UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PERFIL DE LAS CITOQUINAS EN EL FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR, EN PACIENTES CON PERIODONTITIS, INFLUENCIADO POR TABAQUISMO Y TENSIÓN EMOCIONAL

T E S I N A

Que para obtener el Título de:

CIRUJANA DENTISTA

P r e s e n t a:

LAURA MEDINA MARTÍNEZ

DIRECTORA: MTRA. ANA PATRICIA VARGAS CASILLAS.

MÉXICO, D. F. **2005**

Vo Bo

M349337

A mis padres:

Enrique Medina C. y Esperanza Martínez G.

Por estar siempre a mi lado, por enseñarme que el estudio es una de las cosas más valiosas en la vida , por haberme guiado con sus consejos, por todo su esfuerzo, por regalarme un momento más y el más importante en mi vida, los admiro y los amo, gracias.

A mis hermanos:

Héctor y Lucía

Por compartir juntos momentos muy valiosos, por su esfuerzo, por su paciencia y comprensión; esto también es de ustedes.

A mi familia:

A todos los que me brindaron su apoyo, cariño y confianza siempre.

A la Universidad y a la Facultad de Odontología:

Por haberme brindado la oportunidad de formarme profesionalmente, a cada uno de los doctores que formaron parte de mi educación dentro de las aulas, en especial, a la Dra. Patricia Vargas por su paciencia, asesoría y tiempo dedicados a este trabajo.

A mis amigos:

A los que han estado siempre, a todos los que conocí en la universidad y con los que compartí y comparto momentos inolvidables.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 7

CAPÍTULO I CARACTERISTÍCAS CLÍNICAS DE LA ENCÍA MARGINAL NORMAL

1.1 Encía marginal 10
1.2 Surco gingival 11
1.3 Epitelio gingival 12
1.3.1 Epitelio bucal o externo 15
1.3.2 Epitelio del surco 16
1.3.3 Epitelio de unión 17
1.4 Tejido conectivo gingival 17
1.5 Estructura y función de la interfase entre el diente y el epitelio unión 21

CAPÍTULO 2 FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR

2.1 Definición del fluido gingival crevicular 27
2.2 Formación del fluido gingival crevicular 28
2.3 Métodos para la obtención del fluido gingival crevicular 30
2.3.1 Método de lavado gingival 30
2.3.2 Obtención por micropipetas 30
2.3.3 Obtención por tiras de papel absorbente 31
2.4 Composición del fluido gingival crevicular 34

CAPÍTULO 3 CITOQUINAS

3.1 Definición de las citoquinas 42

3.1.1Propiedades generales de las citoquinas 43

3.1.2 Estructura y función de las citoquinas 44

3.2 Citoquinas presentes en los tejidos periodontales enfermos y en el fluido gingival crevicular 46

CAPÍTULO 4 TABAQUISMO Y TENSIÓN EMOCIONAL EN RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

4.1 Tabaquismo 52

4.1.1 Influencia del tabaquismo en la enfermedad periodontal 55

4.2 Tensión emocional 58

4.2.1 Influencia de la tensión emocional en la enfermedad periodontal 60

CAPÍTULO 5 PERFIL DE LAS CITOQUINAS EN EL FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR, EN PACIENTES CON PERIODONTITIS INFLUENCIADO POR TABAQUISMO Y TENSIÓN EMOCIONAL

5.1 Reportes clínicos 63

CONCLUSIONES 69

FUENTES DE INFORMACIÓN 71

INTRODUCCIÓN

La capacidad para diagnosticar y evaluar correctamente la enfermedad periodontal ha sido uno de los principales objetivos en periodoncia. La necesidad para la comprensión de la naturaleza, etiología y patogenia de la enfermedad ha exigido modificar estrategias de diagnóstico y de tratamiento así como mantener la salud periodontal una vez restablecida.

Pese a la expansión de conocimientos respecto a la enfermedad periodontal, el principal método de diagnóstico y clasificación de la enfermedad se hace en el consultorio con las evaluaciones clínicas tradicionales como: historia clínica del paciente, sondeo, presencia o ausencia de inflamación clínicamente detectable, cantidad de placa dentobacteriana y cálculo, pérdida de inserción, etc. En general los tejidos periodontales del paciente son evaluados minuciosamente en busca de signos, síntomas y factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, mismos que resultan ser apropiados para trazar un plan de tratamiento eficaz.

Durante la última década se ha intensificado la necesidad de desarrollar nuevas pruebas de diagnóstico a nivel laboratorio, que recojan información necesaria acerca de la enfermedad periodontal, de manera particular en un paciente, así como del comportamiento y respuesta de los tejidos periodontales para su rehabilitación y para el establecimiento de un diagnóstico y pronóstico, completamente certeros.

La respuesta del huésped a la periodontitis ha sido estudiada por análisis bioquímicos del fluido gingival crevicular. Entre muchos mediadores inflamatorios identificados en el fluido las citoquinas han atraído la atención pues estas influyen en

el cambio y la reparación relacionados en la inflamación, alteración y reparación de los tejidos periodontales.

Ciertas citoquinas se han propuesto como un método de diagnóstico o pronóstico de la destrucción periodontal en el fluido gingival crevicular como; interleucinas (IL)-1β, IL-4, IL-6 e IL-8.

El fluido gingival crevicular se presenta como un exudado en el desarrollo de la enfermedad periodontal, a medida que el fluído, desde la micocirculación del diente va atravesando los tejidos inflamados hacia el surco periodontal, va captando a los mediadores que participan en la respuesta destructora del huésped, así como los productos derivados del metabolismo tisular local. Estos componentes incluidos en el líquido crevicular pueden se recolectados por diferentes mecanismos para ser identificados y cuantificados en estado de salud o enfermedad.

En la actualidad se ha comenzado a considerar a los factores de riesgo que pueden predisponer al individuo a la iniciación y progreso de la enfermedad. Dentro de la historia clínica es importante detectar a los factores de riesgo externos que contribuyan al desarrollo de la enfermedad. El tabaquismo es un factor fuertemente asociado con la enfermedad periodontal, la pérdida ósea y con una respuesta pobre por parte del paciente a la terapia periodontal. La tensión emocional ha sido tambien considerada como un factor que afecta las funciones inmunes y de susceptibilidad de las enfermedades infecciosas.

La siguiente revisión tiene como objetivo estudiar y conocer afondo acerca del perfil de las citoquinas recolectadas en el fluído gingival crevicular de pacientes con enfermedad periodontal sumando a esto los factores de riesgo como el tabaquismo y la tensión emocional.

CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENCÍA MARGINAL NORMAL

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENCÍA MARGINAL NORMAL

La encía es parte de la mucosa oral que reviste las apófisis alveolares de los maxilares y rodea al cuello de los dientes.

Desde el punto de vista clínico la encía se divide en marginal, insertada e interdental.[1]

1.1 Encía marginal

También se le conoce como no insertada y corresponde al borde de la encía que rodea al diente en forma de collar. (Fig. 1.1) En casi el 50% de los casos, una depresión lineal superficial, el surco gingival libre, la separa de la encía insertada. Por lo general, con casi 1mm de ancho, la encía marginal forma la pared de tejido blando del surco gingival.[1] Al insertar una sonda periodontal en esta invaginación y apicalmente hacia el límite cementoadamantino, el tejido gingival se aparta del diente y se abre una hendidura gingival.[2]

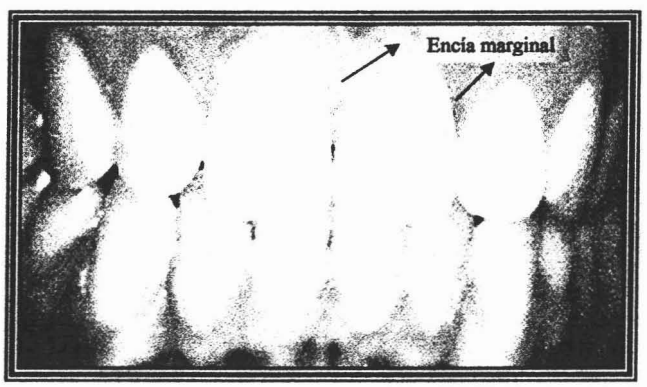


Fig.1.1 Encía marginal [2]

1.2 Surco gingival

Es un surco poco profundo circundante al diente que cubre la superficie dental por un lado y el epitelio del surco correspondiente a la parte interna del margen libre de la encía por el otro. (Fig. 1.2)

Tiene forma de V y apenas permite la entrada de una sonda periodontal. La profundidad 0 se produce experimentalmente en animales libres de gérmenes o después de llevar a cabo un control intenso y prolongado de la placa dentobacteriana.

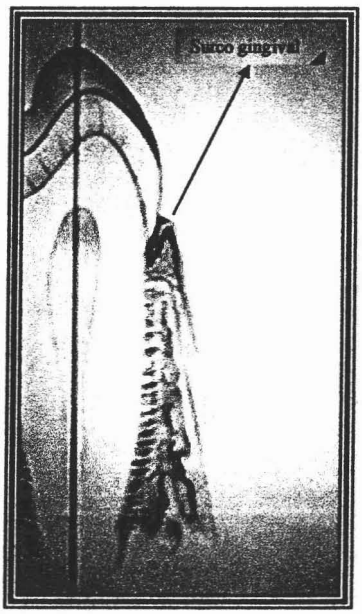


Fig. 1.2 Surco gingival [3]

En una encía sana, desde el punto de vista clínico, es posible encontrar un surco con una profundidad de 1.8, con variaciones de 0 a .6 mm, otros investigadores registran 1.5 y 0.69mm, respectivamente. La maniobra clínica usada para determinar la profundidad del surco consiste en introducir una sonda periodontal y estimar la distancia que penetra. En el ser humano, la llamada profundidad de sondeo de un surco gingival clínicamente sano es de 0 a 3 mm.[1]

1.3 Epitelio gingival

Los tres tipos de mucosa, masticatoria, de revestimiento y especializada, cubren a la cavidad oral protegiéndola del medio ambiente externo. Cada tipo de mucosa tiene la función de proteger contra los daños mecánicos y microbiológicos, el epitelio tiene considerables diferencias en su histología, el grosor y su diferenciación son apropiados para la función y demandas de su entorno.

La estructura del epitelio forma una barrera para impedir la penetración de bacterias y agentes nocivos dentro de la profundidad de los tejidos.[4] (Fig. 1.3)

Fig. 1.3 Epitelio gingival

La principal función del epitelio gingival es proteger las estructuras dentales profundas y permitir el intercambio selectivo con el medio bucal. Esto se logra mediante la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.[1]

La proliferación de los queratinocitos se presenta por mitosis en la capa basal y, con menor frecuencia en los estratos suprabasales, donde una proporción pequeña de células perdura como un compartimiento proliferativo, en tanto que un número mayor empieza a emigrar hacia la superficie.

La diferenciación es el proceso de queratinización que consiste en una secuencia de fenómenos bioquímicos y morfológicos que se produce en la célula a medida que emigra desde la capa basal.

El cambio morfológico principal es un aplanamiento progresivo de la célula, con un aumento de tonofilamentos (expresión morfológica del citoesqueleto de las proteínas de queratina, se irradian a modo de cerdas de cepillo desde las placas de adherencia hacia el citoplasma de las células) y uniones intercelulares vinculado con la producción de gránulos de queratoihialina y la desaparición del núcleo.

Un completo proceso de queratinización conduce a la producción de un estrato córneo superficial ortoqueratinizado similar al de la piel. Solo algunas zonas del epitelio gingival externo se encuentran ortoqueratinizadas; las demás regiones gingivales están cubiertas por epitelio parqueratinizado o no queratinizado, que se hallan al parecer, en fases intermedias de queratinización. Dichas áreas pueden progresar hacia la madurez o desdiferenciarse en distintas circunstancias fisiológicas o patológicas.[1]

En la membrana celular de las células epiteliales a distintos intervalos, albergan una cantidad de zonas electrodensas, a estas estructuras se les denomina hemidesmosomas, estos, participan en la adherencia del epitelio a la membrana basal. El hemidesmosoma, consiste en una placa proteica, situada junto a la membrana plasmática, anclada por el lado citoplasmático con tonofilamentos. La separación entre el hemidesmosoma y la lámina basal es de aproximadamente 25 nm.[2]

Un desmosoma es la unión de dos hemidesmosomas, estos poseen una estructura típica que consta de dos placas densas de fijación.

Las uniones densas (zona occludens) son formas de conexión de las células epiteliales, observadas con menor frecuencia donde se estima que las membranas de las células contiguas se fusionan. En distintas observaciones se sugiere que dichas estructuras permiten el paso de iones y moléculas pequeñas de una célula a otra.[1] (Fig. 1.4)

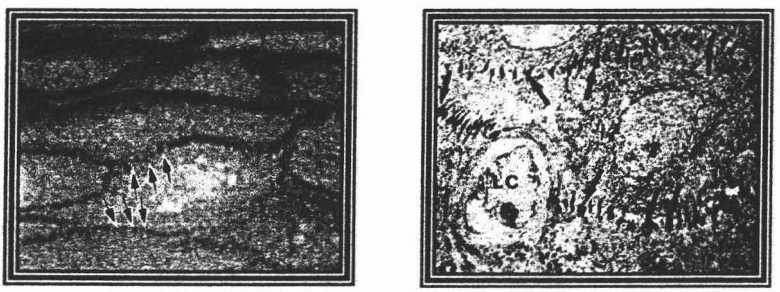


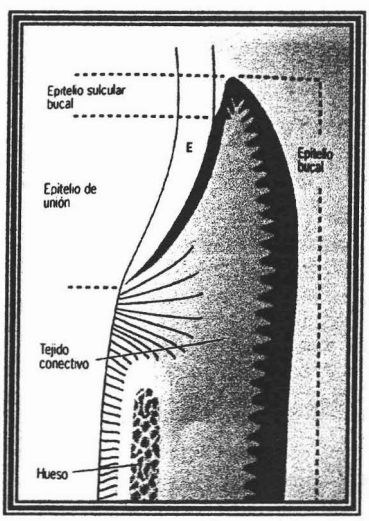
Fig. 1.4 Unión de desmosomas (pares de hemidesmosomas)

1.3.1 Epitelio bucal o externo

Cubre la cresta y la superficie exterior de la encía marginal y la superficie de la encía insertada. Se encuentra queratinizado, paraqueratinizado o bien, presenta estas variedades combinadas. Sin embargo, la superficie prevalente es paraqueratinizada.[1] (Fig. 1.5)

Las queratinas K_1, K_2 y K_{10} a K_{12}, que son específicas para la diferenciación epidérmica, se expresan inmunohistoquimicamente con alta intensidad en las zonas ortoqueratinizadas y con menor en las paraqueratinizadas.

También están presentes las queratinas K_6 y K_{16}, características de los epitelios muy proliferativos, y las K_5 y K_{14}, citoqueratinas específicas de la estratificación. Las áreas paraqueratinizadas expresan K_{19}, por lo regular ausente en los epitelios normales ortoqueratinizados.



El glucógeno puede acumularse de forma intracelular cuando no lo degrada por completo alguna de las vías glucolíticas. Por lo tanto su concentración en la encía normal tiene relación con el grado de queratinización e inflamación.[1]

Fig.1.5 Estructuras tisulares de la encía marginal y tejido conectivo

1.3.2 Epitelio del surco

Es el epitelio que recubre el surco gingival. Se trata de un epitelio escamoso estratificado delgado, no queratinizado y sin proyecciones interpapilares, que se extiende desde el límite coronal del epitelio de unión hasta la cresta del margen gingival. Por lo general, presenta numerosas células con vacuolización hidrópica.

Al igual que otros epitelios no queratinizados, carece de estrato granuloso y córneo y de las citoqueratinas K_1, K_2 y K_{10} a K_{12} .Sin embargo, contienen K_4 y K_{13}, las llamadas citoqueratinas de tipo esofágico. También expresa K_{19} y en circunstancias normales no contiene células de Merkel. Estas se ubican en las capas mas profundas del epitelio, poseen terminaciones nerviosas y se conectan con células contiguas mediante desmosomas.

Los estudios histoquímicos de las enzimas revelan de manera uniforme un menor grado de actividad, que en el epitelio externo, sobre todo en el caso de las enzimas relacionadas con la queratinización. La deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato expresa reacción débil y homogénea en todos los estratos, a diferencia del gradiente que aumenta hacia la superficie observado en los epitelios queratinizados.

El epitelio del surco es sumamente importante porque en ocasiones actúa como una membrana semipermeable a través de la cual los productos tóxicos de las bacterias pasan hacia la encía y el fluído gingival se filtra hacia el surco.[1] (Fig. 1.5)

1.3.3 Epitelio de unión

El epitelio de unión consta de una banda que rodea al diente a modo de collar constituida por epitelio es escamoso estratificado no queratinizado. En las primeras etapas de la vida, su grosor es de tres a cuatro capas, aunque la cantidad de estratos aumenta con la edad hasta 10 o 20. Estas células pueden agruparse en dos estratos: basal y suprabasal. La longitud del epitelio de unión varía desde 0.25 hasta 1.35 mm.

Al igual que el epitelio del surco, el de unión presenta menos actividad enzimática glucolítica que el epitelio externo y carece de actividad de fosfatasa ácida. El epitelio de unión se adhiere a la superficie dental (adherencia epitelial) mediante una lámina basal interna y con el tejido conectivo gingival por medio de una lámina basal externa.[1] (Fig. 1.5)

1.4 Tejido conectivo gingival

El tejido conectivo de la encía se denomina lámina propia y consta de dos capas: un estrato papilar subyacente al epitelio, que incluye proyecciones papilares entre las proliferaciones epiteliales interpapilares, y una capa reticular contigua al periostio del hueso alveolar. (Fig. 1.5)

El tejido conectivo posee un comportamiento celular y otro extracelular compuesto por fibras y sustancia fundamental. La sustancia fundamental ocupa el espacio entre fibras y células, es amorfa y posee un contenido elevado de agua.

Se compone de proteoglucanos, principalmente ácido hialurónico, sulfato de condroitín y glucoproteínas, sobre todo fibronectina.

Las glucoproteínas muestran una débil reacción positiva al PAS de la sustancia fundamental. La fibronectina se fija a los fibroblastos, a las fibras y a muchos otros componentes de la matriz intercelular, lo que contribuye a mediar la adhesión y migración de las células.

Existen tres clases de fibras de tejido conectivo; colágenas, reticulares y elásticas:

1. Las fibras de colágeno tipo 1 conforman el mayor componente de la lámina propia y confiere al tejido gingival, resistencia a la tensión.

2. La colágena de tipo IV (fibras reticulares) se ramifican entre los haces de colágenos de tipo 1 y se continúan con las fibras de la membrana basal y las paredes de los vasos sanguíneos.

3. El sistema de fibras elásticas se integra con fibras de oxitalám y elastina distribuidas entre las fibras colágenas.[1]

Fibras gingivales

El tejido conectivo de la encía marginal es de naturaleza densamente colágena y contiene un sistema predominante de haces de fibras colágenas llamadas fibras gingivales, integradas por colágena tipo I, las fibras gingivales poseen tres funciones:

- Aseguran firmemente la encía marginal contra el diente.

- Proveen la rigidez necesaria para soportar las fuerzas de la masticación sin separse de la superficie dentaria.

- Unen a la encía marginal libre con el cemento de la raíz y la encía insertada contigua.

Las fibras gingivales se agrupan en cuatro grupos:

Fibras dentogingivales

Las fibras se localizan en las superficies interproximales, linguales y vestibulares. Se insertan en el cemento, por debajo del epitelio en la base del epitelio de unión. En las superficies vestibulares y linguales se proyectan como abanico desde el cemento hacia la cresta y la superficie externa de la encía marginal, para terminar a poca distancia del epitelio. (Fig. 1.6)

Fibras circulares

Las fibras circulares atraviesan el tejido conectivo de la encía marginal e interdental y rodean al diente a manera de anillo.[1] (Fig. 1.6)

Fibras transeptales

Localizadas en el espacio interproximal, las fibras de este grupo forman haces horizontales que se extienden entre el cemento de dientes adyacentes en los cuales se insertan. Se ubican entre el epitelio de la base del surco gingival y la cresta del hueso interdental.[1] (Fig. 1.6)

Fibras dentoperiósticas

Están incluidas en la misma porción del cemento que las fibras dentogingivales, pero siguen un curso apical sobre la cresta ósea vestibular y lingual y terminan en el tejido de la encía insertada.[2] (Fig. 1.6)

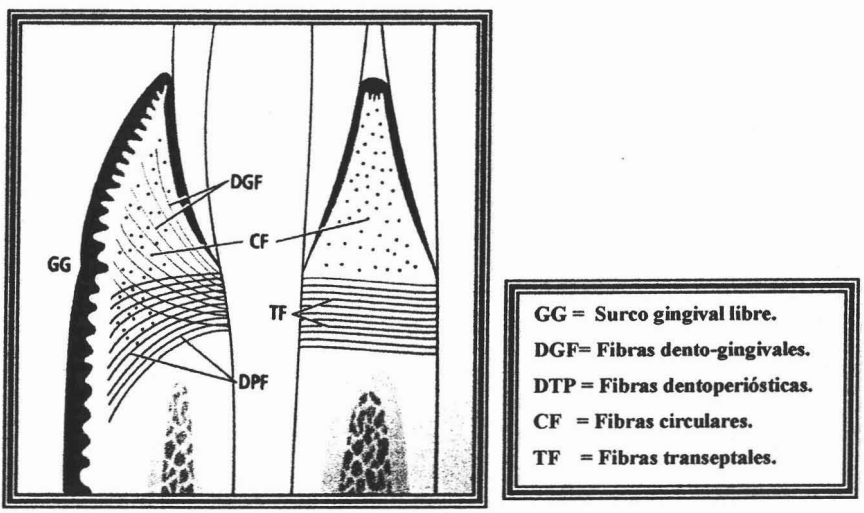


Fig. 1.6 Fibras gingivales

1.5 Estructura y función de la interfase entre el diente y el epitelio de unión

Schroeder y Litsgarten (1970) fueron los primeros en estudiar la anatomía e histología de la adherencia dentogingival, en su monografía: "Estructura fina del desarrollo de la adherencia epitelial al diente humano".[5] Desde entonces el conocimiento de la adherencia epitelial ha sido revisado en numerosos artículos.[5, 6, 7, 8, 9] (Fig. 1.7)

El epitelio de unión tiene una estructura y función que contribuye a que la flora bacteriana patogénica no colonice la superficie dentaria subgingival.[4]

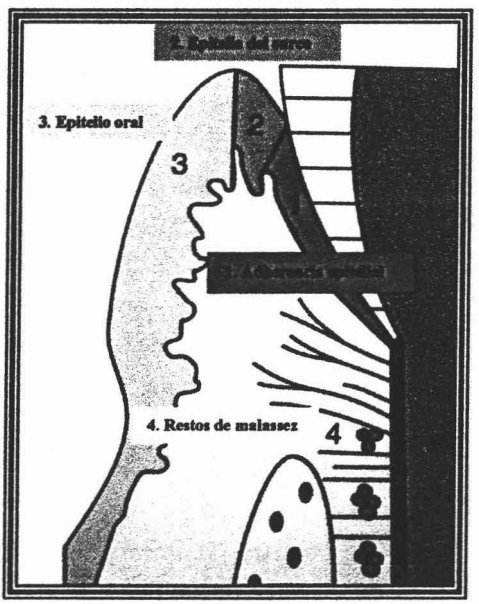


Fig. 1.7 Adherencia epitelial [4]

La adherencia del epitelio de unión es mediada a través de un mecanismo ultramicroscópico definido como adherencia epitelial. Consiste en la unión de hemidesmosomas a la membrana plasmática de las células directamente adheridas al diente y a la lámina basal de la matriz extracelular terminando en la lámina basal interna, sobre la superficie del diente.[4]

Los componentes de la lámina basal interna son sintetizados por las células del epitelio.

Las proteínas de lámina basal interna incluyen fibras de colágeno tipo VIII. Las fibras de colágeno tipo V se localizan en la parte interna de la lámina basal y se ha observado que está asociada con los hemidesmosomas.

La lámina basal interna carecen de colágeno tipo I y IV los cuales son componentes de las membranas basales.

Los hemidesmosomas tienen un papel decisivo en la firme adhesión de las células a la lámina basal interna sobre la superficie del diente.

En general, la interacción entre los diferentes componentes de la matriz extracelular y las células de la superficie molecular actúan como una conexión para el citoesqueleto, fundamental para las células de adhesión, células con motilidad, capacidad sintética, estabilidad y regeneración tisular, y señales de respuesta externa.

El recambio que tiene el epitelio de unión es increíblemente rápido. Su espesor se mantiene gracias al equilibrio entre la formación de células nuevas en las capas basal y espinosa y la exfoliación de células viejas en la superficie.[4]

La actividad mitótica tiene una periocidad de 24 horas. En estudios sobre animales de experimentación, el recambio que se produjo en el epitelio de unión fue de uno a seis días.

Anteriormente se consideraba que solo las células que se encontraban frente a la lámina basal externa se dividían rápidamente. Sin embargo recientes estudios indican que un número importante de células directamente adheridas al diente (DAT= siglas en inglés), son capaces de sintetizar DNA, con lo cual demuestran una actividad mitótica. (FIG. 1.8)

En la parte coronal de epitelio de unión, las células DAT expresan una fuerte densidad para transferir receptores, los cuales sostienen una gran actividad metabólica y un fuerte recambio. Las conclusiones sugieren que las células DAT tienen importancia en el rol dinámico del tejido y en la capacidad reparativa del epitelio de unión.

Los distintos fenotipos pueden producir señales específicas permisivas o instructivas que provienen de la matriz de lámina basal interna y pueden tener una gran influencia en funciones vitales de las células DAT, lo que contribuye al éxito o al fracaso de la defensa de la adherencia epitelial y al cambio en el metabolismo de las células, pudiendo afectar la lámina basal interna.

Los estudios de la morfología de la lámina basal interna de un diente extraído por periodontitis avanzada demuestran que los remanentes de la lámina basal interna pueden provocar una severa degeneración de las células DAT. Aunque la lámina basal interna parece tener una relativa resistencia en los cambios externos en la estructura molecular puede también ser alterada ocasionando cambios en las funciones de las células DAT.[4]

Una amplia variedad de especies bacterianas y sus productos tales como lipopolisacáridos y ácidos lipoprotéicos, pequeñas cadenas de grasa y fosfolipasas han demostrado afectar adversamente al metabolismo de las células epiteliales conduciendo a los cambios en la proliferación de citoquinas y metaloproteinasas.[4]

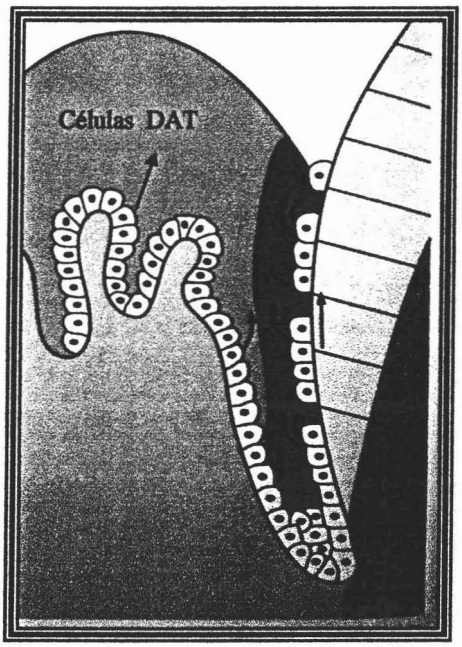


Fig. 1.8 Mecanismo de las células DAT.[4]

CAPÍTULO 2

FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR

FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR

La existencia del fluido gingival crevicular se ha estudiado desde hace 100 años. El pionero de esta investigación fue Waerhaug, (1966) enfocó sus estudios a la anatomía del surco gingival y su transformación a bolsa gingival durante el proceso de la periodontitis.

A finales de los 50's y principios de los 60'S Brill, y colaboradores realizaron estudios para determinar la fisiología, formación y composición del fluido gingival.

Loe, (1965) contribuyó en esto y exploró el uso del FGC como un indicador para la enfermedad periodontal.

Elgelber continúo analizando y enfocó sus estudios a la permeabilidad de los vasos sanguíneos así como la relación con el flujo del fluido. Estos estudios tuvieron un auge en los años 70.

La comprensión y entendimiento de estas estructuras y su fisiología se realizó mediante los estudios de Schroeder y Litsgarden bajo el microscopio electrónico.

La presencia y función de proteínas especialmente enzimas en el fluido gingival crevicular (FGC) fue investigado por Sueda Bang y Cimasoni (1971), con esto se comprendió rápidamente que la liberación de las enzimas posee un alto potencial en el diagnóstico de periodontitis y daño al tejido periodontal. [10]

2.1 Definición del fluido gingival crevicular

El fluido gingival crevicular (FGC) es un trasudado con una composición variada encontrado en el surco periodontal, en salud se localiza entre el diente y la encía marginal. El FGC contiene componentes del suero, de las células inflamatorias, del tejido conectivo, del epitelio y de la flora microbiana que habita el margen gingival del surco.[11] Brill confirmó la presencia de FGC en seres humanos y lo catalogó como transudado. No obstante, otros investigadores demostraron que el fluido es un exudado inflamatorio, y un transudado continuo.[1]

En salud, la cantidad de FGC es mínima. Sin embargo sus compuestos participan en el mantenimiento de la función del epitelio. Durante la inflamación el flujo del FGC aumenta y su composición comienza a presentarse como exudado inflamatorio.

El aumento del flujo del FGC contribuye a la defensa del huésped por la formación de colonias bacterianas y sus metabolitos para enviarlos fuera del surco, así como la restricción de su penetración dentro del tejido.

La principal ruta para la difusión del FGC es a través de la lámina basal interna y de un espacio compacto del epitelio de unión dentro del surco gingival. [11]

2.2 Formación del fluido gingival crevicular

La naturaleza exacta del fluido gingival crevicular, su origen y composición ha sido objeto de controversia. Esto puede deberse a las variaciones en la cantidad y o naturaleza del FGC producido bajo diferentes condiciones clínicas y el uso de una amplia variedad de métodos para su obtención. El aumento en el flujo puede tener efectos protectivos así como facilitar el paso de las inmunoglobulinas.[11]

Las primeras investigaciones intentaron describir su formación a partir de los procesos inflamatorios en el tejido conectivo por debajo del epitelio de unión. Este cambio aumentó principalmente por la permeabilidad de los vasos sanguíneos que fueron inducidos por medios físicos y químicos. En estos estudios se observó la presencia de sustancias introducidas dentro de la circulación parenteral. También el efecto sobre los tejidos se estudió histológicamente en biopsias gingivales.

Los estudios iniciales demostraron que al administrar un líquido fluorescente, éste apareció en el fluido crevicular de perros gingivalmente sanos. Para su recolección se utilizaron tiras de papel por tres minutos, estos experimentos se extendieron a voluntarios humanos. Sin embargo, el epitelio oral no permitió el paso del fluorocromo, por lo que se concluyó que deben de existir diferencias en la permeabilidad entre estos epitelios orales y el epitelio del surco gingival.

Subsecuentes experimentos en perros mostraron que el aumento en el flujo del FGC aumenta notablemente seguido de la estimulación gingival por el cepillado dental, al mascar chicle o después de una inyección intravenosa de histamina o en el inicio de la inflamación. Al ver esto se concluyó que algunas irritaciones de origen químico o mecánico eran necesarias para la producción del FGC, por lo que debería considerarse como fenómeno patológico. [11]

Los estudios de Brill acentuaron los posibles efectos benéficos del FGC y el postuló que éste es componente importante de los mecanismos protectivos en la región del surco. Este concepto ha sido apoyado por el efecto de flushing del FGC, el cual ha demostrado ser capaz de remover partículas de carbón y bacterias que fueron introducidas en el surco gingival.

Además, un importante papel que puede tener el FGC es el de transportar en el espacio del surco substancias antibacterianas e introducirlas a la circulación tal como los antibióticos.[1]

2.3 Métodos para la obtención del fluido gingival crevicular

El obstáculo más difícil de superar cuando se toman muestras de FGC es el poco material que puede obtenerse del surco. Se conocen múltiples métodos de recolección. Éstos incluyen el uso de tiras de papel absorbente, hilos retorcidos colocados alrededor y dentro del surco, micropipetas y lavados intracreviculares. [1]

2.3.1 Método de lavado gingival

Los lavados del surco pueden servir para estudiar el FGC de la encía normal en términos clínicos. Una de las técnicas emplea un aparato que consiste en una placa de acrílico duro que cubre el maxilar con bordes blandos y un surco que sigue los márgenes gingivales; se conecta a cuatro tubos de colección.
Los lavados se obtienen al enjuagar las zonas del surco desde un lado hasta el otro mediante el uso de una bomba peristáltica.

Una modificación de dicha técnica utiliza dos agujas para inyección que calzan una dentro de la otra para que, durante el muestreo, la aguja interna, o de expulsión, quede en el fondo de la bolsa, y la externa, o recolectora, en el margen gingival. La aguja recolectora lleva el fluido a un tubo de ensayo mediante succión continua.[1]

2.3.2 Obtención por micropipetas

El uso de micropipetas permite la toma del fluido por capilaridad. En el surco se colocan tubos capilares de longitud y diámetro estandarizados, y más tarde se centrifuga y analiza su contenido.[1]

2.3.3 Obtención por tiras de papel absorbente

Las tiras de papel absorbente (Periopaper o Durapore) se colocan en el surco (técnica intracrevicular) o en su entrada (técnica extracrevicular). (Fig. 2.1) Es importante la forma como se coloca la tira de papel filtro en el surco. La técnica de Brill consta en colocar la tira de papel en el surco hasta encontrar resistencia. Esta técnica produce un grado de irritación del epitelio del surco que activa por sí mismo el exudado del fluído. A fin de reducir al mínimo la irritación, Loe y Holmpeders ubicaron la tira de papel filtro justo a la entrada del surco o sobre la entrada del mismo. De ese modo la tira capta el fluido que se difunde hacia fuera, aunque el epitelio del surco no queda en contacto con el papel.

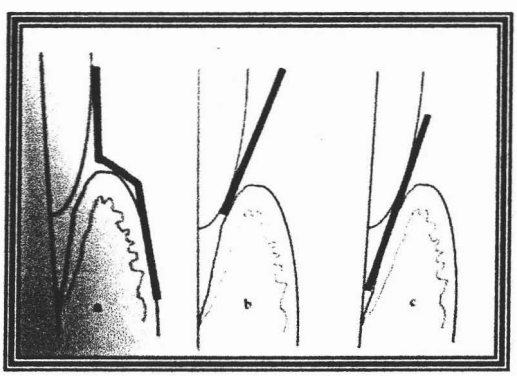


Fig. 2.1 Colocación de una tira de papel filtro en el surco gingival para recolectar fluído crevicular. a y b técnica extracrevicular, b. técnica intracrevicular. [11]

Weinstein y col. usaron trozos de hilo trenzado previamente pesado. Colocaron las hebras en el surco gingival alrededor del diente y estimaron la cantidad de fluido absorbido al pesar la muestra de hilo.

La cantidad de fluido recogido en una tira de papel se valora de diversos modos. La zona mojada se visualiza mejor mediante la tinción con ninhidrina. A continuación se hace la medición planimétrica sobre una fotografía ampliada o con ayuda de una lupa o un microscopio.[1]

Se diseño una técnica electrónica para medir el fluido recolectado en un "papel secante" (Periopaper), (Fig. 2.2) empleando un transductor electrónico (Periotron, Harco Electronics, Winnipeg, Manitoba, Canadá). (Fig.2.3) La humectación de la tira de papel afecta el paso de una corriente electrónica y da una lectura digital. La comparación entre la técnica de tinción con ninhidrina y el sistema electrónico efectuado in vitro no reveló diferencias importantes. La cantidad de FCG recolectado fue en extremo pequeña. [11]

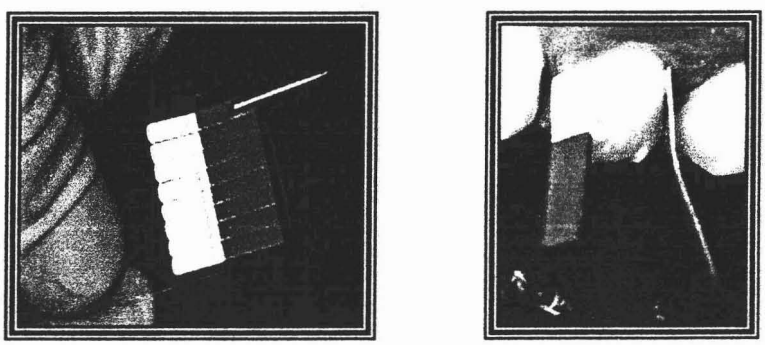


Fig. 2.2 Periopaper[12]

Mediciones tomadas por Cimasoni mostraron que una tira de papel de 1.5 mm de ancho insertada 1 mm dentro del surco con inflamación leve absorbió cerca de 0.1 mg de fluido en 3 min. [11]

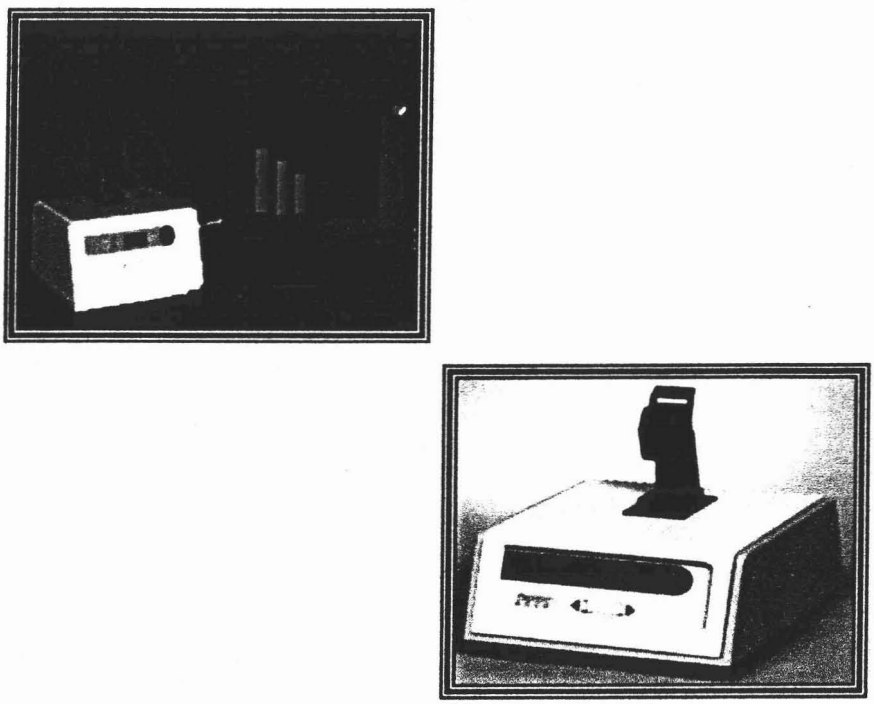


Fig. 2.3 Modelos de transductor electrónico para medir el fluido recolectado en un "papel absorbente" (Periopaper).[13]

Challacombe usó una técnica de dilución por isótopos a fin de medir en un espacio particular la cantidad de FGC presente en cierto tiempo. Sus cálculos en seres humanos voluntarios con un índice gingival medio menor de 1 indicaron que el volumen promedio del FGC varió desde 0.43 hasta 1.56ul en espacios interproximales de molares. [1]

2.4 Composición del fluido gingival crevicular

El fluido gingival crevicular se convierte en un medio ideal de monitoreo de los cambios ocurridos durante el proceso salud-enfermedad periodontal. Este fluido que puede ser trasudado (en condiciones basales o de normalidad) o exudado (en el proceso inflamatorio) contiene una gran cantidad de factores bioquímicos que ofrecen un uso potencial como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico del estado biológico del periodonto en salud y enfermedad.

El valor del fluido gingival crevicular como fuente de biomarcadores radica en el hecho de que es un fluido obtenido del flujo de la filtración capilar de los vasos sanguíneos, vasos linfáticos, del epitelio de unión y del surco principalmente. Este hecho hace que el fluido gingival crevicular pueda coleccionar mediadores bioquímicos y/o productos metabólicos, específicamente el contenido de proteínas plasmáticas, enzimas bacterianas, mediadores inflamatorios así como también productos de la degradación de la matriz colágena y extracelular, que pueden convertirse en un medio de diagnóstico temprano aplicables a la práctica clínica.[14]

Se han encontrado más de 40 componentes en el fluido gingival crevicular y se han clasificado en elementos celulares, electrólitos, compuestos orgánicos, productos bacterianos y metabólicos, enzimas e inhibidores enzimáticos. En particular, la atención se ha desviado a los mediadores bioquímicos de la inflamación, las enzimas derivadas del hospedero., y componentes de la matriz extracelular (MEC= siglas en inglés) en FGC y su posible papel como indicadores de algunos aspectos de la enfermedad periodontal activa.[14]

Elementos celulares

Los que se identifican en el FGC incluyen bacterias, células epiteliales descamadas y leucocitos (polimorfonucleares, linfocitos y monocitos/macrófagos.)[1]

Electrólitos

Potasio, sodio y calcio, de los estudios realizados se observa una relación positiva a la inflamación en concentraciones de calcio y sodio y la concentración de sodio y potasio.

Compuestos orgánicos

Tanto los carbohidratos como las proteínas han sido investigados. La hexosa glucosa y el ácido hexourónico son dos de los compuestos hallados en el FGC.

Las concentraciones de glucosa en el FGC es tres a cuatro veces mayor que en el suero. La concentración total de proteínas, es mucho menor que en el suero, y no existe una correlación importante entre la concentración de estas y el proceso de enfermedad periodontal.[1]

Productos metabólicos y bacterianos

De estos han sido identificados; ácido láctico, urea, hidroxiprolina, endotoxinas sustancias citotóxicas, ácido sulfhídrico y factores antibacterianos.[1]

Enzimas

Colagenasas: Actúan sobre el colágeno no modificado del tejido conectivo subepitelial, ligamento periodontal y hueso alveolar. Las tripsinas actúan sobre el colágeno alterado y estimulan la liberación de procolagenasas por los neutrófilos y fibroblastos.

La hialuronidasa: favorece la difusión tisular microbiana por el tejido conectivo, y por ende, su desorganización al despolimerizar el ácido.

La fosfolipasa A: actúa como precursor de las prostaglandinas.

Las fosfatasas ácidas y alcalinas: determinan pérdida de hueso alveolar. Condroitinsulfatasa, ataca al condroitin sulfato B, presente en el tejido conectivo.

Otras como gelatinasa, aminopeptidasas, ADNasas, ARNasas, keratinasas y fibrinolisinas, producidas por diversas bacterias periodontopatógenas.[15]

Mediadores bioquímicos y productos de la inflamación

En las fases iniciales de la lesión periodontal como en la lesión temprana e inicial, hay un reclutamiento de células inflamatorias hacia los tejidos conectivos gingivales, aumentando significativamente la liberación de varias citoquinas,

linfoquinas, quimoquinas y otros mediadores inflamatorios propios de la respuesta inmune, junto con gran cantidad de anticuerpos contra bacterias periodontopáticas propias de la respuesta inmune. La presencia de estos anticuerpos en el FGC indica que se producen localmente ante la presencia de bacterias periodontopáticas en el surco.

Sin embargo, no se puede descartar que estas provengan del suero y se encuentren en el FGC como un exudado, lo cual indicaría la presencia del microorganismo periodontopático o sus factores de virulencia. Se han encontrado varias subclases de inmunoglobulina G (IgG) en periodontitis, además de proporciones elevadas de IgG_1 y IgG_4 en sitios activos de enfermedad periodontal, correlacionándose positivamente con sangrado al sondeo y con progresión de la enfermedad.

Las citoquinas proinflamatorias como; IL-1ß, IL-4, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral TNF-α se han encontrado en el FGC.

Las prostaglandinas (PG) E_2, metabolitos productos de la cascada del ácido araquidónico, se encuentran en cantidades importantes en sitios inflamados. Estas se asocian con destrucción tisular, cambios metabólicos en el fibroblasto y reabsorción ósea. Se ha encontrado que los niveles altos de PGE_2 en FGC se correlacionan positivamente con inflamación periodontal y destrucción tisular. Un estudio longitudinal ha correlacionado niveles de PGE_2 y su relación con enfermedad periodontal activa, sugiriendo esta prostaglandina como un buen biomarcador de la actividad de la enfermedad periodontal. Desafortunadamente el hallazgo de esta prostaglandina en FGC es costoso.

La mieloperoxidasa es un enzima componente de los gránulos formados por los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y liberada sobre todo en sitios de inflamación activa. [14]

Aunque aún falta mucha evidencia científica que la soporte como un biomarcador, hay estudios que la han encontrado aumentada en comparación con sitios sanos.

Otros componentes del FGC como los factores de complemento, la lisozima, la lactoferrina, la transferrina y la fosfatasa ácida podrían comportarse como biomarcadores de enfermedad periodontal. Sin embargo, aún falta mucha investigación en cada uno de estos elementos.

Enzimas derivadas del hospedero

Se ha sugerido que los niveles de enzimas proteolíticas e hidrolíticas encontradas en el FGC puedan funcionar como biomarcadores diagnósticos.

El gran inconveniente de estas enzimas es que su actividad es modulada por complejos enzimáticos y proteínas que pueden ser producidas local o sistémicamente.

Esto indicaría que la presencia de la enzima en el FGC no necesariamente representaría una actividad biológica en respuesta a la enfermedad in situ. Sin embargo, la presencia de alguna de estas enzimas en formas activas o inactivas puede estar involucrada en enfermedad periodontal, correlacionarse con estadíos inflamatorios y servir como biomarcadores diagnósticos.

La presencia de la enzima colagenasa en FGC ha llamado la atención como un biomarcador ideal, pues los colágenos constituyen las proteínas con mayor presencia en la matriz extracelular y su pérdida constituye una característica principal de la enfermedad periodontal destructiva. [14]

Las colagenasas pueden ser producidas por leucocitos PMNs, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y osteoclastos, así como las bacterias. Varios estudios indican niveles altos de colagenasas asociadas con gingivitis y enfermedad periodontal. Sin embargo, sus altos niveles no han sido bien diferenciados entre gingivitis y periodontitis, sin tener en cuenta que la enzima puede expresarse asociarse con otras enfermedades propias del tejido conectivo, por lo cual no la hace un biomarcador ideal o confiable.

La elastasa es una endopeptidasa que puede degradar proteínas de la matriz extracelular fibrilar y no fibrilar. Los niveles de esta enzima en FGC aumentan en gingivitis experimental, así como también en sitios con lesiones periodontales establecidas.

Se sabe que esta enzima disminuye su producción con tratamiento convencional de sitios afectados. En estudios longitudinales se ha encontrado algo de valor predictivo positivo de la presencia de esta enzima en FGC con el riesgo de desarrollar periodontitis. Esta enzima puede ser promisoria como un biomarcador diagnóstico de enfermedad periodontal activa.

Las catepsinas son un grupo de proteinasas lisosomales que se liberan en altos niveles en sitios con inflamación y pueden degradar muchos componentes de la matriz extracelular. Se han identificado varios tipos de catepsinas en FGC. Algunos estudios la han soportado como útil para determinar la respuesta del tejido al tratamiento convencional.

La fosfatasa alcalina es una enzima lisosomal hallada en osteoblastos, fibroblastos, neutrófilos y bacterias. Se ha encontrado en el FGC así como también en suero, pero sus niveles son mayores en FGC y se han encontrado con correlación positiva en enfermedad periodontal. [14]

La enzima ß-glucoronidasa es la enzima lisosomal más estudiada por su relación con la función del leucocito polimorfonuclear, así como también su habilidad para degradar componentes de la matriz extracelular. Esta enzima parece tener mucho futuro en su desarrollo como ayuda diagnóstica para descubrir sitios con enfermedad periodontal activa.[14]

Componentes de la matriz extracelular (MEC) en FGC

Para el mantenimiento de los tejidos periodontales existe un delicado balance entre salud y enfermedad así como también entre los procesos de reparación y regeneración de tejido nuevo. Durante la enfermedad periodontal, los procesos de destrucción tisular exceden los procesos de síntesis tisular. Así, elementos tanto catabólicos como anabólicos pueden estar presentes en el FGC y pueden ser marcadores potenciales de enfermedad y recuperación tisular.

La medición de proteoglicanos y de sus componentes glucosaminoglicanos en FGC muestra tener algún potencial para el monitoreo de la enfermedad periodontal destructiva. El FGC es rico en productos metabólicos o degradativos de los proteoglicanos, como el dermatan sulfato (abundante en el tejido conectivo) y el condroitin sulfato (abundante en hueso alveolar). La identificación de los isómeros de condroitin 4 y 6 sulfato muestran ser marcadores útiles de actividad de reabsorción ósea activa. [14]

CAPÍTULO 3

CITOQUINAS

CITOQUINAS

3.1 Definición de las citoquinas

Las citoquinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular, que actúan mediando interacciones complejas entre células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas.[17] Estas actúan como moléculas mensajeras que transmiten señales a otras células. Desempeñan numerosas funciones, como la iniciación y el mantenimiento de la respuesta inmunitaria e inflamatoria y la regulación del desarrollo y la diferenciación de las células.[2]

Así, muchas de las primeras citoquinas se descubrieron como leucocitos, por lo que se denominaron interleucinas; otras eran secretadas por monocitos/macrófagos, por lo que se llamaron monocinas. Sin embargo, muchas de esas sustancias son producidas por diferentes tipos celulares del sistema inmune (macrófagos, linfocitos T, células natural k) y células no inmunes (fibroblastos, células endoteliales) por lo tanto su denominación no era correcta, y para agruparlas a todas bajo mismo concepto se les de el nombre de citoquinas.[16]

El subgrupo más grande de citoquinas comprende a las interleucinas, denominadas así por participar en la comunicación celular mediada por los leucocitos. Se conocen 18, designadas interleucina-1 (IL-1) hasta la interleucina 18 (IL-8)[17]

Las interleucinas también participan fundamentalmente en la comunicación de otras células implicadas en los procesos inflamatorios, como las epiteliales, endoteliales y fibroblastos.[2]

Otras citoquinas importantes son los interferones (INF α y β) y los factores de necrosis tumoral (TNF α y β).[16]

3.1.1Propiedades generales de las citoquinas

El peso molecular de las citoquinas por lo general, es menor a 30 kDa. Se unen a receptores específicos de la membrana en las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular, una señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica. [17]

Las citoquinas son producidas por múltiples tipos celulares, principalmente del sistema inmune. Dentro del sistema inmune natural, los macrófagos son las células con mayor producción de citoquinas.

La producción de las citoquinas suele ser transitoria, limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo (es decir, el agente extraño).

Considerando las diversas citoquinas, éstas pueden exhibir una o varias de las siguientes cualidades:

- Pleiotropía.- múltiples efectos al actuar sobre diferentes células
- Redundancia.- varias citoquinas pueden ejercer el mismo efecto
- Sinergismo.- el efecto que se potencia entre dos citoquinas
- Antagonismo.-inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos

Utilizando la analogía de lo que ocurre con las hormonas del sistema endocrino, la acción de las citoquinas se puede clasificar en:

- Autocrinas
- Paracrinas
- Endocrinas (en pocas ocasiones)[16]

3.1.2 Estructura y función de las citoquinas

Muchas de la citocinas pertenecen a la llamada familia de las hematopoyetinas, y tienen estructuras terciarias parecidas: una configuración a base a un conjunto de cuatro hélices, y estructura en lámina.[18] (Fig.3.1)

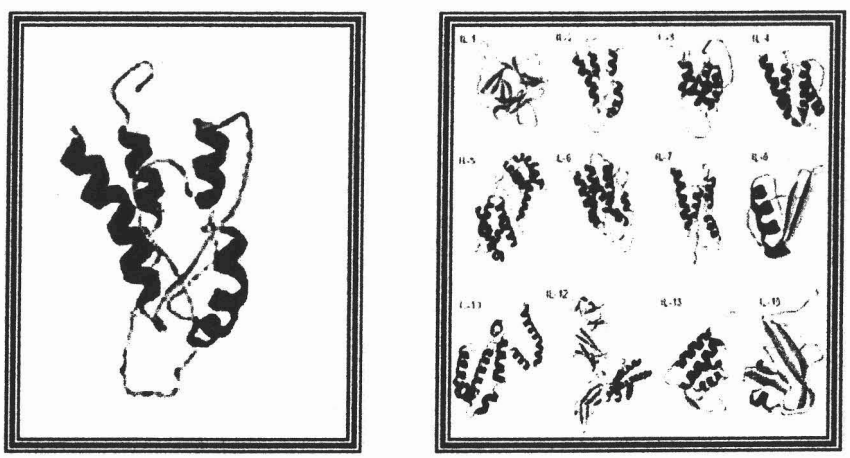


Fig. 3.1 Estructura celular de las citoquinas y estructuras de las primeras 12 citoquinas[19]

Los principales tipos de respuesta mediados por la acción de las citoquinas son:

1. Activación de los mecanismos de inmunidad natural:

    - activación de los macrófagos y otros fagocitos
    - activación de las células natural k.
    - activación de los eosinófilos
    - inducción de las proteínas de fase aguda en el hígado

2. Activación y proliferación de células B, hasta su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos
3. Intervención en la respuesta celular específica
4. Intervención en la reacción de inflamación, tanto aguda como crónica
5. Control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea
6. Inducción de la curación de heridas [16]

3.2 Citoquinas presentes en los tejidos periodontales enfermos y en el fluido gingival crevicular

Entre la citoquinas presentes en el FGC investigadas como marcadores diagnósticos potenciales se encuentran:

Las citoquinas proinflamatorias como IL-1β, IL-14, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral TNF-β se han encontrado en el FGC y estudiado en la progresión de la enfermedad periodontal destructiva. [20]

La Interleucina (IL)-1β. Es un mediador proinflamatorio multifactorial capaz de modular la resorción ósea por la activación de los osteoclastos y estimulando la síntesis de PGE_2 Aunque esta citoquina, originalmente fue considerada un producto de la fagocitosis mononuclear, la evidencia sugiere que los queratinocitos y los fibroblastos gingivales también podrían producirla, Dimarelio (1988) en respuesta al estímulo por los productos bacterianos. La evidencia de que IL-1β puede actuar en gran cantidad de células, tales como fibroblastos, condrocitos, células de hueso, linfocitos sugiere que la destrucción periodontal y la reparación en periodontitis se pueda, en parte, asociar a esta citoquina. (Jandinski1988)[21] Tambien fueron se observó aumentada en la periodontitis. (Preiss y Meyle 1994)[22] y en modelos de gingivitis experimental (Kinane et al. 1992).[23] Además, el tratamiento de la periodontitis dio lugar a una dramática disminución de IL-1β, sugiriendo que esta molécula es crucial en la destrucción del tejido periodontal. (Masada et al. 1990, Reinchardt et al. 1993)[24, 20] (Fig. 3.2)

La IL-4, originalmente fue descrita como un factor del crecimento de la célula-B, es un potente depresor de la función del macrófago. Esta depresión regula al receptor de la membrana para el lipopolisacarido CD14 de los macrófagos (Lauener et al. 1990)[25], lo que posteriormente disminuye la producción de citoquinas por los macrófagos conocido como la apoptosis para los monocitos.

(Mangan et al. 1992).[26] También inhibe la secreción de PGE_2 por los monocitos humanos lo cual ocasiona resorción ósea. (Shapira et al. 1992).[27] En los tejidos periodontales enfermos, la ausencia localizada de IL-4 se asocia con la actividad y progresión de la enfermedad periodontal (Kabashima et al. 1996, Shapira et al. 1992).[28] Esto condujo a la hipótesis de Shapira et al. (1992) que la ausencia de IL-4 dispara la enfermedad periodontal. (Fig. 3.3)

Fig. 3.2 Interleucina (IL-1)

Fig. 3.3 IL-4

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que estimula la secreción de la inmunoglobulina por los linfocitos B humanos, activa las células de T, estimula la síntesis y la secreción de las proteínas en fase aguda por los hepatocitos, y activa la cascada del complemento. (Revel 1989)[29] Su principal papel es la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, las células predominantes del infiltrado celular en la enfermedad periodontal establecida y avanzada. (Page &Schroeder 1976).[30]

Una particular función de IL-6 es inducir la resorción ósea por sí misma y conjuntamente con otros agentes de resorción ósea (Ishimi y otros. 1990, Mundy 1991).[31] (Fig. 3.4)

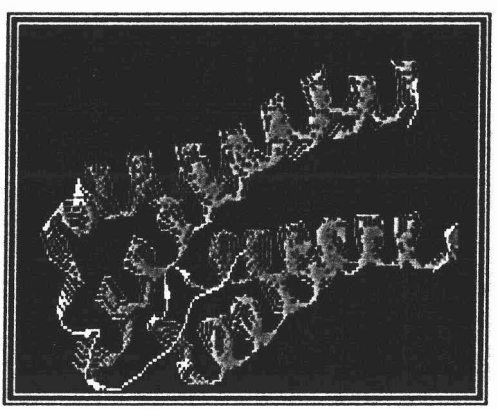


Fig. 3.4 IL-6

La IL-8 Es una de la citoquinas con una potente función quimiotáctica para los leucocitos polimorfonucleares pero también para los linfocitos y macrófagos. Es un potente mediador de la acumulación de leucocitos en los sitios de inflamación. En el FCG los niveles de IL-8 son encontrados en sitios inflamados. (Bickel 1993)[32], (Fig. 3.5)

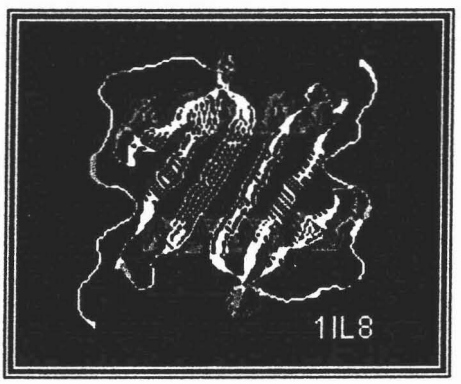


Fig.3.5 IL-8

Finalmente el TNF también se encuentra en dos formas; TNF-α y TNF β. El TNF-α comparte muchas de las actividades biológicas de IL-1 sin olvidar la estimulación de la resorción ósea. Las propiedades de estas citoquinas están relacionadas con la destrucción del tejido que tiene que ver con la estimulación de la resorción ósea y la inducción de proteinasas que destruyen los tejidos. (Fig. 3.6)

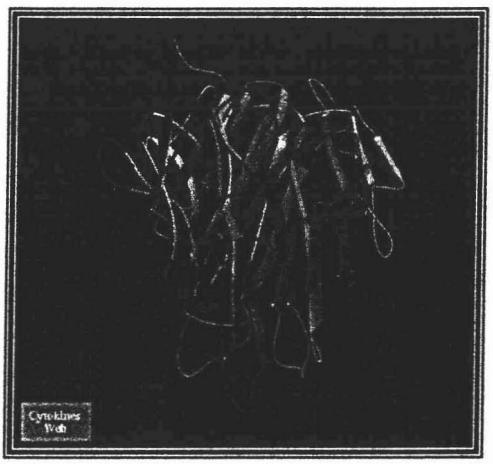


Fig. 3.6 TNF β

CAPÍTULO 4

TABAQUISMO Y TENSIÓN EMOCIONAL EN RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

TABAQUISMO Y TENSIÓN EMOCIONAL EN RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

4.1 Tabaquismo

La adicción al tabaco provocada principalmente por uno de sus componentes activos, la nicotina, acaba degenerando en el abuso de su consumo o tabaquismo. (Fig. 4.1)

El tabaquismo actualmente es, la principal causa mundial de enfermedad y mortalidad evitable. Hoy en día el tabaquismo es considerado una enfermedad adictiva crónica con posibilidades de tratamiento. Un fumador es la persona adicta al consumo de tabaco del cual la persona es dependiente debido a las cantidades de nicotina que éste trae.

Los efectos psicológicos que causa la abstinencia en una persona fumadora son variados, entre ellos nerviosismo, falta de concentración, y los efectos fisiológicos como sueño, apetito, sed, entre muchos otros.

Existen dos tipos de dependencia respecto al tabaco, la dependencia fisiológica y la dependencia psicológica. La primera de ellas hace referencia a la costumbre que tiene la persona fumadora de fumar y la segunda está producida por las cantidades de nicotina y sustancias que el tabaco posee y hace que la persona que consume esta "droga legal" gane una gran dependencia al consumo del tabaco. [33]

Grados de tabaquismo

Fumadores leves

- Menos de 5 paquetes/año
- CO en aire respirado < 15 ppm (partes por millón)

Fumadores moderados

- Entre 5 y 15 paq/año
- CO > 15 y < 25 ppm

Fumadores intensos

- Más de 15 paquetes/año
- CO > 255 ppm

Fig. 4.1 Tabaquismo

Dependencia física de la nicotina

- Dependencia moderada-intensa: consumo de más de 20 cigarrillos al día.
- Dependencia leve: consumo de menos de 20 cigarrillos al día, [33]

En el mundo hay más de mil millones de personas que fuman tabaco. El porcentaje de fumadores ha disminuido en muchos países desarrollados pero está aumentando en los países en vías de desarrollo. En la mayoría de poblaciones, entre el 20 y el 66% de los hombres fuma. Aunque el porcentaje de mujeres que fuman está aumentando, este suele ser inferior al de hombres que fuman cigarrillo después de media hora de levantarse. El tabaquismo es la adicción con mayor mortalidad a nivel internacional, la Organización Mundial de la Salud (OMS) le adjudica 3 millones de muertes anuales en el mundo; en México suman 6 mil, 122 de las cuales se registran diariamente. Los fumadores activos en el orbe son mil millones, mientras que en nuestro país son 13 millones de adultos y uno más de menores de edad.[33]

El consumo de tabaco encierra una paradoja que lo hace aún más difícil de combatir: es altamente mortal pero también tiene muchas posibilidades de ser prevenido. Según la organización Mundial de la Salud (OMS) esta es "una adicción considerada como la primera causa prevenible que ocasiona enfermedad, invalidez y muerte prematura"; y registra 3 millones de muertes anuales en el mundo y medio millón en toda Latinoamérica.

Los jóvenes conforman el grupo más vulnerable a este hábito, pues según los especialistas se fuma por imitación, principalmente. Hoy en día son poco más de un millón de jóvenes mexicanos los fumadores entre los 12 y los 18 años de edad, que más han decidido fumar y que más tarde formarán parte de las estadísticas de fumadores adultos, con padecimientos relacionados al cigarro.[33]

4.1.1 Influencia del tabaquismo en enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es una enfermedad crónica y progresiva que ocasiona la pérdida de los dientes. Se caracteriza por una inflamación de la encía que destruye el soporte circundante de los dientes.

Dependiendo de su grado de afectación se denomina gingivitis, cuando el proceso inflamatorio solamente afecta a la encía. Cuando el proceso inflamatorio afecta a los tejidos periodontales profundos, se produce destrucción del hueso y ligamento, tejidos de soporte del diente. Este grado de afectación le conocemos como periodontitis.

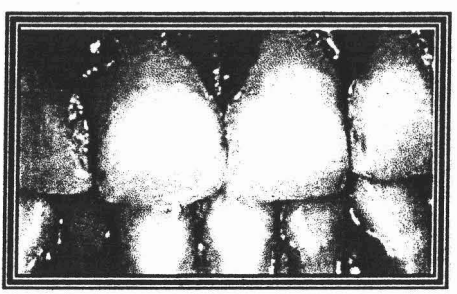


Fig. 4.2 Placa bacteriana y cálculo[34]

La placa bacteriana es el principal detonante de las enfermedades periodontales crónicas. (Fig. 4.2) Cuando el tabaquismo esta presente, la encía recibe menos vascularización y oxígeno, al mismo tiempo que disminuyen los mecanismos de defensa frente a las bacterias de la placa bacteriana, que se vuelven más agresivas y destruyen de manera más activa los tejidos de soporte del diente.[34]

Las bacterias por si mismas no son capaces de provocar las consecuencias de estas enfermedades, necesitan de un individuo susceptible (predisposición genética) y un medio ambiente adecuado (factores como tabaquismo y tensión emocional son factores de riesgo muy importantes en la colonización de estas bacterias).[35]

Los estudios sobre población indican que los fumadores, y especialmente de grandes cantidades, tienen una clara tendencia a la enfermedad periodontal.

Actualmente se ha comprobado que el tabaquismo es un factor independiente y directo que acelera la pérdida ósea alrededor de los dientes por cuatro mecanismos:

1. La nicotina produce una vasoconstricción de la microcirculación gingival. Y como consecuencia se reduce el aporte de oxígeno, de células y de sustancias quimiotácticas en relación con la respuesta inflamatoria gingival.
2. El humo del tabaco provoca una disminución de la inmunidad celular y humoral, en particular de la actividad quimiotáctica y fagocitaria de los leucocitos.
3. El humo del tabaco debilita el potencial de óxido reducción del ecosistema bucal favoreciendo la proliferación de las bacterias de la placa bacteriana.
4. La nicotina es el origen de problemas en el metabolismo de la síntesis del colágeno, de la secreción proteica y de la reproducción de los fibroblastos.
5. El tabaquismo posee una acción sobre la salivación, la cual se ve aumentada, favoreciendo la mineralización de la placa bacteriana y por ende la formación de sarro.[34]

Los adolescentes fumadores están expuestos a un riesgo tres veces superior a lo normal de desarrollar una enfermedad periodontal al alcanzar la edad adulta. (Fig. 4.3)[34]

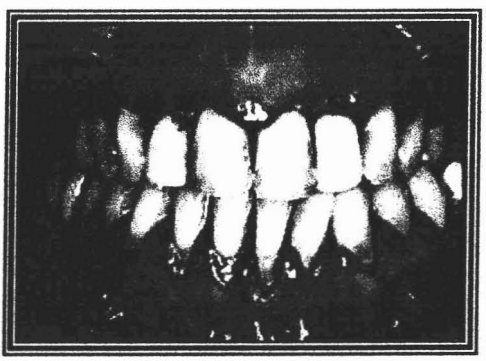


Fig. 4.3 Periodontitis crónica intensificada por tabaquismo.[34]

4.2 Tensión emocional

El siglo XX se ha caracterizado por cambios científicos, tecnológicos y sociales, donde los sujetos de forma individual y colectivamente se ven sometidos de manera continua a condiciones sin precedentes en el curso de su evolución. Surgen sin cesar nuevos problemas y otros se modifican como consecuencia de cambios que suceden antes que el organismo pueda estabilizar su respuesta.

De esta forma en el cuadro de morbilidad y mortalidad de las sociedades modernas ocupan un lugar cada vez más prominente las "enfermedades de la civilización", que han ido desplazando a las enfermedades infectocontagiosas en orden de importancia.

Los factores socioeconómicos y psicosociales desempeñan una función muy relevante en la génesis de estas enfermedades. Todas ellas relacionadas con estados de tensión psicosocial y de conflicto, capaces de introducir cambios biológicos, metabólicos y funcionales, y es esta la manera en que reacciona como un todo el organismo frente a cualquier agresión de cierta intensidad y duración.

Una definición de tensión emocional como estado generador de reacciones, es la siguiente:

La tensión emocional es la respuesta del organismo a un estado de tensión excesiva y permanente que se prolonga más allá de las propias fuerzas del individuo y lo lleva a un sobreesfuerzo emocional, intelectual, que sobrepasa sus propias posibilidades, y le ocasiona como consecuencia, una hiperactividad incontenible, que desencadena una serie muy compleja de modificaciones bioquímicas y un cuadro sintomático precedido por excitación cardiaca, aumento del tono muscular y trastornos gastrointestinales difusos.[36] (Fig. 4.4)

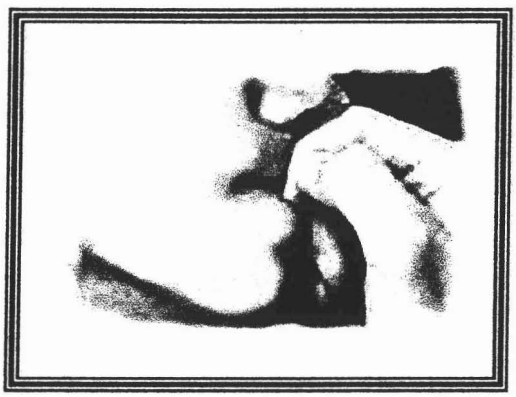


Fig. 4.4 Tensión emocional[37]

En la base de la tensión emocional descansa, con regularidad, un conflicto en el cual no se corresponden las posibilidades de satisfacer necesidades, demandas y deseos, la no correspondencia entre la carga emocional y las reservas para la adaptación. [16]

La tensión emocional es una reacción de respuesta a la acción de agentes externos e internos en la interrelación del hombre con el medio.

Otros autores plantean que es un factor o la combinación de factores físicos, químicos y/o psicológicos que altera la homeostasis y el bienestar del organismo que produce una respuesta de defensa.

Se ha planteado que para que un estímulo provoque la reacción de tensión emocional, este debe ser percibido como una amenaza; pero esta percepción depende de la naturaleza e intensidad del estímulo, novedad, compromiso para el sujeto, expectativas, valores y características de la personalidad. [36]

4.2.1 Influencia de la tensión emocional en la enfermedad periodontal

Existe una fuerte relación entre las alteraciones psicológicas y las enfermedades de origen periodontal; dado que cada vez se vive en un ambiente más estresante, es posible que una mayor incidencia de alteraciones periodontales esté relacionada con este factor contribuyente.

La tensión emocional y física en un paciente con periodontitis pueden ser factores importantes para el fracaso de un tratamiento periodontal por lo que es preciso [1] evaluar los estados de ánimo y conducta de los pacientes y así ofrecer un mejor plan de tratamiento y pronóstico.

La incidencia de la gingivitis ulcerativa necrosante aumenta durante periodos de tensión emocional y psicológica, lo que sugiere una relación entre las dos. Sin embargo no se ha demostrado científicamente que los factores psicosociales estén relacionados o predispongan al inicio de la periodontitis crónica, pero al parecer pudieran tener relación o influenciar la progresión o el desarrollo de la enfermedad

La tensión emocional interfiere en la función inmunitaria normal, y puede generar niveles mayores de hormonas circulantes que llegan a tener efecto sobre el periodonto, esta demostrado que las enfermedades periodontales inflamatorias son una respuesta a la presencia microbiana, relacionadas con bacterias patógenas periodontales. Acontecimientos agobiantes de interés social o moral, conllevan a una mayor prevalencia de la enfermedad periodontal, existiendo una relación favorable entre factores psicosociales y hábitos como; cambios en la dieta, tabaquismo, bruxismo mala higiene bucal y depresión.[38]

Existen varias formas en que los factores de la tensión emocional y psicológica pueden interferir en la susceptibilidad del huésped.

La resistencia de los tejidos del huésped puede estar alterada por mecanismos que actúen por medio del sistema nervioso autónomo y las glándulas endocrinas, teniendo como resultado un aumento en los niveles de corticoesteroides y catecolaminas. Esto puede dar como resultado una disminución en la microcirculación gingival y el flujo salival reforzando la nutrición de *Prevotella intermedia* (se encuentra en altas concentraciones en periodontitis crónica y en la progresión de la enfermedad), pero además deprime las funciones neutrofílicas y linfocitarias lo cual facilita la invasión bacteriana.[1]

Al nivel de la articulación temporomandibular y del sistema oclusal dental, la respuesta de adaptación consiente o inconsciente a las presiones psicológicas y biológicas ambientales, pueden inducir a la creación de hábitos parafuncionales tales como el bruxismo, que alteran al sistema de soporte del diente debido a una sobrecarga de la función oclusal, lo cual puede provocar sintomatología como movilidad y sensibilidad dental.

Se ha demostrado que el traumatismo al periodonto por la oclusión no provoca la aparición de la enfermedad periodontal, pero si acelera el proceso de destrucción de los tejidos, actuando de manera sinérgica con procesos inflamatorios preestablecidos.[38]

CAPÍTULO 5

PERFIL DE LAS CITOQUINAS EN EL FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR, EN PACIENTES CON PERIODONTITIS, INFLUENCIADO POR TABAQUISMOY TENSIÓN EMOCIONAL

PERFIL DE LAS CITOQUINAS EN EL FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR, EN PACIENTES CON PERIODONTITIS, INFLUENCIADO POR TABAQUISMO Y TENSIÓN EMOCIONAL

5.1 Reportes clínicos

En las últimas décadas se han estudiado la respuesta de los factores locales del hospedero hacia la periodontitis por análisis bioquímicos del FGC. Entre muchos de los mediadores inmunes e inflamatorios identificados en el FGC, las citoquinas han atraído particular interés ya que se sospecha que están involucradas tanto en la alteración relacionada con la inflamación así como en la reparación de los tejidos periodontales.

La liberación de las citoquinas por varios tipos celulares es el resultado de la respuesta inmune hacia la agresión bacteriana. Sin embargo, la invasión bacteriana y las respuestas inmunes del hospedero son reguladas por varios factores del medio ambiente.

Como se mencionó en el capítulo anterior, la tensión emocional recientemente se ha considerado ser un posible factor de riesgo para la enfermedad periodontal ya que afecta numerosos parámetros inmunes y altera la función inmune.

Dobbin et al (1991)[39] y Dugué et al (1993)[40] fueron los primeros en analizar los efectos de la tensión psicológica en la producción de la IL-1β.

Deinzer et al (1999)[41] probaron los efectos de la IL-1β en el FGC en individuos con tensión emocional, en este estudio, se examinaron a 39 estudiantes de

medicina durante y después de tener importantes exámenes que se consideraron extremadamente tensionantes. Se les indicó que no se cepillaran 2 cuadrantes antagonistas por 21 días (gingivitis experimental) y que en los cuadrantes restantes tuvieran excelente higiene bucal.

La obtención de las muestras del fluido gingival crevicular fue recopilada a los días 0, 5, 8, 15, 18 y 21 días después de la examinación, estas muestras fueron tomadas en segundos premolares y en primeros molares superiores en los cuadrantes con gingivitis experimental y en los cuadrantes con una perfecta higiene bucal y se analizaron separadamente con la prueba de ELISA para IL-1 β.

Ellos observaron que la tensión presente indujo a un aumento de la IL-1β tanto en los sitios con gingivitis experimental como en los sitios sanos.

Nuevamente Deinzer et al (2000)[42] realizó el mismo estudio ahora estudiando los efectos tardíos de la tensión emocional producida por los exámenes en la secreción de la IL-1β crevicular inducida por placa bacteriana. Sus resultados fueron los mismos que en el estudio anterior, un aumento en la producción de la citoquina 1L-β en el FGC.

Además, ellos observaron que los efectos de la tensión emocional pudieron persistir al menos por 2 semanas más, después de la terminación de los exámenes. Ellos correlacionan sus resultados con los reportes previos de ellos mismos (Deinzer & Schüller 1997)[43] donde la disminución de la IgA persistió al menos por 2 semanas también después del cese de la tensión emocional.

Aunque estas observaciones agregan evidencia a la hipótesis de que las relaciones tensión emocional-enfermedad periodontal pueden estar reguladas por alteraciones inmunológicas, ocasionando el aumento del nivel de la citoquina IL-1β, sus experimentos fueron realizados en pacientes con gingivitis experimental inducida y no con periodontitis.

Giannpoulou, Karma y Mombelli (2003, 2004)[44] estudian el efecto de la inflamación, el tabaquismo y la tensión emocional en el nivel de las citoquinas; IL-1β, IL-4, IL-6 e IL-8 en el FGC con el fin de establecer su valor diagnóstico. Determinaron a las citoquinas en un gran espectro de sujetos periodontalmente sanos y enfermos expuestos a estos factores.

Ellos estudiaron un total de 80 sujetos clasificándolos como: grupo 1 = sanos (20) con encía clínicamente sana; grupo 2= (20) con inflamación gingival sin evidencia de pérdida ósea; grupo 3 = (20) con periodontitis del adulto mostrando evidencia radiográfica de pérdida ósea y pérdida de inserción de mas de 5 mm en al menos ocho sitios y; el grupo 4 = (20) diagnosticados con periodontitis de inicio temprano (periodontitis agresiva) quienes mostraron una pérdida severa de destrucción periodontal, con una pérdida de inserción que iba mas allá de los 5 mm en dos a tres sitios en mas de 14 dientes permanentes (al menos uno de ellos era un incisivo o primer molar) y una evidencia radiográfica de pérdida ósea.

Los hábitos del tabaquismo (cajetillas de cigarrillos/día) y la tensión emocional se registraron durante el examen periodontal. Los eventos sociales tensionantes experimentados por los pacientes fueron determinados por la

Escala de Tensión Modificada y Percibida (MAPS = siglas en inglés) (Linn 1986)[45], basada en la tensión total percibida.

La examinación clínica incluyó determinación de la profundidad al sondeo, pérdida de inserción, el índice de placa, sangrado al sondeo y presencia de supuración en cuatro sitios alrededor de cada diente excluyendo a los terceros molares. Se tomaron series radiográficas periapicales en todos los pacientes y la destrucción del hueso alveolar fue determinada en las caras mesial y distal de todos los dientes.

La obtención de las muestras del fluido gingival fue recopilada en cuatro sitios preseleccionados en cada paciente por medio de tiras de Durapore insertadas 1mm dentro del surco o de la bolsa durante 15 segundos.

Los resultados obtenidos mostraron que la IL-1β, IL6 y la IL-8 estuvieron significativamente elevadas comparadas con los sujetos sanos, los niveles de estos tres marcadores estuvieron significativamente mas aumentados en sitios que pertenecían a pacientes con periodontitis crónica del adulto o de inicio temprano comparados con los de los grupos sanos y con gingivitis.

Se observaron diferencias importantes en las diferentes categorías para la IL-1β comparados con el grupo sano, en el grupo con gingivitis se observó un aumento de 3 veces mas y un aumento de 6 veces mas en pacientes con periodontitis crónica del adulto y 9 veces mas en el grupo con periodontitis de inicio temprano. Ellos correlacionan sus observaciones con las de Kinane et al. (1992)[23] quien usando un modelo de gingivitis experimental reportaron que el nivel de la IL-1β en el FGC aumento rápidamente con la acumulación de placa antes de que se observaran cambios clínicos gingivales.

La IL-4 mostró una relación inversa con el estado periodontal y se encontraron mayores cantidades en el grupo sano y solo rastros en los otros tres grupos.

Los niveles de la IL-8 fueron estadísticamente más altos que las otras tres citoquinas. Las cantidades de las cuatro citoquinas fueron correlacionadas positivamente con los sitios profundos al sondeo.

La IL-4, IL-6 y la IL-8 estuvieron significativamente correlacionadas con el tabaquismo pero no con el nivel de la IL-1β. Parece ser que el cigarrillo contiene potentes inhibidores para la producción de IL-1 β, IL-2, interferón (IFN) y TNFα.

La tensión emocional puede ser un factor disruptivo en la regulación homeostática entre la bacteria oral y el sistema inmune del hospedero a través de la alteración en la producción de citoquinas, en el presente estudio la tensión emocional estuvo asociada con los niveles de IL-1β, IL-6 e IL-8.

Las conclusiones muestran una fuerte asociación positiva entre los niveles de IL-1β, IL-6 IL-8 en al FGC y la enfermedad periodontal y que una mayor producción de citoquinas en presencia de tabaquismo y tensión emocional pueden tener consecuencias clínicas.

En el 2004 los mismos autores estudian el perfil de las citoquinas en al FGC en periodontitis agresiva, con la influencia del tabaquismo y la tensión emocional. Comparando la presencia de IL-1β IL-4 IL-6 e IL-8 en el FGC en 65 pacientes con periodontitis agresiva fumadores y con tensión emocional y 35 periodontalmente sanos.[20]

En sus resultados encontraron que la IL-1β, L-6 y la IL-8 mostraron importantes efectos significativos con la Periodontitis agresiva.[20]

CONCLUSIONES

Aunque son esperanzadores muchos de los nuevos diagnósticos, sólo unos pocos han sido probados suficientemente como para ser útiles en la práctica odontológica.

Aún así, es mucho lo que se espera de esta área de desarrollo y es excelente la probabilidad de que en un futuro cercano se vean pruebas de diagnóstico innovadoras en la práctica periodontal y dentro del consultorio.

Con esto se espera que el diagnóstico de la enfermedad periodontal mejore mas aún en cuanto a la diferenciación de las enfermedades periodontales, la identificación del comienzo y progresión de la enfermedad, la identificación de las personas y de los dientes que son susceptibles al desarrollo y progresión de la enfermedad así como el control de la respuesta al tratamiento.

El Fluido gingival crevicular contiene múltiples metabolitos que pueden ser cuantificados, la citocinas son solo algunos de los componentes del fluido teniendo como objetivo en estas, determinar su función en el proceso de destrucción y progreso de la enfermedad periodontal. Sin embargo el costo resulta ser demasiado elevado para incluirlo en análisis de laboratorio por lo que su estudio ha sido limitado a prácticas de investigación.

Es de vital importancia no dejar de lado los factores externos que resultan ser los más importantes, en el tratamiento periodontal estos deben ser identificados al realizar la historia clínica del paciente.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

En cuanto a la relación entre el tabaquismo, la tensión emocional, y las citoquinas localizadas en el FGC resulta importante e interesante conocer mejor el mecanismo acción y los efectos que ocasionan estas proteínas dentro los tejidos periodontales.

Además clínicamente el tabaquismo y la tensión ligados, pueden determinar el fracaso de la terapia periodontal por lo que se debe tener comunicación con el paciente para poder eliminar estos factores de riesgo, para ello nos podemos apoyar de una terapia psicológica para el paciente y así dar un mejor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad periodontal.

"La información obtenida de cualquier prueba diagnóstica debe ser válida, factible y eficaz para su uso clínico en humanos." Hennekens y Buring 1987.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Carranza F, Newman M, Takei H. Periodontología Clínica. 9ª. ed. Cd. de México: Editorial Mc Graw-Hill, 2004. Pp.15-33, 270-277, 149-151

2. Lindhe J, Karring T, Lang N. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. 3ª .ed. Cd. México: Editorial Panamericana, 2003. Pp. 19-45, 192-228,408-421

3. http://www.encia.com.mx/ dientes.htm/Tipodonto % 2005 (1) jpg

4. Marja T P, Jukka I, Salonen & Veli-J U. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. Periodontology 2000; 2003; 31: 12-31

5. Schroeder HE, Litsgarden MA, Fine Structure of the Developing Epithelial Attachment of Human Teeth. Monogr Dev Biol. 1971;2:1-134

6. Heath JK, Gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Human gingival tissues in culture synthesize three metalloproteinases and a metalloproteinase inhibitor. J Periodontal Res. 1982; 17:183-190

7. Schroeder H. Litsgarden M. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontol 2000. 1997; 13: 90-120

8. Schroeder H. The junctional epithelium. Origin, structure, and significance. Acta Med Dent Helv. 1966; 1: 155-167

9. Stern I. Current concepts of the dentogingival junction: the epithelial and connective tissue attachment to the tooth .J Periodontol 1981: 52: 465-476

10. Uitto VJ, Gingival crevice fluid–an introduction Periodontol 2000. 2003; 31: 9-11

11. Griffiths GS, Formation collection and significance of gingival crevice fluid. Periodontol 2000.2003; 31: 32-42

12. http://images.gogle.com.mx (periopaper)

13. http://jpj.quintessenz.de/index.php?content

14. Arce MR. Terapia Periodontal del futuro. Rev. Col. Med 2004; 35: 40-47

15. Javier LM., Factores de riesgo de la enfermedad periodontal. Odon. Online, 2003, hallado en: http://www.odontologia-online.com/casos/part/JMLT/JMLT03/jmlt03.html

16. Aguirre de A, Quintana R, Brandon N. Citoquinas. Med online. 2002. hallado en:http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/citoquinas.htm

17. Genenser F, Histología sobre bases moleculares, 3era. ed. Cd. de México: Ed Medica panamericana, 1999. 212-214

18. Wikipedia, La enciclopedia libre. 2002. hallado en: http://es.wikipedia.org/wiki/Interleucina

19. http://images.google.com.mx (interleucinas)

20. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdeskis VGS, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and estress. J Clin Periodontol 2004; 31:894-902

21. Jandinski, JJ. Osteoclast activating is now interleukin-1: Historical perspective and biological implications. J Oral Pathol. 1988; 17: 145–152

22. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. Periodontol 1994; 65: 423-428

23. Kinane DF, Winstanley FP, Adonogiannaki E. Moughal NA. Bioassay of interleukin 1 (IL-I) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. Archives of Oral Biol. 1992; 37: 153-6

24. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. Clin. Periodontol 1993; 207: 514-519

25. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS and Vercelli D. Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14, in normal human monocytes. Eur. J. Immunol.1990; 20: 2375-2381

26. Mangan DF, Robertson B & Wahl SM. IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes. J Immunology 1992; 148: 1812-1816

27. Shapira L., van Dyke TE & Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. Medical Hypotheses.1992; 39: 319-322

28. Kabashima H, Nagata K, Hashiguchi I, Toriya Y, Iijima T, Maki K & Maeda K Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-4 in gingival crevicular fluid of patients with inflammatory periodontal disease. J Oral Pathol. Medicine 1996; 25: 449-455

29. Revel M. Host defense infections and inflammations: Role of the multifunctional IL-67/IFN-β2/ cytokine.Experienta1989; 45:549-557

30. Page RC & Schoroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease; a summary of current work. Laboratory Investigation 1976; 33:235-249

31. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J Immunol 1990; 145:3297-3303

32. Bikel M. The role of IL-8 in inflammation and mechanisms of regulation. J Periodontal Resch1993; 64 456-460

33. Organización Panamericana de la Salud. Tabaco o Salud: Situación en las Américas: Un informe de la Organización Panamericana de la Salud. OPS 1992 Publicación Científica No. 536

34. http://www.tabaquismo.freehost.net/boca/gingivitis .jpg

35. Tobacco Smoke and involuntary Smoking hallado en: http://www.greenfacts.org/es/tabaco/acerca-tabaco.htm

36. Barrientos G, Valdés M, Martínez G. Salud mental. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. 1974; 5:16-17

37. Documento.tripod.com.ar/estrés

38. Castellanos JL, Suárez LM, Díaz GO. Medicina en Odontología. Manejo dental de pacientes con enfermedades sistémicas. 2ª.ed.Cd. México: Editorial Manual moderno; 1996. Pp. 396-397

39. Dobbin JP, Harth M., McCain GA, Martin, RA, Cousin, K. Cytokine production and lymphocyte transformation during stress. Brain Behavior, and immunity. 1991; 5: 339- 348

40. Dugué B, Leppänen EA, Teppo AM, Fyhrquist F, Grasbeck R. Effects of psychological stress on plasma interleukins-lβ and 6, C-reactive protein, tumor necrosis factor α, anti-diuretic hormone and serum cortisol. Scandinavian J Clinical Lab Inv. 1993; 53: 555-561

41. Deinzer R, Forster P, Fuck L, Herforth A, Stiller-Wiokler R, Idel H. Increase of crevicular interleukin 1β under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. J Clinical Periodont. 1999; 26: 1-8

42. Deinzer R, Kottmann W, Forster P, Herfortth A, Stiller-Winkler. R, Idel H. After-effects of stress on crevicular interleukin-1β. J Clinical Periodont. 2000; 27: 74-77

43. Deinzer R, Schüller N. Dynamics of stress-related decrease of salivary immunoglobulin A (sIgA). Relationship to symptoms of the common cold and studying behavior. Behavioral Med. 1997; 23: 161-169

44. Giannopolou C, Kamma J, Mombelli A. Effect of inflammation smoking and stress on gingival crevicular fluid cytoquine level. J Clinical Periodont. 2003; 30:145-153

45. Linn M. Modifiers and perceived stress scale. J Consul Clinical Psycho. 1986; 54: 507-513