

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III

(Medicina y Cirugía Bucofacial)

MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS 2013-2014

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER



**ANÁLISIS HISTO-MORFO-MÉTRICO Y EXPRESIÓN DE
CITOQUINAS EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DE
LOCALIZACIONES SUPERFICIALES Y PROFUNDAS EN
PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA
AVANZADA GENERALIZADA TRATADOS MEDIANTE
RASPADO Y ALISADO RADICULAR.**

Tutor: *Dr. Mariano SANZ ALONSO*

Autor: *Sergio Martínez Villa*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a todos los participantes que voluntariamente se han prestado a colaborar en esta investigación.

Al Dr. Mariano Sanz por aceptar guiarme en este viaje que tantas enseñanzas me ha aportado, y al Dr. Ignacio Sanz Martin por su tiempo y dedicación y por querer compartir conmigo sus conocimientos sin los que no habría sido posible realizar esta investigación.

Igualmente, a la Dra. Estela Maldonado, miembro del equipo de investigación y encargada del laboratorio de histología por enseñarme todas las técnicas, por ayudarme a entender cada detalle soportando todas mis preguntas y por estar siempre ahí para facilitarme todo lo posible.

A Leire Virto por ayudarnos con el procesado de las muestras de fluido y por estar siempre dispuesta a resolver cualquier duda.

También agradecer al resto del equipo, Itziar González y Ana O'Connor por hacer fácil los problemas logísticos relacionados con el almacenamiento y mantenimiento de las muestras recogidas.

Por último a todos mis compañeros del máster de periodoncia de la UCM por su colaboración y paciencia durante el proceso de recolección de muestras.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Enfermedades periodontales.....	5
1.2 Encía clínicamente sana y encía inflamada.....	7
1.3 Respuesta inmuno-inflamatoria del huesped.....	9
1.4 Citoquinas	10
1.5 Justificación.....	11
1.6 Hipótesis	12
1.7 Objetivos	12
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
2.1 Diseño.....	13
2.2 Población de estudio.....	13
2.3 Criterios de inclusión y exclusión	13
2.4 Muestreo	14
2.5 Toma y procesado de las muestras	14
2.6 Análisis microscópico de los cortes histológicos.....	17
2.7 Recolección de datos	20
2.8 Análisis estadístico	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1 Descripción general.....	22
3.2 Tablas de resultados	23
3.3 t-tests y Test de Correlación.....	26
4. DISCUSIÓN	29

5. CONCLUSIONES.....	35
6. BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXO 1: INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	40
ANEXO 2: FICHA DE DATOS	41
ANEXO 3: TABLAS DE RESULTADOS.....	42
ANEXO 4: TEST DE CORRELACIÓN	44

INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades de carácter infeccioso que afectan a los tejidos de soporte del diente. Estas enfermedades representan un problema de salud pública ya que tienen una alta prevalencia, llegando a afectar a más de un 85% de la población española mayor de 35 años (Llodra Calvo et al. 2012). Según la clasificación de Armitage en 1999, las enfermedades periodontales se dividen en dos grandes grupos: enfermedades gingivales y Periodontitis (Armitage 1999). Dentro del primer grupo, la gingivitis es la forma más común y se define como una reacción inflamatoria de los tejidos gingivales de carácter reversible y sin pérdida de soporte causada por la acumulación de placa bacteriana en el surco gingival (LOE et al. 1965; THEILADE et al. 1966). Por otro lado, la periodontitis es una enfermedad infecciosa, inflamatoria, progresiva y multifactorial que produce la destrucción irreversible de los tejidos periodontales teniendo como consecuencia final la pérdida dentaria. Al ser una enfermedad infecciosa, las bacterias presentes en el biofilm tienen un papel principal en la etiología de la enfermedad.

El principal factor etiológico de la Periodontitis es la presencia de una infección compleja polimicrobiana, agrupada en un biofilm subgingival (Listgarten 1988; Sanz et al. 2011). Hoy en día sabemos que dentro de la cavidad oral, más de 700 especies bacterianas diferentes han sido identificadas mediante el uso de técnicas moleculares. Éstas podrían suponer únicamente un 50% del total de bacterias presentes en la cavidad oral, y el avance de las técnicas hace que cada día aparezcan nuevas especies o cepas bacterianas. La mayor parte de ellas (más de 400), han sido identificadas en la bolsa periodontal (Paster 2006).

Los estudios epidemiológicos, han demostrado que dentro de este gran número de especies bacterianas que cohabitan en la bolsa periodontal, existe un

número reducido de especies que se han visto relacionadas con el inicio o la progresión de la periodontitis (W. E. Moore & L. V. Moore 1994). En 1994, Haffajee y Socransky propusieron una modificación de los postulados clásicos de Koch, para permitir que algunas de las bacterias periodontales pudieran ser consideradas patógeno periodontal (Haffajee & Socransky 1994). Finalmente, en el “World Workshop in Periodontology” de 1996 (Anon 1996) y basándose en los criterios de Haffajee y Socransky de 1994, se consideró que tres especies bacterianas demostraban evidencia de una fuerte asociación con la periodontitis (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*). También se han asociado con la Periodontitis otras bacterias como *Treponema denticola* (Listgarten & Socransky 1964; Kigure et al. 1995), *Prevotella intermedia* (Tanner et al. 1979; Tanner et al. 1996), *Fusobacterium nucleatum* (Papapanou et al. 2000; Van der Velden et al. 2003) o *Campylobacter rectus* (W. E. Moore et al. 1983; Dzink et al. 1985), que parecen ser agentes etiológicos de distintas enfermedades periodontales destructivas, aunque existe menor evidencia al respecto. Muchas de estas investigaciones, se basaron en la presencia o ausencia de estas bacterias. Hoy en día sabemos las bacterias siempre están presentes, por lo que nos basamos en criterios de cuantificación para identificar las bacterias que se encuentran en mayor proporción y número.

La placa subgingival representa un complejo biofilm, compuesto de bacterias envueltas en una matriz de polímeros extracelulares que contiene canales de agua. La formación de este biofilm incluye diferentes estadios en los que distintos microorganismos se adsorben sobre la superficie dental, coagregan y se multiplican provocando el crecimiento de esta biopelícula (Schroeder 1970; Listgarten et al. 1975; Listgarten 1976). Dentro de la misma, los microorganismos se distribuyen en función de su tolerancia al oxígeno y de sus requerimientos nutricionales, existiendo sinergias y antagonismos entre distintos organismos. Por otro lado, la progresión de la bolsa periodontal favorece la aparición de zonas anaerobias más profundas y aerobias más superficiales ofreciendo nuevos hábitats dentro de los cuales diversos microorganismos pueden desarrollarse. Por lo tanto, la bolsa periodontal ofrece un

amplio abanico de posibilidades para el desarrollo de distintos tipos de bacterias y constituye un reto a la hora de su estudio por la complejidad y variabilidad de su estructura (Darveau et al. 1997).

A pesar del papel fundamental de las bacterias en el inicio y progresión de la enfermedad, como hemos dicho anteriormente, la periodontitis es una enfermedad multifactorial y por lo tanto existen otros factores que intervienen en las enfermedad, entre los cuales la respuesta inmune del huésped es el más importante. A su vez, esta respuesta del huésped se ve modulada por factores genéticos y ambientales (Figura 1) (Kornman 2008), como el tabaco (Bergström 2006) y la diabetes (Khader et al. 2006).

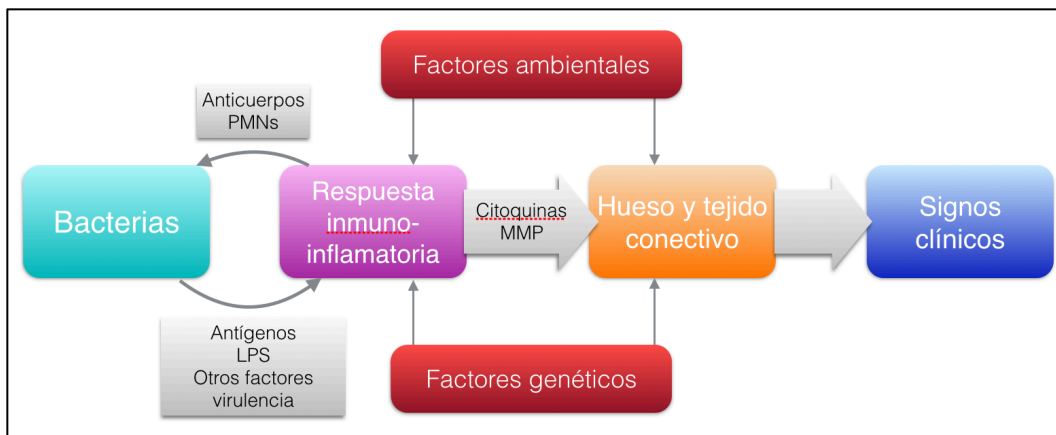


Fig. 1. Patogénesis de la periodontitis. Adaptado de Kornman 2008

1.2 Encía clínicamente sana y encía inflamada

Llamamos encía clínicamente sana, al estado de encía que solemos encontrar en pacientes con una buena higiene oral. Es una encía de aspecto sano, color rosa coral, superficie opaca y consistencia firme. Presenta un epitelio oral y un epitelio sulcular que recubre el interior del surco crevicular y que se continúan con un epitelio de unión que en condiciones de salud está íntimamente unido a la superficie dental a través de hemidesmosomas. Bajo el epitelio oral y el epitelio largo de unión encontramos lo que llamamos “lámina propia” o “corium” que es tejido conectivo compuesto por fibras colágenas que dan soporte y forma a la encía. Inmediatamente bajo el epitelio de unión, se encuentra el plexo vascular dentogingival encargado de

abastecer al epitelio de nutrientes así como de células de defensa (leucocitos).

El área del surco crevicular está continuamente expuesto a la presencia bacteriana por lo que incluso en la encía clínicamente sana, existe un pequeño infiltrado inflamatorio situado en el tejido conectivo inmediatamente bajo el epitelio de unión que aparece como respuesta a esa continua presencia de bacterias en el área crevicular (Page & Schroeder 1976). Este infiltrado inflamatorio contiene leucocitos del tipo agranulocitos como linfocitos y macrófagos pero está predominantemente compuesto por granulocitos polimorfonucleares de tipo neutrófilo que están en continua migración hacia el surco crevicular debido a la atracción quimiotáctica que se crea por los productos derivados de las bacterias del biofilm y por los factores liberados por el huésped debido a esa presencia bacteriana. Estos neutrófilos junto con otras proteínas plasmáticas llegan hasta el surco crevicular donde son expulsados a través de un transudado y exudado que se denomina fluido crevicular gingival y que además tiene una función de arrastre debido a su continua flujo . Sin embargo, en la encía clínicamente sana, existe un equilibrio entre la agresión bacteriana y la respuesta del huésped sin que progrese a una gingivitis.

Este equilibrio puede romperse con el aumento de los acúmulos de placa y cálculo. El aumento de la carga bacteriana hace que aparezca una respuesta del huésped mas intensa instaurándose una inflamación de la encía o gingivitis. La inflamación gingival y las características histológicas del surco gingival o bolsa periodontal han sido ampliamente estudiado en la literatura. Waerhaug en 1952 analizó autopsias humanas y observó que el infiltrado inflamatorio presente en la lesión periodontal estaba relacionado con la presencia y extensión de la placa y el cálculo sobre la superficie dental (WAERHAUG 1952). Gran parte del conocimiento sobre los procesos de la inflamación deriva de experimentos animales. El primer síntoma de la inflamación gingival es un aumento de la permeabilidad en los plexos gingivales (Egelberg 1967). Los experimentos en perros Beagle de Page y Schroeder en 1967 permitieron estudiar los cambios histológicos que se producía a nivel gingival al dejar la placa acumularse durante diferentes intervalos de tiempo. Las

biopsias revelaron cuatro estadios de inflamación. La lesión inicial, temprana, establecida y avanzada. Los tres primeros estadios correspondían a estados de inflamación crecientes dentro de la Gingivitis, mientras que el cuarto estadio correspondía a una Periodontitis establecida.

Histológicamente, aparecen numerosos cambios. Aparece un aumento de la vascularidad y la capilaridad así como del flujo de fluido crevicular (Egelberg 1967; Cimasoni 1983). Hay un aumento de células inflamatorias, que dejan los vasos y ocupan el tejido conectivo adyacente al epitelio de unión provocando un aumento progresivo del infiltrado inflamatorio. En este proceso, la lesión inflamatoria irá aumentando pasando del estadio inicial y temprano en los que el infiltrado inflamatorio esta compuesto principalmente por neutrófilos, linfocitos y macrófagos, a un estadio mas establecido, en el que aumenta el tamaño del infiltrado llegando a zonas mas profundas del tejido conectivo así como el numero de células plasmáticas en su contenido. Finalmente puede establecerse un estadio avanzado, el que encontramos en la periodontitis, en el que el numero de células plasmáticas aumenta considerablemente lo que conlleva a una importante degeneración del colágeno para proporcionar espacio a las células inflamatorias(Berglundh & Donati 2005). En este estadio, el biofilm avanza apicalmente, creando bolsas periodontales y permitiendo un mayor desarrollo de bacterias anaerobias. A diferencia de los estadios anteriores, se observa una perdida de inserción conectival y de inserción ósea del diente. Clínicamente, la encía se presenta edematosa e inflamada.

1.3 Respuesta inmuno-inflamatoria a la agresión bacteriana

Tras la limpieza mecánica del diente, los microorganismo recolonizan rápidamente la superficie dental en pocas horas. Los ensayos clínicos han demostrado que si dejamos que la placa dental se acumule y persista en el tiempo, en pocos días la encía mostrará signos de inflamación y se instaurará una gingivitis. Estas alteraciones inflamatorias son reversible si volvemos a reanudar medidas adecuadas de higiene oral (LOE et al. 1965).

Como hemos visto, el avance progresivo del biofilm hacia zonas más apicales de la superficie dental, crea bolsas periodontales y proporciona nuevos hábitats para el desarrollo de bacterias anaerobias.

La inflamación aparece debido al aumento de la carga bacteriana subgingival. Estas bacterias producen sustancias que dañan directamente los tejidos periodontales, pero también producen sustancias que activan la respuesta inmune celular y humoral del huésped, y es esta respuesta del huésped ante la agresión bacteriana la que más daño puede causar en los tejidos periodontales. (Genco 1992)

Los mecanismos de defensa del huésped engloban complejos mecanismos de comunicación celular que se ven estimulados con la agresión bacteriana. Esta respuesta se puede dividir en dos grandes grupos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida o adaptativa. La respuesta innata es una respuesta inespecífica que incluye todo el proceso inflamatorio tras un primer contacto con cualquier antígeno. La respuesta inmune adquirida es una respuesta mucho más específica dirigida a un antígeno con el que ya hemos tenido un contacto previo y en la que las células plasmáticas y la producción de anticuerpos tienen un papel principal (Silva et al. 2015).

1.4 Citoquinas

Las citoquinas son un conjunto de proteínas solubles secretadas por células tanto del sistema inmune innato como del adquirido. Se trata de moléculas que actúan como mediadores transmitiendo señales de unas células a otras células. Su función inmunoreguladora es clave en la respuesta inmune, la inflamación y en la diferenciación de distintos tipos celulares (Preshaw & Taylor 2011).

Las interleucinas son un grupo importante dentro de las citoquinas. Son secretadas principalmente por los leucocitos y están implicadas en la comunicación entre leucocitos y otras células implicadas en el proceso inflamatorio como son las células endoteliales, epiteliales o los fibroblastos. Existen más de 20 moléculas identificadas como interleucinas cada una con distintas funciones, pudiendo ser proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17) o antiinflamatorias (IL-4, IL-10).

Algunas de ellas actúan como factores quimiotácticos (IL-8) estimulando el reclutamiento de células de defensa hacia el área de la lesión periodontal (leucocitos polimorfonucleares, macrófagos o linfocitos). Otras están involucradas en el metabolismo óseo induciendo (PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17) o inhibiendo (IFN- γ , IL-4) la diferenciación de osteoclastos a través del sistema RANK-RANKL-OPG. Así mismo, los patrones de citoquinas secretados por los linfocitos T colaboradores/helper (Th) tras la presentación del antígeno a través de complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-Class II), van a dictar el tipo de respuesta inmune que tendrá lugar, pudiendo ir hacia una respuesta Th1 si secretan IL-2, TNF- α e IFN- γ , hacia una respuesta Th2 si secretan IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13, hacia una respuesta Th17 si se ven implicados IL-6, IL-17, IL-23 y RANKL o hacia una respuesta T reguladora si se secretan IL-10 y TGF- β 1 (Berglundh & Donati 2005; Terheyden et al. 2014).

Los niveles de interleucinas medidos en el fluido crevicular gingival se han relacionado con diferentes estados inflamatorios. Las citoquinas son mediadores de la inflamación involucradas en la diferenciación, migración y proliferación de células del sistema inmune. En la enfermedad periodontal estas sustancias son secretadas por células del sistema inmune presentes en el infiltrado inflamatorio. Al ser la periodontitis una enfermedad inmuno-inflamatoria, cabría esperar que existiese una relación entre los niveles de algunas interleucinas medidas en muestras de FCG y la cantidad de infiltrado inflamatorio presente en el tejido conectivo.

1.5 Justificación

Hasta el momento no se ha relacionado características histo-morfo-métricas del infiltrado inflamatorio con niveles de interleucinas medidas con tecnología multiplex en pacientes tratados mediante raspado y alisado radicular.

1.6 Hipótesis

“Existe una relación entre las mediciones histo-morfo-métricas del infiltrado inflamatorio y los niveles de algunas citoquinas expresadas en el fluido crevicular gingival en pacientes tratados mediante raspado y alisado radicular”

1.7 Objetivos

- Primario: Examinar biopsias gingivales y muestras de fluido crevicular gingival (FCG) previamente obtenido de localizaciones superficiales y profundas en pacientes con periodontitis crónica avanzada que han sido tratados mediante raspado y alisado radicular, para analizar histo-morfo-métricamente las dimensiones del infiltrado inflamatorio y la correspondiente respuesta inflamatoria mediante la expresión de citoquinas del FCG.
- Proporcionar nuevas hipótesis en este campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1- Diseño

Es un estudio observacional transversal de asociación cruzada que intenta relacionar variables histo-morfo-métricas con expresión de citoquinas en el fluido crevicular gingival.

2.2- Población de estudio

Especificación

La población diana son pacientes con periodontitis crónica generalizada avanzada. La población accesible son todos aquellos pacientes con periodontitis crónica generalizada avanzada que acuden al master de periodoncia de la UCM durante el curso 2013-2014 para ser tratados.

2.3- Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de Inclusión	Criterios de exclusión
Adultos sistémicamente sanos o controlados	Pacientes con diagnóstico de periodontitis agresiva
Diagnóstico de Periodontitis crónica avanzada (Armitage 1999)	Fumadores de más de 20 cigarrillos al día
Paciente que tras la fase inicial de tratamiento causal (RAR) necesita cirugía resectiva en el maxilar superior	Pacientes previamente tratados mediante cirugía periodontal
En la reevaluación: al menos 2 dientes con PS>6mm, SAS y Pérdida ósea radiográfica	Presencia de implantes con peri-implantitis en el cuadrante a tratar
Presencia de un diente con un sondaje medial palatino \geq a 5mm (localización profunda)	Pacientes bajo medicación que pueda influir en el metabolismo óseo
Presencia de un diente con un sondaje medial palatino \leq a 3mm (localización superficial)	Pacientes con enfermedades autoinmunes
	Pacientes tratados con quimio/radioterapia en los últimos 5 años

2.4- Muestreo

Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico de casos consecutivos hasta llegar a un tamaño muestral de 20 pacientes que cumplían los criterios de inclusión.

Al tratarse de biopsias de tejido que iba a ser excisionado por estar así descrito en la técnica quirúrgica aplicada (Friedman 62), no fue necesaria la aprobación por un comité ético.

A todos los pacientes se les entregó un consentimiento informado (Anexo 1), un cuestionario de salud y se les explicó en qué consistía el estudio. Todos los participantes entendieron que eran libres de participar y firmaron dicho consentimiento informado.

2.5- Toma y procesado de las muestras

a) Previo a la cirugía.

Los pacientes incluidos en el estudio, habían recibido tratamiento periodontal básico. Esto incluía una fase sistémica si era necesaria, un periodontograma completo, instrucciones de higiene oral y raspado y alisado radicular), habían sido reevaluados (entre 1 y 2 meses después) y se disponían a recibir tratamiento periodontal quirúrgico de tipo resectivo debido a la presencia de bolsas residuales profundas asociadas con sangrado al sondaje.

Todos los pacientes incluidos recibieron el mismo tipo de cirugía, que consistió en un colgajo de reposición apical, descrito por Friedman en 1962 , realizando cirugía ósea donde fuese necesario siguiendo los principio descritos por Oschenbein en 1986.

Solo se incluyeron los cuadrantes superiores, debido a que las biopsias gingivales se obtuvieron de los rodetes palatinos, que fueron realizados según describe la técnica para reducir el sondaje interproximal y palatino debido a la imposibilidad de reposicionar apicalmente la mucosa palatina.

Selección de las localizaciones

El primer paso consistió en seleccionar las dos localizaciones mediales palatinas de donde se iban a tomar las muestras de FCG y las biopsias.

- Una **localización superficial**: con $PS \leq 3\text{mm}$ y sangrado al sondaje negativo.
- Una **localización profunda**: con $PS \geq 5\text{mm}$ y sangrado al sondaje positivo

Toma de las muestras de FCG

Una vez seleccionadas las localizaciones superficial y profunda, se procedió a tomar una muestra de fluido crevicular gingival en cada localización. Para ello se utilizaron tiras de papel (periopaper®) siguiendo el protocolo descrito por Teles (Teles et al. 2010), que consiste en aislar las localizaciones con rollos de algodón, limpiar suavemente con una gasa los depósitos de placa si los hubiese y secar suavemente el diente con la jeringa de aire. Las tiras de periopaper® se introducen 1-2mm en el surco gingival y se dejan durante 30 segundos. Pasado ese tiempo se retira la tira de papel. Las tiras con restos de placa o sangre son desechadas, y se repiten pasados unos minutos. Si las tiras están limpias de placa o sangre se mide el volumen de FCG mediante un aparato diseñado para medir volúmenes por debajo del microlitro previamente calibrado (Periotron®), obteniendo el valor Periotron® que luego se transformará a unidades de volumen. Estos pasos se realizan tanto para la localización superficial como para la profunda. Finalmente se introduce cada tira en un Eppendorf, se codifica cada eppendorf y se transportan al laboratorio donde se almacenan en el congelador a -80°C hasta ser procesadas.

b) Durante la cirugía

Toma de las biopsias gingivales

Una vez tomadas las muestras de FCG, se procedía a la cirugía periodontal de colgajo de reposición apical. En las localizaciones seleccionadas era necesario realizar un rodete gingival para eliminar las bolsas periodontales presentes por palatino o por interproximal. El rodete se diseñaba previamente con la ayuda de un periostotomo P-24 trazando una incisión festoneada que se extendía de línea ángulo mesial a línea ángulo distal del diente en cuestión. La incisión se realizó cuidadosamente a bisel interno y paralela al diente tal como lo describe el autor de la técnica (Friedman 1962) incluyendo de esta manera en el rodete el epitelio de la bolsa y el tejido conectivo subyacente.

Una vez extraída la biopsia, se irrigaba ligeramente para eliminar los restos de sangre y se colocaba en una gasa estéril para medir la biopsia en sentido apico-coronal, mesio-distal y en grosor. Se realizó una fotografía y se registraron los valores de las mediciones en la ficha del paciente. Las muestras que fueron traumatizadas o laceradas durante su extracción o que no se pudieron extraer en una sola pieza fueron desechadas.

Posteriormente las biopsias se introdujeron en un tubo de ensayo que contenía Formalina al 10% y se trasladaron al laboratorio para ser procesadas.

Las muestras se fijaron en formalina al 10% de 2 a 5 días dependiendo del tamaño de la muestra. Posteriormente las muestras se lavan en etanol (EtOH) al 70% y pasan a ser deshidratadas en soluciones de etanol que van desde el 70% al 100%. Una vez deshidratadas en alcoholes crecientes, se pasan a Butanol y finalmente se sumergen en parafina.

c) Tras la cirugía

Procesado de las biopsias gingivales

Las muestras se fijaron en formalina al 10% de 2 a 5 días dependiendo del tamaño de la muestra. Posteriormente las muestras se lavan en etanol (EtOH) al 70% y pasan a ser deshidratadas en soluciones de etanol que van desde el 70% al

100%. Una vez deshidratadas en alcoholes crecientes, se pasan a Butanol y finalmente se sumergen en parafina.

De los bloques de parafina se obtienen cortes cada 5 micras que se preparan para las tinciones. Para ello, los cortes se sumergen en Xilano para disolver la parafina, y se hidratan sumergiéndolos en soluciones de etanol decrecientes del 100% al 70% y dejándolos finalmente en agua al menos durante 5 minutos.

Una vez hidratados los cortes, se realizan las tinciones alternamente con hematoxilina-eosina y con azul de toluidina y se vuelven a deshidratar las muestras en soluciones crecientes de etanol.

Tras el ultimo lavado en etanol, se hacen tres lavados con xileno. Este compuesto torna el tejido transparente para que se observe con mayor claridad en el microscopio de luz. Posteriormente se coloca un cubre con una gota de medio de montaje para que el cubreobjetos quede fijado, y por último se deja secar unas horas y queda listo para observarlo al microscopio.

Procesado de las muestras de FCG

Las muestras de FCG fueron procesadas mediante la tecnología Luminex®. Para ello, las muestras se descongelaron y se introdujeron en un buffer...

2.6- Análisis microscópico de los cortes histológicos

Microscopio

Para el análisis de los cortes histológicos se utilizó un microscopio de luz (Nikon Eclipse Ti®) conectado a un software de ordenador (NIS-Elements D®). Este software correctamente calibrado, permite entre otras cosas congelar imágenes para el estudio métrico de los cortes, calculando distancias y midiendo áreas definidas.

Selección de los cortes histológicos

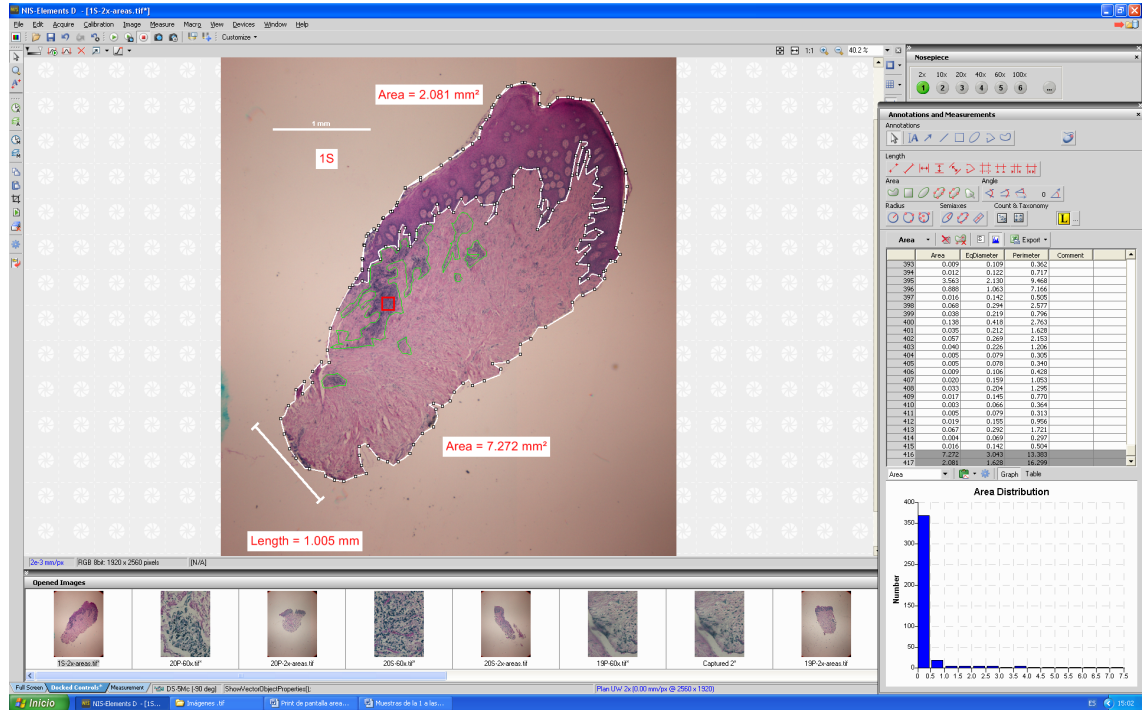
Se seleccionó el corte mas medial o central, es decir, el que correspondía con la localización centro-palatina del diente, de donde se había obtenido la muestra de FCG. Se tuvo en cuenta la calidad de la tinción, en la que debían ser visibles el epitelio bucal, el epitelio de la bolsa y el tejido conectivo subyacente, así como el infiltrado inflamatorio. Si dichos tejidos no eran visibles o correctamente diferenciables se tomó el corte adyacente a éste (mesial o distal) y si aun así las estructuras seguían sin ser visibles se desechaba la muestra.

Medición del epitelio, tejido conectivo e infiltrado inflamatorio

Como hemos dicho anteriormente, el software informático nos permitía marcar y calcular áreas. Por lo tanto, con un aumento de x2 se calcularon cuatro áreas:

- el área total de la muestra
- el área total de epitelio
- el área total de tejido conectivo
- el área total del infiltrado inflamatorio

El área total de tejido conectivo se calculaba haciendo la resta del (área total de la muestra – área total de epitelio).

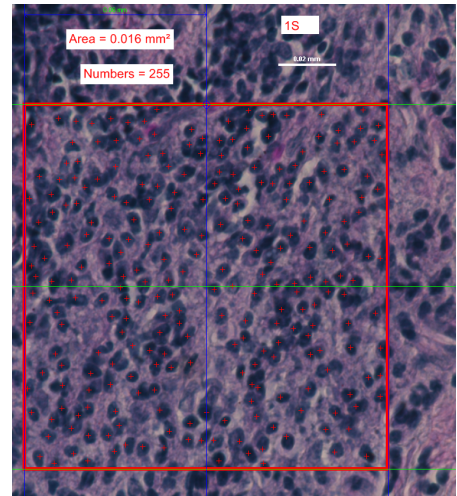
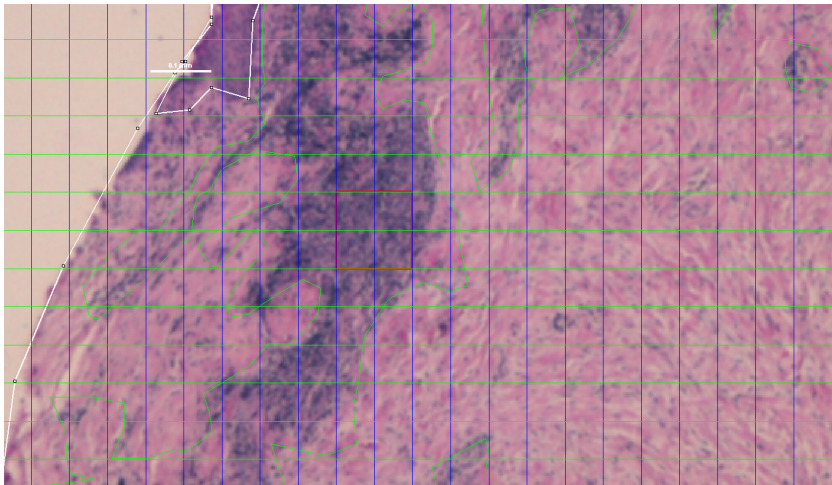


Selección del área de interés para el recuento celular

Con el objetivo de realizar un recuento celular dentro del infiltrado inflamatorio y obtener una densidad celular aproximada, se fijó el aumento microscópico en x60, el mínimo aumento que permitiría diferenciar los distintos tipos celulares.

Ante la incapacidad de realizar con este aumento (x60) el recuento celular de todo el infiltrado inflamatorio, se fijó un área de interés dentro del infiltrado inflamatorio que era posible medir en todas las muestras. Dicho área tenía un tamaño de 0,016 mm² y correspondía con una zona de alta densidad celular dentro del infiltrado inflamatorio, que se determinó por la cantidad de núcleos marcado por la tinción de hematoxilina-eosina.

Una vez determinado el área de interés, mediante una herramienta del software NIS-Elements D®, se contabilizaron la cantidad de núcleos celulares presentes para hallar la densidad celular dentro del área de interés.



2.7- Recolección de los datos

Datos del paciente

Los datos de cada paciente se guardaron en un clasificador. Cada paciente tenía una carpeta que contenía:

- Información y Consentimiento informado (Anexo)
- Ficha de datos del paciente (Anexo 2): en ella se apuntaban los valores Periotron® de las localizaciones superficiales y profundas y las mediciones de ambas biopsias tras ser extraídas. También se apuntaban los parámetros periodontales de las localizaciones seleccionadas y las codificaciones de los eppendorf y tubos de ensayo que contenían las muestras de FCG y las biopsias respectivamente.

Matriz de datos

Todos los datos correspondientes al paciente, a las muestras de FCG y a al análisis histo-morfo-métrico las biopsias se aunaron en una tabla de Excel® (Anexo 3).

2.8- Análisis estadístico

Se definió el área total de infiltrado inflamatorio como variable principal.

Las variables secundarias fueron el volumen de FCG y la concentración de IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-17^a.

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de cada una de las variable.

Se realizaron test de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) para comprobar si la distribución de los valores de la muestra seguía una distribución normal.

Para las variables que siguieron una distribución normal, se realizó un pair-t-test (variables) para variables relacionadas entre muestras de localizaciones superficiales y profundas. Para las variables que no cumplieron criterios de normalidad se realizó un test de Wilcoxon signed-Rank test (variables).

De igual manera se realizó un test de correlación (Spearman) para observar tendencias entre el área de infiltrado inflamatorio y los niveles de las distintas interleucinas medidas.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM® SPSS® 20.0 Statistics.

RESULTADOS

3.1- Descripción general

En total, 20 pacientes participaron en el estudio. La edad media de los participantes fue de $54,87 \pm 8,717$ años. Se incluyeron un total de 9 hombres (45%) y 11 mujeres (55%). Se obtuvieron un total de 40 muestras. 20 de localizaciones superficiales y 20 de localizaciones profundas, contribuyendo cada paciente con dos muestras.

La profundidad media dentro de las bolsas superficiales fue de 2,67 mm (DE 0,488) y la de las bolsas profundas fue de 5,73mm (DE 0,961).

En cuanto a la distribución de las piezas dentales, todas las muestras correspondientes a las bolsas superficiales se tomaron en premolares mientras que todas las bolsas correspondientes a bolsas profundas se tomaron en molares.

Las características de la muestra se exponen en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los participantes

20 Pacientes con Periodontitis Crónica Generalizada Avanzada (Armitage 1999)			
Post-RAR (30-60 días)			
	Medias	IC (95%)*	DE*
Edad (años)	48,83	[42,70-54,97]	5,845
Hombres	9 (45%)		
Mujeres	11 (55%)		
PS (mm)	2,67 (≤ 3 mm: S*)	[2,12-3,21]	0,516
	6,00 (≥ 5 mm: P*)	[4,67-7,33]	1,265
Dientes (40)	Premolares	15 (15S)	
	Molares	25 (16P)	

PS: Profundidad de sondaje; S: Bolsa Superficial ≤ 3 mm ; P: Bolsa Profunda ≥ 5 mm

IC: Intervalo de Confianza , DE: Desviación estándar

Se excluyeron del estudio 5 pacientes. Dos de ellos por no teñirse adecuadamente los cortes histológicos, otros dos por no poder distinguir adecuadamente el epitelio, el tejido conectivo y el infiltrado inflamatorio, y uno por laceración de la biopsia durante su extracción lo que imposibilitaba la orientación de la muestra.

Por lo tanto, se analizaron los resultados de 15 pacientes obteniendo un total de 30 muestras (15 de localizaciones superficiales y 15 de localizaciones profundas).

3.2- Tablas de resultados

La matriz de datos completa se muestra en el Anexo 3.

La tabla 2. Muestra el volumen de fluido crevicular gingival en valor Periotron® y su conversión a μl , así como las concentraciones en $\text{pg}/\mu\text{l}$ de las distintas citoquinas analizadas mediante Luminex® para las localizaciones superficiales y profundas.

Tabla 2. Valor Periotron®, volumen de fluido en μl , concentraciones de IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-17a.

Nº de Muestra	Valor Periotrón	Volumen FCG (μl)	IL-1 β ($\text{pg}/\mu\text{l}$)	IL-6 ($\text{pg}/\mu\text{l}$)	IL-10 ($\text{pg}/\mu\text{l}$)	IL-17a ($\text{pg}/\mu\text{l}$)
1P	116	0,704	43,49	2,13	0,38	0,36
1S	43	0,250	44,64	0,23	0,26	0,7
3P	65	0,370	71,63	1,58	0,29	0,18
3S	57	0,325	43,23	2,85	0,15	0,21
4P	172	1,293	16,91	0	0,03	0,09
4S	72	0,410	21,68	0,03	0	0,05
5P	96	0,560	65,75	0,02	0,07	0,2
5S	60	0,342	31,08	0,14	0,17	0,21

8P	156	1,079	59,27	0,01	0	0,07
8S	116	0,704	0,3	0,06	0	0,03
9P	66	0,375	17,1	0	0	0,08
9S	74	0,422	9,49	0,01	0,03	0,07
10P	129	0,810	6,07	3,75	0,03	0,29
10S	131	0,827	4,21	1,21	0,02	0,19
11P	170	1,263	21,03	0,18	0,14	0,21
11S	40	0,234	18,95	0,04	0	0,1
12P	120	0,735	33,85	0	0,07	0,2
12S	21	0,139	1,95	0,01	0	0,07
14P	154	1,056	42,06	0,02	0,09	0,25
14S	54	0,308	18,88	0	0	0,03
15P	59	0,336	1,26	0,12	0,1	0,29
15S	47	0,271	28,05	0,08	0,1	0,11
16P	68	0,387	5,91	1,04	0,07	0,12
16S	50	0,287	2,51	0,63	0,05	0,13
17P	136	0,872	9,46	0,04	0	0,06
17S	86	0,495	1,43	0,04	0	0,03
18P	75	0,428	0,81	0,01	0	0,01
18S	71	0,404	15,08	0,37	0,3	0,22
19P	143	0,939	60,11	0,16	0	0,13
19S	88	0,508	0,79	0,01	0,14	0,03

La tabla 3 muestra los resultados del análisis histo-morfo-métrico e incluye el área total de infiltrado inflamatorio de la muestra y el recuento celular dentro del área de interés seleccionado.

Tabla 3. Área de I.I* y Recuento celular en localizaciones profundas y superficiales

Nº de Muestra	Área de infiltrado inflamatorio (mm ²)	Recuento celular en el área de interés
1P	3,133	153
1S	0,525	255
3P	0,478	277
3S	0,269	105
4P	1,510	355
4S	0,635	192
5P	0,208	281
5S	1,320	313
8P	0,755	286
8S	0,153	148
9P	0,289	183
9S	0,121	168
10P	0,606	153
10S	0,226	145
11P	0,372	285
11S	0,227	161
12P	0,694	392
12S	0,290	309
14P	0,707	396
14S	0,378	188
15P	0,614	257

15S	0,432	169
16P	0,978	310
16S	0,172	230
17P	0,545	223
17S	0,366	142
18P	0,690	134
18S	0,765	105
19P	0,563	217
19S	0,617	205

**I.I: Infiltrado Inflamatorio*

3.3- t-Test y Test de correlación

La tabla 4 muestra los resultados de los test de comparación de medias entre localizaciones profundas y superficiales.

En las localizaciones profundas, el valor medio Periotron® fue mayor (88,83) que en las localizaciones superficiales (64,67) y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$).

La media de volumen de FCG reveló un mayor volumen de FCG en las localizaciones profundas (0,75 μ l) que en las sanas (0,38 μ l) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$)

El área media del infiltrado inflamatorio calculada para localizaciones profundas y superficiales resultó ser significativamente ($p < 0,015$) mayor en las localizaciones profundas (0,808 mm^2 vs 0,433 mm^2).

El recuento celular dentro del área de interés seleccionado demostró ser mayor en las localizaciones profundas en comparación a las superficiales siendo esta diferencia significativa (289 vs 189, $p < 0,005$). Por lo tanto, podemos decir que la densidad celular dentro del área de interés de cada muestras histológica resultó

ser superior en las localizaciones profundas en comparación con las localizaciones superficiales.

La IL-1 β y la IL-17a se detectaron en el 100% de las muestras estudiadas, mientras que la IL-6 se detectó en un 55% de la muestras y la IL-10 solo se detectó en un 30% de las muestras. Se detectó mayor concentración de interleucinas en las muestras de bolsas profundas que en las muestras de bolsas superficiales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa únicamente para los niveles de IL-1 β (30,31 vs 16,15 pg/ μ l, p<0,044) . Los niveles de IL-6, 10 y 17a se encontraron una concentración por debajo de 1pg/ μ L y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las bolsas profundas y superficiales.

Tabla 4. Estadística descriptiva de las distintas variables

Tipo de variable	Tipo de localización	Media	DE	I.C (95%)	p
Valor Periotron	Profundas	88,83	29,308	[58,08-119,59]	p<0,001*
	Superficiales	64,67	33,098	[29,93-99,40]	
V de FCG	Profundas	0,75	0,332	[0,56-0,93]	p<0,001*
	Superficiales	0,38	0,220	[0,15-0,61]	
Area I.I	Profundas	0,809	0,71	[0,415-1,20]	p<0,015*
	Superficiales	0,433	0,31	[0,260-0,605]	
Recuento celular	Profundas	260	83,41	[214-306]	p<0,005*
	Superficiales	189	64,17	[153-225]	
IL-1beta	Profundas	30,31	25,052	[16,44-44,19]	p<0,044*
	Superficiales	16,15	15,201	[7,73-24-57]	
IL-6	Profundas	0,6	1,095	[0,00-1,21]	p<0,386
	Superficiales	0,38	0,758	[-0,04-0,80]	
IL-10	Profundas	0,08	0,112	[0,02-0,15]	p<0,225
	Superficiales	0,08	0,101	[0,03-0,14]	
IL-17a	Profundas	0,17	0,100	[0,11-0,22]	p<0,181
	Superficiales	0,15	0,169	[0,05-0,24]	

Los test de correlación de Spearman, no resultaron ser significativos entre las variables histo-morfo-métricas y las variables de FCG excepto para IL-10 y el área de infiltrado inflamatorio en bolsas superficiales, donde se encontró una correlación de 0,800 estadísticamente significativa ($p < 0,010$). Para las muestras de localizaciones profundas no se observó ninguna correlación entre ninguna de las variables histo-morfo-métricas y los niveles de interleucinas en FCG.

Los resultados de los test de correlación se muestran en el Anexo 4.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación confirman que dos meses después de haber realizado el tratamiento básico periodontal de raspado y alisado radicular, que tiene como objetivo principal la eliminación de la placa y cálculo subgingival, sigue existiendo un infiltrado inflamatorio residual en todos los casos. Este infiltrado inflamatorio resultó ser mayor y más denso en bolsas profundas que en bolsas superficiales. El estudio del FCG permitió constatar que tanto el volumen de FCG como la concentración de las interleucinas analizadas también era mayor en las bolsas profundas en comparación a las bolsas superficiales. Al estudiar si el tamaño y volumen de infiltrado inflamatorio podía estar relacionado de alguna manera con la concentración de interleucinas analizadas se observó que esta correlación solo existió entre el nivel de IL-1 β y el área de infiltrado inflamatorio de las muestras sanas. Para el resto de variables no existió ningún tipo de correlación que demostrase una relación entre la concentración de interleucinas y la cantidad de infiltrado inflamatorio.

Fluido crevicular gingival

El volumen de FCG está muy relacionado con la cantidad de inflamación presente. En este estudio, el momento de la toma de muestras es post-raspado, por lo que los resultados obtenidos pueden extrapolarse únicamente a ese momento del tratamiento periodontal.

Se observa que en bolsas residuales profundas $\geq 5\text{mm}$, el volumen estático medio de FCG es de 0,747 μl mientras que en las bolsas superficiales $\leq 3\text{mm}$ es de 0,395 μl . Es importante remarcar la diferencia entre volumen estático de FCG y flujo de FCG. El primero corresponde al volumen recolectado en la tira de papel durante los 30 segundos en los que la tira está en el surco y se expresa en μl , mientras que el flujo de FCG se expresa en $\mu\text{l/h}$ y requiere al menos dos mediciones con un intervalo de tiempo entre ambas (Goodson 2003).

El volumen medio de FCG obtenido en bolsas profundas y superficiales en esta investigación concuerda, con los resultados obtenidos en otras estudios. Holborrow en 1990, estudió los cambios que sufría el flujo de FCG tras el raspado y alisado radicular en bolsas mayores o iguales a 5mm. En su estudio, las bolsas profundas tenían valores de FCG estático entre 1 al 1.5 μl y pasaban tras el raspado y alisado radicular a valores alrededor del 0,7 μl en un tiempo de 80 días . Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las muestras de FCG en bolsas profundas $\geq 5\text{mm}$ donde se obtuvo un valor medio de 0,747 μl . Sin embargo, los resultados obtenidos para bolsas superficiales $\leq 3\text{mm}$ son mas elevados en este estudio (0,395 μl) que los estimados para localizaciones sanas según la revisión de Goodson de 2003, donde obtuvo un valor medio de 0,05 μl para localizaciones sanas ($\leq 3\text{mm}$) y de 0,58 μl para bolsas moderadas (4-5mm). Nuestros resultados se acercarán más a los de las bolsas moderadas que a los de las localizaciones sanas. Es preciso recalcar, que en esta investigación se tratan de bolsas superficiales tras el tratamiento básico periodontal, por lo que podían ser bolsas originalmente mas profundas que se han reducido tras el raspado y podría existir una inflamación residual mayor debido a restos de placa o calculo subgingival presentes en las bolsas iniciales, lo que explicaría los mayores valores en las muestras de bolsas superficiales evaluadas en este estudio.

El análisis del FCG también permitió en esta investigación medir los niveles de determinadas interleucinas consideradas de interés.

La relación entre los niveles de IL-1 β en FCG se ha evaluado en numerosas investigaciones. Se ha visto que los niveles de esta citoquina se presentan más elevados en pacientes con periodontitis que en pacientes sanos (Kinney et al. 2014; Chaudhari et al. 2011; Teles et al. 2010). También se ha estudiado la influencia del tratamiento periodontal sobre los niveles de esta citoquina pro-inflamatoria, encontrando reducciones significativas tras el raspado y alisado radicular (Oh et al. 2015; Hou et al. 1995). En el estudio de Hou y colaboradores en 1995, los niveles de IL-1 β resultaron ser tres veces mas elevados en pacientes con periodontitis y en localizaciones inflamadas que en pacientes sanos o sin inflamación. En esta

investigación, no se contó con un grupo control, sino que se seleccionó en el mismo paciente una localización $\leq 3\text{mm}$ y otra $\geq 5\text{mm}$ y se observó que los niveles de IL-1 β eran el doble de elevados en las localizaciones profundas que en las localizaciones superficiales. Estos resultados sugerirían que los niveles de citoquinas son sitio-específicos. Existen, sin embargo, publicaciones que contradicen este último hallazgo concluyendo que los niveles de citoquinas son específicos de el hospedador e independientes de cada localización(Engebretson et al. 2002).

En la literatura científica hay estudios que han relacionado el estatus periodontal con niveles IL-6 (Mogi et al. 1999; Zhao et al. 2001), con niveles de IL-10 (Gamonal et al. 2000; Goutoudi et al. 2004) y con IL-17 (Mitani et al. 2015; Awang et al. 2014). En todos los estudios mencionados, se obtuvieron las muestras previo al tratamiento periodontal. En el presente estudio estudio las muestras se tomaron tras el tratamiento básico periodontal, lo que podría explicar los bajos niveles de concentración obtenidos en las concentraciones de IL-6, IL-10, IL-17a en esta investigación.

Infiltrado inflamatorio

Los resultados relacionados con la cantidad de infiltrado inflamatorio entran dentro de lo esperado, siendo las localizaciones profundas las que por lo general mayor infiltrado inflamatorio mostraron. La media del área de infiltrado de las localizaciones profundas resultó ser mayor que el de las localizaciones superficiales. Sin embargo se han encontrado algunas diferencias con respecto a otros estudios. Estos han comprobado las diferencias histológicas del infiltrado inflamatorio en pacientes con periodontitis avanzada.

En un estudio de Berglundh et al. en 1999, se observó mediante biopsias gingivales los cambios a largo plazo en el infiltrado inflamatorio tras la terapia básica periodontal. En su estudio, se tomaron las biopsias antes del tratamiento y 12 y 24 meses después, demostrando que tras el tratamiento periodontal no quirúrgico y con un adecuado y frecuente programa de mantenimiento (cada 3 meses) se podía mantener valores reducidos de infiltrado inflamatorio (Berglundh et al. 1999).

En este estudio, el momento de la toma de biopsia difiere. La biopsia se toma previo a la cirugía periodontal entre 1 y 2 meses tras el raspado y alisado radicular. Por lo tanto, en esta investigación se muestra los resultados a corto plazo tras el raspado y alisado radicular, y el estado en el que llegan los tejidos al día de la cirugía periodontal. Si comparamos los valores del infiltrado inflamatorio obtenidos en el estudio de Berglundh con los obtenidos en este estudio, se observa que previo al tratamiento, el área media de infiltrado inflamatorio era de $1,01 \text{ mm}^2$ (DE 0,76) y 12 y 24 meses después, el área se había reducido hasta $0,06 \text{ mm}^2$ (DE 0,3) y $0,09$ (DE 0,1) respectivamente.

Este trabajo ha estudiado el infiltrado inflamatorio presente previo a la cirugía y tras 1-2 meses del raspado y alisado radicular, encontrando unos valores medios de $0,809 \text{ mm}^2$ en las localizaciones profundas y de $0,433 \text{ mm}^2$ en las localizaciones superficiales. Dichos resultados no son comparables ya que no se siguieron los mismos protocolos en cuanto al tratamiento periodontal, pero vemos que 1 ó 2 meses tras el raspado y alisado radicular, en nuestro caso sigue existiendo un infiltrado inflamatorio residual, siendo este mayor en bolsas profundas que en superficiales.

Otro estudio (Zitzmann et al. 2005) comparó el infiltrado inflamatorio en 15 pacientes con un diseño a boca partida, donde en un lado se hacía un colgajo de acceso y en el otro se hacía cirugía resectiva y se tomaban biopsias previo al tratamiento y 6 meses después. De nuevo, previo al tratamiento se observó en todos los casos un extenso infiltrado inflamatorio de entre $1,33$ y $1,41 \text{ mm}^2$, que tras el tratamiento periodontal se redujo significativamente. A los 6 meses, el grupo de cirugía resectiva presentó un infiltrado inflamatorio medio de $0,08 \text{ mm}^2$, mientras que en el grupo de colgajo de acceso fue de $0,19 \text{ mm}^2$. Los resultados obtenidos a los 6 meses mediante cirugía resectiva son muy similares a los obtenidos a los 24 meses mediante raspados repetidos en el estudio de Berglundh et al 1999. Estos resultados junto con los hallados en este estudio, parecen indicar que tanto el tratamiento no quirúrgico como el tratamiento quirúrgico son capaces de reducir significativamente el infiltrado inflamatorio presente en las lesiones periodontales,

alcanzando su mayor reducción pasados 6 meses en un programa de mantenimientos frecuentes que incluya re-raspados de las bolsas recurrentes con sangrado.

Esta parte del trabajo no incluye el análisis inmuno-histo-químico, por lo que no podemos ofrecer datos sobre tipos celulares. Sin embargo, los recuentos celulares medidos en el área de interés seleccionado dentro del infiltrado inflamatorio revelaron que la densidad celular en el infiltrado de las biopsias de localizaciones profundas (260 células/0,016 mm²) fue mayor que la de localizaciones superficiales (189 células/0,016 mm²). El análisis inmuno-histo-químico de las muestras nos ayudará a conocer de manera mas específica el contenido celular de los infiltrados inflamatorios analizados, pudiendo llegar a nuevas conclusiones.

La limitación principal de este estudio es el hecho de no contar con muestras previas al tratamiento periodontal básico con las que poder comparar los resultados post-tratamiento. Esta limitación viene dada por el hecho de ser un estudio histológico con pacientes. No sería ético tomar una biopsia previa al tratamiento periodontal, por lo se decidió analizar los resultados post-tratamiento periodontal básico y compararlos con los resultados de otros estudios. A parte de las propias limitaciones de un estudio histológico en humanos, el pequeño tamaño muestral es otra limitación, así como el hecho de no tener un grupo control sano.

La morbilidad del paciente es un factor a tener en cuenta a la hora de realizar tratamientos periodontales. En los estudios mencionados anteriormente la combinación de un protocolo intensivo de raspado radicular con visitas frecuentes (cada 3meses) de mantenimiento consiguió resultados de reducción del infiltrado inflamatorio similares a los obtenidos mediante cirugía, con una menor morbilidad del paciente. A la luz de estos resultados, los beneficios de la tereapia conservadora podrían haber reducido la necesidad de terapia quirúrgica en los casos presentados o cuanto menos haber reducido más aún el perfil inflamatorio de las localizaciones analizadas.

Aunque las bolsas profundas demostraron mayor cantidad de infiltrado inflamatorio que las bolsas superficiales, estas últimas presentaron en todos los casos un infiltrado inflamatorio residual tras el tratamiento de raspado y alisado radicular. Este último dato, hace cuestionar el tiempo que es preciso esperar tras el tratamiento básico periodontal antes de pasar a la fase quirúrgica, pudiendo ser necesario alargar los tiempos de reevaluación para maximizar los beneficio del raspado, o realizar re-tratamientos para minimizar las limitaciones del raspado y alisado radicular inicial.

CONCLUSIONES

El análisis de muestras histológicas y de FCG obtenidas entre 1 y 2 meses tras el tratamiento de raspado y alisado radicular en bolsas profundas y superficiales de pacientes con periodontitis crónica avanzada permitió llegar a las siguientes conclusiones:

Las muestras de bolsas profundas demostraron tener un mayor volumen de fluido crevicular gingival, un mayor área y densidad del infiltrado inflamatorio, y una mayor concentración de IL-1 β que las muestras de bolsas superficiales.

No se encontró correlación evidente bidireccional entre los niveles de las interleucinas analizadas y las características histo-morfo-métricas del infiltrado inflamatorio. Por lo tanto, los niveles de las interleucinas medidas no reflejaron el tamaño del infiltrado inflamatorio medido histológicamente.

Entre uno y dos meses tras el tratamiento periodontal básico, tanto las bolsas profundas como las superficiales exhibieron un infiltrado inflamatorio residual en el momento de la cirugía.

BIBLIOGRAFÍA

- Anon, 1996. *Proceedings of the 1996 World Workshop in Periodontics. Lansdowne, Virginia, July 13-17, 1996.*
- Armitage, G., 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, 4(1), pp.1–6.
- Awang, R.A. et al., 2014. Clinical associations between IL-17 family cytokines and periodontitis and potential differential roles for IL-17A and IL-17E in periodontal immunity. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 63(12), pp.1001–1012.
- Berglundh, T. & Donati, M., 2005. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 32 Suppl 6, pp.87–107.
- Berglundh, T., Liljenberg, B. & Lindhe, J., 1999. Some effects of periodontal therapy on local and systemic immunological parameters. *Journal of clinical periodontology*, 26(2), pp.91–98.
- Bergström, J., 2006. Periodontitis and smoking: an evidence-based appraisal. *The journal of evidence-based dental practice*, 6(1), pp.33–41.
- Chaudhari, A.U. et al., 2011. Correlation of levels of interleukin-1 β in gingival crevicular fluid to the clinical parameters of chronic periodontitis. *The journal of contemporary dental practice*, 12(1), pp.52–59.
- Cimasoni, G., 1983. Crevicular fluid updated. *Monographs in oral science*, 12, pp.III–VII, 1–152.
- Darveau, R.P., Tanner, A. & Page, R.C., 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000*, 14, pp.12–32.
- Dzink, J.L. et al., 1985. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *Journal of clinical periodontology*, 12(8), pp.648–659.
- Egelberg, J., 1967. The topography and permeability of vessels at the dento-gingival junction in dogs. *Journal of periodontal research. Supplement*, 1, pp.1–39.
- Engbretson, S.P. et al., 2002. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, 29(1), pp.48–53.
- Gamonal, J. et al., 2000. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and

- the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology*, 71(10), pp.1535–1545.
- Genco, R.J., 1992. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of periodontology*, 63(4 Suppl), pp.338–355.
- Goodson, J.M., 2003. Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*, 31, pp.43–54.
- Goutoudi, P., Diza, E. & Arvanitidou, M., 2004. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of Dentistry*, 32(7), pp.511–520.
- Haffajee, A.D. & Socransky, S.S., 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5, pp.78–111.
- Hou, L.T., Liu, C.M. & Rossomando, E.F., 1995. Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *Journal of clinical periodontology*, 22(2), pp.162–167.
- Khader, Y.S. et al., 2006. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *Journal of diabetes and its complications*, 20(1), pp.59–68.
- Kigure, T. et al., 1995. Distribution of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *Journal of periodontal research*, 30(5), pp.332–341.
- Kinney, J.S. et al., 2014. Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *Journal of clinical periodontology*, 41(2), pp.113–120.
- Kornman, K.S., 2008. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *Journal of periodontology*, 79(8 Suppl), pp.1560–1568.
- Listgarten, M.A., 1976. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *Journal of periodontology*, 47(1), pp.1–18.
- Listgarten, M.A., 1988. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 15(8), pp.485–487.
- Listgarten, M.A. & Socransky, S.S., 1964. ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF A SPIROCHETE IN THE LESION OF ACUTE NECROTIZING ULCERATIVE GINGIVOSTOMATITIS (VINCENT'S INFECTION). *Archives of oral biology*, 9, pp.95–96.
- Listgarten, M.A., Mayo, H.E. & Tremblay, R., 1975. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *Journal of*

- periodontology*, 46(1), pp.10–26.
- Llodra Calvo, J.C. et al., 2012. Aportaciones y perspectivas del equipo multiprofesional a la cartera de servicios en atención primaria. Informe SESPAS 2012. *Gaceta Sanitaria*, 26, pp.118–123.
- LOE, H., THEILADE, E. & JENSEN, S.B., 1965. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *Journal of periodontology*, 36, pp.177–187.
- Mitani, A. et al., 2015. Increased expression of interleukin (IL)-35 and IL-17, but not IL-27, in gingival tissues with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, 86(2), pp.301–309.
- Mogi, M. et al., 1999. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Archives of oral biology*, 44(6), pp.535–539.
- Moore, W.E. & Moore, L.V., 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5, pp.66–77.
- Moore, W.E. et al., 1983. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infection and immunity*, 42(2), pp.510–515.
- Oh, H. et al., 2015. Effects of initial periodontal therapy on interleukin-1 β level in gingival crevicular fluid and clinical periodontal parameters. *Journal of oral science*, 57(2), pp.67–71.
- Page, R.C. & Schroeder, H.E., 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 34(3), pp.235–249.
- Papapanou, P.N. et al., 2000. “Checkerboard” assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *Journal of periodontology*, 71(6), pp.885–897.
- Paster, B., 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42, pp.1–8.
- Preshaw, P.M. & Taylor, J.J., 2011. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of clinical periodontology*, 38 Suppl 11, pp.60–84.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A.J. Working Group 1 of Seventh European Workshop on Periodontology, 2011. Periodontal infections: understanding the complexity--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. In *Journal of clinical periodontology*. *Journal of clinical periodontology*. pp. 3–6.

- Schroeder, H.E., 1970. The structure and relationship of plaque to the hard and soft tissues: electron microscopic interpretation. *International dental journal*, 20(3), pp.353–381.
- Silva, N. et al., 2015. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci*, 23(3), pp.329–355.
- Tanner, A. et al., 1996. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *Journal of periodontal research*, 31(3), pp.195–204.
- Tanner, A.C. et al., 1979. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *Journal of clinical periodontology*, 6(5), pp.278–307.
- Teles, R. et al., 2010. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *Journal of periodontology*, 81(1), pp.89–98.
- Terheyden, H. et al., 2014. Inflammatory reaction - communication of cells. *Clinical oral implants research*, 25(4), pp.399–407.
- THEILADE, E. et al., 1966. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *Journal of periodontal research*, 1, pp.1–13.
- Van der Velden, U. et al., 2003. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *Journal of clinical periodontology*, 30(7), pp.603–610.
- WAERHAUG, J., 1952. The gingival pocket; anatomy, pathology, deepening and elimination. *Odontologisk tidskrift*, 60(Suppl 1), pp.1–186; 70 figures.
- Zhao, C. et al., 2001. [Detection of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from active and non-active adult periodontitis sites]. *Hua xi yi ke da xue xue bao = Journal of West China University of Medical Sciences = Huaxi yike daxue xuebao / [bian ji zhe, Hua xi yi ke da xue xue bao bian wei hui]*, 32(3), pp.444–445.
- Zitzmann, N.U., Berglundh, T. & Lindhe, J., 2005. Inflammatory lesions in the gingiva following resective/non-resective periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*, 32(2), pp.139–146.

ANEXO 1: Información y Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Título del protocolo: Línea de Histología. Análisis histopatológico y expresión de las citoquinas del fluido crevicular en localizaciones sanas y enfermas en pacientes periodontales.

Departamento: Periodoncia

Director del estudio: Mariano SANZ ALONSO

Profesor encargado del estudio: Ignacio SANZ MARTIN

Alumnos encargados del estudio: Aurora BARRACHINA y Sergio MARTINEZ

Hoja de información:

Le estamos pidiendo que participe de un estudio de investigación porque presenta Periodontitis crónica. Este tipo de estudios se realiza para poder saber más sobre su enfermedad y así poder mejorar el diagnóstico y los tratamientos en futuros pacientes con enfermedad periodontal.

Su participación es completamente voluntaria; si no desea hacerlo continuaremos con su atención habitual con total normalidad y su negativa no le traerá ningún inconveniente.

La participación en este estudio no supone ninguna modificación de los protocolos de tratamiento usados habitualmente con la excepción de que antes de someterse a la cirugía, tomaremos unas muestras de fluido crevicular procedente de las bolsas periodontales a tratar y analizaremos parte de los tejidos desechados en la cirugía, por lo que no supone ningún riesgo adicional.

Consentimiento

Don/Doña _____ con numero de identificación _____, en calidad de paciente, certifico que he recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.

He quedado satisfecho/a con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto mi consentimiento para el procedimiento propuesto y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión a la persona responsable del estudio.

Firma de las partes a fecha ____ de _____ de 20__

Firma del Paciente

Nombre y firma del alumno

Firma del profesor responsable

ANEXO 2: Ficha de datos del paciente

DEPARTAMENTO DE PERIODONCIA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Toma de muestras Histológicas											
Proyecto	Alumno/s										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%; padding: 2px;">M</td> <td style="width: 10%; padding: 2px;">V</td> <td style="width: 80%; padding: 2px;">Fecha</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="padding: 2px;">Fecha nac</td> </tr> </table>	M	V	Fecha	Fecha nac			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 2px;">Fecha último RAR</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Fecha RAR cuad CX</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Medicación</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Antibióticos</td> </tr> </table>	Fecha último RAR	Fecha RAR cuad CX	Medicación	Antibióticos
M	V	Fecha									
Fecha nac											
Fecha último RAR											
Fecha RAR cuad CX											
Medicación											
Antibióticos											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 100%; padding: 2px;">Paciente de Estudio N°</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">N° Historia</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Screening completado</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Consentimiento Verbal</td> </tr> </table>	Paciente de Estudio N°	N° Historia	Screening completado	Consentimiento Verbal	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 2px;">Periodontograma Baseline</td> <td style="width: 50%; padding: 2px;">Periodontograma Post RAR</td> </tr> </table>	Periodontograma Baseline	Periodontograma Post RAR				
Paciente de Estudio N°											
N° Historia											
Screening completado											
Consentimiento Verbal											
Periodontograma Baseline	Periodontograma Post RAR										
MUESTRA DE FLUIDO											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 100%; text-align: center; padding: 2px;">SANO</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Valor Periötron</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Eppendorf</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Muestra Congelada</td> </tr> </table>	SANO	Valor Periötron	Eppendorf	Muestra Congelada	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 100%; text-align: center; padding: 2px;">PERIO</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Valor Periötron</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Eppendorf</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Muestra Congelada</td> </tr> </table>	PERIO	Valor Periötron	Eppendorf	Muestra Congelada		
SANO											
Valor Periötron											
Eppendorf											
Muestra Congelada											
PERIO											
Valor Periötron											
Eppendorf											
Muestra Congelada											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 100%; padding: 2px;">Tamaño (MD/AC/G)</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Foto</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Tubo N°</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Estela recibido</td> </tr> </table>	Tamaño (MD/AC/G)	Foto	Tubo N°	Estela recibido	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 100%; padding: 2px;">Tamaño</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Foto</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Tubo N°</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Estela recibido</td> </tr> </table>	Tamaño	Foto	Tubo N°	Estela recibido		
Tamaño (MD/AC/G)											
Foto											
Tubo N°											
Estela recibido											
Tamaño											
Foto											
Tubo N°											
Estela recibido											
MUESTRA HISTOLOGÍA											

ANEXO 3: MATRIZ DE DATOS

Matriz de Datos Histología

Nº Muestra	Genero	Edad	Diente	PS (mm)	Tamaño en mm (MD/AC/G)*	Valor Periotron	Volumen de FCG (µl)	IL-1β (pg/µl)	IL-6 (pg/µl)	IL-10 (pg/µl)	IL-17a (pg/µl)	Area Total de la Muestra	Area Total Epitelio	Area Total TC*	Area Total de I.I.* (mm2)	% de I.I.* sobre el Area total de TC	Recuento celular en área de interés (0,016 mm2)	
1S	M	46	15	3	8/4/03	43	0,25	44,64	0,23	0,26	0,7	7,272	2,081	5,191	0,525	10,11	255	
1P	M	46	18	8	10/5/04	116	0,704	43,49	2,13	0,38	0,36	15,938	3,411	12,527	3,133	25,01	153	
2S	M	54	14	2	7/4/03	16												
2P	M	54	16	5	12/8/05	20												
3S	F	49	15	3	7/3/02	57	0,325	43,23	2,85	0,15	0,21	1,760	0,010	1,750	0,269	15,37	105	
3P	F	49	16	5	8/5/03	65	0,37	71,63	1,58	0,29	0,18	3,637	0,700	2,937	0,478	16,28	277	
4S	M	71	15	3	08/03/2,5	72	0,41	21,68	0,03	0	0,05	3,209	0,872	2,337	0,635	27,17	192	
4P	M	71	16	6	8/7/03	172	1,293	16,91	0	0,03	0,09	7,114	1,020	6,094	1,510	24,78	355	
5S	F	51	14	3	6/5/03	60	0,342	31,08	0,14	0,17	0,21	6,118	0,806	5,312	1,320	24,85	313	
5P	F	51	17	5	8/7/04	96	0,56	65,75	0,02	0,07	0,2	6,670	0,910	5,760	0,208	3,61	281	
6S	F	43	15	2	10/4/03	37												
6P	F	43	16	5	8/3/2,5	74												
7S	M	37	14	3	7/4/03	79												
7P	M	37	16	6	8/4/03	73												
8S	F	50	16	2	5/2/02	116	0,704	0,3	0,06	0	0,03	1,320	0,280	1,040	0,153	14,71	148	
8P	F	50	17	5	10/4/04	156	1,079	59,27	0,01	0	0,07	2,936	0,529	2,407	0,755	31,37	286	
9S	F	63	25	2	8/3/03	74	0,422	9,49	0,01	0,03	0,07	1,542	0,468	1,074	0,121	11,27	168	
9P	F	63	27	7	8/4/03	66	0,375	17,1	0	0	0,08	2,642	0,441	2,201	0,289	13,13	183	
10S	M	42	16	2	9/7/02	131	0,827	4,21	1,21	0,02	0,19	3,960	1,040	2,920	0,226	7,74	145	
10P	M	42	17	6	12/9/02	129	0,81	6,07	3,75	0,03	0,29	5,717	0,548	5,169	0,606	11,72	153	

11S	F	54	25	3	10/5/02	40	0,234	18,95	0,04	0	0,1	7,068	0,552	6,516	0,227	3,48	161
11P	F	54	27	5	19/5/02	170	1,263	21,03	0,18	0,14	0,21	5,665	0,508	5,157	0,372	7,21	285
12S	F	48	15	2	7/3/03	21	0,139	1,95	0,01	0	0,07	2,031	0,725	1,306	0,290	22,21	309
12P	F	48	17	5	8/4/03	120	0,735	33,85	0	0,07	0,2	4,614	1,582	3,032	0,694	22,89	392
13S	M	50	14	3	4/2/02	145											
13P	M	50	16	5	10/4/03	88											
14S	M	57	25	3	7/3/03	54	0,308	18,88	0	0	0,03	2,058	0,558	1,500	0,378	25,20	188
14P	M	57	27	6	8/4/03	154	1,056	42,06	0,02	0,09	0,25	3,585	0,477	3,108	0,707	22,75	396
15S	F	59	16	3	7/3/03	47	0,271	28,05	0,08	0,1	0,11	2,275	0,593	1,682	0,432	25,68	169
15P	F	59	17	5	9/4/05	59	0,336	1,26	0,12	0,1	0,29	3,066	0,812	2,254	0,614	27,24	257
16S	M	46	26	2	9/3/05	50	0,287	2,51	0,63	0,05	0,13	1,869	0,301	1,568	0,172	10,97	230
16P	M	46	28	7	9/4/05	68	0,387	5,91	1,04	0,07	0,12	6,021	1,431	4,590	0,978	21,31	310
17S	F	66	15	3	6/3/03	86	0,495	1,43	0,04	0	0,03	2,911	0,605	2,306	0,366	15,87	142
17P	F	66	17	5	7/3/04	136	0,872	9,46	0,04	0	0,06	4,094	0,916	3,178	0,545	17,15	223
18S	F	54	15	3	7/5/03	71	0,404	15,08	0,37	0,3	0,22	5,176	0,916	4,260	0,765	17,96	105
18P	F	54	16	6	9/5/03	75	0,428	0,81	0,01	0	0,01	3,724	0,802	2,922	0,690	23,61	134
19S	M	67	26	3	8/4/03	88	0,508	0,79	0,01	0,14	0,03	2,859	1,313	1,546	0,617	39,91	205
19P	M	67	27	5	6/2/03	143	0,939	60,11	0,16	0	0,13	3,563	0,888	2,675	0,563	21,05	217
20S	F	53	15	2	7/3/06	32											
20P	F	53	17	5	7/4/07	143											

* MD: mesio-distal / AP: Apico-coronal / G: grosor ; TC: Tejido Conectivo ; I.I: Infiltrado Inflamatorio

IL-17a (pg/?) S	N	9	-339	9	659**	9	745**	9	695	9	1,000	9	449	9	220	9	621	9	224	9	-386	9	010
	C.C	,116	-339	,216	,008	,002	,038	,038	,038	,038	,038	,038	,093	,093	,430	,430	,013	,423	,155	,155	,972	,972	
	Sig.																						
Area Total de la Muestra S	N	15	15	15	15	14	9	9	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	C.C	,556	-,186	,443	,159	,587	,088	,093	,093	,093	,449	,449	1,000	1,000	,718**	,718**	,907**	,618	,014	,704	-,107	,152	,589
	Sig.	,031	,508	,098	,587	,088	,088	,093	,093	,093	,449	,449	1,000	1,000	,718**	,718**	,907**	,618	,014	,704	-,107	,152	,589
Area Total Epitelio S	N	15	15	15	15	14	9	9	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	C.C	,295	,118	,089	-,095	,283	,220	,220	,220	,220	,718**	,718**	,003	,003	1,000	1,000	,446	,661**	,236	,302	,302	,302	,302
	Sig.	,286	,676	,752	,747	,460	,430	,430	,430	,430	,718**	,718**	,003	,003	1,000	1,000	,446	,661**	,236	,302	,302	,302	,302
Area Total TC* S	N	15	15	15	15	14	9	9	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	C.C	,556	-,200	,589	,391	,633	,621	,621	,621	,621	,621	,621	,907**	,907**	,446	,446	1,000	,496	-,250	-,250	-,250	-,250	-,250
	Sig.	,031	,475	,021	,167	,067	,013	,013	,013	,013	,013	,013	,000	,000	,095	,095	1,000	,060	-,369	-,369	-,369	-,369	-,369
Area Total de I.I* (mm2) S	N	15	15	15	15	14	9	9	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	C.C	,753**	-,114	,407	-,013	,800**	,224	,224	,224	,224	,224	,224	,618	,618	,661**	,661**	,496	1,000	,650**	,650**	,650**	,650**	,650**
	Sig.	,001	,685	,132	,964	,010	,423	,423	,423	,423	,423	,423	,014	,014	,007	,007	,060	1,000	,009	,009	,009	,009	,009
% de I.I* sobre el Area total de TC S	N	15	15	15	15	14	9	9	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	C.C	,426	,082	-,025	-,398	,317	-,386	-,386	-,386	-,386	-,386	-,386	-,107	-,107	,236	,236	-,250	,650**	,650**	,650**	,650**	,650**	,650**
	Sig.	,114	,771	,930	,159	,406	,155	,155	,155	,155	,155	,155	,704	,704	,398	,398	,369	,009	,009	,009	,009	,009	,009
Recuento celular en área de interés (0,016 mm2) S	N	15	15	15	15	14	9	9	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	C.C	-,066	-,425	,125	-,334	,109	,010	,010	,010	,010	,010	,010	,152	,152	,302	,302	-,036	,293	,272	,272	,272	,272	,272
	Sig.	,817	,114	,657	,243	,781	,972	,972	,972	,972	,972	,972	,589	,589	,274	,274	,899	,289	,327	,327	,327	,327	,327
	N	15	15	15	15	14	9	9	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

C.C: Coeficiente de correlación

Correlaciones P

	PS (mm) P	Valor Periotron P	Volumen de FCG (?) P	IL-1? (pg/?!) P	IL-6 (pg/?!) P	IL-10 (pg/?!) P	IL-17a (pg/?!) P	Area Total de la Muestra P	Area Total Epitelio P	Area Total TC* P	Area Total de I.* (mm2) P	% de I.* sobre el Area total de TC P	Recuento celular en área de interés (0,016 mm2) P	
Spearman's rho	1,000	-,147	-,147	-,347	,324	-,100	,065	,300	,076	,276	,464	,135	-,238	
		,601	,601	,205	,305	,784	,819	,278	,787	,319	,081	,631	,392	
		15	15	15	12	10	15	15	15	15	15	15	15	
		-,147	1,000	1,000	,179	-,211	-,369	-,075	-,075	,364	,246	,054	,382	
		,601			,524	,511	,294	,790	,483	,182	,376	,850	,159	
		15	15	15	15	12	10	15	15	15	15	15	15	
		-,147	1,000	1,000	,179	-,211	-,369	-,075	-,075	,364	,246	,054	,382	
		,601			,524	,511	,294	,790	,483	,182	,376	,850	,159	
		15	15	15	15	12	10	15	15	15	15	15	15	
		-,347	,179	,179	1,000	,063	,431	,166	-,043	-,050	,068	-,214	-,200	,227
		,205	,524	,524		,845	,214	,553	,879	,860	,810	,443	,475	,416
		15	15	15	15	12	10	15	15	15	15	15	15	15
		,324	-,211	-,211	,063	1,000	,127	,569	,477	,242	,488	,007	-,323	-,232
		,305	,511	,511	,845		,765	,053	,117	,448	,108	,983	,306	,468
		12	12	12	12	12	8	12	12	12	12	12	12	12
		-,100	-,369	-,369	,431	,127	1,000	,399	-,222	-,031	-,215	-,037	,172	-,299
	,784	,294	,294	,214	,765		,253	,538	,933	,550	,919	,634	,401	

