



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA BUCOFACIAL**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
Master Ciencias Odontológicas

**EFECTOS CLÍNICOS Y ANTIINFLAMATORIOS
DE LA RADIACIÓN LÁSER DE Nd:YAG
APLICADA ADICIONALMENTE AL
TRATAMIENTO NO-QUIRÚRGICO EN
PERIODONTITIS CRÓNICA.**

M^a Cristina Egido Manchado

**Directores:
Juan Antonio García Núñez
Clara Gómez Hernández**



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, U.C.M.
INSTITUTO QUÍMICA FÍSICA ROCASOLANO, C.S.I.C.**



JUAN ANTONIO GARCÍA NÚÑEZ, Profesor Titular del Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

M^a CLARA GÓMEZ HERNÁNDEZ, Científico Titular del Departamento de Sistemas de Baja Dimensionalidad, Superficies y Materia Condensada del Instituto de Química Física “Rocasolano” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid;

CERTIFICAN: que la presente Memoria titulada *“Efectos clínicos y antiinflamatorios de la radiación láser de Nd:YAG aplicada adicionalmente al tratamiento periodontal no-quirúrgico en periodontitis crónica”* llevada a cabo por **Dña. Cristina Egido Manchado** ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Creemos que la mencionada Memoria reúne las características para ser defendida ante un Tribunal para la obtención del Master en Ciencias Odontológicas.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a cinco de septiembre de dos mil doce.

Fdo:
Juan Antonio García Núñez

Fdo:
M^a Clara Gómez Hernández

ÍNDICE

1. Introducción.....	5- 17
2. Hipótesis y Objetivos.....	18- 20
3. Material y Métodos.....	21- 28
4. Resultados.....	29- 36
5. Discusión.....	37- 42
6. Conclusiones.....	43- 44
7. Bibliografía.....	45- 51

1. Introducción

1. Periodontitis Crónica

Las enfermedades periodontales son infecciones causadas por microorganismos específicos que afectan a los tejidos de soporte que rodean a los dientes, desencadenándose una respuesta inflamatoria e inmunitaria que conduce a la destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar (*Page y cols., 1997*).

La periodontitis crónica es por tanto una enfermedad inflamatoria que cursa con destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar con la consiguiente formación de bolsas, recesiones o ambas (*Armitage, 1999*).

La etiología de la periodontitis es multifactorial, pero las bacterias son consideradas agentes etiológicos primarios cuyo papel en el inicio de la enfermedad y posterior desarrollo es fundamental. Estos microorganismos son capaces de adherirse a la superficie de los dientes y organizarse en comunidades bacterianas, formando una compleja estructura denominada biofilm (*Marsh y cols., 2005*). Dicho biofilm ha sido definido como: “comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes” (*Costerton y cols., 1987, 2002*).

Como resultado de la maduración del biofilm, las especies patógenas liberan en el surco gingival diversos factores de virulencia (antígenos) y algunos son capaces de evadir los mecanismos de defensa del huésped y causar daño en los tejidos periodontales. Debido a la presencia de antígenos bacterianos, a nivel local se produce una reacción inflamatoria durante la cual una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares (PMN) son atraídos a la zona de interacción entre las bacterias y la superficie tisular.

Los PMN son células fagocíticas predominantes en el tejido conectivo subepitelial, las cuales migran a través del epitelio hacia el fluido crevicular gingival (FCG), gracias a los

fenómenos de adhesión y quimiotaxis. Durante esta migración, provocan la ruptura de hemidesmosomas epiteliales de los tejidos blandos del periodonto. Esta ruptura es inducida por las especies reactivas del oxígeno (ERO): O_2^- , H_2O_2 , HOCl y el radical $\cdot OH$, generados por los PMN activados (*Waterman y cols., 1995*).

También se incrementa la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (*Batista y cols., 2002*) en respuesta a un estímulo inflamatorio, incrementando así la concentración de óxido nítrico, el cual produce efectos negativos sobre los tejidos periodontales. La participación del estrés oxidativo en esta enfermedad es un hecho. La liberación de ERO que provienen de PMN y otras células inmunológicas, conduce a daños oxidativos en biomoléculas que desencadenan cambios morfofuncionales en los endotelios de los vasos y por tanto en los tejidos periodontales que nutren (*Chapple y cols., 1997*).

Una vez en el surco gingival, los PMN activados y gracias a una serie de receptores de superficie específicos, llevan a cabo los procesos de opsonización, fagocitosis y lisis celular con el objetivo de eliminar todos los patógenos periodontales y sus antígenos (*Abbas y cols., 1999*).

El paso de gingivitis a periodontitis conlleva la progresión del “frente inflamatorio” a zonas más profundas del tejido conectivo. Sin embargo, la razón por la que esto sucede no ha sido bien establecida. Uno de los mecanismos podría ser que las bacterias adquieren la habilidad de penetrar en el tejido conectivo o bien las defensas del huésped son perturbadas, permitiendo dicha invasión. De cualquiera de las dos maneras, las bacterias o mejor dicho sus productos, como los Lipopolisacáridos (LPS) pueden inducir la expresión de interleucina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (FNT), los cuales juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inflamatoria. Además, el inicio del proceso inflamatorio a través de la inducción de dichas citocinas (IL-1, FNT), estimula la producción de mediadores secundarios, los cuales a su vez amplifican el grado de inflamación (*Offenbacher, 1996; Jiang y cols., 1999*). Simultáneamente, las citocinas reducen la capacidad de reparar el tejido dañado

a través de la apoptosis de células como los fibroblastos (*Graves y cols., 2001*). Finalmente, la inducción de la cascada inflamatoria estimula la osteoclastogénesis, lo que supondrá una destrucción del hueso alveolar (*Rodan y cols., 2000*).

La producción de citocinas juega un papel central en la progresiva migración del frente inflamatorio hacia el hueso. Según lo expuesto en una reciente revisión, para que se produzca destrucción ósea, dos factores son críticos: 1) el grado de inflamación debe ser suficiente para producir un incremento de la actividad enzimática proteolítica y formación de osteoclastos; 2) los mediadores inflamatorios deben progresar penetrando en el tejido conectivo para llegar a una posición suficientemente cerca del hueso alveolar (*Cochran, 2008*). En este sentido cabe destacar que la citocina proinflamatoria FNT- α tiene un papel clave para alcanzar dicha concentración de mediadores inflamatorios que en última estancia conlleva a la pérdida de hueso alveolar.

La evidencia que soporta la hipótesis del frente inflamatorio fue corroborada en un estudio realizado en primates. La periodontitis experimental fue estimulada mediante la colocación de suturas de seda alrededor de los dientes posteriores. Los animales del grupo experimental, que recibieron una inyección local de bloqueadores de IL -1 y TNF, mostraron una disminución en la progresión del frente inflamatorio hacia el hueso alveolar (*Graves y cols., 1998*).

Otros dos estudios, investigaron también el papel de la IL-1 y del TNF en la destrucción ósea causada por periodontitis experimental mediante el uso de bloqueadores de dichas citoquinas. La inhibición de la actividad de IL-1 y TNF se tradujo en una reducción del 67% del número de osteoclastos formados así como una inhibición del área de pérdida de hueso alveolar en un 60% (*Assuma y cols., 1998, Delima y cols., 2001*). Estos estudios sugieren por tanto que, la superproducción de IL-1 y TNF por el sistema de defensa innato del huésped es el

principal contribuidor para la destrucción del hueso del periodonto debido a su papel como activadoras de osteoclastos.

Más concretamente, las citocinas proinflamatorias IL- 1β , IL-6, IL-11, IL-17, PGE2 y FNT- α , pueden inducir la osteoclastogénesis mediante el incremento de la expresión de RANKL (ligando del receptor del factor nuclear kappa-beta) mientras se disminuye la producción de OPG (osteoprotegerina) en las células progenitoras de osteoclastos. En contraste, mediadores antiinflamatorios como IL-13 e INF- γ , pueden disminuir la expresión de RANKL y/o incrementar la expresión de OPG para inhibir la osteoclastogénesis (*Nakashima y cols., 2000*).

La IL- 1β así como el FNT- α , producidos por diferentes tipos de células: monocitos/macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y osteoblastos, son esenciales en el inicio de la respuesta inflamatoria y posteriormente en la destrucción de los tejidos de soporte del diente. Pueden inducir el incremento de las moléculas de adhesión para leucocitos y células endoteliales y estimulan la producción de quimiocinas, las cuales son necesarias para el reclutamiento de los leucocitos circulantes. También inducen la expresión de otros mediadores inflamatorios, los cuales amplifican o sostienen la respuesta inflamatoria como las prostaglandinas o metaloproteinasas (*Dinarello, 1996; Pfenmaier y cols., 1996*). Aunque el periodonto tiene una alta capacidad para reparar lesiones, en algunas situaciones, estas citocinas pueden limitar la reparación mediante la inducción de la apoptosis de las células productoras de matriz conectiva (*Amin y cols., 2000, Hock y cols., 2001, Graves y cols., 2003*). Además, estas dos citocinas tienen efecto sinérgico en su capacidad de reabsorber hueso (*Stashenko y cols., 1987*).

Individualmente, la IL- 1β regula la producción de prostaglandinas, leucotrienos y factor de activación plaquetario en muchos tipos de células además de su ya conocido papel como precursor de la formación de osteoclastos (*Gowen y Mundy, 1986; Billingham 1987; Takatis y*

cols., 1988; Delaleu y Bickel, 2004). El FNT- α además de ejercer su efecto proinflamatorio, destaca por su efecto sobre la destrucción del tejido conectivo al inducir la producción de colagenasa (*Bertolini y cols., 1986; Meikle y cols., 1989*).

2. Tratamiento clásico de la Periodontitis Crónica

La Periodontitis Crónica (PC) está fuertemente asociada con la presencia de cálculo dental en la superficie radicular. Se ha sugerido que la rugosidad del cálculo en sí misma no induce a una respuesta inflamatoria, incluso se ha demostrado que es posible una adherencia epitelial subgingival tras la desinfección del cálculo mediante clorhexidina (*Lisgarten y Ellegaard, 1973*). En cambio, ofrece una superficie ideal para la colonización bacteriana (*Waerhaug, 1952*) y alberga continuamente y en contacto directo con los tejidos periodontales una placa bacteriana viable (*Zander y cols., 1960; Theilade, 1964; Schroeder, 1969*).

El desbridamiento mecánico de la placa bacteriana de todas las superficies dentales mediante raspado y alisado radicular, para reducir el número total de bacterias y cambiar las condiciones ambientales de los nichos microbianos, constituye el medio principal para detener y prevenir el progreso de la enfermedad periodontal (*Kaldahl y cols., 1993*).

Tradicionalmente, para llevar a cabo el raspado y alisado radicular (RAR) se emplean métodos mecánicos manuales como curetas o aparatos sónicos y ultrasónicos (*Sbordone y cols., 1990*). Sin embargo, es posible que no se consiga eliminar todas las cepas patógenas del área subgingival así como sus toxinas, y por tanto no respondan de forma adecuada al tratamiento. Algunas investigaciones han demostrado que la eliminación total de estas bacterias periodontopatógenas no es predecible tras la terapia periodontal mecánica (*Renvert y cols., 1990; Winkel y cols., 1997*). Estudios clásicos como el desarrollado por el grupo de Waerhaug apuntaban que en más del 90% de los casos podíamos encontrar placa y/o cálculo en aquellas localizaciones con profundidades de sondaje de más de 5 mm (*Waerhaug y cols., 1978*).

Conclusiones semejantes obtuvieron Buchanan y Robertson afirmando que, el 60% de los molares presentaba depósitos de cálculo después del tratamiento periodontal no quirúrgico (*Buchanan y Robertson, 1987*).

Numerosas hipótesis han sugerido que podría deberse a la inaccesibilidad de los instrumentos periodontales para eliminar ciertos nichos en bolsas profundas, o bien por existencia de bacterias específicas asociadas fuertemente a la enfermedad que producen recidivas. De la misma manera, el acceso a áreas como furcaciones, concavidades o la zona distal de los molares puede ser muy limitado (*Adriaens y cols., 1988*). Así, tras la instrumentación con curetas se observa cálculo residual y una capa de barrillo dentinario o “*smearlayer*”, constituida por bacterias y mediadores citotóxicos, que podría dificultar la reinserción de los fibroblastos retardando la curación del proceso (*Polson y cols., 1984*). Además, el hecho de presentar bolsas residuales y no lograr un adecuado control de la infección, está directamente relacionado con el futuro riesgo de pérdida de los tejidos periodontales (*Claffey y cols., 1990*).

3. Tratamiento coadyuvante de la PC: La radiación láser.

En la búsqueda de terapias eficaces para lograr una superficie radicular biocompatible, con mayor grado de descontaminación y reducción de la inflamación de los tejidos periodontales adyacentes, aparecen los láseres como terapia alternativa o coadyuvante de los métodos tradicionales en los últimos años.

Las primeras aplicaciones de la radiación láser en el ámbito de la odontología fueron descritas por el grupo de Goldman y por Stern y Sognaes (*Goldman y cols., 1964; Stern y Sognaes, 1972*). Ambos artículos describieron el efecto de un láser de rubí sobre el esmalte y la dentina.

La palabra “Láser” es el acrónimo para “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (amplificación de luz mediante emisión estimulada de radiación). En general, los diferentes tipos de láseres son clasificados de acuerdo al medio activo utilizado. Cada sistema láser tiene su longitud de onda característica de emisión (λ) (*Miserendino y cols., 1987*). La radiación láser, en función de su λ , interactúa de forma distinta con los tejidos. Cuando la luz láser alcanza un tejido puede reflejarse, absorberse, dispersarse o ser transmitida hacia los tejidos circundantes. En el tejido biológico, la absorción es principalmente debida a la presencia de moléculas de agua libres, proteínas, pigmentos u otras macromoléculas. El coeficiente de absorción depende en gran medida de la λ de la radiación láser, teniendo un papel fundamental dichas moléculas de agua. El coeficiente de absorción ($\alpha : \text{cm}^{-1}$) para el agua es de 0,00029 para el láser de Argon ($\lambda=514 \text{ nm}$), 0,020 para el láser de diodo (800 nm), 0,61 para el laser de Neodimio ($\lambda=1.064 \text{ nm}$), 12.000 para el láser de Erblio ($\lambda=2.940 \text{ nm}$) and 860 para el láser de CO2 ($\lambda= 10.600 \text{ nm}$) (*Niemz, 1996*).

La terapia periodontal con láser, se caracteriza por ser un procedimiento no invasivo con una mínima destrucción celular así como una hinchazón mínima de los tejidos. Entre sus numerosas características cabe destacar su alto efecto bactericida y detoxificante. Es un tratamiento que ofrece la selección de varios parámetros, permitiendo su reproducibilidad las veces que se desee y con muy buena aceptación por parte del paciente. Se ha comprobado que mejora y acelera la cicatrización de la herida; reduce el dolor postoperatorio, la inflamación y el edema; y disminuye la necesidad de antibiótico así como de anestesia local (*Cobb y cols., 2010, Sgolastra y cols., 2011*).

Según la revisión llevada a cabo por Aoki y cols. en 2004, debido a que el uso del láser puede lograr una excelente ablación del tejido con un fuerte efecto bactericida, se ha convertido en una de las modalidades de tratamiento periodontal no quirúrgicas más promisorias. Otra

ventaja de esta terapia es que puede alcanzar localizaciones que la instrumentación mecánica convencional no puede.

Además, como ya hemos comentado anteriormente, la instrumentación mecánica produce un barrillo dentinario que puede dificultar la cicatrización del periodonto. Sin embargo, la terapia con láser produce una detoxificación sin barrillo dentinario, dejando una superficie con condiciones favorables para la inserción de los tejidos periodontales.

Gracias a los últimos avances, el intervalo de longitudes de onda de emisión de la radiación láser se ha visto ampliado considerablemente, y numerosos estudios sugieren que los láseres pueden ser aplicados en diferentes tipos de tratamientos dentales. Hoy en día, disponemos de diferentes equipos de radiación láser en el campo periodontal (Er:YAG, Er,Cr:YSGG, Nd:YAG, diodos, CO₂), cada uno con unas características particulares y efectos muy diversos, por lo que se exige la selección del más idóneo para cada tipo de trabajo.

El láser de Nd:YAG (acrónimo del inglés “neodymium-doped yttrium aluminium garnet”) sigue demostrando un efecto bactericida (*Kranendonk y cols., 2010*) suprimiendo y erradicando patógenos periodontales putativos (*Cobb y cols., 1992, Ben Hatit y cols., 1996*). Sin embargo, recientes investigaciones han concluido que no debe utilizarse como sustituto del RAR para eliminar los depósitos de cálculo (*Cobb y cols., 2010*).

El láser de Er:YAG (acrónimo del inglés “erbium-doped yttrium aluminium garnet”) es bien absorbido por todos los tejidos biológicos que contienen moléculas de agua, siendo en la actualidad uno de los láser más utilizados por su versatilidad en la ablación de tejidos duros y blandos (*Shoop y cols., 2002; Aoki y cols., 2004*). Ha sido demostrada su capacidad para eliminar no sólo bacterias sino también toxinas bacterianas difundidas por el cemento radicular (*Ishikawa y cols., 2004*) así como los resultados positivos obtenidos en la remoción del cálculo en las bolsas periodontales (*Watanabe y cols., 1996; Schwarz y cols., 2001 y 2003*). Recientemente, el empleo de láseres de baja potencia en una λ de emisión comprendida en el

intervalo rojo (visible)-infrarrojo cercano, lo que viene a denominarse “*fototerapia láser o terapia láser de bajo nivel energético*” han mostrado un efecto positivo disminuyendo el sangrado, profundidad de la bolsa y reduciendo niveles de metaloproteinasa-8 (MMP-8) en bolsa periodontal (*Qadri y cols., 2005*).

4. Láser de Nd: YAG.

En 1961, Snitzer publicó el prototipo del láser de Nd:YAG, el cual emitía un espectro con una longitud de onda de 1,06 micras; siendo Geusic en 1964 el que lo desarrollaría finalmente (*Snitzer y cols., 1961; Geusic y cols., 1964*).

El medio activo del láser de Nd: YAG es un granate (cristal) y está compuesto por los elementos itrio, aluminio y oxígeno formando una matriz cristalina ($Y_3Al_5O_{12}$), dopados con neodimio (ión trivalente de la familia de los lantánidos). Es un láser de luz pulsada con una $\lambda = 1.064$ nm, por tanto emitiendo dentro de la región espectral del infrarrojo cercano, lo que permite su transmisión a través de fibra óptica de 200 a 400 micras de diámetro, facilitando su manejo y consiguiendo llegar hasta cualquier lugar de la cavidad bucal, inclusive dentro del conducto radicular. Por ello, el láser de Nd:YAG ha sido recomendado para varios tipos de cirugías menores de tejido blando como gingivoplastias, gingivectomías, biopsias de lesiones incipientes o frenectomías (*Pick y cols., 1993*). Por otra parte, debido a que su longitud de onda de emisión apenas es absorbida por el agua, su energía se dispersa o penetra en mayor cuantía en los tejidos biológicos, a diferencia de otros láseres infrarrojos con fuerte absorción por el agua: Er:YAG o CO₂. Así, en el agua, el láser de Nd: YAG podría teóricamente penetrar a una profundidad de 60 mm después de ser atenuada su energía inicial en un 10% (*AAP, 2002*).

Gracias a las características de penetración y termogénesis, el láser Nd: YAG produce una capa gruesa de coagulación en la zona irradiada y es ahí donde muestra un gran poder hemostático. En 1990, la Federación Dental Americana (FDA) aprobó la eliminación de tejidos

blandos con láser pulsado de Nd: YAG (*Sulewski, 2000*). White y colaboradores utilizaron el láser Nd: YAG sin anestesia en la cavidad oral, observando un mínimo sangrado en comparación a las cirugías tradicionales (*White y cols., 1991*).

Resulta sencilla la aplicación del láser mediante una fibra óptica flexible con una superficie de contacto de 400µm (diámetro del núcleo: 320µm) en la bolsa periodontal; por ello y debido a su gran efecto bactericida, en 1997 la FDA aprobó la limpieza del surco periodontal mediante láser Nd: YAG (*Sulewski, 2000*). Sin embargo en los últimos años, debido a los resultados controvertidos derivados de numerosos ensayos clínicos en los que se comparó el desbridamiento convencional versus el desbridamiento con láser de Nd:YAG, se recomienda este láser como coadyuvante, pero no como sustituto de los métodos tradicionales (*Cobb y cols., 2010*).

Existe un protocolo preestablecido para la utilización de este láser, que recomienda su aplicación una vez completada la fase mecánica del tratamiento periodontal ante la persistencia de una profundidad de bolsas de 4-6 mm y con sangrado al sondaje en zonas localizadas. Se debe trabajar a 1,5-2 W de energía con una frecuencia de 15-20 pulsos por segundo, utilizando una fibra de 320µm; se aplica habitualmente el láser durante 20-120 segundos en cada bolsa periodontal con el objetivo de eliminar el tejido de granulación y vaporizar el tejido necrótico (*Bader, 2000; Miyazaki y cols., 2003*).

Sin embargo, en la mayoría de ensayos clínicos en los que se ha utilizado este láser, no se ha seguido un protocolo establecido en cuanto a los parámetros utilizados. Esta falta de homogeneidad queda patente si nos fijamos en la revisión de *Slot y cols., 2009*. Dicha revisión sobre el uso del láser de Nd:YAG en el tratamiento periodontal no quirúrgico, recoge 8 ensayos clínicos: *de Andrade y cols., 2008; Kara y cols., 2008; Liu y cols., 1999; Miyazaki y cols., 2003; Neil y Mellonig, 1997; Noguchi y cols., 2005; Radvar y cols., 1996; Sjöström y cols., 2002*. Cuatro de dichos ensayos clínicos emplearon el laser de Nd:YAG como monoterapia

para el desbridamiento; comparándolo dos de ellos con el RAR efectuado de forma manual. El resto, lo emplearon como coadyuvante después del RAR, aunque en el caso de *Liu y cols., 1999* hay un grupo que recibió en primer lugar el tratamiento láser seguido del RAR. Los resultados individuales de cada ensayo son muy heterogéneos, por lo que la conclusión final de dicha revisión, al igual que la de otras revisiones sobre este tema (*Karlsson y cols., 2008; Sanz y cols., 2008*), es que la terapia láser no aporta ningún beneficio adicional.

Sin embargo, los últimos estudios más recientes publicados sobre el empleo de Nd:YAG como terapia coadyuvante al RAR, han obtenido resultados beneficiosos a favor de dicha combinación terapéutica, frente al empleo del RAR en exclusividad. Dos recientes publicaciones que describen los efectos a corto plazo (*Qadri y cols., 2010a*) y a largo plazo (*Qadri y cols., 2010b*) son claros ejemplos del efecto positivo del láser de Nd:YAG. Nuestro propio grupo de investigación, ha descrito como tras la aplicación de una sola sesión de láser después del RAR, se obtienen mejorías a nivel inmunológico al analizar los niveles de IL-1 β , TNF- α en el FCG (*Gómez y cols., 2011*). De la misma manera, en el ensayo clínico llevado a cabo por Eltas y colaboradores, han observado una mayor disminución de los niveles de IL-1 β y MMP-8 en el FCG de las bolsas periodontales que recibieron el láser como coadyuvante (*Eltas y cols., 2012*). Además, han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a los 3 y 9 meses en cuanto a la disminución en la profundidad de sondaje (PS) y el nivel de inserción clínica.

Finalmente, merece la pena destacar el trabajo realizado por el grupo de Giannelli, en el que compara el efecto de diferentes protocolos con distintos tipos de láser en pacientes periodontales. Uno de los hallazgos de este trabajo es que tanto el láser de diodo como el de Nd:YAG, son capaces de reducir la activación endotelial y la extravasación de leucocitos en el tejido conectivo de la encía controlando los niveles de la molécula de adhesión intercelular-1

(ICAM-1). Esta propiedad, junto con su capacidad para inactivar LPS bacterianos, supone un efecto antiinflamatorio importante en los tejidos periodontales (*Giannelli y cols., 2012*).

5. Justificación.

Pese al considerable interés que ha generado la terapia complementaria con láser de Nd:YAG y los resultados positivos a nivel inmunológico reportados en los estudios más recientes, actualmente sigue existiendo algo de controversia en cuanto a la eficacia clínica del tratamiento coadyuvante con láser sobre el RAR.

Esta controversia creemos puede deberse a la falta de homogeneidad en cuanto a parámetros de irradiación aplicados (inherentes a cada equipo láser comercializado) como diferentes energías, velocidades de repetición (frecuencias), tiempos de exposición y diferentes aplicadores y en cuanto al no consenso entre los protocolos de actuación con los pacientes, hechos que no permiten comparaciones verdaderas de los resultados.

Por otra parte, estudios también recientes llevados a cabo con algún otro tipo de láser (diodo), han mostrado que se obtienen mejores resultados con aplicaciones repetidas de radiación láser después del RAR, frente a la aplicación única, en las primeras semanas del tratamiento.

Por todo ello, debido a los recientes efectos comentados, beneficiosos desde un punto de vista inmunológico, y a la falta de ensayos clínicos que comparen los efectos entre una única exposición y varias exposiciones a la radiación láser de Nd:YAG después del desbridamiento mecánico, pensamos que se deberían evaluar y comparar todos estos efectos a nivel clínico e inmunológico teniendo presente la manera de dosificar la radiación láser.

2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La eliminación del biofilm subgingival es un requisito imprescindible en la terapia periodontal. Diversos estudios demuestran como el tratamiento periodontal convencional no quirúrgico resulta inefectivo a la hora de eliminar la placa en bolsas profundas. Por otra parte, la interacción entre las bacterias periodontopatógenas y los leucocitos polimorfonucleares (PMN) activa una cascada de procesos bioquímicos. Así, durante la fagocitosis los PMN liberan citocinas, potentes especies oxidativas y radicales tóxicos, alterando el balance entre los niveles de radicales libres y las defensas antioxidantes celulares y desencadenando al mismo tiempo el proceso inflamatorio.

Por ello, se hace necesaria la búsqueda de terapias alternativas o coadyuvantes más eficaces en la eliminación de la placa y con capacidad adicional de modular el mecanismo antioxidativo celular. Por todo ello, dentro de este contexto pensamos que la fototerapia láser podría situarse en una posición ventajosa.

El **Objetivo principal** del presente trabajo de investigación fue *comparar la respuesta entre el tratamiento periodontal convencional y el mismo tratamiento complementado con Terapia Láser, mediante el empleo de la radiación procedente de un láser de Nd:YAG, bien aplicada en una única dosis o bien en dosis repetidas, desde un punto de vista clínico, inflamatorio y antioxidante, en pacientes adultos afectados de periodontitis crónica*. Como objetivos específicos se propusieron:

- Analizar las diferencias encontradas entre los tres tipos de tratamiento a lo largo del periodo evaluado, en cuanto a la evolución de los siguientes parámetros clínicos: Porcentaje de sangrado en boca total (PPBT), porcentaje de placa en boca total (PBBT), profundidad de sondaje (PS) en mm.

- Analizar las diferencias encontradas entre los tres tipos de tratamiento a lo largo del periodo estudiado, en cuanto a la evolución de las concentraciones (pg/ μ L) de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y FNT- α y del estado antioxidante total del FGC.
- Estudiar la dependencia de estos efectos con la frecuencia de aplicación del tratamiento: una única dosis o repetida en varias sesiones

3. Material y Métodos

1. Diseño del estudio y población estudiada

El presente trabajo de investigación ha consistido en un estudio clínico prospectivo controlado aleatorizado. El estudio ha sido diseñado para comparar la respuesta al tratamiento periodontal convencional, con la obtenida con ese mismo tratamiento complementado con terapia láser (radiación láser de Nd:YAG, aplicada en una única dosis o en dosis repetidas), en pacientes con Periodontitis Crónica moderada.

Dicha investigación ha sido llevada a cabo en el Departamento de Periodoncia de la Universidad Complutense de Madrid, dónde se seleccionó y se trató a la población diana. Los resultados obtenidos, fueron procesados en el Departamento de Química Láser dentro del Instituto de Química y Física Rocasolano, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid.

El estudio se realizó bajo los principios éticos aprobados por la Unidad de Coordinación de Ensayos Clínicos del Hospital San Carlos de Madrid, a fecha de 25 de Junio del 2009 (Código interno: E-09/254).

El cálculo del tamaño muestral determinó que nueve sujetos por cada grupo de tratamiento proporcionaría una potencia del 80% para alcanzar una verdadera diferencia de 1 mm entre los grupos de estudio y el grupo control, usando como variable primaria la reducción de la profundidad de sondaje y asumiendo una desviación estándar de 0,7mm. De acuerdo con esto y después de examinar a 35 pacientes en total, se incluyeron 27 pacientes (9 por grupo) que cumplían los criterios de inclusión. Dichos pacientes fueron investigados desde octubre de 2010 hasta junio de 2012.

Los 27 pacientes que se estudiaron (10 hombres y 17 mujeres) con edades comprendidas entre los 35 y 70 años (edad media de 47,5 años) cumplieron los siguientes criterios de inclusión: diagnóstico de Periodontitis Crónica moderada generalizada conforme a la clasificación de Armitage de 1999, con presencia de al menos 4 dientes por cuadrante, en los

cuales no hubiera coronas, puentes o apoyo de prótesis removible, ni amalgamas tipo II o IV. La profundidad de sondaje debía estar comprendida entre 4 – 6 mm en al menos un 30% de los dientes (*Armitage, 1999*).

Los criterios de exclusión que se aplicaron fueron los siguientes: pacientes que durante el último año hubiesen recibido tratamiento periodontal, aquellos en tratamiento con antibióticos o antiinflamatorios en los 3 últimos meses o durante la realización del estudio así como pacientes en tratamiento con inmunosupresores o con cualquier condición sistémica que tuviese interacción con el periodonto. Las mujeres embarazadas o en periodo de lactancia también fueron excluidas así como aquellos pacientes que utilizaban colutorios antisépticos en su rutina diaria.

Todos ellos antes de comenzar el estudio, firmaron un consentimiento informado en dónde se les explicaba los objetivos del estudio así como la posibilidad de abandonarlo voluntariamente.

La investigación fue llevada a cabo por un examinador cegado (C. E.) encargado de recoger los parámetros clínicos e inmunológicos; y un operador (D. N.) independientes. Las muestras de FCG obtenidas fueron también cegadas para su posterior análisis en el laboratorio de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Los 27 pacientes estudiados fueron divididos de forma aleatorizada en dos grupos experimentales (de 9 pacientes cada uno) y un grupo control. La aleatorización de los mismos fue llevada a cabo mediante sobres herméticamente cerrados los cuales contenían el protocolo de tratamiento coadyuvante. Dichos sobres eran abiertos por el operador justo después de realizar el tratamiento periodontal básico.

2. Variables Respuesta.

Las mediciones fueron tomadas antes del tratamiento y a las 4 semanas y 8 semanas después del mismo por un periodoncista calibrado (C.E.). La calibración del examinador se realizó con 5 pacientes que no formaron parte del estudio, en los cuales se realizó un periodontograma inicial y otro transcurridas 48 horas. La calibración se completó de forma exitosa, una vez que ambas mediciones coincidieron en $> 90\%$.

Las variables clínicas utilizadas en esta investigación fueron: Porcentaje de Placa en boca total (PPBT) (*Ainamo y Bay, 1975*); Porcentaje de Sangrado en boca total (PSBT) (*Ainamo y Bay, 1975*) y Profundidad de Sondaje media. Dichos parámetros clínicos fueron estudiados en todos los dientes, excluyendo los terceros molares, en seis localizaciones por cada diente.

Para el cálculo del PPBT se utilizó una sonda exploratoria de caries del nº 23; mientras que para la medición de la Profundidad de Sondaje (PS) se empleó una sonda periodontal manual milimetrada CP15 (UNC; Hu-FriedyInstrument Co, Chicago, IL, USA). La determinación del PSBT se realizó mediante la presencia o ausencia de sangrado a los 30 segundos tras el sondaje.

Las variables inmunológicas estudiadas fueron: IL- 1β , FNT- α y Capacidad Antioxidante en FCG. Para la determinación de las mismas se procedió a la recolección de FCG mediante tiras de papel (Periopaper, Oraflow INC., Plainview, NY, USA). La localización seleccionada para la toma de fluido fue la bolsa más profunda de cada cuadrante, tomando así 4 muestras en 4 bolsas periodontales de cada paciente del estudio, excluyendo los terceros molares para evitar contaminación por saliva. La toma de muestras se efectuó al día siguiente de la toma de los registros clínicos para evitar el sangrado y la contaminación de las puntas en la toma de muestras. Tras el aislamiento de la zona con rollitos de algodón y secado con una jeringa de aire, se procedió a eliminar la placa supragingival cuidadosamente con una cureta estéril. Posteriormente se introdujo la tira de papel en el surco hasta notar resistencia y se esperaron 30

segundos para permitir la absorción del fluido. Cuando las muestras fueron contaminadas con sangre fueron desechadas.

Después de la recogida de FCG, el volumen de la muestra fue medido con Periotron 8000 (Pro-Flow Inc., Amityville, New York, USA). Las lecturas del Periotron 8000 fueron convertidas en volumen actual (μL), previa realización de una curva de calibrado realizada con suero humano de pacientes sanos (donantes de sangre) y ajustada a una regresión polinómica de cuarto orden (*Chapple y cols., 1999*).

Las puntas de Periopaper fueron almacenadas en viales estériles con filtro y congeladas a -80°C para su posterior análisis.

3. Tratamiento Periodontal. Secuencia de tratamiento.

Todos los pacientes incluidos en el estudio recibieron un tratamiento periodontal básico para el control de la infección periodontal. Dicho tratamiento consistió en un desbridamiento mecánico para la eliminación del cálculo supragingival y subgingival.

La eliminación del cálculo supragingival se realizó con un sonicador SONYflex 2003 de Kavo y punta accesoria universal, y posteriormente se aplicó una pasta abrasiva (Dentsply) mediante una taza de goma para contra-ángulo.

La eliminación del cálculo subgingival se realizó de forma manual mediante curetas (Hu-Friedy Co., Chicago, IL, USA) y bajo anestesia local con lidocaína al 2% (Octocaine 1:100.000, Laboratorios Clarben S.A, Madrid). Los 4 cuadrantes fueron instrumentados de forma manual en dos citas separadas entre sí por un intervalo de 48 horas. En cada una de la citas se procedía al raspado y alisado radicular de un cuadrante superior y otro inferior durante un tiempo aproximado de 1 hora. Todos los tratamientos fueron llevados a cabo por el mismo periodoncista (D. N.).

Además, todos los pacientes fueron instruidos en la técnica de cepillado modificada de Bass así como en la capacidad de diferenciar la presencia o ausencia de placa bacteriana en las superficies dentales mediante el uso de sustancias reveladoras de placa. Después de cada reevaluación se repetían dichas instrucciones y se motivaba de nuevo al paciente.

Los pacientes no utilizaron colutorios durante el periodo de estudio para no enmascarar los resultados obtenidos.

Una vez finalizado el desbridamiento mecánico, los pacientes eran asignados de manera aleatoria a un grupo de estudio. Los 27 pacientes quedaron por tanto divididos de la siguiente manera: 9 pacientes en el grupo experimental I; 9 pacientes en el grupo experimental II y otros 9 pacientes en el grupo control.

Los pacientes del grupo experimental I recibieron una única aplicación de láser de Nd:YAG como coadyuvante, al día siguiente de finalizar el tratamiento periodontal básico.

Los pacientes del grupo experimental II recibieron 5 sesiones de láser de Nd:YAG durante la dos semanas posteriores al tratamiento periodontal básico aplicadas en días alternos y comenzando la primera de ellas al día siguiente del último RAR.

Los pacientes que formaban parte del grupo control después del tratamiento periodontal básico común, no recibieron ningún tratamiento adicional.

4. Tratamiento con láser de Nd:YAG.

Los grupos experimentales I y II recibieron de forma complementaria la radiación fundamental de un láser de Nd: YAG (Diodium-Schütz Weil-Dental) emitiendo a 1064nm, con una duración de pulso de 2ms, una velocidad de repetición de 10Hz y transmitida a través de una fibra óptica de 200µm en toda la cavidad oral.

La energía de salida del láser, medida con un detector piroeléctrico Gentec-DE 500+ en combinación con una consola Gentec-EO SOLO fue de 75 mJ, y el tiempo de exposición utilizado por cada superficie de diente (vestibular y lingual) fue de 30s.

El láser fue aplicado dentro de la bolsa periodontal con un movimiento continuo de entrada y salida. Después del tratamiento de cada diente, la punta de la fibra óptica que se carboniza fue cortada para evitar problemas de degradación o contaminación que interfiriesen en su correcta dosificación.

5. Procesado de las muestras de FCG para la medición de IL-1 β y FNT- α .

Las muestras diluidas de FCG fueron analizadas para determinar la concentración de mediadores de la inflamación mediante la técnica ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Los niveles de IL-1 β y FNT- α en FCG fueron determinados por duplicado mediante BLK-223 (kit de ELISA para determinación del FNT- α humano) y BLK-224 (kit de ELISA para la determinación de IL-1 β) respectivamente, ambos de Biolink (Biolink 2000, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se calcularon a partir de las curvas estándar creadas para cada estudio. La concentración de citocina en una determinada posición se calculó dividiendo la cantidad de citocina determinada por ELISA entre el volumen de FCG extraído correspondiente a esa misma posición, previamente calculado a partir de la curva de calibrado del Periotron 8000, y por lo tanto se expresó en pg/ μ L.

6. Procesado de las muestras de FCG para la medición de la Capacidad Antioxidante.

La determinación del estado antioxidante total del FCG se midió mediante el test fotométrico (ImAnOx (TAS) Kit, Immundiagnostik AG, Stubenwald-Alle 8a, D64625 Bensheim). Esta determinación se basa en la reacción de los antioxidantes de la muestra con una cantidad definida de peróxido de hidrógeno proporcionado exógenamente (H₂O₂). Los

antioxidantes de la muestra eliminan una cantidad del H₂O₂ suministrado. El H₂O₂ residual se determina fotométricamente mediante una reacción enzimática que implica la conversión de 3,3',5-5'- tetrametilbencidina (TMB) en un producto coloreado. Las muestras se miden a 450 nm y son expresadas en μmol/L.

7. Análisis estadístico.

Se procedió al análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos calculando: media, mediana y desviación típica. Se analizaron las diferencias en la evolución de los parámetros clínicos e inflamatorios antes del tratamiento, a las 4 y 8 semanas entre los tres tipos de tratamientos aplicados.

Tras los resultados obtenidos después de realizar una prueba de normalidad indicada al tamaño de la muestra (Shapiro- Wilk), se decidió realizar test no paramétricos para el análisis de las variables cuantitativas.

Para establecer comparaciones intragrupo el test utilizado fue el test de Friedman, considerándose los valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos. Para establecer comparaciones intergrupo, el test utilizado fue el test Kruskal –Wallis, aceptándose los valores $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

Después de la realización de ambos test en aquellos resultados estadísticamente significativos, se llevaron a cabo pruebas “a posteriori” basadas en la comparación por parejas, para así descubrir entre que grupos se encontraban las diferencias.

4. Resultados

1. Variables clínicas.

Las variables clínicas que se estudiaron en la presente investigación fueron: PPBT, PSBT y PS. Todas ellas fueron analizadas en el tiempo, partiendo de una situación inicial, para ver su evolución a las 4 y 8 semanas respectivamente en los 3 grupos de tratamiento respecto a esa situación inicial (*diferencias intragrupo*). Además, tanto a las 4 como a las 8 semanas, se examinaron las diferencias en la evolución de los parámetros estudiados entre los 3 grupos de tratamiento (*diferencias intergrupo*).

En términos generales se observó a nivel clínico una mejora de la enfermedad periodontal para los 3 grupos de estudio. No se observaron complicaciones durante el periodo de seguimiento tales como abscesos o infecciones, tolerándose de forma positiva los 3 tratamientos por parte de los pacientes.

1.1 Porcentaje de placa en boca total:

Hubo una marcada reducción en cuanto a los niveles de placa en los 3 grupos de tratamiento a lo largo del periodo de seguimiento. En la evaluación a las 4 semanas, tanto el grupo control (RAR) como el grupo complementado con terapia láser repetida (RAR + Nd:YAG repetido), mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a sus valores iniciales. Cuando se examinó a los pacientes a las 8 semanas, tanto el grupo control como los dos grupos experimentales (RAR + Nd:YAG, RAR + Nd:YAG repetido), revelaron diferencias estadísticamente significativas respecto a sus valores previos al tratamiento.

Sin embargo, no se observaron diferencias intergrupo en los valores alcanzados en los parámetros evaluados a lo largo del periodo de seguimiento del estudio. (Figura 1).

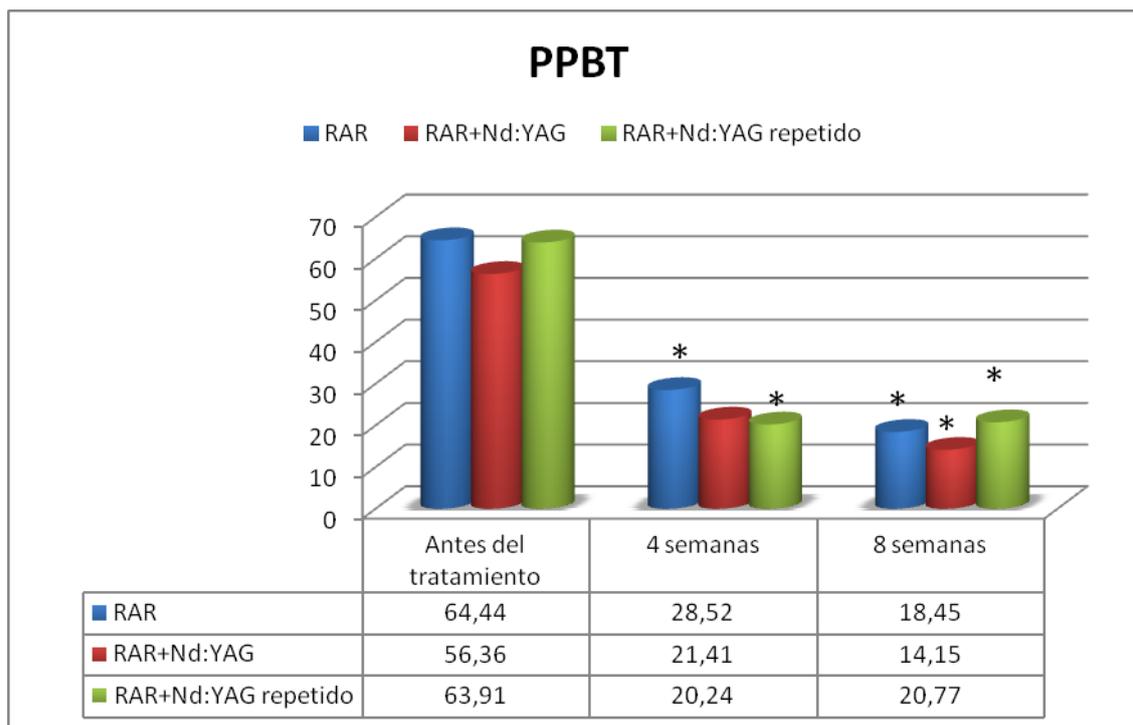


Figura 1.

* Diferencias estadísticamente significativas intragrupo $p < 0,05$.

** Diferencias estadísticamente significativas intergrupo $p < 0,05$.

1.2 Porcentaje de sangrado en boca total:

El PSBT, valorado de manera dicotómica tras el sondaje, reveló una importante disminución para todos los grupos a las 4 semanas de evaluación, continuándose el descenso hasta las 8 semanas (Figura 2). Sin embargo, no en todos los grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En el grupo control, pese a que el sangrado se redujo de manera sustancial, los resultados no fueron estadísticamente significativos respecto al inicio del tratamiento.

Por el contrario, en el grupo RAR + Nd:YAG a las 8 semanas, así como en el grupo RAR + Nd:YAG repetido tanto a las 4 como a las 8 semanas de seguimiento, se hallaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los porcentajes iniciales.

Las diferencias intergrupo no fueron estadísticamente significativas ni a las 4 ni a las 8 semanas de seguimiento. (Figura 2).

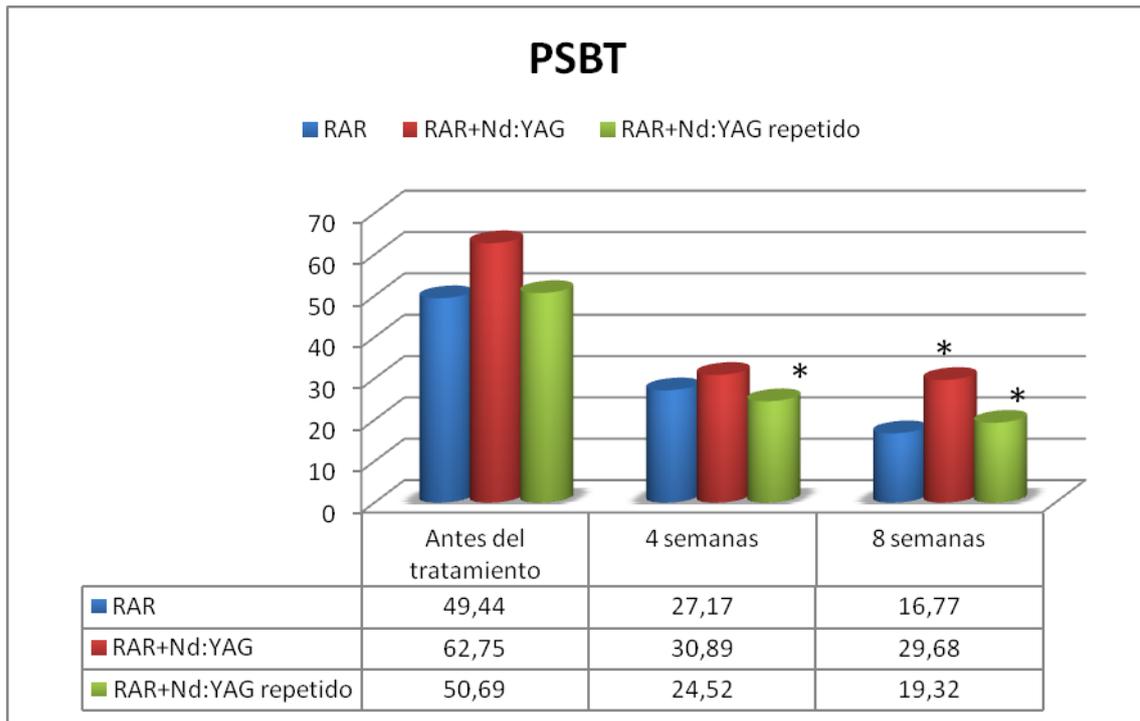


Figura 2

* Diferencias estadísticamente significativas intragrupo $p < 0,05$.

** Diferencias estadísticamente significativas intergrupo $p < 0,05$.

1.3 Profundidad de sondaje:

Observándose la profundidad de sondaje media de las 3 modalidades de tratamiento, podemos apreciar como los 3 tratamientos resultan efectivos en la reducción de bolsa. La mayor disminución la encontramos en el grupo RAR + Nd:YAG a las 4 semanas de evaluación, siendo ésta de 0,8 mm.

Las diferencias intragrupo encontradas, son estadísticamente significativas en los 3 grupos respecto al inicio de los tratamientos tanto a las 4 como a las 8 semanas. Sin embargo, ni entre la cuarta y octava semana las diferencias son significativas. Tampoco aquí se encontraron diferencias significativas intergrupo (Figura 3).

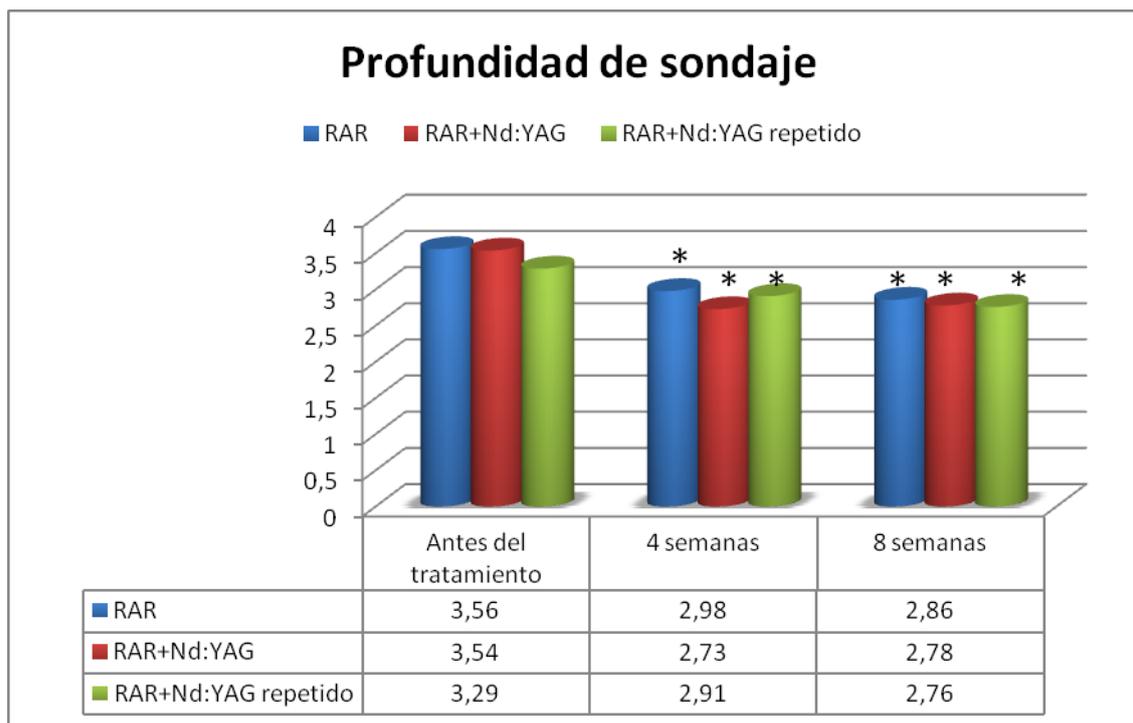


Figura 3

* Diferencias estadísticamente significativas intragrupo $p < 0,05$.

** Diferencias estadísticamente significativas intergrupo $p < 0,05$.

2. Variables inmunológicas.

2.1 Interleucina 1 β (IL-1 β).

Los niveles de la IL-1 β aumentaron de manera progresiva a las 4 y 8 semanas en el grupo control. En el caso del grupo RAR + Nd:YAG, el recuento de IL-1 β disminuyó a las 4 semanas de evaluación, para aumentar después hasta valores cercanos a los registrados antes del tratamiento. Sin embargo, en el grupo RAR + Nd:YAG repetido, la disminución de los niveles de IL-1 β que tuvo a lugar en la semana 4, siguió produciéndose hasta la semana 8.

Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas respecto al inicio a las 4 semanas de seguimiento para los grupos experimentales (RAR + Nd:YAG y RAR + Nd:YAG repetido). Además, el análisis de diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos mediante el test de Kruskal-Wallis complementado por pruebas a posteriori basadas en el

análisis por parejas, detectó diferencias estadísticamente significativas a las 8 semanas entre el grupo control y el grupo RAR + Nd:YAG repetido (Figura 4).

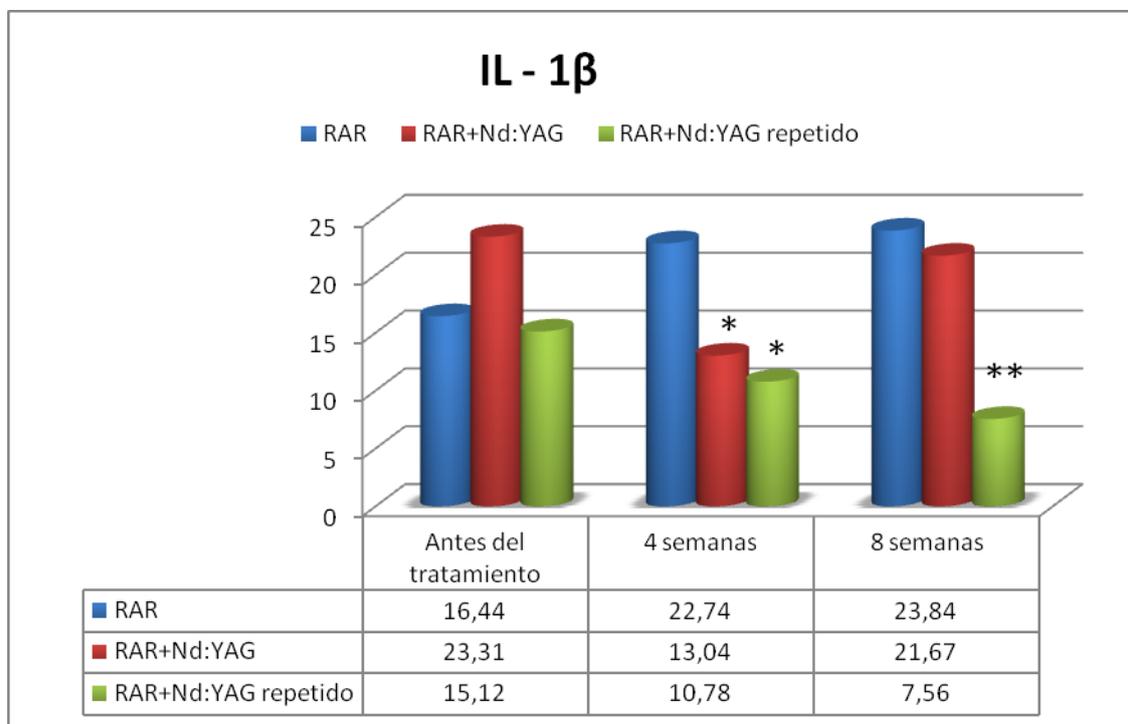


Figura 4

* Diferencias estadísticamente significativas intragrupo $p < 0,05$.
 ** Diferencias estadísticamente significativas intergrupo $p < 0,05$.

2.2 Factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α):

Al evaluar la variación de los niveles del FNT- α en el FCG dentro del periodo de seguimiento y en cada grupo de tratamiento, observamos que el grupo control (RAR) mostró un aumento de dichos niveles a las 4 semanas. A las 8 semanas incluso se observaron unos niveles más elevados, los cuales fueron estadísticamente significativos respecto al estado inicial de partida y respecto a los otros dos grupos (RAR+Nd:YAG y RAR+Nd:YAG repetido).

En el caso de los grupos complementados con la terapia láser tanto de dosis única como repetida, los niveles no fueron estadísticamente significativos durante todo el tiempo que duró la investigación. Sin embargo en el grupo RAR + Nd:YAG la disminución que tuvo lugar a las 4 semanas aumentó ligeramente a las 8 semanas; mientras que en el grupo RAR + Nd:YAG

repetido se pudo observar una tendencia a la disminución del TNF- α progresiva hasta las 8 semanas respecto al inicio del estudio (Figura 5).

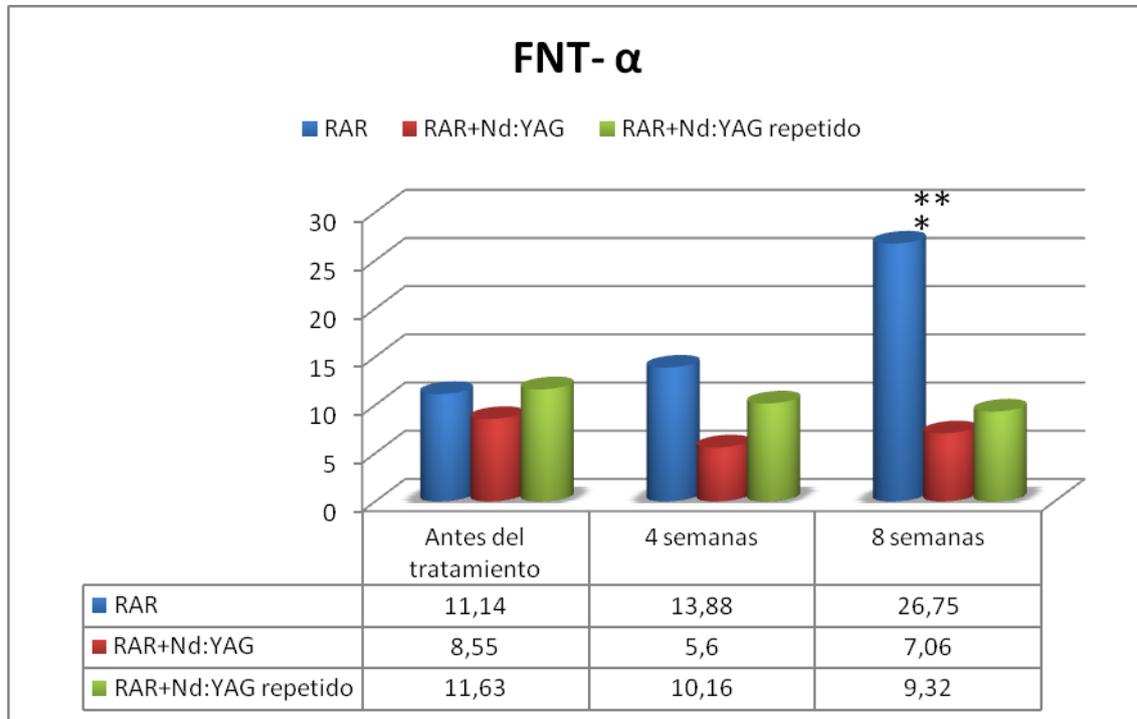


Figura 5

* Diferencias estadísticamente significativas intragrupo $p < 0,05$.
 ** Diferencias estadísticamente significativas intergrupo $p < 0,05$.

2.3 Capacidad antioxidante:

Al evaluar la capacidad total antioxidante en FGC, se puede apreciar un aumento progresivo de los niveles antioxidantes en los tres grupos, aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los 3 grupos a lo largo del periodo de seguimiento respecto al momento previo al tratamiento.

Cabe destacar que el análisis estadístico reveló, a las 4 semanas de evaluación, diferencias estadísticamente significativas *intergrupo* entre el grupo control y el grupo complementado con la terapia láser con dosis repetidas (Figura 6).

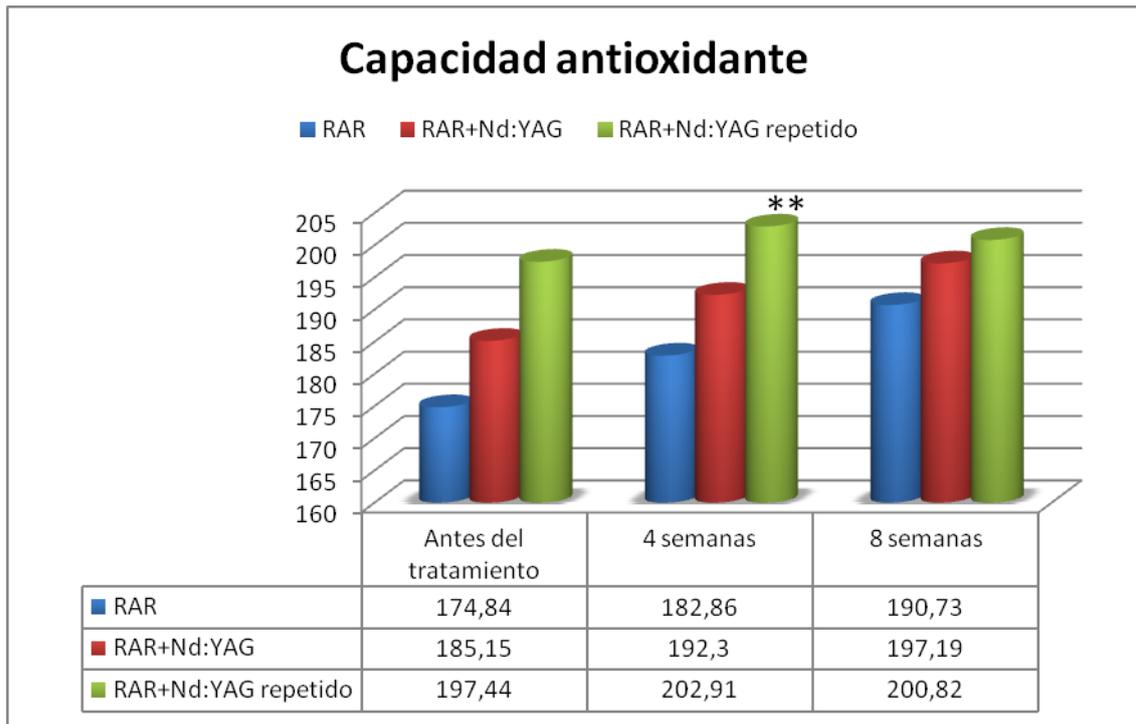


Figura 6

* Diferencias estadísticamente significativas intragrupo.
 ** Diferencias estadísticamente significativas intergrupo.

5. Discusión

El láser de Nd:YAG es en la actualidad el láser en estado sólido más importante. Las principales ventajas del láser de Nd:YAG son su construcción simple y compacta y su alta potencia media de salida. Es un láser de luz pulsada con una emisión dentro de la región espectral del infrarrojo cercano, lo que permite su transmisión a través de fibra óptica, facilitando su manejo y su aplicación dentro de la bolsa periodontal (*Perry y cols., 1997, Romanos 1994*).

Hasta hace poco existía una limitada evidencia para apoyar la eficacia del láser de Nd:YAG como herramienta complementaria al tratamiento periodontal no quirúrgico en adultos con inflamación periodontal. Tanto es así que apenas hay estudios clínicos publicados en esta década que analicen la evolución clínica y los niveles de los mediadores inflamatorios en el FCG tras la irradiación con láser de Nd:YAG en los sitios afectados en pacientes con periodontitis crónica. Destacan los resultados de cinco estudios clínicos realizados por cuatro grupos de investigación diferentes (*Miyazaki y cols., 2003, Qadri y cols., 2010, 2011, Gómez y cols., 2011, Eltas y Orbak, 2012*). Una cuestión discutible que podría explicar el escaso apoyo a la eficacia de este tipo de radiación láser sería el sobrecalentamiento de los tejidos irradiados y por lo tanto, la exposición de los tejidos dentales blandos y principalmente los duros al daño (*Miserendino y cols., 1994*). Por ello, para evitar daños térmicos, los parámetros de irradiación empleados en estos estudios clínicos fueron seleccionados de acuerdo a resultados obtenidos de anteriores investigaciones “in vitro”, donde las potenciales alteraciones morfológicas de la superficie radicular se evalúan bajo estandarizadas condiciones “in vitro” (*Bader, 2000; Gómez y cols., 2009*).

El propósito de este trabajo de investigación ha consistido en evaluar si el uso simple o repetido de la radiación de Nd:YAG aplicada complementariamente al RAR resulta en mayores mejoras clínicas, inmunológicas y antioxidantes que el tratamiento de RAR solo. Los dientes y las superficies radiculares fueron primeramente desbridadas seguidas de la irradiación

bactericida y hemostática con un láser de Nd:YAG a 1064 nm. Nuestros resultados muestran claramente que tanto el tratamiento RAR como los tratamientos RAR+Nd:YAG ó RAR+Nd:YAG repetido resultan en un descenso de todos los parámetros clínicos evaluados. Sin embargo, la diferencia entre las respuestas en los 3 grupos estudiados fue pequeña y no estadísticamente significativa tras 2 meses de tratamiento. Únicamente, en el caso del PSBT, los pacientes tratados con láser (con una dosis como con dosis repetidas) mostraron mejores resultados en cuanto a la disminución de dicha variable respecto a los valores registrados antes del tratamiento. La diferencia en este aspecto es que, los pacientes que recibieron RAR+Nd:YAG con dosis repetidas mostraron una mejoría más temprana (a las 4 semanas), que aquellos que solo recibieron una única sesión.

Algunos estudios han reportado efectos significativos en parámetros clínicos a favor de la terapia con láser de Nd:YAG. Un ejemplo de esto, es el trabajo llevado a cabo por Neil y Mellonig, los cuales encontraron que la aplicación del láser combinada con el RAR reducía significativamente los valores de PS y pérdida de inserción clínica a los 3 y 9 meses del tratamiento en comparación con el RAR tradicional (*Neil y Mellonig, 1997*). Igualmente, Qadri y cols. observaron que a los 3 meses de seguimiento la PS había disminuido 0,6 mm más en el lado experimental (RAR +t erapia láser) respecto al lado control (RAR) (*Qadri y cols., 2010*). Gómez y colaboradores describieron mejorías en el grupo experimental en los parámetros de IP, índice de sangrado al sondaje y PS. Sin embargo en ninguno de ellos, los cambios resultaron ser estadísticamente significativos (*Gómez y cols., 2011*).

Por el contrario, otros estudios como Sjöström y Friskopp, no encontraron un beneficio adicional al empleo de la radiación láser de Nd:YAG después del RAR en cuanto a parámetros clínicos se refiere (*Sjöström y Friskopp, 2002*). En este sentido, la revisión sistemática realizada por el grupo de Slot concluye que, aunque existan estudios que apunten una mejoría tras el uso del láser de Nd:YAG como complemento, no hay datos suficientes estadísticamente

significativos para decir que el láser de Nd:YAG aporte un beneficio adicional en los parámetros clínicos (*Slot y cols., 2009*).

La citocina IL-1 es un mediador de la respuesta inflamatoria del huésped a las infecciones y otros estímulos inflamatorios (*Delaleu y Bickel, 2004*). IL-1 β aparece significativamente incrementada en los tejidos periodontales y fluido gingival en los sistemas afectados con periodontitis frente a los sitios sanos (*Stashenko y cols., 1991*). IL-1 β es un poderoso y potente mediador estimulador de la resorción ósea lo que sugiere que tiene un papel en la degradación de la matriz extracelular en la periodontitis (*Shirodaria y cols., 2000*).

FNT- α es una “muy potente” citocina proinflamatoria presentando un efecto multifactorial sobre el metabolismo óseo (*Liu y cols., 2010*). Se ha demostrado que FNT- α promueve la proliferación y diferenciación de los osteoclastos en ratas con artritis erosiva, lo que sugiere que FNT- α es una diana a tener en cuenta en la detección de osteolisis inflamatoria (*Lam y cols., 2000*).

En nuestro trabajo, los niveles de IL- 1 β respondieron de manera más favorable en aquellos grupos en los que el RAR fue complementado con la terapia láser. Más concretamente, el uso del láser de Nd:YAG con dosis repetidas demostró en este sentido ejercer de manera progresiva una disminución de los niveles de dicha citocina durante el periodo de estudio. Además, dentro de este grupo (RAR+Nd:YAG repetido) se detectaron niveles de IL- 1 β en el FCG significativamente inferiores a las 8 semanas post-tratamiento al compararlo con los otros tratamientos evaluados (RAR solo y al RAR complementado con una sola dosis de láser).

Al igual que sucede con la IL-1 β , los valores de FNT- α aumentaron a lo largo del seguimiento en el grupo RAR. Más específicamente, a las 8 semanas hubo una significativa elevación de los niveles del FNT- α , siendo estadísticamente significativa respecto a las otras modalidades de tratamiento aplicadas (RAR+Nd:YAG y RAR+Nd:YAG repetido). De esta forma se observó que el uso de la radiación láser como coadyuvante permitió la disminución

del nivel de este marcador en el FCG, disminución que se mantiene constante tras su aplicación en dosis repetidas, y que sin embargo tiende a alcanzar los niveles iniciales a las 8 semanas tras una única aplicación de la radiación láser.

Analizando los resultados sobre mediadores inflamatorios en los estudios ya publicados, Miyazaki, en un estudio a 12 semanas, encontró un descenso no estadísticamente significativo de IL-1 β en el grupo de Nd:YAG como monoterapia en comparación con los ultrasonidos en el tratamiento no quirúrgico de PC (Miyazaki y cols., 2003). Por el contrario, Gómez y colaboradores, sí encontraron descensos significativos tanto en IL-1 β como en TNF- α al emplear la radiación láser de Nd:YAG como tratamiento complementario al RAR a corto plazo (4 y 8 semanas), frente al RAR (Gómez y cols., 2011). Qadri y cols. han investigado los efectos a corto y largo plazo de una sola aplicación de un láser pulsado de Nd:YAG refrigerado por agua en combinación con RAR, demostrando a corto plazo una significativa reducción de los niveles creviculares de IL-1 β y MMP-8, y a largo plazo una menor pérdida ósea y una disminución de volumen de FCG que el grupo control (RAR aplicado en exclusividad), reduciendo así la severidad de la inflamación periodontal (Qadri y cols., 2010, 2011). Posteriormente, en un estudio reciente por Eltas y Orbak (Eltas y Orbak, 2012) se muestra una reducción en los niveles de IL-1 β y MMP-8 en el grupo complementado con la radiación del láser de Nd:YAG frente al tratado simplemente con RAR, aunque esta reducción no fue significativa a los 3 ni a los 9 meses post-tratamiento, aunque sí una reducción significativa en los valores del IG y FCG.

Finalmente, en nuestro estudio, hemos comprobado que existe un aumento del estado antioxidante total del FCG después de los tratamientos desarrollados, influyendo de manera más positiva la aplicación complementaria de la radiación láser a dosis repetidas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo investigador, donde se observó que el estado antioxidante total del FCG, después del tratamiento con RAR +

Nd:YAG, aumentó gradualmente hasta las 8 semanas de forma estadísticamente significativa, en relación con un menor aumento registrado tras el tratamiento RAR aplicado en exclusividad (Gómez y cols., 2011). La capacidad antioxidante total del fluido gingival desciende en la periodontitis como consecuencia de la lesión inflamatoria, y se recupera después de la terapia no quirúrgica (Chapple y cols., 2007; Brock y cols., 2004; Tsai y cols., 2005). De esta manera, podemos pensar que la capacidad antioxidante total del FCG se ve influenciada por la reducción de la inflamación periodontal tras una exitosa terapia no quirúrgica complementada con Nd: YAG.

En nuestro trabajo, utilizando los mismos parámetros tanto para el tratamiento de 1 sola aplicación de radiación láser tras el RAR, como para 5 aplicaciones de radiación láser hemos encontrado ciertos efectos adicionales a favor de la terapia láser. Se podría decir que existe una cierta tendencia, principalmente a nivel de los parámetros inflamatorios, de obtener mejores resultados al complementar el RAR con la aplicación del láser de Nd:YAG. Además, los resultados parecen mostrar una superioridad del efecto ejercido tras la administración repetida frente a la administración única.

Sería ideal aumentar el periodo de seguimiento así como el tamaño muestral, para evaluar si esas tendencias que se han reflejado en los resultados a favor de la terapia láser repetida como complemento, adquieren una fuerza mayor con resultados estadísticamente significativos en la mayor parte de los parámetros clínicos e inmunológicos, en los diferentes tiempos evaluados.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, permitieron concluir que:

1. El tratamiento periodontal no quirúrgico en pacientes con Periodontitis Crónica moderada mediante el RAR convencional así como el RAR en combinación con la radiación de un láser de Nd: YAG, aplicado en dosis única o repetidas, condujo a una mejora CLÍNICA de las variables estudiadas respecto al punto de partida inicial.
2. Desde el punto de vista INFLAMATORIO, los dos grupos que recibieron la aplicación de la radiación láser de Nd:YAG como coadyuvante al RAR, demostraron una disminución en los niveles tanto de IL-1 β como de FNT- α . Además, la terapia láser repetida reveló un efecto significativo adicional, disminuyendo dichos parámetros de forma progresiva y constante, así como demostrando ser el tratamiento más eficaz en la reducción los valores de IL-1 β durante el periodo de seguimiento.
3. Todos los tratamientos condujeron al aumento de la capacidad antioxidante total, sin embargo, la aplicación repetida de la radiación láser de Nd:YAG influyó de manera marcada y positiva sobre dicho aumento.

7. Bibliografía

1. AAP (The American Academy of Periodontology). The Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology, Cohen RE, Ammons WF. Revised by Rossman JA. Lasers in periodontics (Academy report). *J Periodontol* 2002; 73: 1231–1239.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology 1999; chapter 3. W.B. Saunders.
3. Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol* 1988; 59: 493–503.
4. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25: 229-235.
5. Amin A, Dave M, Attur M, Abramson S. COX-2, NO and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep* 2000, 2: 447-453.
6. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishiwaka I. Lasers in non surgical periodontal therapy. *Periodontol* 2000 2004; 36: 59-97.
7. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4(1):1-6. Review.
8. Assuma R, Oates T, Cochran C, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998; 160: 403–409.
9. Bader HI. Use of laser in periodontic. *Dent Clin North Am* 2000; 44: 779-91.
10. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis* 2002; 8(5): 254-60.
11. Ben Hatit Y, Blum R, Severin C, Maquin M, Jabro MH. The effects of a pulsed Nd:YAG laser on subgingival bacterial flora and on cementum: an in vivo study. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14: 137–143.
12. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* 1986; 319: 516-518.
13. Billingham ME. Cytokines as inflammatory mediators. *British Medical Bulletin* 1987; 43: 350-357.
14. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 2004; 31(7): 515-521.
15. Buchanan SA, Robertson PB. Calculus removal by scaling/root planing with and without surgical access. *J Periodontol* 1987; 58: 159–163.
16. Chapple IL, Brock GR, Milward MR, Ling N, Matthews JB. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? *J Clin Periodontol* 2007; 34(2): 103-110.
17. Chapple IL, Landini G, Griffiths GS, Patel NC, Ward RS. Calibration of the Periotron 8000 and 6000 by polynomial regression. *J Periodontal Res* 1999; 34(2):79-86.
18. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24(5): 287-96.

19. Claffey N, Nylund K, Kiger R, Garrett S, Egelberg J. Diagnostic predictability of scores of plaque, bleeding, suppuration, and probing pocket depths for probing attachment loss. 3 1/2 years of observation following initial therapy. *J Periodontol* 1990; 17: 108–114.
20. Cobb CM, Low SB, Coluzzi DJ. Lasers and the treatment of chronic periodontitis. *Dent Clin North Am* 2010;54:35-53.
21. Cobb CM, McCawley TK, Killoy WJ. A preliminary study on the effects of the Nd:YAG laser on root surfaces and sub- gingival microflora in vivo. *J Periodontol* 1992; 63: 701– 707.
22. Cochran D. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 2008; Suppl 79: 1569-1576.
23. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 435-64.
24. Costerton JW, Donlan RM. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167-93. Review.
25. de Andrade AK, Feist IS, Pannuti CM, Cai S, Zezell DM, De Micheli G. Nd:YAG laser clinical assisted in Class II furcation treatment. *Lasers Med Sci* 2008; 23:341-347.
26. Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol* 2000 2004; 35:42–52.
27. Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, Graves DT. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 233–240.
28. Dinarello C. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.
29. Eltas A, Orbak R. Effect of 1,064-nm Nd:YAG laser therapy on GCF IL-1 α and MMP-8 levels in patients with chronic periodontitis *Lasers Med Sci* 2012; 27(3):543-50.
30. Geusic JE, Marcos HM, Van Uitert LG. Laser oscillations in Nd-doped yttrium aluminum, yttrium gallium, and gadolinium garnets. *Appl Phys Lett* 1964; 4:182.
31. Giannelli M, Bani D, Viti C, Tani A, Lorenzini L, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Comparative evaluation of the effects of different photoablative laser irradiation protocols on the gingiva of periodontopathic patients. *Photomed Laser Surg* 2012; 30(4):222-30.
32. Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. Impact of the laser on dental caries. *Nature* 1964; 203:417.
33. Gómez C, Bisheimer M, Costela A, García-Moreno I., García A, García J.A. Evaluation of the effects of Er:YAG and Nd:YAG lasers and ultrasonic instrumentation on root surfaces. *Photomedicine and Laser Surgery* 2009 Feb; 27: 43-48.
34. Gómez C, Domínguez A, García-Kass AI, García-Nuñez JA. Adjunctive Nd:YAG laser application in chronic periodontitis: clinical, immunological, and microbiological aspects. *Lasers Med Sci* 2011 26:453–463.
35. Gowen M, Mundy GR. Actions of recombinant IL- α and interferon- α on bone resorption in vitro. *Journal of Immunology* 1986; 136: 2478-2482.
36. Graves D, Cochran D. The contribution of IL 1 and TNF to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003; 74: 391-401.

37. Graves D, Oskoui M, Volejnikova S, et al. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res* 2001; 80: 1875-1879
38. Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental perio- dontitis. *J Periodontol* 1998; 69: 1419–1425.
39. Hock J, Krishnan V, Onyia J, Bidwell J, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 975-984.
40. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Potential applications of Erbium: YAG laser in periodontics. *J Periodontal Res* 2004; 39(4): 275-285. Review.
41. Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infect Immun* 1999; 67: 2125–2130.
42. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol*. 1993 Apr; 64(4): 243-53.
43. Kara C, Demir T, Orbak R, Tezel A. Effect of Nd:YAG laser irradiation on the treatment of oral malodour associated with chronic periodontitis. *Int Dent J* 2008; 58:151-158.
44. Karlsson MR, Diogo Löfgren CI, Jansson HM. The effect of laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in subjects with chronic periodontitis: A systematic review. *J Periodontol* 2008; 79: 2021-2028.
45. Kranendonk, A. A., Van der Reijden, W. A., Van Winkelhoff, A. J. & Van der Weijden, G. A. (2010) The bactericidal effect of a Genius Nd:YAG laser. *International Journal of Dental Hygiene* 8, 63–67.
46. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000; 12: 1481-1488.
47. Listgarten MA, Ellegaard B. Electron microscopic evidence of a cellular attachment between junctional epithelium and dental calculus. *J Periodontal Res* 1973; 8: 143-150.
48. Liu CM, Hou LT, Wong MY, Lan WH. Comparison of Nd:YAG laser versus scaling and root planing in peri- odontal therapy. *J Periodontol* 1999;70:1276-1282.
49. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol* 2000 2010; 52(1):163-206.
50. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005; 32 Suppl 6:7-15. Review.
51. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy J, Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type 1 collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and IL-1 evidence that breakdown is mediated by metalloproteinase. *J Periodontal Res* 1989; 24: 207-213.
52. Miserendino LJ, Levy GC, Abt E, Rizoiu IM. Histologic effects of a thermally cooled Nd:YAG laser on the dental pulp and supporting structures of rabbit teeth. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 1994; 78: 93-100.

53. Miserendino LJ, Neiburger EJ, Pick RM. Current status of lasers in dentistry. *Ill Dent J* 1987; 56:254
54. Miyazaki A, Yamaguchi T, Nishikata J y cols. Effects of Nd: YAG and CO2 laser treatment and ultrasonic scaling on periodontal pockets of chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2003; 74: 175-80.
55. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane- bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275:768-775.
56. Neill ME, Mellonig JT. Clinical efficacy of the Nd:YAG laser for combination periodontitis therapy. *Pract Peri- odontics Aesthet Dent* 1997; 9(Suppl. 6):1-5.
57. Niemz MH. *Laser-tissue Interaction. Fundamentals and Applications*. Berlin: Springer-Verlag, 1996: 64-65.-257.
58. Noguchi T, Sanaoka A, Fukuda M, Suzuki S, Aoki T. Combined effects of Nd:YAG laser irradiation with local antibiotic application into periodontal pockets. *J Int Acad Periodontol* 2005; 7:8-15.
59. Offenbacher S. Periodontal diseases: Pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996; 1: 821-878.
60. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontol* 2000 1997; 14:9-11.
61. Perry DA, Goodis HE, White JM. In vitro study of the effects of Nd:YAG laser probe parameters on bovine oral soft tissue excision. *Lasers Surg Med* 1997; 20(1): 39-46.
62. Pfizenmaier K, Wajant H, Grell M. Tumor necrosis factors in 1996. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 271-277.
63. Pick RM, Colvard MD. Current status of lasers in soft tissue dental surgery. *J Periodontol* 1993; 64:589-602.
64. Polson AM, Frederic GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumenta- tion and its removal by citric acid. *J Periodontol* 1984; 55: 443-446.
65. Qadri T, Javed F, Poddani P, Tunér J, Gustafsson A. Long-term effects of a single application of a water-cooled pulsed Nd:YAG laser in supplement to scaling and root planing in patients with periodontal inflammation. *Lasers Med Sci* 2011; 26:763-766.
66. Qadri T, Poddani P, Javed F, Tuner J, Gustafsson A. A short-term evaluation of Nd:YAG laser as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodon- tal inflammation. *J Periodontol* 2010;81:1161-1166.
67. Qadri, T, Miranda L, Tuner J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 714-719.
68. Radvar M, MacFarlane TW, MacKenzie D, Whitters CJ, Payne AP, Kinane DF. An evaluation of the Nd:YAG laser in periodontal pocket therapy. *Br Dent J* 1996; 180:57-62.
69. Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 345-350.

70. Rodan G, Martin T. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 200; 289: 1508-1514.
71. Romanos GE. Clinical applications of the Nd:YAG laser in oral soft tissue surgery and periodontology. *J Clin Laser Med Surg* 1994; 12(2): 103-108.
72. Sanz M, Teughels W, Group A of European Workshop on Periodontology. Innovations in non-surgical peri-odontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8 Suppl.):3-7.
73. Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol* 1990; 61(9): 579-84.
74. Schoop U, Moritz A, Kluger W, Patruta S, Goharkhay K, Sperr W, Wernisch J, Gattringer R, Mrass P, Georgopoulos A. The Er: YAG laser in endodontics: results of an in vitro study. *Lasers Surg Med* 2002; 30(5): 360-364.
75. Schroeder HE. Formation and inhibition of dental calculus. Berne: Hans Huber Publishers 1969.
76. Schwarz F, Aoki A, Sculean A, Georg T, Scherbaum W, Becker J. In vivo effects of an Er:YAG laser, an ultrasonic system and scaling and root planing on the biocompatibility of periodontally diseased root surfaces in cultures of human PDL fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2003; 33: 140-147.
77. Schwarz F, Putz N, Georg T, Reich E. Effect of an Er:YAG laser on periodontally involved root surfaces: an in vivo and in vitro SEM comparison. *Lasers Surg Med* 2001; 29: 328-335.
78. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*; 2011 Oct 16.
79. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1 alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res* 2000; 79: 1864-1869.
80. Sjöström L, Friskopp J. Laser treatment as an adjunct to debridement of periodontal pockets. *Swed Dent J* 2002; 26:51-57.
81. Slot DE, Kranendonk AA, Paraskevas S, Van der Weijden F. The effect of a pulsed Nd:YAG laser in non-surgical periodontal therapy. Systematic Review. *J Periodontol* 2009; 80:1041-1056.
82. Snitzer E. Optical laser action of Nd in barium crown glass. *Phys Rev Lett* 1961; 7:444-446.
83. Stashenko P, Dewhirst F, Peros W, Kent RL, Ago J. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 1987; 138: 1464-1468.
84. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal state. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 548-554.
85. Stern RH, Sognnaes RF. Laser inhibition of dental caries suggested by first tests in vivo. *J Am Dent Assoc* 1972; 85:1087-1090.

86. Sulewski JG. Historical survey of laser dentistry. *Dent Clin North Am* 2000; 44: 717–752.
87. Takatis DN, Schneerberger G, Dziak, R. Recombinant interleukin-1 stimulates prostaglandin E2 production by osteoblastic cells: synergy with parathyroid hormone. *Calcified Tissue International* 1988; 42: 358-362.
88. Theilade J. Electron microscopic study of calculus attachment to smooth surfaces. *Acta Odontologica Scandinavia* 1964; 22: 379-387.
89. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2005; 40(5): 378-384.
90. Waerhaug J. Healing of the dentoepithelial junction following subgingival plaque control. II. As observed on extracted teeth. *J Periodontol* 1978; 49: 119–134.
91. Waerhaug J. The gingival pocket. *Odontologisk Tidskrift* 1952; 60 Suppl 1.
92. Watanabe H, Ishikawa I, Suzuki M, Hasegawa K. Clinical assessments of the erbium:YAG laser for soft tissue surgery and scaling. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14: 67–75.
93. Waterman WH, Sha'afi RI. A mitogen-activated protein kinase independent pathway involved in the phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 in human neutrophils stimulated with tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209(1): 271-8.
94. White JM, Goodis HE, Rose CL. Use of the pulsed Nd:YAG laser for intraoral soft tissue surgery. *Lasers Surg Med* 1991; 11: 455–461.
95. Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Timmerman, MF, Vangsted T, van der Velden U. Effects of metronidazole in patients with “refractory” periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 573–579.
96. Zander HA, Hazen SP, Scott DB. Mineralization of dental calculus. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 1960; 103: 257-260.