoquina TNF- α puede modular negativamente la respuesta reparativa en fibroblastos gingivales y que este mediador está presente en el tejido periodontal en reparación, resulta especialmente interesante el identificar si es que existen alteraciones en los niveles de esta citoquina durante la

reparación de los tejidos periodontales. Considerando que los tejidos periodontales de los pacientes fumadores presentan alteraciones en sus mecanismos de reparación, el objetivo principal de esta tesis fue el identificar si el tabaquismo puede modificar la capacidad de reparación tisular asociada a la terapia periodontal y si esta reparación alterada puede ser explicada, al menos en parte, por la presencia de niveles elevados de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α .

ASPECTOS TEÓRICOS

Los tejidos periodontales están constituidos por la encía y los tejidos periodontales de inserción como son cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar (Bartold *et al.*, 2006). La encía corresponde a una mucosa conformada por un epitelio de revestimiento y un corion de tejido conectivo que se encuentran en constante exposición a agentes injuriantes tanto físicos, químicos y bacterianos (Bartold *et al.*, 2006). La forma más prevalente de periodontitis corresponde a la llamada periodontitis crónica. En Chile, la prevalencia de pérdida de inserción clínica ha sido estimada en 38% en adultos jóvenes y 69% en adultos mayores (Gamonal *et al.*, 2010). El tratamiento de la enfermedad consiste en el debridamiento mecánico de la superficie radicular con el propósito de reducir los niveles de bacterias contaminantes causantes de la respuesta inflamatoria periodontal (Lang & Lindhe. 2008). Esto permite lograr una superficie radicular biocompatible que facilita la cicatrización de los tejidos y la reducción de los niveles de inflamación (Lang & Lindhe. 2008).

Fases o etapas de la reparación de tejidos

El debridamiento de la superficie radicular permite descontaminar la raíz dentaria. La fase inicial de la reparación tisular corresponde a la de hemostasia que es activada en forma consecutiva a la hemorragia desencadenada por la

terapia periodontal. En esta se conforma un coágulo sanguíneo constituido por eritrocitos, plaquetas activadas y una matriz conformada por fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondina (Polimeni *et al.*, 2006). Esta matriz detiene la hemorragia y favorece los procesos de adhesión, migración y proliferación celular necesarios para la reparación del tejido (Shaw & Martin. 2009). Luego de finalizada la fase hemostática sobreviene una respuesta o fase inflamatoria donde abundan polimorfonucleares neutrófilos y monocitos que llegan al sitio injuriado. Estas células tienen como función limpiar el coágulo de bacterias y del tejido necrótico a través de la fagocitosis, liberación de enzimas y productos oxigenados (Shaw & Martin. 2009).

Los macrófagos atraídos al tejido en reparación secretan una serie de mediadores polipeptídicos o factores de crecimiento que participan en la reparación periodontal. Estos factores actúan reclutando fibroblastos y células endoteliales al tejido dañado estimulando además su proliferación y producción de moléculas de matriz para conformar el llamado tejido de granulación (Polimeni *et al.*, 2006). Estas células migran principalmente desde los bordes de la herida atraídos por factores de crecimiento secretados por las plaquetas y macrófagos infiltrantes (Aukhil, 2000). Una vez en el tejido, los fibroblastos se diferencian a un fenotipo celular específico conocido como miofibroblasto (Goldberg *et al.*, 2007). Estas células se caracterizan por secretar abundante

matriz extracelular contribuyendo la regeneración de las fibras colágenas que contribuyen a la conformación de la inserción periodontal. Los miofibroblastos se caracterizan por expresar una isoforma de actina conocida como actina muscular de tipo alfa (α -SMA) (Shaw & Martin. 2009). Este tipo especial de actina le confiere a la célula una mayor capacidad contráctil lo que ha sido vinculado con la reducción del volumen de la herida y, por lo tanto, con la reparación del tejido (Shaw & Martin. 2009).

En consecuencia la actividad coordinada de síntesis de componentes de matriz y de proteasas que remodelan la matriz en formación sumado a la actividad contráctil del citoesqueleto celular del miofibroblasto, permite la remodelación del tejido en reparación (Häkkinen *et al.*, 2000). Como se mencionó anteriormente, la función del fibroblasto se encuentra controlada principalmente por factores de crecimiento y citoquinas que regulan la capacidad de migración, proliferación, síntesis y degradación la matriz extracelular (Häkkinen *et al.*, 2000). Un elemento importante a considerar es que las características de la reparación periodontal dependerán de la ausencia o presencia de señales para reclutar y estimular las células que participan en el proceso de reparación tisular (Polimeni *et al.*, 2006).

Dentro de los factores de crecimiento y citoquinas que participan en este proceso se ha determinado que TGF- β 1 y TNF- α juega un papel crucial en la

respuesta inflamatoria y reparativa periodontal (Bartold *et al.*, 2006). TNF- α es la principal citoquina mediadora de la respuesta inflamatoria aguda ante la infección de bacterias Gram negativas y es la responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de infecciones generadas por este tipo de bacteria (Abbas y Pillai 2004). Tiene una potente actividad durante la fase inflamatoria de la reparación de heridas y también en condiciones de inflamación crónica como en la periodontitis (Wajant *et al.*, 2003). TNF- α es producida como una proteína de transmembrana de 233 residuos aminoacídicos, (Abbas y Pillai 2004). Al estar unida a la membrana su actividad biológica permanece limitada, siendo activa su forma soluble (Abbas y Pillai 2004). Su principal fuente celular son los fagocitos mononucleares activados, linfocitos T, células NK y mastocitos (Abbas y Pillai 2004). Entre las principales funciones de TNF- α están facilitar la migración de neutrófilos y monocitos hasta el foco de infección induciendo la expresión de moléculas de adhesión en células vasculares endoteliales (Abbas y Pillai 2004).

TGF- β 1 es una citoquina que juega un papel fundamental en la diferenciación de miofibroblastos. Inicialmente es secretado en el tejido dañado por plaquetas y posteriormente también por macrófagos y células epiteliales, entregando así un suministro continuo de este factor para la reparación tisular (Frank *et al.*, 1996). La función de esta citoquina es promover la síntesis de matriz

extracelular especialmente colágeno tipo I y III, inhibir la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y estimular la expresión de α -SMA en miofibroblastos (Tomasek *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1995, Mailhot *et al.*, 1995).

Una vez que el estímulo inflamatorio ha cesado, los fibroblastos producen de manera autocrina TGF- β 1, lo que permite mantener la actividad fibrogénica (Tomasek *et al.*, 2002). TGF- β 1 es secretada en su forma biológicamente latente asociado al péptido de latencia (Latent TGF- β binding protein, LTBP). Después del clivaje de LTBP por proteasas como plasmina o por la integrina α v β 3, TGF- β es convertido a su forma biológicamente activa (Tomasek *et al.*, 2002).

Se ha descrito que TNF- α puede tener un efecto antagonista sobre TGF- β 1, alterando la síntesis de colágeno tipo I y III, además de la expresión de α -SMA en fibroblastos de piel (Verrecchia *et al.*, 2000; Goldberg *et al.*, 2007). Esto ha sido interpretado como un mecanismo que podría retardar la reparación del tejido. Estudios recientes han demostrado que en fibroblastos gingivales humanos, TNF- α es capaz de inhibir diferentes respuestas inducidas por TGF- β 1 como son la activación por fosforilación de Smad 2/3 con la consecuente disminución en la producción de colágeno tipo I, periostina, fibronectina y la expresión del marcador de miofibroblastos α -SMA (Arancibia *et al.*, 2012). Estos

antecedentes **permiten proponer que TNF- α podría tener un efecto antagónico sobre la reparación periodontal.**

Tabaquismo

El consumo de tabaco es el principal factor de riesgo de múltiples enfermedades y muertes en el mundo actual (World Health Organization, 2011). Representa uno de los principales problemas de salud pública dado el elevado costo económico y social asociado a su consumo. El tabaquismo está relacionado con cerca de 6 millones de muertes anuales, preferentemente en países de bajo y mediano desarrollo (World Health Organization, 2011).

El humo de cigarrillo es una compleja mezcla de cerca de 4.000 componentes con propiedades citotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (Ding *et al.*, 2008). La inhalación pasiva o activa del humo de tabaco produce una disolución de los productos de la combustión en el epitelio oral y la vía aérea. Estos productos de combustión pueden dividirse en gaseosos y particulados, siendo este último tipo de partícula la que concentra la mayor toxicidad ya que presenta nicotina, fenol, hidrocarburos, nitrosaminas y metales pesados, entre otros componentes (Witschi *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que la exposición al humo de cigarrillo podría inducir en los tejidos gingivales una serie de cambios como son la secreción de citoquinas

inflamatorias que modifican la homeostasis, defensa y respuesta frente a injurias del tejido (Ryder *et al.*, 2007). Dentro de estas citoquinas se cuenta a TNF- α (Boström L *et al.*, 1998), IL-1 β (Toker *et al.*, 2012) y la enzima proteolítica uroquinasa (González *et al.*, 2009).

Se ha reportado además que el tabaquismo puede modificar la respuesta inflamatoria en el periodonto, observándose menor sangrado al sondaje (SS) en los pacientes fumadores (Palmer *et al.*, 2005). El desarrollo de enrojecimiento gingival y el volumen de fluido crevicular gingival es también menor en estos pacientes (Palmer *et al.*, 2005). A nivel histológico se ha encontrado que los sujetos fumadores presentaban un menor número de vasos sanguíneos respecto a no fumadores, fenómeno que puede tener relevancia en la respuesta reparativa periodontal (Palmer *et al.*, 2005).

Terapia periodontal en fumadores

Los pacientes fumadores tienen 4 veces más riesgo de desarrollar periodontitis comparado con los no fumadores después de ajustar por edad, raza o etnia, ingreso y nivel educacional (Tomar *et al.*, 2000). En fumadores pesados, esto es fumadores de 31 o más cigarrillos al día, el riesgo se eleva a 5,6 veces mientras que en fumadores livianos, 9 o menos cigarros/día, disminuye a 2,8 veces (Tomar *et al.*, 2000). Junto al mayor riesgo de desarrollo de periodontitis,

diferentes estudios han demostrado la negativa influencia del tabaquismo en la terapia periodontal no quirúrgica (Labriola *et al.*, 2005, Tomar *et al.*, 2000, Ah *et al.*, 1994). En una revisión sistemática se evaluó el impacto del tabaquismo sobre la terapia periodontal no quirúrgica encontrándose una menor reducción en la profundidad al sondaje en pacientes fumadores (Labriola *et al.*, 2005).

Si bien los pacientes fumadores presentan una menor ganancia en el nivel de inserción clínico al ser comparados con fumadores, esta diferencia no es significativa (Labriola *et al.*, 2005). A su vez se ha reportado que el tabaquismo determina una menor reducción en la profundidad al sondaje luego de cirugía periodontal al comparar pacientes fumadores versus no fumadores (Ah *et al.*, 1994).

En cirugías de cobertura radicular el tabaco influye negativamente en cambios como nivel de inserción clínico y ubicación del margen gingival al final del procedimiento (Chambrone L *et al.*, 2012). Adicionalmente, en pacientes fumadores tratados mediante un injerto de tejido gingival se ha observado un retraso en la epitelización y un menor sangrado en el sitio dador (Silva *et al.*, 2010). Los pacientes fumadores presentan una menor formación de tejido óseo

consecutiva al tratamiento de lesiones intraóseas utilizando procedimientos regenerativos (Patel *et al.*, 2012).

Los antecedentes antes expuestos permiten suponer que niveles aumentados de TNF- α , probablemente inducidos por la exposición al humo de tabaco podrían afectar negativamente la respuesta reparativa en los tejidos periodontales. Es por esto que en el presente estudio se buscó identificar si niveles incrementados de esta citoquina se asocian con una reparación defectuosa en el tejido periodontal de pacientes fumadores.

HIPÓTESIS:

La exposición al humo de tabaco disminuye la capacidad de reparación del tejido periodontal y aumenta los niveles de la citoquina TNF- α en fluido gingival crevicular.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del tabaquismo sobre la capacidad de reparación del tejido periodontal a nivel clínico y sobre los niveles de la citoquina TNF- α en el FGC de sujetos fumadores y no fumadores con periodontitis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto del tabaquismo sobre parámetros clínicos periodontales tales como nivel de inserción clínico, profundidad y sangrado al sondaje además de niveles de placa bacteriana durante el tratamiento no quirúrgico de la periodontitis.

2. Determinar el efecto del tabaquismo sobre los niveles de TNF- α en el fluido gingival crevicular durante las diferentes etapas de la reparación periodontal.
3. Relacionar los niveles de TNF- α en el FGC con la ganancia de inserción clínica y reducción en la profundidad al sondaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tamaño de muestra

En el presente estudio de cohorte concurrente se utilizó un tamaño de muestra por conveniencia de acuerdo a la cantidad de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión durante el periodo de reclutamiento de 2 años (Marzo del 2010 y Noviembre 2012).

Selección de sujetos

Mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia se seleccionó a veintiséis sujetos con diagnóstico de periodontitis, con o sin hábito tabáquico, entre los pacientes que asistieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, entre marzo del 2010 y Noviembre del 2012. Los sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión/exclusión fueron invitados a participar en este estudio. Todos los sujetos que cumplieron los criterios de inclusión leyeron y firmaron un consentimiento informado. El protocolo de este estudio fue aprobado por los Comités de ética de la Pontificia Universidad Católica de Chile y de la Universidad de Chile.

Criterios de inclusión y exclusión

Para ingresar al estudio todos los sujetos debían tener entre 35 y 55 años de edad, ambos géneros y presentar al menos 15 dientes excluyendo los terceros molares. Clínicamente debían presentar 3 o más sitios periodontales con valores de profundidad al sondaje de 5 mm, nivel de inserción clínico de 2 mm y sangrado al sondaje de 20% o más de los sitios examinados. Se excluyeron pacientes diabéticos o con otras enfermedades con impacto en el periodonto o reparación de heridas, embarazadas y aquellos que habían consumido antibióticos o antiinflamatorios durante los últimos 6 meses.

Nivel de exposición de tabaco

Para definir el nivel de exposición al humo de tabaco se utilizó el test semi cuantitativo NicAlert que permite detectar los niveles cotinina presentes en la saliva (metabolito de la nicotina). Siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo entregó valores de 0 a 6 que permitían estimar los niveles de exposición al humo de tabaco.

Registros clínicos periodontales

Estos registros se aplicaron en cinco momentos del estudio, desde el registro basal llamado tiempo 0 (T0) y a los 7 días (T7), 14 días (T14), 30 días (T30) y 90 (T90) días después del inicio de la terapia periodontal. Un examinador

calibrado realizó todos estos registros. En las evaluaciones T0 y T90 se registró el nivel de inserción clínico (NIC), profundidad al sondaje (PS), sangrado al sondaje (SS) y placa bacteriana (PB). En las sesiones intermedias (T7, T14, T30) se registraron los valores de PS, PB y SS. Los parámetros clínicos se registraron en 6 sitios por diente (mesio vestibular, medio vestibular, disto vestibular, mesio lingual, medio lingual, disto lingual) utilizando una sonda periodontal Carolina del Norte (Hu-Friedy). Se excluyó a los terceros molares de estas mediciones. El nivel de inserción clínico (NIC) fue evaluado determinando la distancia entre la unión amelocementaria y el fondo del surco/saco periodontal. La profundidad al sondaje (PS) fue determinada evaluando la distancia entre el margen gingival y el fondo del surco/saco periodontal. La medición de placa bacteriana (PB) fue evaluada determinando la presencia o ausencia de placa en 4 superficies dentarias a nivel del cuello dentario. El sangrado al sondaje (SS) fue evaluado determinando la presencia o ausencia de sangrado hasta 15 segundos después del sondaje periodontal.

Obtención de muestras de fluido gingival crevicular

Con el propósito de evaluar los niveles de TNF- α se tomaron muestras en fluido gingival crevicular (FGC) a los tiempos 0, 7, 14, 30 y 90 días post tratamiento periodontal. Para esto se utilizaron tiras de Periopaper las cuales fueron ubicadas por 30 segundos a nivel subgingival en 3 sitios de cada paciente en

sitios periodontales que mostraban una PS de 4 a 6 mm antes de la terapia periodontal. Las tiras se almacenaron en tubos Eppendorf y se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis. El volumen de fluido gingival crevicular fue medido utilizando un aparato Periotron que determina los cambios en la humectación de la tira de Periopaper en base a modificaciones en la conductancia eléctrica del papel (Ciantar & Caruana. 1998)

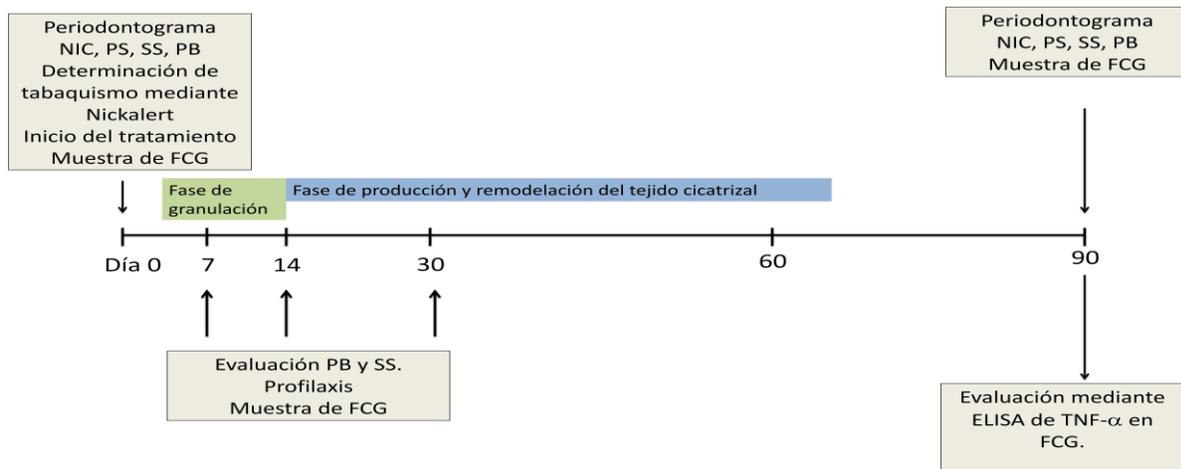
Terapia periodontal

Un operador realizó la terapia periodontal en todos los pacientes. Esta consistió en una sesión de educación en higiene oral, destartraje supra y subgingival y alisado radicular utilizando la modalidad de boca completa en una sola sesión. Se utilizaron curetas periodontales (Hu-Friedy) y un equipo de ultrasonido (Cavitron Bobcat). El tiempo promedio de tratamiento por cada paciente fue de 2,5 horas.

Determinación de los niveles de TNF- α

Los niveles relativos de la citoquina TNF- α se evaluaron utilizando fueron evaluados mediante un ensayo de ELISA (TNF- α Human Ultrasensitive ELISA Kit. Carlsbad, California. EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esquema 1. Diseño del estudio



Análisis estadístico

Todos los datos fueron incorporados a una planilla electrónica Excel y luego importados a Stata (Versión 11). Para el análisis de datos se utilizó el análisis estadístico de Shapiro Wilk, t de Student y Wilcoxon - Mann Whitney. Se comparó los valores de edad, género, NIC, PS, SS y PB entre los grupos de estudio. Se analizó los cambios en los niveles de NIC, PS, SS y PB antes y después de la terapia entre los grupos de fumadores y no fumadores. Los niveles de la citoquina TNF- α se analizaron mediante el test de Wilcoxon - Mann Whitney.

RESULTADOS

Se reclutaron 26 sujetos entre Marzo del 2010 y Noviembre del 2012. De este total, 23 individuos finalizaron el estudio mientras que 3 desertaron una vez iniciada la fase de terapia. La distribución final de individuos fue de 12 para el grupo de no fumadores y 11 para el grupo de fumadores. La adhesión al estudio fue de un 100% para el grupo de fumadores y de un 90% para los no fumadores.

Los datos demográficos de los pacientes incorporados al estudio se presentan en la tabla I. Ambos grupos tuvieron una distribución similar en género y edad y no hubo diferencias significativas en PS, NIC, SS y PB. Los fumadores declararon consumir en promedio 14,62 cigarrillos al día e indicaron un historial de tabaquismo de 26,1 años (promedio). Los no fumadores declararon no haber fumado nunca y 5 de ellos se reportaron como fumadores pasivos al vivir o trabajar a menos de 10 metros de personas fumadoras.

El promedio de los valores de cotinina salival (Nick Alert) detectado en fumadores fue de 4,63 mientras que en el grupo de no fumadores fue de 1,08.

Tabla I. Características demográficas y clínicas de los individuos reclutados para el estudio.

	No fumadores	Fumadores
Género (<i>Mujeres/Hombres</i>)	7M/5H	5M/6H
Edad (<i>años</i>)	47,1 (+-6,91)	47,6 (+-6,67)
Consumo de cigarrillos (<i>cigarrillos/día</i>)	-	14,62 (+-3,16)
Tiempo de consumo (<i>años</i>)	-	26,1 (+-15,17)
fumador pasivo (<i>n° de sujetos</i>)	5	-
Profundidad al sondaje (<i>mm</i>)	2,97 (+-0,34)	3,05 (+-0,35)
Nivel de inserción (<i>mm</i>)	2,88 (+-1,07)	3,63 (+-1,45)
Porcentaje superficie con placa bacteriana	86% (11)	90,1% (+- 11,7)
Porcentaje sitios que sangran al sondaje	63,4% (16,7)	51,7% (+-23,8)
Número de dientes perdidos	2,91 (1,67)	4,63 (2.9)

*Se indican los valores en promedio para cada una de las variables seguido por la desviación estándar.

En la tabla II se muestran las características clínicas de los individuos al inicio y luego de 90 días del estudio. Se observó una disminución en los parámetros inflamatorios en ambos grupos lo que es compatible con los efectos positivos del tratamiento periodontal. Se registraron reducciones en la PS, NIC, PB y SS en ambos grupos. Sin embargo, la magnitud de este cambio mostró diferencias al comparar ambos grupos entre sí.

Tabla II. Características clínicas de individuos fumadores y no fumadores antes y después de la terapia periodontal.

	No Fumadores			Fumadores	
	PRE	POST		PRE	POST
PS	2,97 (0,34)	2,01 (0,28)	PS	3,04 (0,35)	2,48 (0,21)
NIC	2,9 (1,07)	2,65 (0,85)	NIC	3,63 (1,45)	3,46 (1,41)
PB	86 (11)	33,2 (18,6)	PB	90,1 (11,7)	63,8 (20,5)
SS	63,4 (16,7)	31,5 (12)	SS	51,7 (23,8)	36,6 (11,5)

Se indican los valores promedio para cada una de las variables analizadas seguido de la desviación estándar. PS: Profundidad al sondaje, NIC: Nivel de inserción clínico, PB: Placa bacteriana, SS: Sangrado al sondaje

En la tabla III se muestra la magnitud del cambio en la respuesta clínica luego de la terapia periodontal en los grupos de individuos fumadores y no fumadores. En los pacientes no fumadores se observó una reducción en la PS de 0,96 mm mientras que este valor fue de 0,56 mm en los fumadores con una diferencia entre los grupos de 0,4 mm. En los pacientes no fumadores la ganancia de NIC fue de 0,25 mm mientras que en los fumadores fue de 0,17 mm, con una diferencia entre los grupos de 0,08 mm. La reducción de sitios con PB en los pacientes no fumadores fue de 52,8%, mientras que en los pacientes fumadores fue de 26,3%, con una diferencia entre los grupos de 26,5%. La reducción del sangrado al sondaje en pacientes no fumadores fue de 31,9% mientras que en fumadores fue de 15,1%, con una diferencia entre los grupos de 16,8%.

Tabla III. Cambios en las características clínicas antes y después de la terapia entre fumadores y no fumadores.

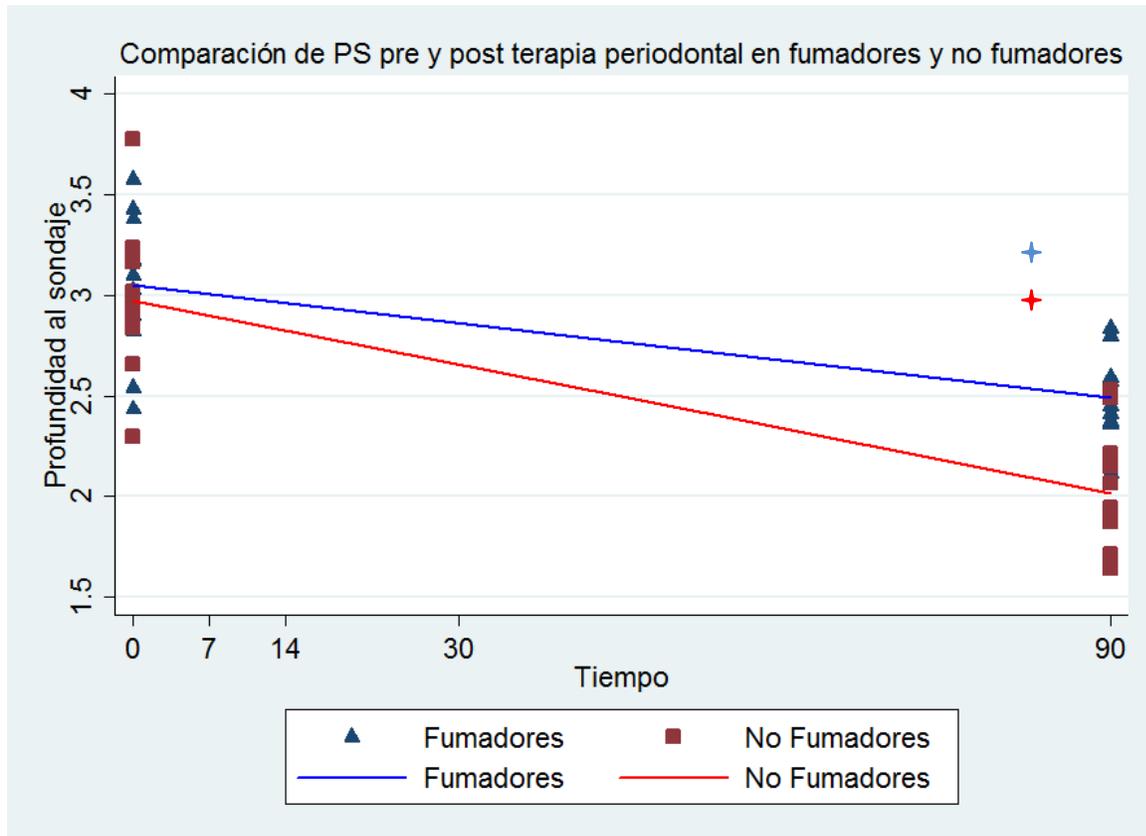
	No Fumadores	Fumadores
ΔPS	0,96 (0,06)	0,56 (0,14)
ΔNIC	0,25 (0,22)	0,17 (0,04)
ΔPlaca bacteriana	52,8 (7,6)	26,3 (8,8)
ΔSangrado al sondaje	31,9 (4,7)	15,1 (12,3)

Se indican los valores promedio para cada una de las variables clínicas seguido de la desviación estándar. PS: Profundidad al sondaje, NIC: Nivel de inserción clínico

Profundidad al sondaje

Las variaciones en la PS se grafican en la figura 1. Para esta variable se observó una reducción significativa tanto en el grupo de individuos fumadores como en no fumadores. Para los no fumadores la PS cambió de 2,97 a 2,01 mm luego de la sesión de terapia periodontal obteniéndose una reducción significativa de 0,96 mm ($p=0,00001$ IC=0,77 – 1,13). Para los fumadores el

valor promedio de PS cambió de 3,04 mm a 2,48mm observándose una reducción significativa de 0,56mm ($p=0,0001$ IC=0,35 – 0,78).



† Diferencia estadística en grupo fumador, † no fumador, † entre los grupos.

Figura 1. Variaciones en la profundidad al sondaje antes y después de la terapia periodontal. Se grafican los valores promedio de profundidad al sondaje al antes de la terapia y luego de 90 días luego de la sesión de tratamiento periodontal.

Nivel de inserción clínico

Al cuantificar los cambios en el NIC se observó en el grupo de individuos no fumadores un valor promedio inicial de 2,9 mm que luego de la terapia disminuyó a 2,65 mm obteniéndose una ganancia significativa en el NIC de 0,25 mm en el periodo de estudio ($p=0,0058$ IC=0,06 – 0,44) (Figura 2). Para los individuos fumadores el valor promedio de NIC cambió de 3,63 a 3,46 mm obteniéndose una ganancia significativa en el nivel de inserción clínico de 0,17 mm en el periodo de estudio ($p=0,0292$ IC=0,04 – 0,70).

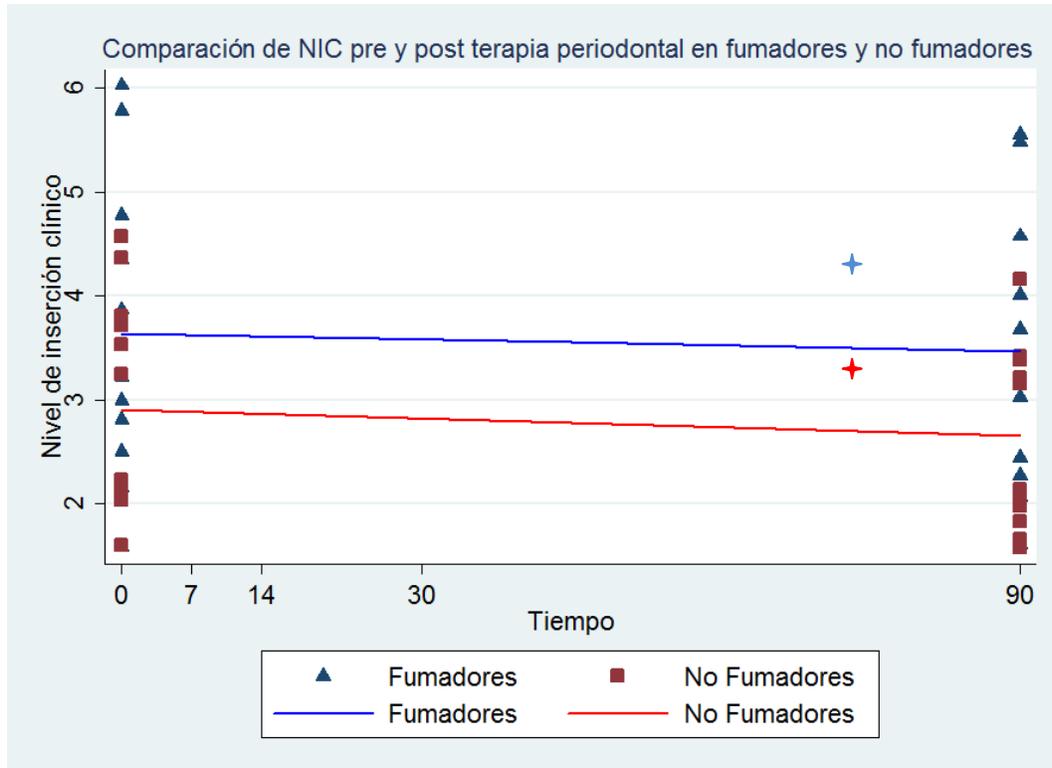


Figura 2. Cambios en los valores promedio de nivel de inserción clínico antes y después de la terapia periodontal. Se grafican los valores promedio de nivel de inserción clínico antes de la terapia y luego de 90 días luego de la sesión de tratamiento periodontal.

Sangrado al sondaje

En la figura 3 se muestran los valores promedio de SS a lo largo del estudio. Para ambos grupos se observó una disminución significativa en el porcentaje de

sitios sangrantes desde el tiempo 0 hasta los 14 y 30 días luego de la terapia periodontal. Se registró una reducción en el SS de 8,55% ($p=0,0141$ IC=1,12 – 15,97) para los fumadores y de 7,96% ($p=0,0091$ IC=1,66 – 14,26) para los no fumadores. Al comparar la proporción de sitios que sangran al sondaje a los tiempos 0 y 90 se observó una disminución de este parámetro tanto en pacientes fumadores como no fumadores. En el caso de los no fumadores fue de un 31,81% ($p=0,0001$ IC=18,87 – 44,75) y en el de fumadores fue de un 15,99% ($p=0,0079$ IC=3,8 – 28,18).

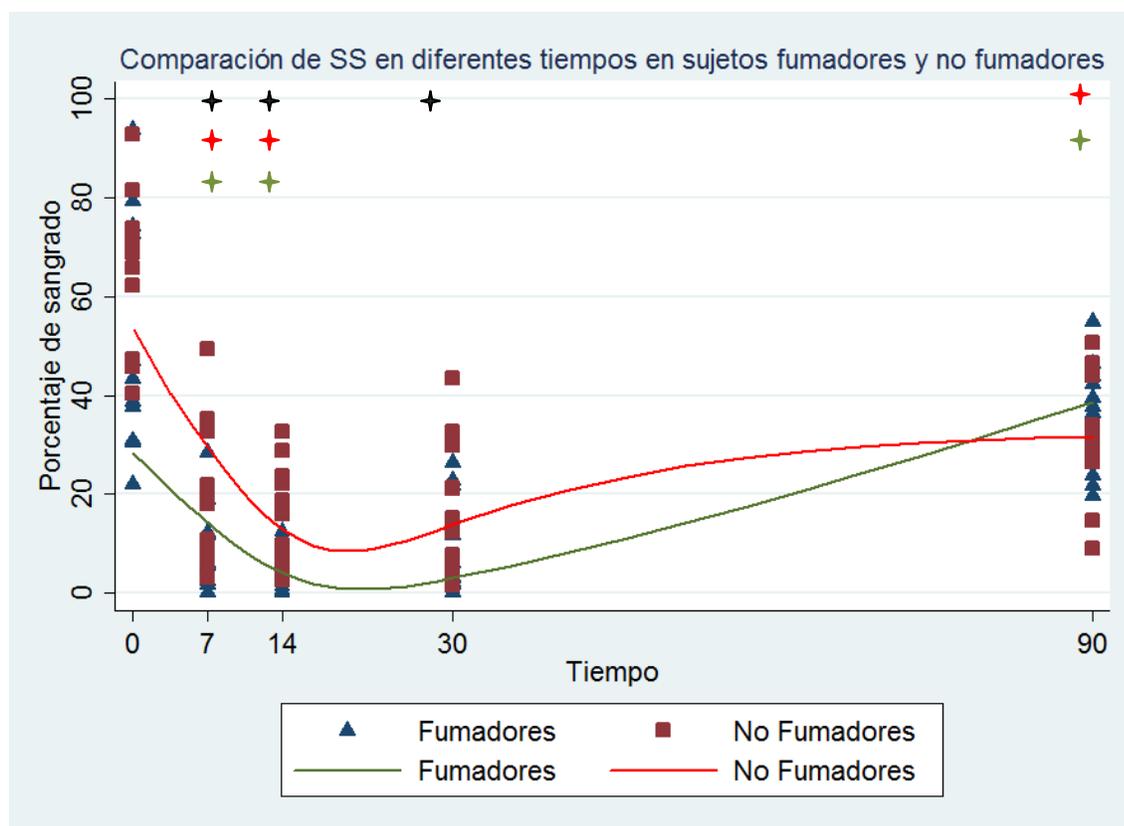


Figura 3. Cambios en los valores promedio de sangrado al sondaje a lo largo del estudio. Se grafican los valores promedio de sangrado al sondaje a los tiempos 0, 7, 15, 30 y 90 días luego de la sesión de terapia periodontal.

Placa Bacteriana

Para ambos grupos de individuos fumadores y no fumadores se observó una reducción significativa en los niveles de placa bacteriana al comparar el tiempo 0 con el tiempo 7 registrándose una reducción de 56,6% de reducción para fumadores ($p=0,00001$ IC=39 – 74,27) y 56,3% para no fumadores ($p=0,00001$ IC=44,3 – 68,3) (Figura 4). Los niveles de PB siguieron bajando para el grupo de no fumadores entre los días 7 y 14 ($p=0,0325$ IC=-0,79 – 22,2). Sin embargo, este efecto no se replicó para los individuos fumadores ($p=0,1220$ IC=-5,02 – 17,36). Al comparar los tiempos 0 y 90 se observó una disminución significativa en la proporción de sitios con placa bacteriana en pacientes no fumadores (51,58%; $p=0,00001$ IC=38,12 – 65,04) y fumadores (25,41%; $p=0,0051$ IC=7,65 – 43,17). Es importante destacar que al tiempo 90 la proporción de sitios con placa fue un 33,89% superior en pacientes fumadores con respecto a no fumadores ($p=0,0041$ IC=-56,65 – -11,14).

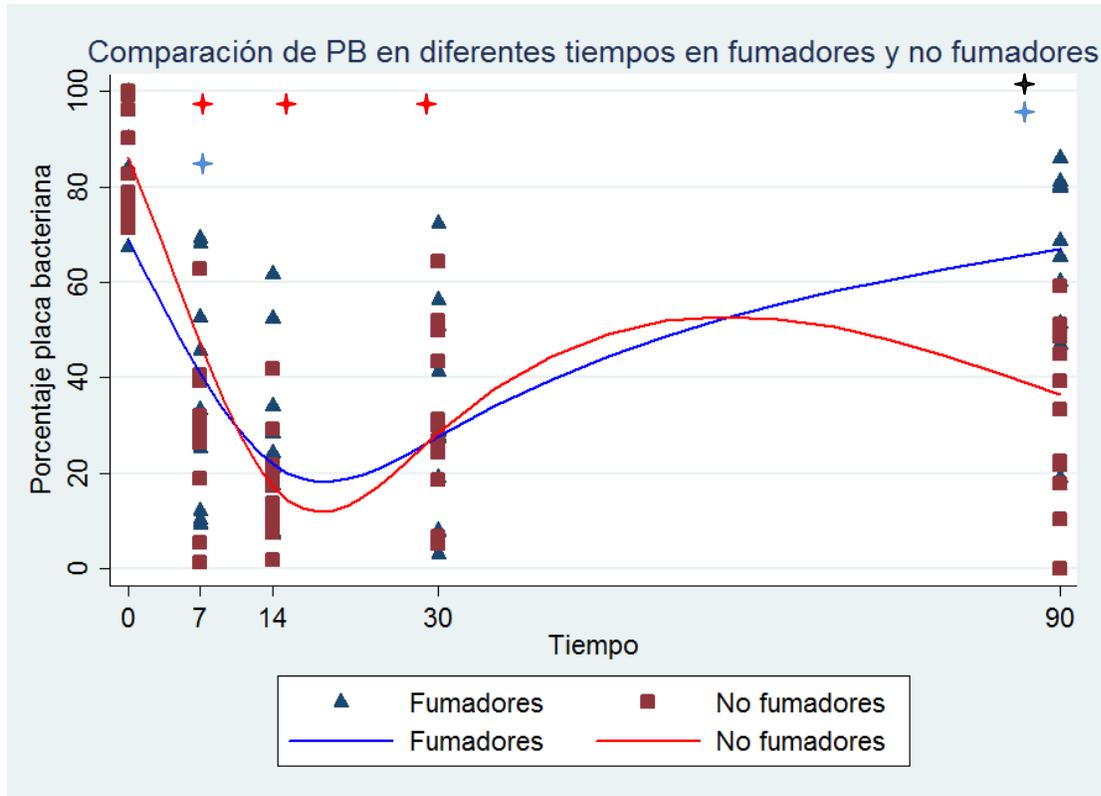


Figura 4. Cambios en los niveles de placa bacteriana a lo largo del estudio.

Se registran los valores promedio de porcentaje de sitios con placa bacteriana a los tiempos 0, 7, 14, 30 y 90 días.

Volumen de fluido gingival crevicular

Al inicio del estudio (tiempo 0) el volumen promedio de FGC fue similar para fumadores (0,54 μ L) y no fumadores (0,61 μ L) ($p=0,5957$ IC=-0,16 – 0,26) (Figura 5). Durante los diferentes tiempos del estudio se observó una reducción

del volumen de FGC para los pacientes no fumadores, situación que no ocurrió para los no fumadores. Al finalizar el estudio (tiempo 90) y compararlo con el tiempo 0 el volumen de FGC promedio para los no fumadores fue de 0,136 μL ($p=0,0332$ IC=-0,01 – 0,28) y de 0,225 μL para los fumadores ($p=0,0033$ IC=0,07 – 0,37).

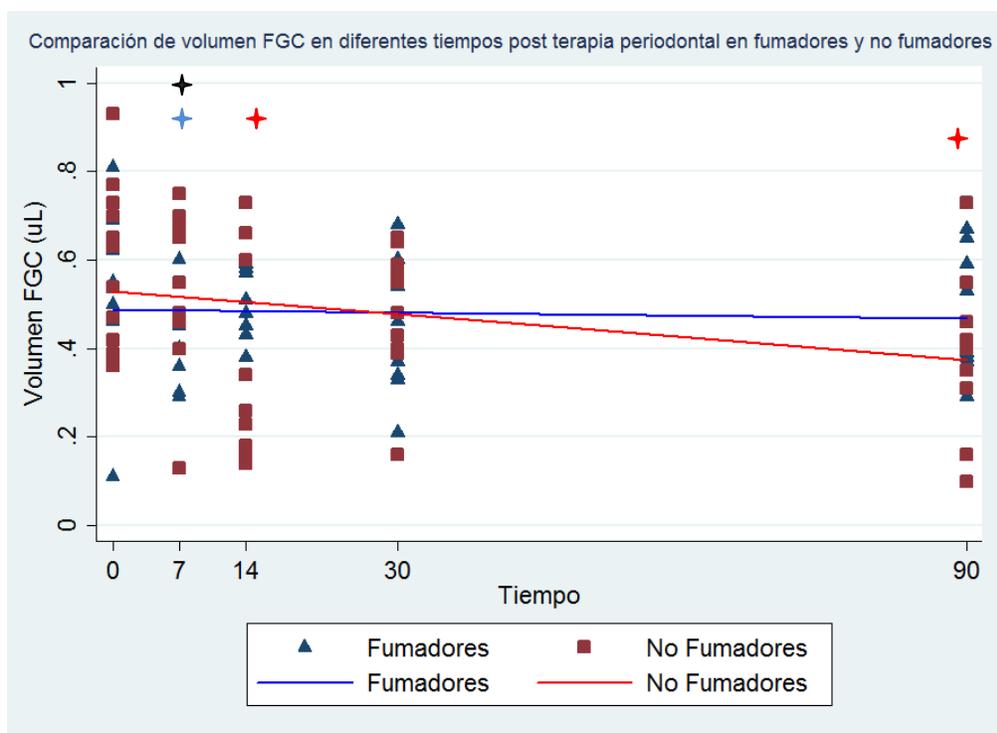


Figura 5. Volumen de fluido gingival crevicular a lo largo del estudio. Se registran los valores promedio de volumen de FGC a los tiempos 0, 7, 14, 30 y 90 días para los grupos de individuos fumadores y no fumadores.

TNF- α

Las mediciones de TNF- α en el FGC mostraron un valor promedio de 364,83 pg/mL en no fumadores y 1370,33 pg/mL en fumadores ($p=0,0013$ IC=-1469,75 – -541,24) (Figura 6). Se observó una reducción significativa en el promedio de esa concentración a lo largo del estudio siendo estas concentraciones similares para ambos grupos.

A continuación se describen los datos de la medición de TNF- α en el fluido crevicular para cada uno de los tiempos evaluados.

En el tiempo 7 se observó en los pacientes no fumadores un promedio de 686 pg/ml de TNF- α observándose un incremento significativo respecto al tiempo anterior ($p=0.03$). En los pacientes fumadores se observó un promedio de 304,05 pg/ml de TNF- α observándose una disminución significativa respecto al tiempo anterior ($p=0,0196$).

En los tiempos 14 y 30 post terapia no se observaron diferencias significativas en los niveles de TNF- α .

En el tiempo 90 el nivel de TNF- α en el grupo de pacientes no fumadores fue de 308 pg/ml y en fumadores de 461,25 pg/ml; observándose un incremento no significativo en ambos grupos ($p=0,0641$ y $0,3725$ respectivamente). Entre los

grupos, no se observó una diferencia significativa en el nivel de TNF- α ($p=0,1649$).

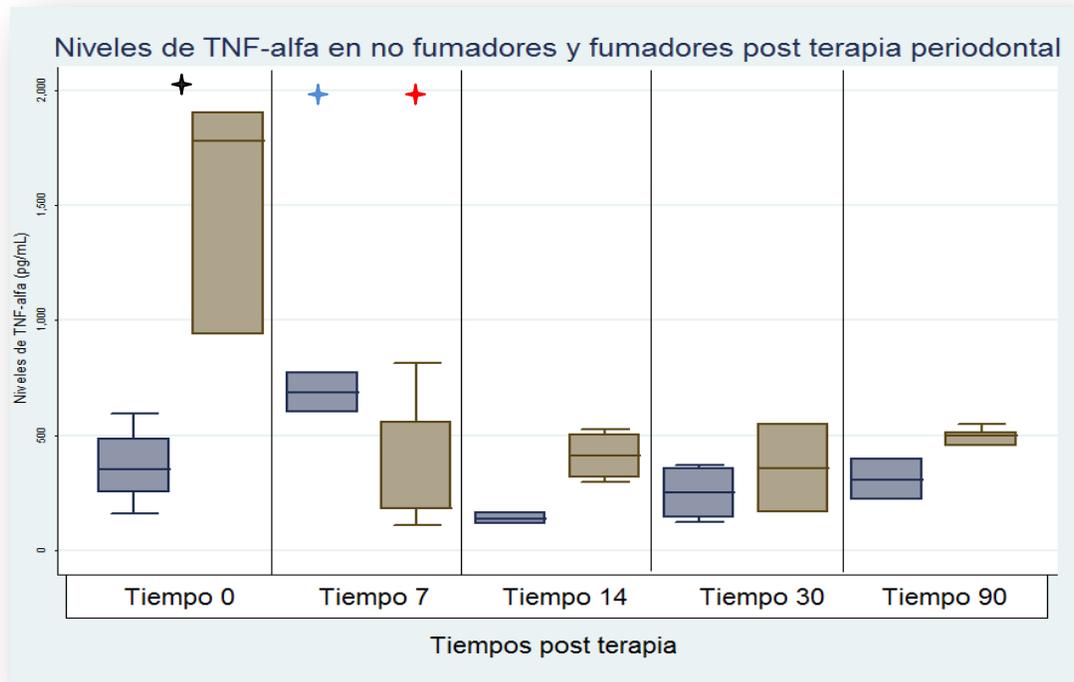


Figura 6. Niveles de TNF- α en FGC a lo largo del estudio. Se grafican los valores promedio y desviación estándar de TNF- α para pacientes fumadores (café) y no fumadores (azul) a los tiempos 0, 7, 14, 30 y 90 días luego de la terapia periodontal.

DISCUSIÓN

El presente estudio analizó la respuesta a la terapia periodontal no quirúrgica en pacientes fumadores y no fumadores. Se evaluó además la concentración de la citoquina TNF- α antes, durante y después de la terapia periodontal como un posible modulador de la reparación periodontal durante la fase de cicatrización del tejido. Se observó una mejoría en los parámetros clínicos periodontales a lo largo del estudio registrándose una reducción en la profundidad al sondaje y una disminución en el sangrado al sondaje luego de la terapia periodontal. Paralelamente se observó una ganancia de inserción clínica para ambos grupos de individuos fumadores y no fumadores al finalizar el estudio. Sin embargo, el grupo de pacientes fumadores registró una menor reducción en la profundidad al sondaje y una menor ganancia en los niveles de inserción clínica. Esta respuesta es similar a los resultados reportados en diversos estudios clínicos (Needleman *et al.*, 2007. Apatzdiou *et al.*, 2005. Darby *et al.*, 2005) y es coincidente con los resultados de la presente tesis. Una observación importante fue que los pacientes fumadores presentaron un peor control de placa en comparación con los no fumadores, lo que puede haber explicado, al menos en parte, la reparación deficitaria en este grupo de individuos. Por otro lado, los individuos fumadores presentaron una mayor concentración de TNF- α en el FGC al inicio del tratamiento. Sin embargo, los niveles de esta citoquina se

redujeron luego de la terapia periodontal de manera similar para ambos grupos y se mantuvieron constantes hasta los 90 días.

Nivel de inserción clínico

En el presente estudio el grupo de fumadores presentó en promedio 0,73 mm más de pérdida de inserción clínica en comparación con el grupo de no fumadores. Este resultado es concordante con el estudio de Grossi *et al.* (1994) que reportó mayor pérdida de inserción clínica en fumadores. Luego de la terapia periodontal se obtuvo una mayor ganancia de inserción clínica en no fumadores (0,25 mm) comparado con los fumadores (0,17 mm). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Estos valores son coincidentes con una revisión sistemática que evaluó 6 estudios en los cuales se reportó una ganancia de NIC favorable a los pacientes no fumadores (0.116 mm), pero que no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (Labriola *et al.*, 2005).

Sangrado al sondaje.

Una observación interesante fue la detección de un alto porcentaje de sitios con sangrado al sondaje antes del tratamiento en pacientes fumadores. Needleman *et al.* (2007) reportaron un resultado similar al no observar diferencias significativas en el sangrado al sondaje entre pacientes fumadores y no

fumadores. Por otro lado, al finalizar el estudio (tiempo 90) no se observaron diferencias en el sangrado al sondaje entre individuos fumadores y no fumadores. La revisión sistemática de Labriola *et al.* ha sugerido que antes de la terapia periodontal los fumadores presentan un menor sangrado al sondaje en comparación con los no fumadores. La misma conclusión obtuvo la investigación de Bergström *et al.* registrando al inicio del estudio una menor proporción de sitios que sangraban al sondaje en fumadores (Bergström *et al.*, 2001). Esta diferencia entre el presente estudio y los reportados por Labriola *et al.* (2005) y Bergström *et al.* (2001) se podrían deber un mayor nivel de placa observado en este estudio. Los mayores niveles de placa en el presente estudio podrían generar un incremento en el sangrado al sondaje que iguale o asemeje las respuestas de fumadores y no fumadores.

Placa bacteriana

Respecto al control de placa es necesario indicar que estudios previos han reportado resultados similares donde el grupo de fumadores después de 6 meses de seguimiento presentó mayores nivel de placa bacteriana comparado con los no fumadores (Müller *et al.*, 2002). Este mayor nivel de exposición a placa puede haber influido negativamente en la respuesta a la terapia periodontal observada en el presente estudio en el caso de los individuos fumadores. Es necesario considerar que en este estudio los pacientes se

mantuvieron con sesiones de control de placa profesional a los 7,14 y 30 días. Es posible que los mayores niveles de placa bacteriana en pacientes fumadores se debieron a un peor cumplimiento de estos o a algún efecto del tabaquismo sobre la formación de biofilm.

Profundidad al sondaje

La profundidad al sondaje inicial observada en fumadores fue superior comparada con los no fumadores (0,07mm) y la reducción a la PS después de la terapia periodontal fue un 42% menos en fumadores respecto a los no fumadores. Lo anterior es coincidente con estudios que han propuesto que los pacientes fumadores presentan mayores PS antes de la terapia periodontal y que el cigarrillo influye negativamente en el proceso de cicatrización después de la terapias no quirúrgicas (Preber et al., 1986. Renvert et al., 1998. Jin et al., 2000). La menor respuesta a la terapia obtenida en el presente estudio resulta concordante con la menor reducción de profundidad al sondaje obtenida en fumadores en la revisión sistemática de Labriola et al (2005).

Volumen de FGC

El volumen de FGC ha sido asociado al estado de inflamación de los tejidos periodontales, donde un incremento en el volumen se vincula a una mayor severidad de la inflamación periodontal (Løe & Holm-Pedersen, 1965). En este

estudio el volumen de FGC fue menor para el grupo de fumadores al inicio del estudio. Esto ha sido reportado en otros estudios debido a los efectos del tabaco sobre la microvasculatura gingival y la subsecuente menor producción de FGC (Morozumi et al., 2004) Una vez aplicada la terapia periodontal el volumen de FGC se redujo para ambos grupos lo que es compatible con una reducción del exudado inflamatorio asociado a la terapia periodontal (Gomes et al., 2009). A los 90 días se registró un menor volumen de FGC en no fumadores. Esto se podría explicar por la mayor desinflamación de los tejidos periodontales asociada a menores niveles de placa bacteriana y ausencia del hábito de fumar. Es importante destacar que existe discrepancia respecto a si existen diferencias en el volumen de FGC entre fumadores y no fumadores (Üstün & Alptekin, 2007. Mokeem et al., 2014). Estudios de Üstün & Alptekin (2007) reportan que al inicio del estudio existe mayor volumen de FGC en fumadores. Otro estudio de Mokeem et al. (2014) reporta que el volumen de FGC es significativamente menor en fumadores respecto a los no fumadores.

TNF- α

El grupo de fumadores presentó mayores niveles de TNF- α antes de la terapia periodontal en comparación con los no fumadores. Un resultado similar fue reportado por Boström *et al.* (1998) al evaluar pacientes fumadores y ex fumadores antes de la terapia periodontal donde se obtuvo que ambos grupos

de pacientes presentaban niveles elevados de TNF- α . Por otro lado, Petrescu et al. (2010) indicó que los niveles de TNF- α son dependientes del número de cigarrillos consumidos por día. Estos datos favorecen la idea que el tabaquismo estimule la respuesta inflamatoria en el periodonto y esto se refleje en mayores niveles de esta citoquina en el FGC. Es importante destacar que luego de la terapia periodontal se observó una reducción en los niveles de TNF- α en el FGC de similar magnitud para fumadores y no fumadores. Es posible que los niveles de desinflamación logrados en este estudio hayan permitido reducir los niveles de la citoquina TNF- α en ambos grupos. Estos datos permiten concluir que la citoquina TNF- α no tendría un efecto diferencial en los tejidos en cicatrización y probablemente no permitiría explicar la menor capacidad de cicatrización periodontal en pacientes fumadores.

Fumadores pasivos

En el estudio hubo 5 pacientes fumadores pasivos, que a pesar que auto-reportaron no consumir cigarrillos, estaban expuestos al humo del tabaco a menos de 10 metros dentro de su grupo familiar o en su trabajo. Resultados del NHANES III, indica que los pacientes no fumadores pero que están sometidos a un ambiente con humo de cigarro tenían 1.6 veces más riesgo de desarrollar periodontitis respecto a los que no estaban expuestos al ambiente con humo. Un estudio reciente indica que ser fumador pasivo no está relacionado con el

desarrollo de periodontitis utilizando como variable diagnóstica al menos 1 sitio con profundidad al sondaje mayor a 3.5mm (Tanaka *et al.*, 2013). Es importante destacar que el presente estudio utilizó un test semi-cuantitativo para medir los niveles de cotinina a nivel salival. Needleman *et al.* (2007) reportó que el uso de mediciones basales de consumo de cigarrillos por día y número de años de consumo son imprecisas y presentan una elevada tendencia al error, lo que hace su uso poco confiable. Needleman *et al.* (2007) propone el uso de mediciones de cotinina salival para estudios en fumadores puesto que refleja de manera más precisa el hábito de consumo diario de tabaco. En este sentido el presente estudio logró una adecuada evaluación del hábito de fumar.

Conclusiones

Este estudio permitió reproducir los resultados de estudios previos que han demostrado una menor capacidad de reparación periodontal en fumadores. Nuestros resultados muestran además que esta menor capacidad de cicatrización se podría deber a un peor control de placa observado en fumadores. Por otro lado, el humo de cigarrillo puede tener efectos deletéreos en diferentes aspectos de la cicatrización tales como la síntesis de colágeno, diferenciación de miofibroblastos y migración celular entre otras (Silva *et al.* 2012). El presente estudio sólo mostró diferencias en los niveles de TNF- α en el FGC al inicio del estudio (antes de la terapia). Sin embargo, la terapia

periodontal redujo los niveles de esta citoquina por igual para fumadores y no fumadores. Un análisis cuadrático de estos datos (no mostrado en los resultados de la tesis) sugirió que los niveles de esta citoquina tendrían una tendencia a elevarse entre los días 30 y 90 luego de la terapia en el grupo de fumadores. Este efecto podría ser evaluado utilizando un mayor número de pacientes o tomando un mayor número de muestras/sitios de FGC.

Los resultados del presente estudio permiten concluir que el peor control de placa bacteriana y la exposición al humo de tabaco podrían explicar la menor capacidad de cicatrización periodontal en pacientes fumadores.

RESUMEN

En el presente estudio de cohorte concurrente se reclutaron 11 pacientes fumadores y 12 pacientes no fumadores con periodontitis. Se registró el nivel de inserción clínica (NIC), profundidad al sondaje (PS), sangramiento al sondaje (SS), placa bacteriana (PB) en todos los pacientes. Los pacientes fueron tratados mediante terapia periodontal no quirúrgica en una sola sesión y se tomarán muestras de fluido crevicular gingival (FCG) a los tiempos 0, 7, 14, 30 y 90 días post tratamiento con el fin de evaluar los niveles de TNF-a durante las diferentes etapas de la reparación periodontal. Los niveles de TNF-a fueron evaluados mediante un ensayo de ELISA en las muestras eluidas desde el FCG.

En los pacientes no fumadores se observó una reducción significativa en la PS de 0,96 mm mientras que este valor fue de 0,56 mm en los fumadores con una diferencia entre los grupos de 0,4 mm. En los pacientes no fumadores la ganancia de NIC fue de 0,25 mm mientras que en los fumadores fue de 0,17 mm, con una diferencia entre los grupos de 0,08 mm. La reducción de sitios con PB en los pacientes no fumadores fue de 52,8%, mientras que en los pacientes fumadores fue de 26,3%, con una diferencia entre los grupos de 26,5%. La reducción del sangrado al sondaje en pacientes no fumadores fue de 31,9% mientras que en fumadores fue de 15,1%, con una diferencia entre los grupos

de 16,8%. Las mediciones iniciales de TNF-a en el FGC mostraron un valor promedio de 364,83 pg/mL en no fumadores y 1370,33 pg/mL en fumadores. Se observó una reducción significativa en el promedio de esa concentración a lo largo del estudio siendo estas concentraciones similares para ambos grupos.

Los resultados del presente estudio permiten concluir que el peor control de placa bacteriana y la exposición al humo de tabaco podrían explicar la menor capacidad de cicatrización periodontal en pacientes fumadores.

REFERENCIAS

Abbas Abul K, Pillai Shiv. Cellular and Molecular Immunology. 5th Edition. Editorial Elsevier. 2004. 243 – 255.

Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwarf KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. Journal of Clinical Periodontology 1994; 21: 91 – 97.

Arancibia R, Oyarzun A, Silva D, Tobar N, Martinez J, Smith PC. TNF- α inhibits TGF- β -stimulated myofibroblastic differentiation and extracellular matrix production in human gingival fibroblast. Journal of Periodontology 2012; 84: 683 – 693.

Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. Journal Clinical Periodontology 2005; 32: 973 – 983.

Aukhil I. Biology of wound healing. Periodontology 2000 2000; 22: 44 – 50.

Barbour S.E, Nakashima K, Zhang JB, Tangada S, Hahn CL, Schenkein HA, Tew JG. Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host

response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Critical Reviews Oral Biology and Medicine* 1997; 8: 437 – 460.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 2008; 16: 585 – 601.

Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000 2006; 40: 29 – 49.

Bergström J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology* 2004; 92: 1 – 8.

Boström L, Linder LE, Bergström J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 1998; 25: 767 – 773.

Ciantar M, Caruana DJ. Periotron 800: calibration characteristic and reliability. *Journal of Periodontal Research* 1998; 33: 259 – 264.

Chambrone L, Chambrone D, Pustiglioni FE, Chambrone LE, Lima LA. The influence of tobacco smoking on the outcomes achieved by root-coverage procedures. A systematic review. *Journal of the American Dental Association* 2009; 140: 294 – 306.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. *Journal Clinical Periodontology* 2005; 32: 200 – 206.

Ding YS, Zhang L, Jain RB, Jain N, Wang RY, Ashly DL. Levels of tobacco-specific nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from different tobacco varieties. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2008; 17: 3366 – 3371.

Frank S, Madlener M, Werner S. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 10188 – 10193.

Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I, Aranda W, Carvajal P, Arteaga O. Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of Periodontology* 2010; 81: 1403 – 1410.

Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Marcantonio RA. The effect of smoking on gingival crevicular fluid volume during the treatment of gingivitis. *Acta Odontologica Latinoamericana* 2009; 22: 201 – 206.

Gonzalez R, Arancibia R, Cáceres M, Martínez J, Smith PC. Cigarette smoke condensate stimulates urokinase production through the generation of reactive

oxygen species and activation of the mitogen activated protein kinase pathways in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 2009; 44: 386 - 394.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology* 1994; 65: 260 – 267.

Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127: 2645 – 2655.

Häkkinen L, Uitto V-J, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology* 2000 2000; 24: 127 – 152.

Jin L, Wong KY, Leung WK, Corbet EF. Comparison of treatment response patterns following scaling and root planning in smokers and non-smokers with untreated adult periodontitis. *Journal of Clinical Dentistry* 2000; 11: 35 – 41.

Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontology* 2000 2007; 44: 178 – 194.

Labriola A, Needleman I, Moles DR. Systematic review of the effect of smoking on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology 2000* 2005; 37: 124 – 137.

Lang N, Lindhe J. *Periodontology and implant dentistry* 2008; 5: 830.

Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette Smoking and Inflammation: Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of Dental Research* 2012; 91: 142 – 149.

Löe H, Holm-Pedersen P. Absence and Presence of Fluid from Normal and Inflamed Gingivae. *Periodontics* 1965; 149: 171 – 177.

Mailhot JM, Schuster GS, Garnick JJ. Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF-beta 1 stimulation. *Journal of Clinical Periodontology* 1995; 22: 679 – 685.

Morozumi T, Kubota T. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology* 2004; 31: 267 – 272.

Mokeem SA, Vellappally S, Preethanath RS, Hashem MI, Al-Kheraif AA, Anil S. Influence of smoking on clinical parameters and gingival crevicular fluid volume in patients with chronic periodontitis. *Journal of Oral Health and Dental Management* 2014; 13; 469 – 473.

Müller HP, Stadermann S, Heinecke A. Longitudinal association between plaque and gingival bleeding in smokers and non-smokers. *Journal Clinical Periodontology* 2002; 29: 287 – 294.

Needleman I, Suvan J, Gilthorpe MS, Tucker R, St George G, Giannobile W, Tonetti M, Jarvis M. A randomized-controlled trial of low-dose doxycycline for periodontitis in smokers. *Journal Clinical Periodontology* 2007; 34: 325 – 333.

Offenbacher S, Barros SP, Beck James. Rethinking periodontal inflammation. *Journal of Periodontology* 2008; 79: 1577 – 1584.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32: 180 – 195.

Patel RA, Wilson RF, Palmer RM. The effect of smoking on periodontal bone regeneration: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology* 2012; 83: 143 – 155.

Petrescu F, Voican SC, Silosi I. Tumor necrosis factor- α serum levels in healthy smokers and non smokers. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2010; 5: 217 – 222.

Polimeni G, Xiropaidis A, Wikesjö U. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology 2000* 2006; 41: 30 – 47.

Preber H, Bergström J. Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1986; 94: 102 – 108.

Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontology 2000* 2007; 43: 267 – 277.

Renvert S, Dahlén G, Wikström M. The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. *Journal of Clinical Periodontology* 1998; 25: 153 – 7.

Shaw T, Martin P. Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science* 2009; 122: 3209 – 3213.

Silva CO, Ribeiro Edel P, Sallum AW, Tatakis DN. Free gingival grafts: graft shrinkage and donor-site healing in smokers and non-smokers. *Journal of Periodontology* 2010; 81: 692 – 701.

Silva D, Cáceres M, Arancibia R, Martínez C, Martínez J, Smith PC. Effects of cigarette smoke and nicotine on cell viability, migration and myofibroblastic differentiation. *Journal of Periodontal Research* 2012; 47: 599 - 607.

Smith PC, Guerrero J, Tobar N, Cáceres M, González MJ, Martínez J. Tumor necrosis factor-alpha-stimulated membrane type 1-matrix metalloproteinase production is modulated by epidermal growth factor receptor signaling in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* 2009; 44: 73 - 80.

Tanaka K, Miyake Y, Hanioka T, Arakawa M. Active and passive smoking and prevalence of periodontal disease in young Japanese women 2013. *Journal of Periodontal Research*; 48: 600 – 605.

Toker H, Akpınar A, Aydın H, Poyraz O. Influence of smoking on interleukin-1beta level, oxidant status and antioxidant status in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients before and after periodontal treatment. *Journal of Periodontal Research* 2012; 47: 572 – 577.

Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Periodontology* 2000 2000; 71: 743 – 751.

Tomasek J, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown R. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nature* 2002; 3: 349 – 363.

Tonnetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Annals of Periodontology*. 1998; 3: 88 – 101.

Üstün K, Alptekin N. The effect of tobacco smoking on gingival crevicular fluid volume. *European Journal of Dentistry*. 2007; Vol.1: 236 - 239

Verrecchia F, Pessah M, Atfi A, Mauviel A. Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *Journal Biological Chemistry* 2000; 275: 30226 – 30231.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation* 2003; 10: 45 – 65.

Witschi H. Carcinogenic activity of cigarette smoke gas phase and its modulation by beta-carotene and N-acetylcysteine. *Toxicological Science* 2005; 84: 81 – 87.

World Health Organization. Report on the global tobacco epidemic. 2011.

Zhang K, Garner W, Cohen L, Rodriguez J, Phan S. Increased types I and III collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA and protein in hypertrophic burn scar. *Journal of Investigative Dermatology* 1995; 104: 750 – 754.

Anexo 1.

Protocolo ELISA para medir TNF- α

Preparación de muestras

Añadir 100 μ L de buffer de dilución estándar a cada tubo Eppendorf con las muestras de Periopaper.

Centrifugar a 800 RPM a 4°C por 1 hora. Esto permite que el fluido gingival crevicular contenido en los Periopaper se mezcle con el buffer de dilución estándar.

Centrifugar a 13.200 RPM a 4°C por 5 minutos. Esto permite que restos de fluido gingival crevicular que quedan en el Periopaper se terminen de mezclar con el buffer de dilución estándar.

Reconstitución y dilución de HU TNF- α US Standard

Reconstituir el estándar de TNF- α liofilizado con 1.2ml de buffer de dilución estándar. Mezclar frasco energicamente y luego dejar 10 minutos en reposo para obtener una completa reconstitución. Esto permite obtener una concentración de 380 pg/ml de TNF- α . Usar el estándar reconstituido de TNF- α antes de 1 hora de la reconstitución.

Realizar la dilución seriada del estándar reconstituido de TNF- α . Añadir 0.050 ml de estándar reconstituido de TNF- α en un tubo con 0.550 ml de buffer de dilución estándar. Esto obtendrá una concentración de 32 pg/ml de TNF- α , este será el tubo #1. Se recomienda utilizar tubos de vidrio para evitar que se adhieran TNF- α a las paredes. Este procedimiento permitirá confeccionar la curva estándar.

Añadir 300 μ l de buffer de dilución estándar a los restantes tubos marcándolos con los números #2 (16), #3 (8), #4(4), #5(2), #6 (1), #7 (0.5), #8 (0.25), #9 (0)

En el tubo #1 se tiene 600 μ m/l a una concentración de 32 pg/ml que se vortexea por 8 segundos.

Se toma 300 μ m/l del tubo #1 y se depositan en 300 μ m/l de buffer de dilución estándar en el tubo #2, obteniéndose una concentración de 16 pg/ml.

Se toma 300 μ m/l del tubo #2 y se deposita en 300 μ m/l de buffer de dilución estándar en el tubo #3, obteniéndose una concentración de 8 pg/ml.

Se toma 300 μ m/l del tubo #3 y se deposita en 300 μ m/l de buffer de dilución estándar en el tubo #4, obteniéndose una concentración de 4 pg/ml.

Se toma 300 μ m/l del tubo #4 y se deposita en 300 μ m/l de buffer de dilución estándar en el tubo #5, obteniéndose una concentración de 2 pg/ml.

Se toma 300 $\mu\text{m/l}$ del tubo #5 y se deposita en 300 $\mu\text{m/l}$ de buffer de dilución estándar en el tubo #6, obteniéndose una concentración de 1 pg/ml.

Se toma 300 $\mu\text{m/l}$ del tubo #6 y se deposita en 300 $\mu\text{m/l}$ de buffer de dilución estándar en el tubo #7, obteniéndose una concentración de 0.5 pg/ml.

Se toma 300 $\mu\text{m/l}$ del tubo #7 y se deposita en 300 $\mu\text{m/l}$ de buffer de dilución estándar en el tubo #8, obteniéndose una concentración de 0.25 pg/ml.

El tubo #9 solo contiene 300 $\mu\text{m/l}$ de buffer.

Descartar el remanente estándar reconstituido de TNF- α y guardar frasco de buffer de dilución estándar a 4°C.

Placa multipocillo

Luego sobre la placa multipocillo se añade 50 μl de buffer de incubación en cada pocillo.

Se añade 50 μl de los tubos #1 al #8 en cada pocillo de la primera fila por duplicado.

Luego sobre la placa multipocillo se añade 50 μl de buffer de dilución estándar en cada pocillo.

Se añade 50 µl de cada tubo Eppendorf con la muestra en cada pocillo por duplicado.

Añadir 50 µl de conjugado de Biotina en cada pocillo, cubrir e incubar por 2 horas a 37° C.

Dilución con solución de trabajo Streptavidina – HRP

Se aspira y se lava 4 veces.

Se incuba agregando 100 µl de solución de trabajo de Streptavidina – HRP (una proteína unida covalentemente a la enzima peroxidasa de rábano picante que permite la unión biotina-streptavidina) y se deja 30 minutos. Esta solución es viscosa debido a que presenta 50% de glicerol, por lo que recomienda adecuarla a temperatura ambiente y mezclarla previamente. Pipetear lentamente y remover los excesos de la punta de la pipeta con un papel seco absorbente.

Se aspira y se lava 4 veces.

Adición de sustrato fluorogénico

Reconstitución de la solución stock Amplex Ultrared

Se toma 10 mM de solución Amplex Ultrared y se añade 340 μ L de DMSO. Se vortexea. Proteger de la luz y la humedad. Guardarla a -20°C en oscuridad para su futuro uso. Tiempo de duración 6 meses.

Preparación de la solución de peróxido de hidrogeno

Para obtener 20Mm de solución de peróxido de hidrogeno, se diluyen 22.7 μ L de peroxido estabilizado al 3% en 977 μ L de buffer. Esta solución es poco estable, por lo que debe ser usada con prontitud.

Dilución de PBS

Se diluye 10 veces el PBS 1x, para obtener 10 ml.

Preparación de sustrato

Se añade 50 μL de 10 Mm de solución de Amplex Ultrared y 19 μL de solución de peróxido de hidrogeno estabilizado al 3% al tubo con 10 ml de PBS. Esta solución debe ser utilizada en las próximas 4 horas y debe ser protegida de la luz.

Adición de sustrato a placa multipocillo

Después del último lavado de la placa multipocillo, se añade 100 μL de sustrato a cada pocillo de la placa. Se cubre y se incuba a temperatura ambiente. Luego de 12 minutos se procede a colocarlo en el lector multipocillo Sinergy 4 que emite una longitud de onda de excitación de 530 nm y mide la longitud de onda de emisión de cada pocillo a 590 nm.

Anexo 2. Certificados de aprobación Comité de Ética y acta consentimiento informado



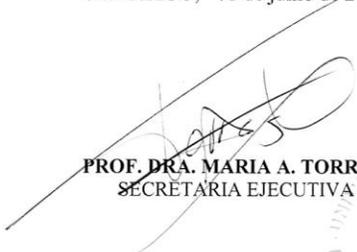
UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DECANATO

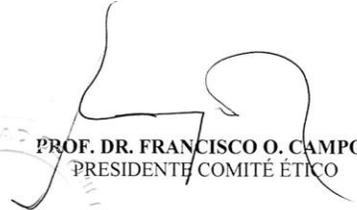
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

El Comité de Ética de la Facultad de Odontología, luego de aclarados los aspectos de los consentimientos informados del proyecto 1090142, otorga la aprobación de los mismos, cuyo Investigador Responsable es el Académico Prof. Dr. PATRICIO SMITH FERRER, de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Medicina.

Se extiende el presente documento para ser presentado al Comité Asesor de Bioética de FONDECYT.

SANTIAGO, 01 de junio de 2009.


PROF. DRA. MARIA A. TORRES V.
SECRETARÍA EJECUTIVA


PROF. DR. FRANCISCO O. CAMPOS S.
PRESIDENTE COMITÉ ÉTICO

FOCS/vrd.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
 FACULTAD DE MEDICINA
 ESCUELA DE MEDICINA - COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

**LISTADO COMPLETO DE LOS MIEMBROS DEL COMITÉ DE ÉTICA
 DE LA INVESTIGACIÓN DE LA ESCUELA DE MEDICINA
 PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE**

SESIÓN JUEVES 18 DE JUNIO DE 2009

Dra. Paula Bedregal García

Médico Cirujano, Profesor Asociado del Departamento de Salud Pública.

Dra. Sandra Braun Jones

Médico Cirujano, Profesor Asociado de Medicina, Secretaria Ejecutiva del Comité.

Dr. Hernán González Díaz.

Médico Cirujano, Profesor Asistente de Medicina.

Dr. Gustavo Kaltwasser González.

Médico Cirujano, miembro externo a la Universidad.

Dr. Hernán Muñoz Letelier

Médico Cirujano, Profesor Asociado del Departamento de Anestesiología.

Dra. Sofía Salas Ibarra

Médico Cirujano, Profesor Asociado de Medicina, Presidenta Comité de Ética.

Dra. Beatriz Shand Klagges

Médico Cirujano, Profesor Departamento de Neurología y Centro de Bioética.

Dr. José Luis Tapia Illanes

Médico Cirujano, Profesor Titular del Departamento de Pediatría.

Dr. Claudio Vera Pérez- Gacitúa.

Médico Cirujano, Instructor Asociado de Medicina.




DRA. SOFÍA SALAS I.
 Presidenta
 Comité de Ética de la Investigación
 Escuela de Medicina

Santiago, 18 de Junio de 2009.

**ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA INVESTIGACIÓN
CLÍNICA**

TÍTULO DEL PROYECTO:

Reparación tisular en los tejidos periodontales humanos: Modulación por
tabaquismo y factores de crecimiento.

Consentimiento **Nº1**

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

Dr. Patricio Smith Ferrer

Profesor Asistente

Carrera de Odontología

Centro de Investigaciones Médicas

Facultad de Medicina

Pontificia Universidad Católica de Chile

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar –o no- en una investigación médica a desarrollar.

Objetivo de la investigación: identificar factores que puedan modificar o condicionar la capacidad de cicatrización o de reparación de las encías.

Procedimiento de la investigación: Se me ha solicitado participar voluntariamente en un estudio que investigará sobre la capacidad de cicatrización de las encías. Esta invitación se generó luego que mi odontólogo tratante, que no forma parte del equipo de investigadores de este estudio, me indicara la conveniencia de extraer los terceros molares superiores. Esta extracción dentaria fue indicada debido a que los terceros molares se encuentran retenidos y no tienen espacio para erupcionar adecuadamente. Adicionalmente a la extracción de mi tercer molar y sólo si acepto participar en este estudio, estoy de acuerdo en ser sometido a una evaluación de mis dientes y encías por un odontólogo especialista. Así mismo acepto que se me extraiga una muestra de encía de 1.5 mm de diámetro en forma previa (5, 10 o 20 días) a la extracción del tercer molar superior por el cual estoy consultando. Esta muestra de tejido que se tomará es un procedimiento adicional a la extracción

dentaria de terceros molares. Durante la extracción del tercer molar superior se me tomará una nueva muestra del tejido en cicatrización, el cual será utilizado en el presente estudio. La muestra será utilizada únicamente para el estudio de la participación las proteínas actina muscular alfa, fibronectina, osteopontina y periostina en la cicatrización de las encías y no se realizará ningún tipo de análisis genético con este tejido. Si en el futuro esta muestra es utilizada con otro fin, se me solicitará mi consentimiento. Estas muestras de tejido serán guardadas indefinidamente en un laboratorio dentro del Centro de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la UC.

Beneficios: No obtendré beneficios directos por participar en este estudio. Sin embargo, si durante la evaluación y/o procedimientos dentales a los cuales seré sometido se encuentra alguna patología, se me indicarán oportunamente las alternativas de tratamiento para dicho problema. Por otro lado, la información obtenida por este estudio podría ser de utilidad para conocer más acerca de la capacidad de cicatrización de las encías y podría ayudar así a otras personas.

Riesgos: Los riesgos de estos procedimientos son bajos. Sin embargo, existe la posibilidad que luego de la toma de la muestra inicial ocurra sangramiento o

dolor en la encía comprometida. Así mismo, podría ocurrir infección de este tipo de lesión. Sin embargo, este es un hecho infrecuente.

Costos: El costo de la toma de muestra de tejido gingival que me sea solicitada para este estudio será financiada por el proyecto de investigación. Sin embargo, el costo de la extracción del tercer molar no será cubierta por este estudio.

Compensaciones: Cualquier complicación como resultado del procedimiento o toma de muestra de tejido a realizar será atendida por el investigador responsable de este proyecto si así lo deseo. En caso de ocurrir alguna complicación relacionada con la toma de muestra de tejido gingival, esta será resuelta sin costos adicionales para el paciente por el investigador responsable de este estudio.

Confidencialidad de la información: Los resultados de este estudio me serán informados y pueden ser publicados en revistas médicas y/o presentados en conferencias científicas, pero mi nombre o identidad no será revelada y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial de

acuerdo a la reglamentación vigente, a menos que mi identidad sea solicitada por ley por los tribunales de justicia respectivos. Yo podré retirarme de este estudio en cualquier momento sin dar razones ni tampoco sin que esto modifique la calidad de la atención odontológica que recibiré. Si retiro mi consentimiento mis muestras de tejido serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada. En caso que no desee participar en este estudio, esto no afectará la calidad o tipo de tratamiento por el cual consulté.

Preguntas: Cualquier pregunta que yo quiera hacer en relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por el Dr. Patricio Smith Ferrer, Centro de Investigaciones Médicas, Carrera de Odontología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Marcoleta 391.

Teléfono: 3546994 o por el Presidente del Comité de ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Dra. Sofía Salas. Marcoleta 391. Teléfono: 3548170.

Este consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzado(a) u

obligado(a) en forma alguna. Se me han explicado claramente los propósitos de la investigación, procedimientos, riesgos, beneficios y derechos que me asisten.

PACIENTE RESPONSABLE

FECHA_____

Dr. Patricio Smith Ferrer

INVESTIGADOR RESPONSABLE

NOMBRE Y FIRMA TESTIGO

Nombre Firma

DIRECTOR CLÍNICA LUGAR TOMA DE MUESTRA