

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**Departamento de Estomatología III
(Medicina y Cirugía Bucofacial)**



**EL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA IL-1 Y SU
EVENTUAL ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD
PERIODONTAL EN UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Guillermo José Valderrama Mateos

Bajo la dirección de los doctores

Antonio Bascones Martínez
Amando Garrido Pertierre

Madrid, 2005

ISBN: 84-669-2818-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**EL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA IL-1
Y SU EVENTUAL ASOCIACIÓN CON LA
ENFERMEDAD PERIODONTAL EN UNA
POBLACIÓN ESPAÑOLA**

TESIS DOCTORAL

D. GUILLERMO JOSÉ VALDERRAMA MATEOS

MADRID, 2005



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y
CIRUGÍA BUCOFACIAL**

***EL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA
IL-1 Y SU EVENTUAL ASOCIACIÓN CON LA
ENFERMEDAD PERIODONTAL EN UNA
POBLACIÓN ESPAÑOLA***

DIRECTORES

**Dr. D. ANTONIO BASCONES MARTÍNEZ
Dr. D. AMANDO GARRIDO PERTIERRA**

TESIS DOCTORAL

MADRID, MMV

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

Dr. Antonio Bascones Martínez

Subdirector del Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

El consejo del Departamento de Estomatología III acordó en su reunión en la fecha abajo reseñada, que el trabajo de investigación ***“EL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA IL-1 Y SU EVENTUAL ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA”*** realizado por el Licenciado en Odontología **D. Guillermo José Valderrama Mateos** y bajo la dirección y tutela de los profesores **Doctor Antonio Bascones Martínez** y **Doctor Amando Garrido Pertierra**, reúne todas y cada una de las consideraciones exigidas por normas y ley para su lectura, enjuiciamiento y valoración a fin de obtener el **Grado de Doctor**.

Madrid, a 15 de Abril del 2005 .

Fdo. Prof. Dr. Antonio Bascones Martínez

D. ANTONIO BASCONES MARTÍNEZ, Catedrático de Medicina Bucal y Periodoncia del Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, y

D. AMANDO GARRIDO PERTIERRA, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

INFORMAN: Que el presente trabajo titulado “*EL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA IL-1 Y SU EVENTUAL ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA*” ha sido realizado por **D. GUILLERMO JOSÉ VALDERRAMA MATEOS** bajo nuestra dirección en los Departamentos de Estomatología III de la Facultad de Odontología y Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Consideramos que el mencionado trabajo reúne las características y condiciones necesarias para ser defendido ante un Tribunal para obtener el Grado de Doctor.

Y para que así conste donde proceda, firmamos el presente informe, en Madrid a 15 de Abril del 2005

Fdo. **Prof. Dr. Antonio Bascones**

Fdo. **Prof. Dr. Amando Garrido**

A Gema y Claudia

*Por brindarme la fuerza y confianza necesaria para llegar hasta el final.
Sin ellas a mi lado, la luz del mañana se desvanecería.*

Agradecimientos

Al Profesor Antonio Bascones, por abrirme las puertas de su Máster, lugar repleto de conocimiento y sabiduría. Un conocimiento y una sabiduría que unido al esfuerzo y a la constancia que allí se respira, ha sido suficiente para encontrar al profesional que un día soñé. Gracias profesor, por hacer de la facultad la octava isla.

Al Profesor Amando Garrido, por enseñarme que por más triunfos y distinciones que se posean, uno puede continuar siendo fiel a sus principios. La humildad, la bondad y sobretodo la amistad que manifiesta hacia los que le rodean, hace de usted una persona digna de emular.

A Susana, por tenerme verdadera paciencia y enseñarme los misterios de su laboratorio. Han sido tres años repletos de buenas caras y constante ayuda, donde sin tu apoyo, esta travesía hubiese sido inimaginable.

A Pablo, un verdadero amigo que siempre confió en mí. Capaz de ayudarme y hacerme sentir un buen profesional. El llevarme de Madrid tu amistad y el cariño de tu familia, hace que el viaje haya tenido sentido.

A mis compañeros del Master, sobretodo a Francisco, por ayudarme a lograr una ilusión, por hacerme pasar momentos y vivencias inolvidables de las cuales, ya nunca nadie me podrá arrebatar.

A los miembros de los Departamentos de Cardiología Y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid.

A mi familia y amigos, en especial a mi padre Diego y a mi abuela Carmen, por ser mis ángeles. Ángeles encargados de protegerme y guiarme por esta aventura a la que llaman vida.

Índice

<i>Resumen</i>	1
<i>Summary</i>	3
<i>Abreviaturas</i>	5
<i>I. Introducción:</i>	7
I.1 Descripción de la enfermedad periodontal y el papel de las bacterias.....	8
I.2 Principales factores de riesgo. Importancia del factor genético en la aparición de la enfermedad periodontal.....	16
I.3 Respuesta inmunológica del paciente en presencia de microorganismos periodontopatógenos.....	24
I.4 Descripción de los mediadores de la inflamación y sus efectos bioquímicos sobre el periodonto.....	33
I.5 Importancia de las interleuquinas, en especial la IL-1, en la evolución de la enfermedad periodontal.....	40
I.6 Conceptos generales de variación genética. Origen y causa	47
I.7 Diversidad del genoma. Polimorfismos.....	54
I.8 El polimorfismo de los genes de la IL-1. Su relación con la enfermedad periodontal	60
<i>II. Objetivos del trabajo</i>	72
<i>III. Pacientes y Métodos</i>	74

III.1	Diseño experimental.....	75
III.2	Descripción de la muestra	76
III.3	Obtención de parámetros clínicos.....	78
III.4	Recogida de muestras de IL-1 β en fluido gingival crevicular (FGC) y su recuento.....	79
III.5	Obtención de la muestra sanguínea y extracción del ADN.....	85
III.6	Detección del polimorfismo en los genes de la IL-1A Y de la IL-1B.....	89
III.7	Análisis estadístico.....	97
IV.	<i>Resultados</i>	98
IV.1	Estadística descriptiva.....	99
IV.2	Estadística analítica.....	105
V.	<i>Discusión</i>	116
V.1	Concentración de IL-1 β en FGC.....	117
V.2	Relación entre el polimorfismo de los genes de la IL-1 y la enfermedad periodontal.....	123
V.3	Prevalencia del polimorfismo de los genes de la IL-1.....	126
VI.	<i>Conclusiones</i>	130
VII.	<i>Bibliografía</i>	132

Resumen

La enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio de carácter crónico, desencadenado por una serie de bacterias periodontopatógenas específicas. En este proceso inflamatorio, la interleuquina 1 (IL-1) junto a otros productos bioquímicos, son los encargados de iniciar la destrucción en los tejidos de inserción del diente. Por ello, la síntesis de IL-1 está notablemente relacionada con la severidad y progresión de la enfermedad periodontal.

Numerosas estirpes celulares son capaces de secretar la IL-1, pero su producción viene determinada genéticamente por los genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN. Éstos, son genes polimórficos y por tanto susceptibles de sufrir cualquier tipo de variación genética. El polimorfismo genético es un tipo muy importante de mutación monogénica, en el cual se produce la sustitución de un par de bases nitrogenadas por otro par distinto. Ello puede originar la sobreproducción de la proteína codificada lesionando los tejidos de inserción del diente.

Diferentes estudios “*in vitro*” han demostrado que la IL-1 β es 15 veces más potente que la IL-1 α y 500 veces más potente que el TNF α , en la mediación de la reabsorción ósea. Además, la IL-1 β se ha aislado en mayor cantidad (10 a 50 veces) que la IL-1 α de fluido gingival crevicular (FGC) en lugares con periodontitis. Éstas, son dos de las principales razones por las que decidimos cuantificar la presencia de esta proteína.

Nuestra investigación se centró en dos grupos, uno de pacientes sanos y otro de pacientes con enfermedad periodontal crónica activa. Cada grupo estuvo constituido por 25 individuos, a los que se les tomaron muestras de ADN y de IL-1 β en el (FGC). Por un lado se cuantificó la concentración de la proteína, y por otro, se determinó la prevalencia de polimorfismos en los genes IL-1A +4845 e IL-1B +3953.

Realizado el correspondiente análisis estadístico de los resultados, se observó que existía una relación estadísticamente significativa entre la concentración de IL-1 β en FGC y el padecimiento de la enfermedad periodontal. Por el contrario, el hecho de presentar polimorfismos genéticos en IL-1A+4845 y/o en IL-1B+3953, no fue un factor de riesgo para padecer la enfermedad periodontal crónica. Por lo tanto, no se pueden considerar como marcadores genéticos para dicha enfermedad, ni tampoco implican una sobreproducción de IL-1 β en FGC. Finalmente, la prevalencia de los polimorfismos genéticos estudiados en nuestra población de estudio de raza caucasiana y origen español, presenta valores similares al de otras poblaciones de idéntica raza.

Summary

The periodontal disease is a chronic inflammatory process caused by specific periodontopathogenic bacteria. In this inflammatory process, the interleukin 1 (IL-1) joined to other biochemical products, are in charge of the beginning of tooth attachment tissue destruction. Because of that, IL-1 synthesis is hardly related with the severity and progression of the periodontal disease.

A big quantity of cellular strains are able to secrete this protein. But its productions, is genetically determined by IL-1A, IL-1B and IL-1RN expression genes. These, are polymorphic genes and susceptible of suffering any type of genetic variation. The genetic polymorphism is a very important type of monogenic mutation, in which the substitution of a pair of nitrogen bases by other pair of bases is observed. This mutation can involve the overproduction of the codified protein, causing a bigger destruction of the tooth attachment tissues.

Different “*in vitro*” studies have demonstrated that the IL-1 β is 15 times more powerful than the IL-1 α and 500 times than the TNF α in the mediation of bone lose. Beside that, IL-1 β has been isolated in more quantity (10 to 50 times) than IL-1 α in gingival crevicular fluid (GCF) in sites with periodontitis. These are two of the main reasons why we decided to quantify this protein form.

Our research is based in two groups, one group of healthy patients and another group of patients with chronic active periodontal disease. Every group was formed by 25 people. DNA and IL-1 β samples were taken from GCF to every patient. From one side, the concentration of this protein was quantified and from the other, the prevalence of the polymorphism in IL-1A +4845 and IL-1B +3953 genes was determined.

Once the statistic analysis was done, a statistical significantly different between the more concentration of IL-1 beta in GCF and the presence of periodontal disease was observed. On the contrary, the fact of presenting genetic polymorphism in IL-1A +4845 and/or IL-1B +3953 gene, wasn't a risk factor to suffer the chronic periodontal disease. Because of that, they cannot be considered as genetic markers for this disease. The presence of these polymorphisms neither involves an overproduction of IL-1 beta in GCF. Finally the prevalence of the studied genetic polymorphism in our study caucasian population with spanish origin, presents similar values to other caucasian populations.

Abreviaturas

α1-AT: Alfa-1-antitripsina	LOS: Lipo-oligosacárido
α2-M: Alfa-2-macroglobulina	LPS: Lipopolisacárido
ADN: Ácido desoxirribonucleico	LT: Linfotóxina
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	MAF: Factor activador de macrófagos
BCGF-1: factor de crecimiento de células B derivado de células T	MHC: complejo principal de histocompatibilidad
CTX: Factor quimiotáctico derivado de leucocitos	MIF: Factor de inhibición de migración de macrófagos
ELAM-1: Molécula de adhesión endotelial	MMP: Metaloproteínasa de la matriz
ELISA : Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay	NK: Linfocitos asesinos
FGC: Fluido gingival crevicular	OAF: Factor activador de osteoclastos
ICAM-1: Molécula de adhesión Intracelular	PgE2: Prostaglandina E2
IFNγ: Interferón gamma	PMN : Leucocito polimorfonuclear
IgA: Inmunoglobulina A	SNP: Polimorfismo de un sólo nucleótido
IgG: Inmunoglobulina G	TH: Linfocitos colaboradores
IL-1: Interleuquina 1	TNF-α: Factor de necrosis tumoral α
IL-1A: Gen de la IL-1A	UV: Ultravioleta
IL-1α : Proteína IL-1 alpha	VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular
IL-ra: Proteína antagonista del receptor	Pb: Pares de bases
IL-1B : Gen de la IL-1B	LAF: Factor activador de linfocitos
IL-1β: Proteína IL-1 beta	
IL-RN: Gen de la interleuquina	
LAC : Límite amelocementario	

I. INTRODUCCIÓN

I.1. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y EL PAPEL DE LAS BACTERIAS.

La enfermedad periodontal es una infección de origen bacteriano, que cursa con un proceso inflamatorio de carácter crónico. Este proceso inflamatorio está desencadenado por un conjunto de bacterias periodontopatógenas presentes en la cavidad oral. La presencia de esta comunidad de bacterias adheridas a los tejidos duros, como pueden ser los dientes, recibe el término de biofilm (1).

Estudios considerados ya como clásicos, pusieron en evidencia, por primera vez (2), que la acumulación de bacterias en la superficie limpia de los dientes, induce de manera reproducible una respuesta inflamatoria en los tejidos gingivales asociados. Esa inflamación local se mantiene en el tiempo, mientras continúe presente el biofilm. La eliminación de la placa bacteriana, conduce a la desaparición

de los signos clínicos de inflamación (3,4). Por tanto, la gingivitis es un estado clínico no destructivo de la enfermedad periodontal.

Un estudio experimental de periodontitis en perros, demostró que la acumulación de placa en el tiempo, junto con el desarrollo de la gingivitis, conllevó la aparición de periodontitis en algunos perros, mientras que en otros, sólo se mantuvo la gingivitis y no evidenciaron una pérdida de inserción (5).

En un excelente trabajo realizado en 1986 sobre una población de trabajadores de una plantación de té en Sri Lanka, se observó la diferente predisposición de aquellos por padecer la enfermedad. Los trabajadores carecían por completo de una adecuada higiene oral y además, tampoco se habían preocupado por recibir un correcto tratamiento dental. Por lo general la población presentaba acúmulos de cálculo y placa dental extremadamente elevados. Los

primeros estudios que se realizaron, desvelaron que la población en general padecía una periodontitis severa en edades tempranas. Pero cuando se examinó la población de forma minuciosa, se encontraron tres formas distintas del estado de la enfermedad, que se pudieron sistematizar en tres grupos: A) individuos que desarrollaron mínimamente la enfermedad (11% de la población), B) individuos que desarrollaron la enfermedad de forma generalizada y severa (8% de la población) y C) individuos que desarrollaron una periodontitis moderada, similar a la forma clínica más común en los Estados Unidos (81% de la población) (6).

Esta falta de regularidad en la prevalencia, distribución y severidad de la periodontitis, obligó a considerar la etiología de la enfermedad como multifactorial. En ella se puede encontrar un factor etiológico, *causal e ineludible* en el desarrollo de la patología, las bacterias (*Fig.1*). Pero también existen otra serie de factores etiológicos, denominados factores de

riesgo, entre los que se encuentran los *biológicos*. Éstos, engloban a las enfermedades sistémicas tales como enfermedades cardiovasculares, pulmonares, diabetes, obesidad, enfermedades óseas, embarazo, etc...

Un tercer grupo de factores de riesgo, son los basados en el *comportamiento humano o ambientales*. Dentro de éstos, se encuentran: la higiene oral, el estrés y/o el tabaco.

Otros factores de riesgo son los *genéticos*, de crucial importancia, los cuales se relacionan con la susceptibilidad del individuo para desarrollar la enfermedad.

Se ha demostrado ampliamente, que las bacterias tienen un papel etiológico primario en la patogénesis de la periodontitis, participando en la formación de la bolsa periodontal, la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar. Pero ni la cantidad, ni la variedad de las especies, son capaces de ofrecer una explicación

de los diferentes grados de severidad que presenta la periodontitis dentro de la población. Aún así, numerosos

Fusobacterium nucleatum, Campylobacter rectus ...

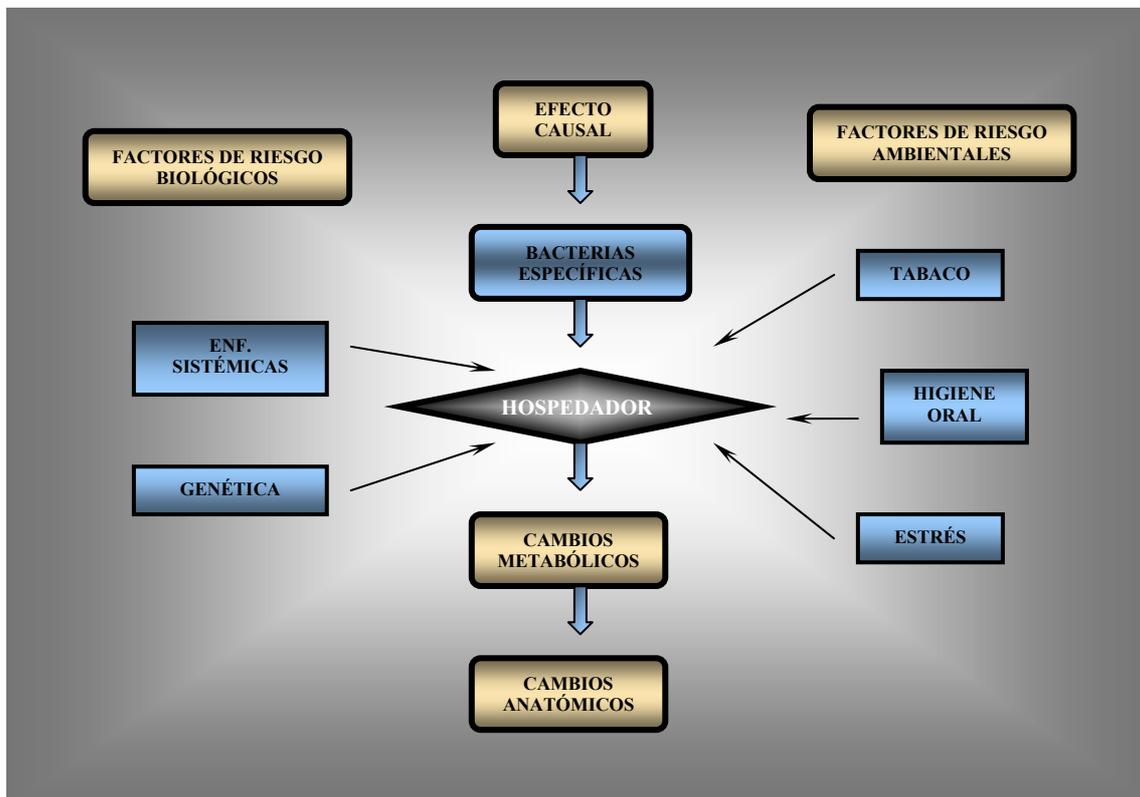


Figura 1. Factores que intervienen en la etiología de la enfermedad periodontal.

estudios han presentado una fuerte asociación entre áreas con enfermedad periodontal destructiva y una mayor concentración de ciertas especies periodontopatógenas (7,8,9). Entre éstas destacamos: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromona gingivalis*, *Tanerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*,

Todas estas especies se agrupan en dos categorías, en función del tipo de microorganismo de que se trate. Los microorganismos exógenos, que no forman parte del ecosistema periodontal, y cuyo objetivo de tratamiento es su eliminación del ecosistema y los micro-

organismos endógenos, que forman parte del ecosistema periodontal, y en el que el tratamiento está, generalmente dirigido a disminuir su cantidad.

Entre las especies asociadas a una periodontitis progresiva, sobresale el *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, el cual se ha encontrado con gran frecuencia en personas con una pérdida de inserción severa y/o una rápida progresión de la enfermedad (10,11,12).

Albander y colaboradores (13) demostraron que los adultos jóvenes con periodontitis agresiva generalizada, presentan aumentados sus niveles de anticuerpos IgG e IgA reactivos a *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, en comparación con los controles sanos.

Aass y colaboradores (14) valoraron la incidencia de pérdida ósea radiográfica a lo largo de ocho años en personas jóvenes y

correlacionaron esta disminución con la cantidad de *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* cuya presencia fue detectada con anterioridad. Posteriormente, cepas específicas de esta especie bacteriana se relacionaron significativamente con formas agresivas de la enfermedad periodontal (15).

También existe una gran evidencia científica que la *Porphyromonas gingivalis* está fuertemente asociada a la periodontitis crónica (16,12). Esta bacteria se ha detectado en grandes cantidades, en personas con pérdida severa de inserción y gran profundidad de sondaje. Estos altos niveles se han encontrado con gran frecuencia, en personas que muestran una progresión rápida de la enfermedad (17,18).

Grossi y colaboradores (19, 20) concluyen que la presencia de *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythensis* en la flora subgingival, está asociada a un mayor riesgo de pérdida de tejido periodontal. Estos autores estimaron que

el riesgo (*odds ratio*) de la pérdida clínica de inserción atribuida a la *Porphyromona gingivalis* es de 1.6 y el del *Tanerella forsythensis* de 2.5.

Algunas sustancias bacterianas pueden dañar directamente las células y tejidos del huésped, mientras que otros componentes microbianos pueden activar los sistemas inflamatorios o inmunitarios celular y humoral, dañando secundariamente al periodonto. Ésta última vía es la responsable de la mayor parte de la lesión periodontal (*Fig.2*).

Los microorganismos de la placa pueden dañar también los componentes celulares y estructurales del periodonto por medio de la liberación de sus productos de desecho proteolíticos y deletéreos. Además, se debe tener en cuenta, la formación de sustancias nocivas por la microflora de la bolsa gingival y la invasión microbiana a los tejidos blandos.

La leucotoxina producida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* tiene un efecto tóxico sobre los neutrófilos polimorfonucleares humanos (PMN). Esta proteína ha sido estudiada por varios investigadores de Europa y de Estados Unidos con el fin de conocer en profundidad el papel que desempeña en la evolución de la enfermedad periodontal. La producción de leucotoxina, podría permitir al *Actinobacillus actinomycetemcomitans* evadir la defensa fagocitaria del huésped; convirtiéndose en una propiedad importante en la virulencia de dicho microorganismo.

Los constituyentes celulares de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas también parece que intervienen en el trastorno periodontal. Éstos factores incluyen endotoxinas, componentes bacterianos de superficie y elementos capsulares.

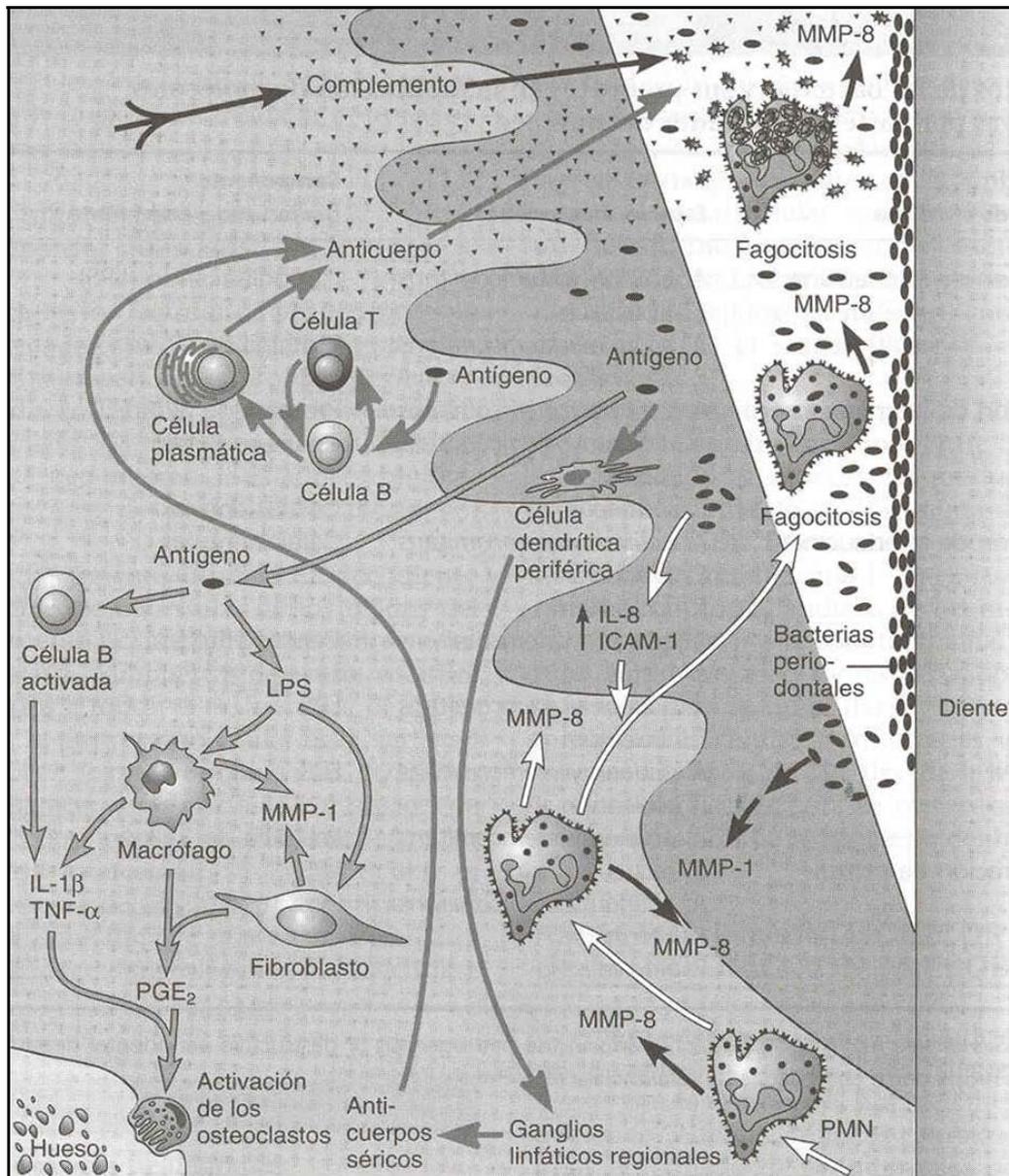


Figura 2. Esquema de los mecanismos clave de la interacción huésped-bacteria en las enfermedades periodontales. Las interacciones de las bacterias o de los antígenos bacterianos con los tejidos del huésped conducen al reclutamiento de neutrófilos (flecha blanca), producción de anticuerpos (flechas grises) y a la resorción del hueso (flechas gris claro con contorno negro). La producción de IL-8 y de ICAM-1 en las células epiteliales en respuesta a las bacterias periodontales proporciona una señal quimiotáctica a los neutrófilos (PMN). Una función de los neutrófilos es controlar mediante fagocitosis la agresión bacteriana, pero también segregan metaloproteinasas de la matriz (MMP-8), las cuales pueden contribuir a la destrucción del tejido. La producción de IL-1 β , TNF- α y PGE₂ en respuesta al LPS bacteriano lleva a la resorción ósea a través de la activación, proliferación y diferenciación de los osteoclastos (77).

La preponderancia de bacterias gramnegativas en las bolsas durante la enfermedad periodontal motiva altas concentraciones de endotoxina, constituyente de las paredes celulares de las bacterias gramnegativas. La endotoxina, o lipooligosacárido (LOS) (antes denominado *lipopolisacárido [LPS]*, aparece en la membrana externa de todas las bacterias gramnegativas (22).

Tanto las bacterias gramnegativas como las grampositivas subgingivales elaboran diversos subproductos tóxicos que también poseen la capacidad para destruir el tejido. Entre estos se incluyen los ácidos grasos orgánicos, como el ácido butírico y el propiónico, las aminas, algunos compuestos volátiles de azufre, el indol, el amoníaco y los glucanos. El peptidoglucano, componente de la pared celular presente en especies gramnegativas y grampositivas, afecta en ocasiones a una variedad de reacciones del huésped, incluyendo la activación del complemento, la actividad inmunosupresiva,

la estimulación del sistema reticulo-endotelial, así como las propiedades de inmunopotenciación. El peptidoglucano también parece contar con capacidad para estimular la resorción ósea y a los macrófagos para que produzcan prostaglandinas y colagenasas.

Las bacterias que aparecen en la placa dental producen una diversidad de enzimas que sin duda alguna fomentan la aparición de enfermedades periodontales. Las enzimas bacterianas que posiblemente contribuyan al proceso patológico incluyen las colagenasas, la hialuronidasa, la gelatinasa, las aminopeptidasas, las fosfolipasas y las fosfatasas alcalina y ácida.

La degradación del colágeno es una característica central de la destrucción del periodonto. La fuente primaria de colagenasa en la bolsa periodontal son, tal vez, las células de los tejidos del huésped, aunque las colagenasas bacterianas podrían contribuir también a la degradación del colágeno. Se sabe que

P.gingivalis y ciertas cepas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* producen colagenasas.

La hialuronidasa bacteriana modifica en ocasiones la permeabilidad de la encía, permitiendo la proliferación apical del epitelio de unión a lo largo de las superficies radiculares. La hialuronidasa aparece en concentraciones más altas en las bolsas periodontales que en el surco normal, y las bolsas periodontales exhiben mayor cantidad de bacterias aisladas que producen hialuronidasa. Asimismo, estudios experimentales llevados a cabo por (87) muestran que la aplicación superficial de hialuronidasa en la encía, desorganiza el tejido conectivo gingival y produce migración apical del epitelio de la encía a lo largo del cemento, es decir, en las fases iniciales de formación de la bolsa periodontal.

Las respuestas inmunitarias a los microorganismos parecen estar dirigidas principalmente contra las enzimas y toxinas liberadas extracelularmente. Estas reacciones inmuni-

tarias tienen como resultado una mayor liberación de citoquinas y mediadores proinflamatorios, que a su vez aumentarán la inflamación y de esta manera, serán más nocivos para el huésped (21).

En cuanto a la prevalencia de la enfermedad periodontal, existen estudios epidemiológicos en adultos que demuestran que los efectos provocados por la periodontitis, sólo afectan a un subgrupo de la población adulta.

Albander y colaboradores (23) encontraron que aproximadamente el 53% de las personas dentadas, residentes en Estados Unidos y con edades comprendidas entre los 30 y 90 años, habían padecido en algún momento de su vida, una pérdida de inserción periodontal de 3 mm o mayor. Por otro lado, sólo un 34.5% de estos adultos, manifestaron una periodontitis, si la definimos como la presencia de una pérdida de inserción de 3 o más mm, junto con la presencia de una profundidad de

sondaje $\geq 3\text{mm}$ en los mismos lugares de medición.

La menor prevalencia de la periodontitis, en comparación con la gingivitis en diferentes grupos de edades, y la asociación significativa entre la presencia de inflamación gingival y el desarrollo y progresión en la destrucción de los tejidos periodontales, nos demuestra que la gingivitis es capaz de evolucionar a periodontitis, en algunos individuos más que en otros (24).

Los estudios realizados señalan significativamente, la presencia de una gran variabilidad en el grado de afectación periodontal entre diferentes poblaciones (25,26,27,28), e incluso entre subgrupos dentro de una misma población (23,29). Además, la pérdida de tejidos periodontales, afecta dentro de un mismo individuo, indistintamente a diferentes dientes y en diferentes lugares.

Esto se evidencia significativamente en la variabilidad interindividuo e intraindividuo existente

en cuanto a la prevalencia y severidad de la pérdida de inserción periodontal, así como de otros parámetros de destrucción (23,25, 30,31).

I.2 PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO. IMPORTANCIA DEL FACTOR GENÉTICO EN LA APARICIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

En el anterior apartado, se ha centrado nuestra atención en el papel que desempeñan las bacterias en la evolución de la enfermedad periodontal. Además, se ha expuesto los diferentes factores de riesgo que acompañan a la periodontitis. A continuación, describiremos los factores que contribuyen con mayor firmeza en la destrucción de los tejidos de inserción del diente, entre los que se encuentran el hábito de fumar, la enfermedad diabetes mellitus y el factor genético.

■ **Tabaquismo:** los efectos provocados por el tabaco, han sido estudiados de manera exhaustiva durante muchos años. La mayoría de los estudios sugieren la existencia de una fuerte asociación en cuanto a la intensidad y el tipo de tabaco utilizado, con el estado de los tejidos gingivales, y la consiguiente pérdida de inserción periodontal. (32).

Estudios transversales, han mostrado consistentemente que la mayor prevalencia y severidad de la enfermedad periodontal, se encuentra en individuos fumadores (33,34).

Generalmente, la estimación de riesgo nos muestra que el hecho de fumar, lleva consigo un mayor riesgo de padecer la enfermedad, estimándose una frecuencia entre 2 y 7 veces mayor frente a los pacientes no fumadores (35,36,37).

Parece ser, que además existe una relación dosis-efecto entre el hábito de fumar y la severidad de la enfermedad. Varios estudios trans-

versales se han llevado a cabo con el fin de demostrar esta relación dosis dependiente.

En los denominados grandes fumadores, se ha evidenciado una severidad mucho mayor de la enfermedad en comparación con la de los fumadores ligeros (34,38). Además se ha asociado significativamente, el número de años en los que el paciente ha fumado con la pérdida dentaria y la presencia de la enfermedad periodontal, con independencia de factores sociales o del comportamiento (39).

También se ha estudiado la relación temporal existente, entre el fumar cigarrillos y la aparición de la enfermedad periodontal. Los resultados evidencian que el hábito de fumar se asocia a un incremento en la profundidad de sondaje y en la pérdida de inserción. Estos resultados se han obtenido tras un seguimiento a 10 años (40). La eliminación del hábito, mejora considerablemente la salud periodontal (41, 34).

Además del hábito de fumar cigarrillos, otras modalidades de fumar como, el fumar en pipa o fumar puros, han evidenciado efectos destructivos similares sobre los tejidos periodontales (41,42). Por otro lado, se sabe que al disminuir la cantidad de tabaco se reduce y se localizan las zonas afectadas por la enfermedad. Los beneficios que aporta esta disminución al consumo de tabaco, normalmente se observan con mayor claridad en las recesiones gingivales y en las lesiones blancas de la mucosa (43).

Numerosos estudios, han centrado sus líneas de investigación en conocer los mecanismos por los cuales, el hábito de fumar tabaco predispone a padecer la enfermedad. A raíz de estas investigaciones se han sugerido numerosos mecanismos de acción. Estudios realizados en parejas de gemelos con una avanzada edad, han mostrado que los hermanos gemelos que han llevado una larga vida siendo fumadores presentan una mayor pérdida de

hueso alveolar que sus respectivos hermanos no fumadores (44).

Muchos estudios han centrado su investigación en los efectos que produce el fumar sobre la placa dental. Y sus efectos locales y sistémicos sobre las células del huésped. No se han encontrado diferencias concluyentes en lo que respecta a la microflora periodontal, entre individuos fumadores y no fumadores (45,46). Sin embargo, se han descubierto numerosos efectos relacionados con la vascularización y los sistemas inmunológicos del huésped.

Hioka y colaboradores, encontraron diferencias en el grado de saturación de la hemoglobina por el oxígeno ubicada en las encías de los pacientes fumadores, con respecto a los pacientes no fumadores. Este hecho sugiere que la microcirculación gingival de los fumadores se encuentra claramente afectada por el efecto del tabaco (47).

También se han descrito los efectos perjudiciales del tabaco sobre el sistema inmunológico del paciente. Se han encontrado modificaciones en el sistema inmunológico humoral y celular, y variaciones en las citoquinas y las moléculas de adhesión, presentes en las numerosas reacciones en cascada que se originan dentro del proceso inflamatorio (48,49).

Se ha observado en estudios *in vitro*, que la nicotina presente en el tabaco, inhibe tanto la unión como el crecimiento de los fibroblastos presentes en los ligamentos periodontales (50).

La nicotina, ocasiona un descenso significativo en la cantidad de proteínas, además de originar daños en la membrana celular de los fibroblastos, y provoca una disminución en el crecimiento de estas células (51).

Tras la exposición a la nicotina la arquitectura típica, que poseen los fibroblastos, adquiere una forma completamente atípica a la habitual, mostrando la formación de vacuolas. Estos efectos tóxicos se convierten en irreversibles cuando las concentraciones de nicotina son mayores.

Otros estudios clínicos (52, 53), muestran que la respuesta al tratamiento periodontal por parte de los pacientes fumadores es mucho más desfavorable que en pacientes no fumadores. Los estudios que emplean técnicas no quirúrgicas de tratamiento, encuentran una menor reducción en la profundidad al sondaje, y una cicatrización mucho más lenta, después de realizar el raspado y alisado radicular.

Unos resultados similares a los anteriores han sido descritos por otros autores, en las técnicas quirúrgicas de tratamiento y en los tratamientos de regeneración periodontal (32).

■ **Diabetes Mellitus:** Sobre la base de los resultados obtenidos de estudios clínicos en humanos (54) y de estudios experimentales con animales (55), se ha llegado a la conclusión de que la hiperglucemia es responsable de la glicosilación progresiva de las proteínas, promoviendo que, de manera avanzada se produzca la glicolización de los productos finales. Estos productos son capaces de estimular a los fagocitos, quienes mediarán en la puesta en libertad de las citoquinas inflamatorias, principales responsables de la destrucción de los tejidos periodontales.

Se ha demostrado que los pacientes diabéticos, presentan una respuesta inflamatoria exagerada en comparación con los pacientes no diabéticos y, éste parece ser uno de los motivos por los cuales la destrucción tisular es mayor (56).

Existe documentación suficiente para demostrar que las células del ligamento periodontal, de pacientes que han sido insulín-

dependientes durante mucho tiempo, han reducido su capacidad para producir tejido mineral y han visto alterada su respuesta en la síntesis de factores de crecimiento (57).

Por todo lo mencionado hasta ahora cabe suponer que la respuesta al tratamiento periodontal y al mantenimiento periodontal, es claramente desfavorable para este grupo de pacientes.

Los estudios anteriormente señalados, evidencian también que un pobre control de la glucemia, incrementará de manera significativa el riesgo de aumento en la pérdida ósea y el progreso de la enfermedad periodontal. Además, los pacientes con un buen control de su diabetes, tendrán un riesgo mayor de desarrollar la enfermedad que los pacientes que no padezcan la diabetes.

Basado a los registros obtenidos de una población de 1426 personas con edades comprendidas entre los 25 – 74 años, se estimó que

el *odds ratio* de sufrir una pérdida de inserción en personas diabéticas era de 2.3, respecto a personas no diabéticas (33).

Un estudio longitudinal estimó el riesgo de sufrir una pérdida de hueso alveolar en un grupo de nativos americanos no insulín-dependiente con un pobre control de su diabetes y en personas con un buen control de su diabetes o personas no diabéticas. Observaron que el *odds ratio* en el desarrollo de una pérdida ósea alveolar, era 2.2 veces mayor en los pacientes con un buen control de su diabetes, en comparación con los no diabéticos. También se observó que en los pacientes con un pobre control de su diabetes el *odds ratio* era 5.3 veces mayor que los que tenían un buen control de la misma (58).

Existe una clara evidencia de que personas jóvenes diabéticas insulín-dependiente, sobretodo aquellas con un pobre control de su glucemia, tienen peor salud periodontal que personas no diabéticas (59).

El estado hormonal y otros cambios fisiológicos que tienen lugar en la aparición de la diabetes mellitus, son de gran importancia, ya que actúan como verdaderos factores causales en la patogénesis de la enfermedad periodontal. Estos factores, son capaces de promover numerosos cambios sistémicos en importantes componentes del sistema inmunológico, así como alteraciones en la fisiología del tejido periodontal. Estas alteraciones se traducirán en: cambios en los vasos sanguíneos, deficiencia en la respuesta inmunológica local ante la agresión bacteriana y cambios en el metabolismo del colágeno.

■ **Factor genético:** sin lugar a duda, este factor ha sido uno de los apartados más novedosos y recientemente investigados en relación con la etiología de la enfermedad periodontal. Los estudios que han investigado el factor genético, sugieren que contribuye significativamente a que existan variaciones interindividuos. Estas variaciones,

son las responsables de la prevalencia y severidad de la periodontitis.

Los estudios realizados en gemelos, manifiestan que entre el 30% y el 60% de las variaciones que existen respecto a los parámetros clínicos registrados de los pacientes con enfermedad periodontal, pueden ser atribuidos a factores genéticos (60). A pesar de esto, aun no se ha podido determinar con clarividencia el papel que desempeñan estos factores, en la predisposición a padecer la enfermedad periodontal.

El aumento en la susceptibilidad de padecer la enfermedad periodontal rápidamente progresiva en su forma prepuberal, tiene un claro patrón interfamiliar (61,62). La enfermedad ha sido atribuida a varios defectos presentes en la respuesta inmunológica del huésped ante la presencia de una infección microbiana (63).

La periodontitis prepuberal generalizada, se ha asociado con una deficiente adhesión de los leucocitos,

así como otras muchas anomalías de estas células (64). Ello provoca un recubrimiento anormal tanto de los neutrófilos como de los monocitos, generando una respuesta inmunológica inadecuada en el huésped. Se ha sugerido que tanto el modelo de herencia autosómico recesivo (65), como el modelo de herencia autosómico dominante (66), son responsables de la enfermedad periodontal prepuberal.

Los estudios realizados en familias demuestran que la periodontitis juvenil agresiva está presente dentro de una misma familia. Esto sugiere que el factor genético, es en cierta medida responsable del incremento en la susceptibilidad, a la hora de padecer esta forma de la enfermedad (67,68).

Existen estudios, que ponen en evidencia notables diferencias interindividuo en cuanto al grado de producción de ciertas citoquinas inflamatorias. Entre ellas encontramos: la interleukina-1 (IL-1), el fac-

tor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la prostaglandina E2 (69).

También se ha demostrado que ciertos polimorfismos genéticos, guardan una clara relación en cuanto a la producción de IL-1 y TNF- α entre diferentes individuos (70).

La IL-1 y el TNF- α son potentes estimuladores de la reabsorción ósea. Por lo tanto, una sobreproducción de cualquiera de estas dos citoquinas, provocada por la exposición a patógenos periodontales, se cree que pueda ser uno de los mecanismos responsables de la destrucción del tejido periodontal.

A partir de los datos obtenidos, se ha establecido la hipótesis de que las variaciones genéticas presentes en las citoquinas, parecen ser un importante marcador del riesgo en la periodontitis agresiva del adulto. Numerosos polimorfismos genéticos, han sido propuestos como candidatos a ser marcadores genéticos de riesgo para la enfermedad periodontal. Varios estudios recien-

tes, se han centrado en la relación existente entre la pérdida de inserción periodontal y la frecuente aparición del polimorfismo del gen de la IL-1.

El estudio de los polimorfismos de los genes de la IL-1 será nuestro principal objeto de estudio. Por tanto, a lo largo de la introducción se expondrán diferentes apartados relacionados con la inmunología y la genética médica para su mejor comprensión.

Se han estudiado numerosos polimorfismos en diferentes mediadores de la inflamación. Entre ellos la IL-4, un potente regulador de la función de los macrófagos. El polimorfismo del gen de la IL-4, se ha encontrado presente en mayor medida dentro de un grupo de pacientes con periodontitis agresiva, en comparación con otro grupo control (71). Sin embargo no se ha conseguido asociar la presencia del polimorfismo del gen de la IL-10 con la periodontitis crónica o agresiva (72,73).

I.3 RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL HUÉSPED EN PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS.

Las reacciones inmunitarias del huésped desempeñan un importante papel en la patogenia de la enfermedad periodontal. Contribuyen en el proceso patológico y son capaces de modular los efectos de las bacterias (74). Las reacciones inmunes pueden ser beneficiosas (protectoras) o nocivas (destruccionas). Varios componentes del sistema inmunitario colaboran en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos varían en cantidad, según el estado patológico de los tejidos. También son de relevancia los anticuerpos inducidos por las bacterias bucales y el factor del complemento (75).

Estas variables relacionadas con el huésped, pueden afectar a: colonización por las bacterias,

invasión bacteriana, destrucción hística, cicatrización y fibrosis (76).

■ **Colonización bacteriana:** en las enfermedades periodontales, la fuente principal de inmunoglobulinas (Ig) y complemento, se encuentra en el fluido crevicular; el cual contiene anticuerpos producidos sistémica y localmente. Estos anticuerpos modulan en potencia los tipos y las cantidades de microorganismos inhibiendo la colonización, la lisis, o ambos procesos. No obstante, en el trastorno periodontal relacionado con bacterias, las cifras de bacterias subgingivales aumentan extraordinariamente en comparación con las cantidades de dichos gérmenes en los pacientes sanos en términos gingivales. Esta pesada carga de antígenos en un medio “externo” puede superar al sistema inmunitario, distorsionando o anulando cualquier efecto protector positivo (77).

■ **Invasión bacteriana:** en contraste con las grandes cantidades de bacterias presentes en el surco gingival o en la bolsa, son relativa-

mente pocas las bacterias por debajo de la lámina basal del epitelio. Es probable que esto surja de la barrera física que provee el epitelio de unión y de las reacciones protectoras del huésped. Los tejidos de la encía son bañados tanto por los anticuerpos estimulados por las bacterias bucales como por el complemento, situación que podría llevar a la lisis bacteriana. Asimismo, los factores quimiotácticos podrían conducir a monocitos y a PMN al infiltrado inflamatorio, ocasionando la lisis y fagocitosis bacteriana (*Fig.4*).

Actualmente, se ha esclarecido y destacado la relevancia de los PMN y los macrófagos por ser los máximos responsables de la fagocitosis dentro de la respuesta inmunológica.

Ante una encía normal desde el punto de vista clínico, el surco gingival cuenta con cifras bajas de neutrófilos. Sin embargo en un

estado de inflamación gingival, las cantidades de neutrófilos se encuentran incrementadas, infiltrándose directamente en su interior por debajo de la región dentogingival. Con frecuencia, los fagocitos son atraídos quimiotácticamente hacia las bacterias invasoras, fijándose a ellas mediante receptores C3b y otros varios (78) (*Fig.3*). Después del proceso de fagocitosis, las bacterias sufren por lo regular una lisis celular. Posibles defectos quimiotácticos en neutrófilos o macrófagos predisponen a la aparición de la enfermedad periodontal. Además, los pacientes con padecimientos sistémicos, que incluyan trastornos funcionales de los neutrófilos, sufren frecuentemente estados graves de la enfermedad (77).

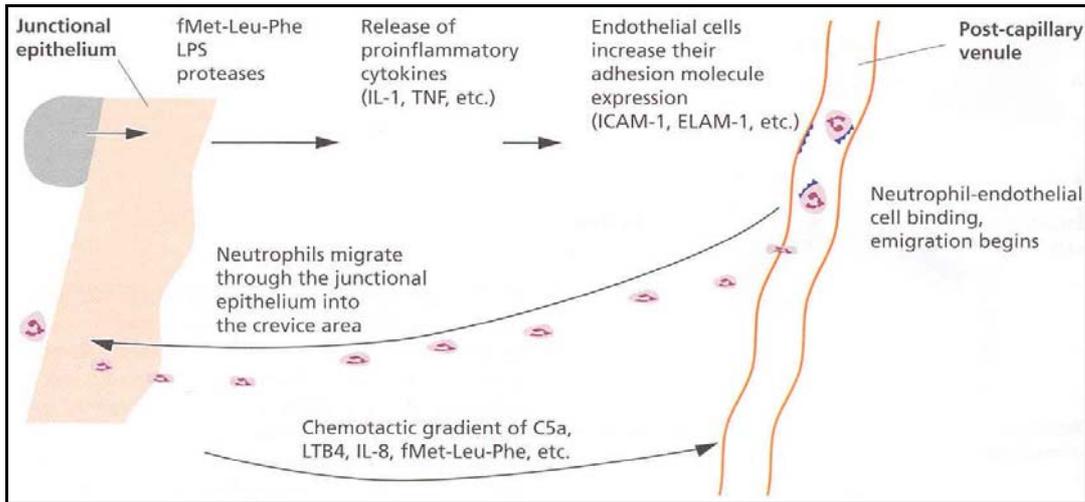


Figura 3. Atracción de los neutrófilos hacia el epitelio de unión y a la región de la hendidura (21).

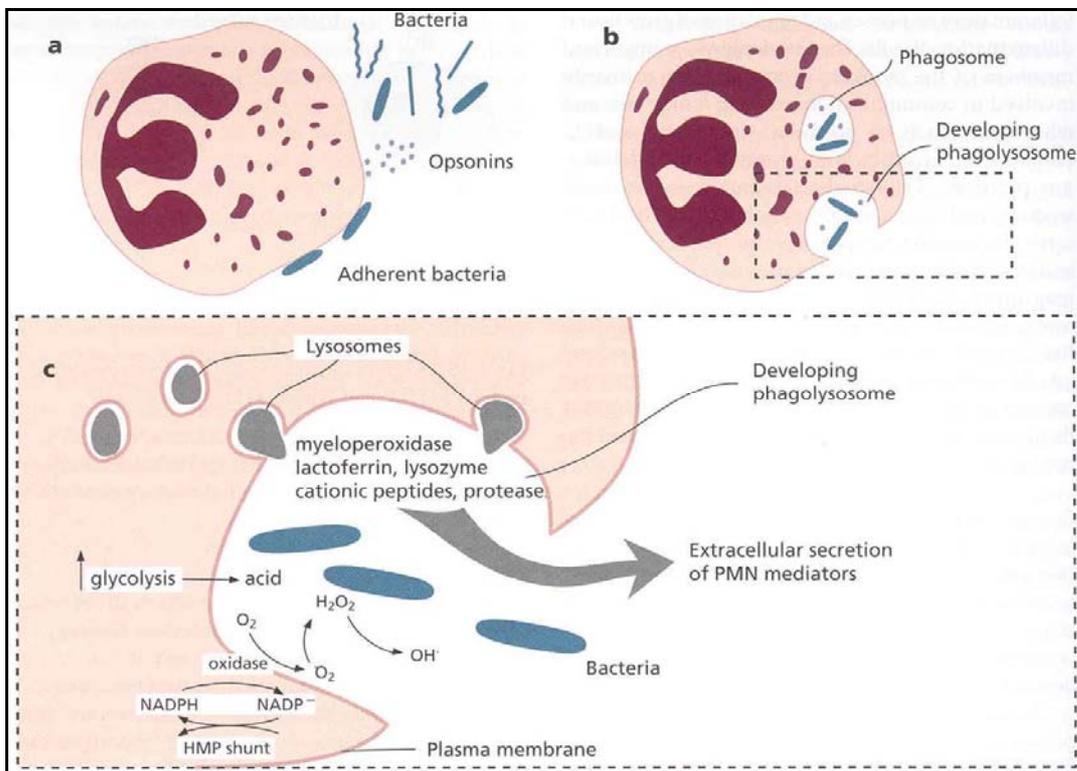


Figura 4. Quimiotaxis, opsonización y fagocitosis bacteriana. Procesos que se producen en el encuentro entre PMN y las bacterias (21).

■ **Destrucción hística:** La descripción de los procesos inflamatorios e inmunitarios facilita la comprensión de la patogenia de la enfermedad periodontal. Estos procesos defensivos están intrincadamente relacionados y son los responsables de la respuesta del huésped a la lesión.

Las reacciones del huésped a los parásitos también pueden ser subdivididas en términos generales en: respuestas innatas (inespecíficas) y de adaptación (específicas). Las reacciones innatas son la respuesta inflamatoria y no conllevan mecanismos inmunológicos. Las reacciones de adaptación tienden a ser más eficaces, dado que la respuesta del huésped, es una respuesta inmunológica “de medida” frente a los patógenos ofensivos.

1. Mecanismos inmunitarios innatos, actúan sin ningún contacto previo con el microorganismo causante de la enfermedad.

Son las *barreras físicas* de las superficies epiteliales cutáneas y mucosas y los responsables *vasculares y celulares* de la respuesta inflamatoria. El huésped tiene un repertorio extenso de defensas para impedir la invasión de los patógenos. Las respuestas eficaces se traducen en una lesión que se resuelve rápidamente (por ejemplo, un absceso estafilocócico que se cura) o en la falta de lesión (por ejemplo, la viruela en una persona con vacunación antivariólica). Una respuesta ineficaz puede tener como resultado una lesión crónica que no se resuelva (por ejemplo, tuberculosis) o, si se despliega excesivamente, en una lesión en la cual las respuestas del huésped constituyen el aspecto más significativo del proceso destructivo (por ejemplo, artritis reumatoide o asma) (21).

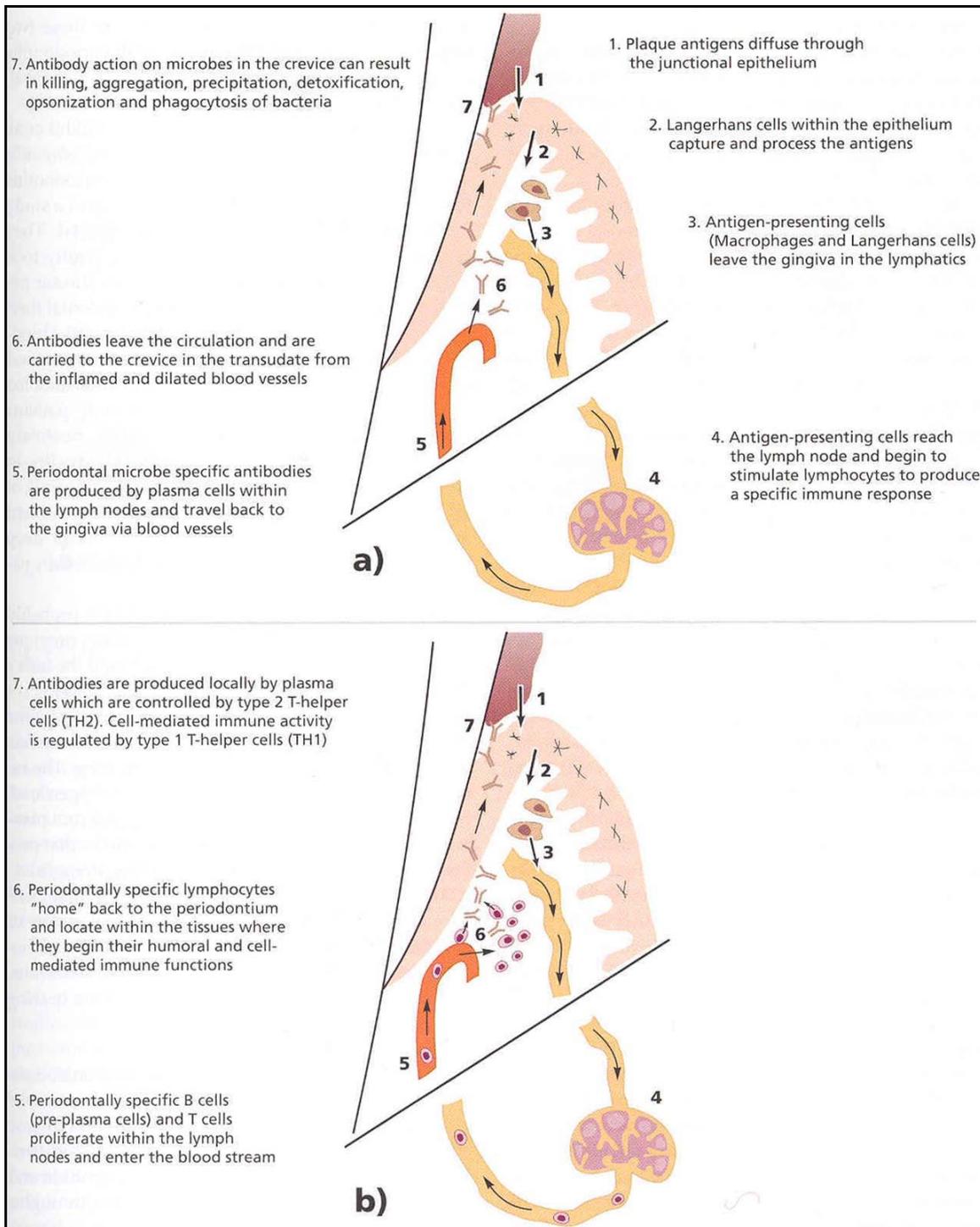


Figura 5. *a) Respuesta inmunitaria humoral sistémica* ante la agresión de antígenos microbianos, dentro de la hendidura gingival.
b) Respuesta inmunitaria celular local dentro de la hendidura gingival. y el mecanismo por el cual las células inmunitarias periodontales emigran hacia el periodonto (21).

2. Mecanismos inmunitarios específicos, la principal característica de cualquier respuesta inmunitaria es la especificidad. Dentro de los mecanismos inmunitarios, interactúan las respuestas inmunitarias celular y humoral.

■ **Respuesta inmunitaria humoral**

El conocimiento de la función de la respuesta inmunitaria humoral del periodonto todavía es incompleto. Así, no se conoce si los plasmocitos del periodonto producen anticuerpos relevantes o totalmente inespecíficos ante las bacterias periodontales. Podría ser que las células de Langerhans y otras células, que presenten los antígenos, pusieran en marcha respuestas inmunitarias humorales en los ganglios linfáticos periféricos y que los anticuerpos producidos interaccionen con aquellos para comenzar a cumplir su función. Este hecho sería claramente ineficaz y en cambio, sería efectivo un mecanismo *in situ* o la proliferación local de linfocitos B en plasmocitos periodontalmente relevantes dentro del periodonto.

Recientemente se ha observado la proliferación *in situ* de células para la respuesta inmunitaria humoral o celular (79). El reclutamiento de linfocitos hacia áreas de lesión o infección es esencial para una defensa eficaz del huésped. La migración constante de linfocitos T y otros leucocitos a lugares de todo el organismo permite que el sistema inmunitario íntegro proteja a los tejidos de diversos desafíos antigénicos. La migración de leucocitos hacia los tejidos es muy notable durante las respuestas inflamatorias y es el resultado de la expresión inducida por citoquinas de moléculas de adhesión en la superficie de células endoteliales vasculares (80) (Fig.4).

■ **Respuesta inmunitaria celular.**

Generalmente, la inmunidad por mediación celular se inicia cuando el antígeno de la placa subgingival penetra en el tejido conectivo atravesando el epitelio de unión. Células como las de Langerhans, dentro del epitelio, se encargan de presentar el antígeno, lo procesan y lo alteran de

forma que sea reconocible por el sistema inmunitario. Esto quiere decir que lo transforman en un péptido antigénico capaz de unirse al complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC).

El linfocito (CD4+), que es capaz de reconocer la asociación entre el antígeno extraño y el propio MHC, se estimula, prolifera y libera citoquinas. Las citoquinas a su vez actúan sobre otras células linfoides (macrófagos, linfocitos B y otros linfocitos T) produciendo daños tisulares, inflamación y reabsorción ósea.

Los linfocitos son capaces de sensibilizarse y ante una nueva exposición a los antígenos de la placa, responden con proliferación y síntesis de citoquinas. Estas sustancias son señales que actúan sobre otros tipos de células para estimular, inhibir e incluso destruir.

Los linfocitos también pueden producir citoquinas cuando son estimulados por sustancias mitogénicas liberadas por la microflora

subgingival o por otras células en la reacción inflamatoria.

Solamente se encuentra tejido gingival histopatológicamente normal o prístino en las zonas adyacentes de dientes completamente libres de placa; por lo tanto, esto es raro en seres humanos. Las biopsias de encías humanas clínicamente sanas contienen células inflamatorias, principalmente, linfocitos T con pocos linfocitos B o plasmocitos.

Después de un periodo de 4-7 días de acumulación de placa, se produce un flujo de linfocitos hacia el tejido. Pasadas tres semanas de acumulación, la lesión está dominada principalmente por linfocitos T. Tras seis meses de acumulación de placa, las lesiones aún siguen dominadas por linfocitos y PMN (81).

Ocasionalmente, se observaron plasmocitos en la lesión inicial y en la fase temprana de gingivitis inducida experimentalmente, donde la inflamación gingival se produce después de la acumulación de placa

en sujetos que se abstuvieron de cumplir con las medidas de higiene bucal. Sin embargo, parece ser que se requieren más de seis meses de acumulación de placa, antes de que los plasmocitos constituyan una producción significativa del tejido conectivo infiltrado (81,82).

Se ha comprobado que los plasmocitos son el componente mayoritario del tejido conectivo infiltrado en la lesión avanzada, donde la pérdida de hueso es evidente. Las cantidades de plasmocitos parecen aumentar con la gravedad de la lesión. La gingivitis suele estar dominada por linfocitos, mientras que la periodontitis lo está por plasmocitos (21).

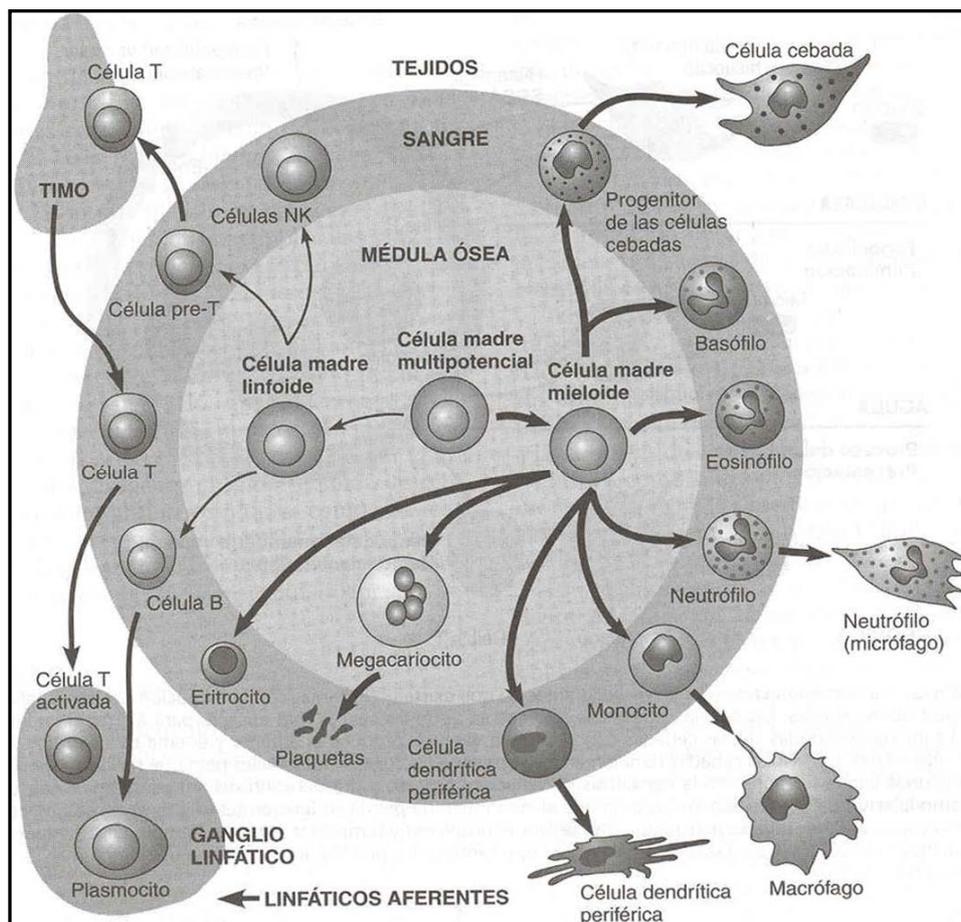


Figura 6. *Origen de los distintos componentes celulares del sistema inmunológico (77).*

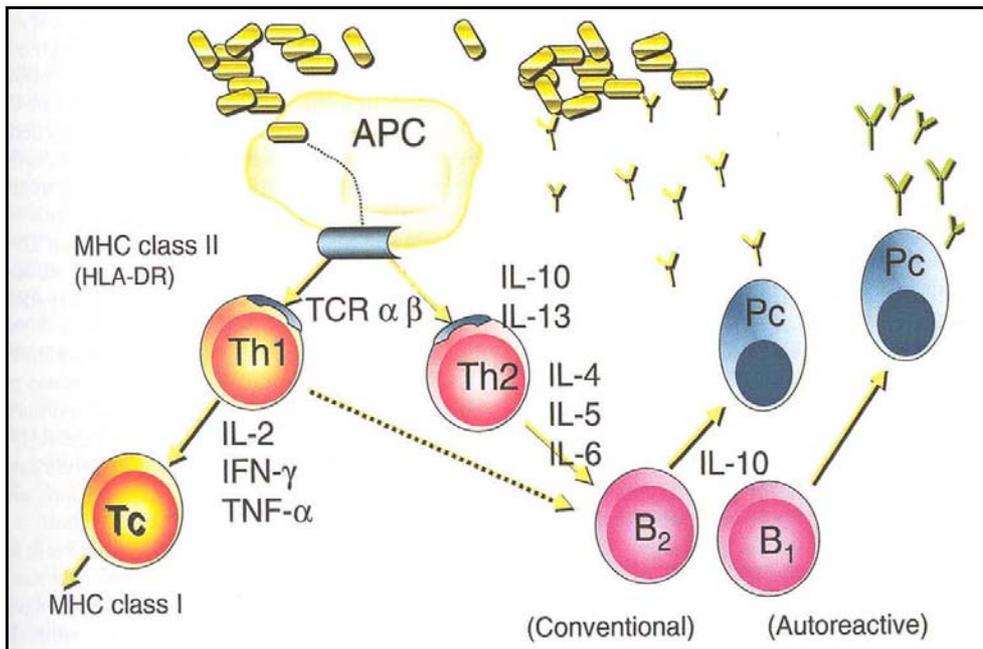


Figura 7. Regulación inmunológica del paciente durante el transcurso de la enfermedad periodontal (21).

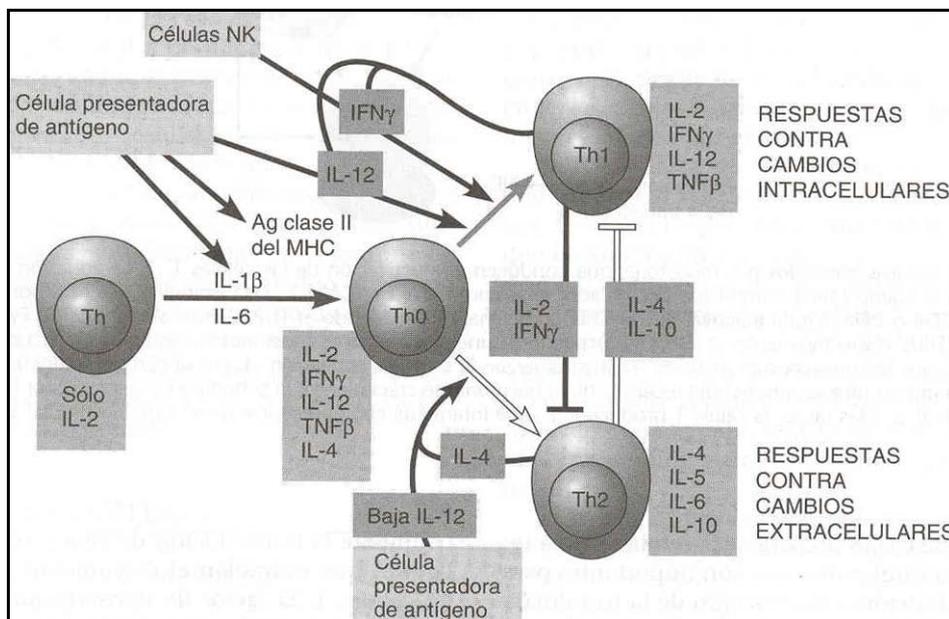


Figura 8. Regulación inmunológica del paciente durante el transcurso de la enfermedad periodontal (77).

■ **Cicatrización y fibrosis.** Los macrófagos influyen en la actividad de los fibroblastos e intervienen en la cicatrización liberando fibronectina, sustancia quimiotáctica para los fibroblastos y otros elementos que afectan su función y conducen a su activación (83). Los linfocitos también liberan linfocinas con capacidad para activar y reclutar fibroblastos. Por tanto, las diferentes reacciones inmunitarias del huésped también influyen en la rapidez y calidad de cicatrización de los tejidos dañados (77).

I.4 DESCRIPCIÓN DE LOS MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN Y SUS EFECTOS BIOQUÍMICOS SOBRE EL PERIODONTO.

Una descripción clásica de la inflamación es la que se aplica a una zona en la que, microscópicamente, se ve la encía enrojecida, hinchada, caliente, dolorida y con pérdida de función en lugares específicos.

El *enrojecimiento* y el *calor*, se deben a la vasodilatación y al flujo incrementado de sangre. La *tumefacción* es el resultado del aumento de la permeabilidad vascular y la filtración de proteínas plasmáticas, que crean un potencial osmótico que atrae líquido hacia los tejidos. En relación con las alteraciones vasculares hay una acumulación de células inflamatorias que infiltran la lesión. El *dolor* rara vez se experimenta en la enfermedad periodontal, en particular en las primeras etapas, pero puede producirse por efecto de la estimulación de los nervios aferentes por los mediadores químicos de la inflamación (gingivitis ulcerosa necrotizante, donde la rápida destrucción tisular es típica). También puede actuar la tensión tisular sumamente incrementada (típica de los abscesos periodontales). El *impedimento de la función* sería representado por las articulaciones artríticas hinchadas. Un ejemplo de función impedida en el medio bucal sería la apertura reducida o el trismo de la mandíbula asociado a veces a pericoronaritis en

la región del tercer molar. Una manifestación periodontal de pérdida de función, sería la función disminuida de los dientes móviles por periodontitis (21).

Dentro de la reacción inflamatoria, encontramos diferentes moléculas, células y procesos inflamatorios.

■ ***Proteinasas e inhibidores.*** La enfermedad periodontal genera una degradación tisular, por lo cual las proteasas del huésped y microbianas son elementales en los procesos destructivos. Las proteinasas, como su nombre indica, son aquellas moléculas que dividen las proteínas por hidrólisis de las uniones péptidas. Estas enzimas proteolíticas de acuerdo con la localización de la actividad de la enzima en el sustrato, pueden dividirse en dos clases principales: endopeptidasas (proteinasas) y exopeptidasas. Las primeras, cortan las uniones de su sustrato dentro de la cadena polipeptídica, mientras que las exopeptidasas dividen el sustrato sólo en uno o dos

residuos del extremo de la cadena polipeptídica.

En las dos últimas décadas, numerosos estudios han intentado evaluar la actividad endopeptidasa y las concentraciones en el fluido crevicular gingival. Estos estudios desarrollaron gingivitis experimental (donde los voluntarios se abstuvieron de cepillarse durante varias semanas), estudios transversales (de pacientes con periodontitis) y estudios longitudinales antes y después del tratamiento periodontal. En la mayoría de los casos se procuró evaluar la actividad de las proteinasas por la vía de la medición de la actividad enzimática, aunque también se emplearon inmunodeterminaciones.

En algunos de dichos estudios se buscó una asociación con la gravedad de la enfermedad y en la mayoría de los casos se obtuvo una asociación positiva o una reducción de los niveles de proteinasa. En los homogeneizados de tejido gingival se pudo detectar actividad

endopeptidasa, incluidas la colagenasa, la elastasa y la tripsina, así como las proteinasas. Más aun, recientemente se demostró actividad del activador plasminógeno tisular asociada con el recubrimiento epitelial de la hendidura.

La liberación de proteasas en las encías y el área de la hendidura promueve reacciones inflamatorias y contribuye al daño del tejido conectivo por distintas vías. Por el contrario, los inhibidores de proteasa sirven como moduladores de la función proteasa en el área y dificultan el proceso inflamatorio.

Todas las endopeptidasas provenientes del huésped, de las cuales se sabe que se liberan en la hendidura, pueden ser inhibidas por la función combinada de la alfa-2-macroglobulina (α 2-M) y la alfa-1-antitripsina (α 1-AT). De hecho, se ha demostrado la inhibición de la colagenasa gingival por la α 2-M y la colagenasa leucocitaria polimorfonuclear (PMN) es además inhibida por la α 1-AT. Las colagenasas

bacterianas también pueden ser inhibidas por inhibidores de la proteinasa humana, pero también hay posibilidades de que potentes proteinasas como la que posee *P.gingivalis* (gingivaína) son capaces de degradar a estos inhibidores (21).

■ ***Metaloproteinasas de la matriz (MMP)***. Después del descubrimiento de la colagenasa a principios de la década de los sesenta, se introdujo una nueva línea de investigación en el campo periodontal merced al trabajo pionero de Fullmer y Gibson (84), que demostraron que tanto las células epiteliales como el tejido conectivo gingival inflamado son capaces de producir colagenasa en cultivos de tejidos.

Una de las metaloproteinasas de la matriz que fueron objeto de mucha atención es la colagenasa neutrófila (PMN), que se encuentra en concentraciones más elevadas en muestras gingivales inflamadas que en las encías clínicamente sanas. La presencia de colagenasa fue demos-

trada en homogeneizados de encía obtenidos de pacientes con periodontitis midiendo su actividad. La inmunolocalización de los tejidos con colagenasa demostró que las biopsias gingivales, tomadas de los pacientes con enfermedad periodontal contenían pequeñas cantidades de enzima, mientras que las muestras gingivales, obtenidas de los sujetos tratados, no contenían la enzima. El aumento de la cantidad de enzimas MMP en individuos enfermos en comparación con los sanos (85), su incremento durante la gingivitis experimental (86) y su reducción después del tratamiento periodontal (87,88) sugiere que las MMP participan en la degradación del tejido periodontal.

Entre las MMP, tanto la colagenasa fibroblástica como las MMP tienen la capacidad singular, no compartida por los otros miembros de la familia, de dividir la triple hélice de los colágenos de tipo I, II y III, iniciando así la degradación de la matriz extracelular. Se piensa que la colagenasa de los PMN

llega a la hendidura en los PMN que migran (89) y las evaluaciones de esta enzima en la hendidura pueden reflejar el número de PMN emigrantes en la hendidura antes que el potencial destructor de los tejidos.

■ ***Leucocitos polimorfonucleares (PMN).*** El PMN es el leucocito predominante en la hendidura gingival, tanto en el estado salud como en el de enfermedad. Los PMN de la circulación son atraídos al área por la vía de los estímulos quimiotácticos evocados desde la placa dental. Histológicamente, se puede observar a los PMN atravesando el tejido conectivo gingival en la inflamación. Sin embargo, también se encuentran PMN en la encía clínicamente sana y son reclutados en respuesta a los factores quimiotácticos en la región de la hendidura gingival.

Attström y Egelberg (90), en un experimento con perros, mostraron que los neutrófilos de la circulación sanguínea periférica marcados con carbono, migran hacia la hendidura gingival siendo su ritmo

de migración mayor en las encías inflamadas que en las sanas. El número de PMN aumentó en la hendidura gingival a medida que se desarrolló la gingivitis. Encontraron un mayor número de PMN en los lugares con periodontitis al compararlos con los de gingivitis.

Como en otros tejidos, la migración de los leucocitos hacia el tejido conectivo gingival, a través del epitelio de unión y atravesando la hendidura gingival, está controlada por la vía de las moléculas de adhesión.

En un estudio en el cual se pidió a los voluntarios que interrumpieran las prácticas normales de higiene bucal durante varias semanas (estudio de gingivitis experimental), demostraron que los vasos en el tejido conectivo gingival expresan ELAM-1 e ICAM-1 en estado de salud y de inflamación gingival y se encontraron PMN en mayor abundancia en las áreas que expresan una intensa tinción de ELAM-1 e ICAM-1. Además, el epitelio de la

hendidura y de unión se tiñó positivamente para ICAM-1, lo que sugirió la importancia de esta molécula de adhesión para permitir la migración de los PMN a través del epitelio hacia la hendidura gingival (91).

Los PMN de la hendidura gingival, constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos periodontales. Esto es ilustrado por las deficiencias cualitativas y cuantitativas, como se da en la neutropenia cíclica y en el síndrome Chédiak-Higashi, que conducen a una destrucción importante del tejido periodontal.

La elastasa, una proteasa de serina, que fue considerada ya en la sección anterior, es un constituyente granular primario de los PMN que causa degradación tisular y está presente con mayor actividad en sitios de inflamación gingival.

Murray y cols. (92) demostraron que aunque se observe un aumento en la concentración de la elastasa en aquellas zonas donde se

ha incrementado la gravedad de la enfermedad, ésta proteína podría encontrarse en forma inactiva. Se produce liberación granular secundaria de los PMN durante la migración celular y el proceso es independiente de la liberación granular primaria, de la cual se piensa que se relaciona con la activación de PMN. Las diferencias entre las cantidades relativas de elastasa (constituyente granular primario) y de lactoferrina (constituyente granular secundario) fueron halladas en sitios con distintas fases de la enfermedad. Se encontró una mayor proporción de lactoferrina que de elastasa en los sitios de periodontitis. Esta variación en la liberación de los PMN de enzimas granulares primaria y secundaria pueden indicar alteraciones en la función PMN en los diferentes estadios de la enfermedad.

■ **Prostaglandinas.** Las prostaglandinas, derivadas del ácido araquidónico, son mediadores importantes de la inflamación. No es sorprendente, por lo tanto, que estén

implicadas en la patogenia de la enfermedad periodotal (93).

Las citoquinas proinflamatorias son capaces de estimular a los macrófagos y a otras células para producir cantidades importantes de prostaglandinas, en particular PGE₂, que son potentes vasodilatadores e inductores, a su vez de la producción de citoquina por diversas células. Las prostaglandinas actúan sobre los fibroblastos y osteoclastos, junto con las citoquinas, para inducir la producción de metaloproteinasas de la matriz, lo cual es relevante para el recambio tisular y para el proceso destructivo periodontal.

Muchos estudios examinaron la relación de la PGE₂ con la enfermedad periodontal y sugirieron que su concentración en el líquido crevicular gingival aumenta en la gingivitis con respecto de la encía sana y se encuentra en concentraciones muy elevadas durante los periodos de progresión de la enfermedad (94).

■ **Interacción entre células endoteliales y leucocitos.** El endotelio que tapiza los vasos separa estructural y funcionalmente los elementos sanguíneos del tejido extravascular. Durante una respuesta inflamatoria local, la lesión en una zona produce la liberación de mediadores químicos de la inflamación que cambian las proteínas vasculares y acumulan las células hemáticas en el lugar de la lesión. Además se produce adhesión localizada de los leucocitos hemáticos periféricos al recubrimiento celular endotelial.

La adhesión de los leucocitos es un paso esencial en la diversidad de procesos fisiopatológicos y un fenómeno clave en la patogenia de ciertas enfermedades vasculares. En la migración celular participan tres estructura principales: las células endoteliales, las moléculas de adhesión celular (los receptores y sus ligandos) y las células extravasadas.

La adhesión de los leucocitos parece ser esencial en el control del

tránsito celular hacia las áreas inflamadas y se ha propuesto que las citoquinas podrían desempeñar un papel importante en la regulación de este tránsito. Esto puede ser regulado en parte por los efectos de las citoquinas sobre las células endoteliales, tanto en la promoción de la expresión de las moléculas de las células endoteliales para los leucocitos como en estimulación de las células endoteliales para facilitar la migración leucocitaria a través de la pared vascular. La expresión de las moléculas de adhesión se induce precozmente durante las respuestas inflamatorias experimentales en la piel de los monos y seres humanos. La presencia de la molécula de adhesión intracelular (ICAM)-1 en el epitelio de unión sano fue comunicada por Grawford y Hopp (95).

Un estudio posterior demostró la presencia de ICAM-1 expresando el epitelio de la bolsa enferma en sujetos que padecían periodontitis adulta. Además de la molécula de adhesión endotelial (ELAM-1) o la

molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1), en expresión del tejido gingival, también fueron estudiadas otras moléculas de adhesión, a saber: laminina, fibronectina, vitronectina, tenascina y CD11b (21).

■ **Citoquinas.** Las funciones de los diferentes tipos de citoquinas serán expuestas en el siguiente apartado: importancia de las interleuquinas, en especial la IL-1, en la evolución de la enfermedad periodontal.

I.5 IMPORTANCIA DE LAS CITOQUINAS, EN ESPECIAL LA IL-1, EN LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Las citoquinas son proteínas solubles que median en las interacciones complejas entre los linfocitos, las células inflamatorias y otros elementos celulares del tejido conectivo. Son segregadas por células que

actúan como moléculas mensajeras que transmiten señales a las otras células. En un principio fueron llamadas linfoquinas antes de reconocer su producción por otras células. Tienen numerosas acciones como la iniciación y el mantenimiento de las respuestas inmunitaria e inflamatoria, la regulación del desarrollo y la diferenciación de las células. Las interleuquinas son miembros importantes del grupo de las citoquinas y están implicadas principalmente, en la comunicación entre los leucocitos y otras células que intervienen en los procesos inmunitarios e inflamatorios, como son las células epiteliales, las endoteliales y los fibroblastos.

Estas moléculas son liberadas en pequeñas cantidades y tienen diversas acciones sobre las células que llevan el receptor específico para las citoquinas. Estas sustancias son numerosas, tienen funciones que se superponen y están ligadas entre sí formando una red activa que controla la respuesta del huésped. El control de la liberación y acción de las

citoquinas es complejo y depende de inhibidores y receptores.

Muchas citoquinas son capaces de actuar sobre la célula que las produce, (función autocrina), de manera que autoestimulan su propia producción y la producción de otras citoquinas. Otras son las paracrinas, que se fijan a las células próximas algunas son endocrinas y se unen a células distantes. Las citoquinas pueden ser pleiotróficas, motivando diferentes actividades biológicas a partir de distintas células. Por otra parte, diferentes citoquinas pueden mostrar reacciones similares (96,97).

La acumulación de células plasmáticas y linfocitos en los tejidos periodontales sugiere que las citoquinas intervienen en los cambios patológicos del periodonto. Debido al amplio número de citoquinas identificadas hasta la fecha, sólo se analizarán las principales. Inicialmente, las citoquinas fueron denominadas según su actividad biológica. Estas incluyeron al factor activador de macrófagos (MAF,

macrophage activation factor), el de inhibición de migración de macrófagos (MIF, *migration inhibition factor*), el factor quimiotáctico derivado de leucocitos (CTX, *leukocyte-derived chemotactic factor*), la linfo-taxina (LT) y el factor activador de osteoclastos (OAF, *Osteoclast-activating factor*) (98).

■ **Citoquinas proinflamatorias.**

Las citoquinas interleuquina-1 (IL-1), IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF) estimulan la reabsorción ósea *in vitro e in vivo*. Las actividades de IL-1, IL-6 y TNF han sido estudiadas en muestras de GCF en zonas con inflamación clínica en seres humanos. Otros estudios intentaron determinar las citoquinas en tejidos sanos y enfermos. Estudios sobre el mecanismo de acción de la IL-1 sobre los fibroblastos *in vitro*, sugieren que la IL-1 puede actuar sobre los fibroblastos para promover la reparación o la destrucción de la matriz celular. También demostraron que el material del implante dental puede estimular a las células mononucleares periféricas para

producir IL-1 y TNF, lo que posteriormente, en teoría, da por resultado pérdida ósea y la consiguiente pérdida del implante. Las consecuencias clínicas, sin embargo, no son evidentes (21).

■ **Citoquinas quimiotácticas.**

Han sido identificadas una serie de más de 20 moléculas entre las cuales la más famosa y mejor caracterizada es la interleuquina-8 (IL-8), que tienen poderosas funciones quimiotácticas para los leucocitos, particularmente para los neutrófilos, pero también para los linfocitos y macrófagos. Estas moléculas actúan reclutando células de defensa hacia áreas donde se las necesita y son importantes en las respuestas con mediación celular. Se utiliza el término quimioquina para describir estas moléculas y es una forma abreviada de “citoquina quimiotáctica” (21).

■ **Citoquinas señaladoras de linfocitos.** Los linfocitos T colaboradores (TH1 y TH2) son linfocitos que regulan en los tejidos las

respuestas inmunitarias humoral y de mediación celular por la vía de las citoquinas. La respuesta inmunitaria humoral es promovida por TH2, que produce citoquinas características, a saber, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Los linfocitos TH1 liberan IL-2 e interferón (IFN)-IFN γ , que refuerzan las respuestas de mediación celular (*Fig. 7 y 8*).

Estas citoquinas constituyen un mecanismo preciso para el control de la respuesta inmunitaria, de modo que sea suficiente para enfrentarse al patógeno. Las citoquinas pueden influir sobre la respuesta inmunitaria determinando la clase de inmunoglobulina producida, lo que puede tener un efecto profundo sobre la función de anticuerpos. Por ejemplo, las moléculas IgM son más eficaces para la bacteriolisis y las moléculas IgG para la opsonización. Existen cuatro tipos diferentes de anticuerpos IgG clases distintas (IgG1-4) basados en diferencias en la porción Fc de estas moléculas. La subclase anticuerpo influye sobre la función

anticuerpo, con la IgG2 como antígeno de unión menos fuerte que la IgG1. Varios investigadores hallaron la cantidad de IgG2 superior al lado de la IgG1 en pacientes con periodontitis grave y proponen que los niveles de la subclase IgG son factores importantes en la susceptibilidad a la periodontitis (99).

Yamazaki y colaboradores (100,101), publicaron que los linfocitos productores de TH2 predominan en las lesiones de gingivitis y periodontitis. Las células TH2 refuerzan la respuesta inmunitaria humoral antes que las respuestas mediadas por células. Esto avala el concepto de que estas lesiones son dominadas por plasmocitos y además, que la respuesta inmunitaria humoral es más notable que la respuesta de mediación celular en la periodontitis crónica (21).

Más recientemente, la mayor parte de las citoquinas de nuevo se denominaron interleuquinas, en referencia a su función en la comunica-

ción interleucocitaria. Hoy en día, 10 interleuquinas se han identificado y numeradas del número 1 al 10. Otras incluso reciben su nombre sobre la base de su actividad biológica (96).

● ***Il-1 (α y β)***. Es una citoquina pleiotrófica con diversas actividades. Incluye a OAF (102,97, 103) debido a su estimulación de osteoclastos y al factor activador de linfocitos (LAF, por sus siglas en inglés *lymphocyteactivating factor*) en vista de su capacidad para estimular la proliferación de células T tratadas con fitohemaglutinación. Se sabe también que interviene en la activación de células TH, el fomento de la maduración de células B, la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos, la mejoría de la actividad de células NK, así como en otras reacciones. Es secretada por monocitos, macrófagos, células B, fibroblastos, neutrófilos, células epiteliales y muchos otros tipos de células estimuladas. Esta estimulación causa fagocitosis, componentes del complemento (C3a y C5a), otras dife-

rentes sustancias. La IL-1 aparece en los tejidos gingivales y en el líquido del surco, y decrece después del tratamiento periodontal (104,105, 106). También aumenta el procolágeno de fibroblastos, la prostaglandina E2 (PGE2) y la actividad de la reabsorción ósea (107).

La interleuquina 1 (IL-1), citoquina producida por macrófagos, células B y células del epitelio escamoso, es un importante mediador inmunitario. Su liberación es estimulada a partir de estas células por lipooligosacáridos (LOS) de periodontopatógenos como: *P.gingivalis* y *C.rectus*. La IL-1 motiva la proliferación de los timocitos, las células T, las células B y los fibroblastos, así como otras células. Además, mejora la producción de linfocinas, entre ellas el factor de crecimiento de células T (IL-2) y el factor activador de osteoclastos (108). Asimismo la IL-1 mejora la producción de anticuerpos por las células B, y de colagenasa y prostaglandinas por los fibroblastos.

La IL-1 aparece en mayores cantidades en el líquido gingival de lugares inflamados; lo que sugiere que podría intervenir en la enfermedad periodontal influenciando las reacciones inmunitaria e inflamatoria del huésped ante los mitógenos y antígenos bacterianos.

- **IL-2 (α y β):** Esta interleuquina fue llamada originalmente factor de crecimiento de células T por su efecto sobre las células T activadoras de mitógenos o antígenos (células TH y TC). Se sabe que posee una función general en las reacciones inmunitarias (109). La IL-2 estimula también la actividad funcional de macrófagos, modula la función y causa la proliferación de células NK (110,111). Es secretada por las células TH y las NK, además su concentración se ve aumentada en los tejidos periodontales durante la periodontitis (106).

- **IL-3.** Esta sustancia apoya el crecimiento y la diferenciación de células hematopoyéticas, incluyendo

la estimulación del crecimiento de mastocitos y la secreción de histamina. La secretan células TH y otras NK activadas (106,111).

● **IL-4.** En un principio fue denominada como *factor de crecimiento de células B derivado de células T* (BCGF-1, *B-cell growth factor*) debido a su activación de células B. También podría ser lo que se denominó *factor de inhibición de migración* (MIF). Se sabe que interviene asimismo en la activación, proliferación y diferenciación de células B, el crecimiento de células T, la función de macrófagos y el crecimiento de mastocitos (96,112). La IL-4 también motiva la síntesis de IgE por las células B. Las células TH secretan IL-4. Ésta aumenta en los tejidos periodontales en el curso de la periodontitis (106).

● **IL-5.** Esta sustancia motiva la proliferación de células B y fomenta la producción de inmunoglobulina A. Junto con la IL-4, también estimula la producción de inmunoglobulina E. Las células TH secretan IL-5.

● **IL-6.** Esta interleuquina estimula la producción de inmunoglobulinas por las células plasmáticas y, con la IL-1, activa la producción de células TH. Las células TH, los macrófagos, los monocitos, los fibroblastos y las células endoteliales secretan IL-6. Ésta aumenta en lugares de inflamación gingival e interviene en la reabsorción ósea (113,105,103).

● **IL-7.** Esta sustancia motiva la proliferación de células T aglutinando la IL-2 y receptores IL-2. Es secretada por las células del estroma de la médula ósea.

● **IL-8.** Esta interleuquina es quimiotáctica para los neutrófilos e incrementa su adhesión a las células endoteliales. Los macrófagos son los encargados de su secreción.

● **IL-9.** Es secretada por algunas células TH, motiva la proliferación de células TH, en ausencia de un antígeno, o las células que presentan antígenos; también fomenta el crecimiento de mastocitos.

● **IL-10.** La secretan y suprimen las células TH. La producción de IFN- γ por células NK, inducida por IL-2, también participa en la secreción y supresión de la IL-10. La IL-10 inhibe la capacidad de los monocitos para presentar antígenos (114,115,111)

● **IFN (α , β y γ).** Son una familia de tres glucoproteínas elaboradas por leucocitos, fibroblastos y linfocitos T, respectivamente. Proveen actividad antiviral, mejoran la actividad de macrófagos (IFN- γ), así como la actividad de células T y de células NK (117,121). El IFN- γ interviene además en la reabsorción ósea, inhibiendo la proliferación y diferenciación de las células madre de osteoclastos (98).

● **TNF (α y β).** Estas sustancias son producidas por macrófagos y células TH, respectivamente y causan necrosis de ciertos tumores. El TNF- α es producido por macrófagos después de la estimulación ocasionada por elementos bacte-

rianos gramnegativos, entre ellos lipopolisacáridos (LPS) (116). TNF- β , antes conocido como *linfotoxina* (LT), es producido de manera primaria por células TH. El TNF- α y el β intervienen en la activación de los osteoclastos, estimulándolos para que causen reabsorción ósea. El TNF- α ayuda además a los leucocitos en su capacidad para adherirse a las células endoteliales e incrementa su fagocitosis y quimiotaxia. Estos efectos, junto con la acción sobre los macrófagos que conduce a la angiogénesis motivada por macrófagos, pueden participar en los cambios vasculares registrados en la enfermedad periodontal (116,77).

I.6 CONCEPTOS GENERALES DE VARIACIÓN GENÉTICA. ORIGEN Y CAUSAS.

El ser humano presenta un grado considerable de variación genética, observado en rasgos como la estatura, la presión sanguínea y el color de la piel. En el espectro de la variación genética se incluyen los estados patológicos, como la fibrosis quística o la neurofibromatosis tipo 1. Esta faceta de la variación genética constituye el eje central de la genética médica.

Toda variación genética se origina a partir del proceso conocido como mutación, definida como una alteración de la secuencia del ADN. Las mutaciones pueden afectar a células **somáticas** (todas las que no son germinales) o **germinales** (células que producen gametos y pueden transmitirse de una generación a la siguiente).

Como consecuencia de las mutaciones, es posible que un gen se diferencie de un individuo a otro en términos de su secuencia del ADN. Se denomina **alelo** a la versión o secuencia de un gen particular. La localización de un gen en un cromosoma se denomina **locus** (de la palabra latina que significa “lugar”). Podría decirse que un individuo tiene un alelo determinado en el *locus* de la beta globulina en el cromosoma 11. Si un individuo presenta el mismo alelo en ambos miembros de un par de cromosomas, se dice que es **homocigótico**. Si los alelos difieren en la secuencia de ADN, el individuo es **heterocigótico** (*Fig.9*).

Los alelos presentes en un *locus* determinado constituyen el **genotipo** del individuo. Algunos **loci** (plural de *locus*) presentan una variabilidad considerable entre individuos.

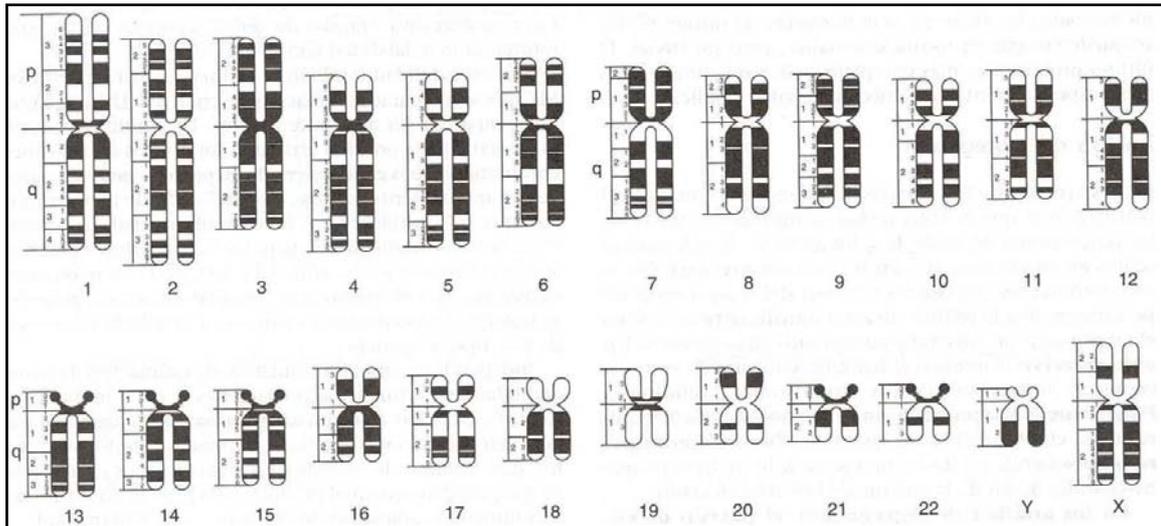


Figura 9 Los cromosomas humanos. La nomenclatura usada para ubicar posiciones a lo largo de los cromosomas se basa en el aspecto físico y los patrones de tinción de los cromosomas vistos durante la profase o el comienzo de la metafase. Todos los cromosomas contienen un brazo corto (p, o petite) y un brazo largo (q). En este esquema, denominado ideograma, los cromosomas se representan como aparecen después de teñirlos con Giemsa (de donde proviene el término patrones de bandas G). Los genes se localizan según sus posiciones dentro de estas bandas. Por ejemplo: 11q23 indica una posición en la tercera banda de la segunda región en el brazo largo del cromosoma 11 las subbandas se designan con puntos decimales (p. ej. 11q23.2) (21).

Si un *locus* tiene dos o más alelos, y la frecuencia de cada uno de los cuales supera el 1% en la población, se considera que se trata de un *locus* polimórfico (muchas formas). El *locus* polimórfico se denomina a menudo polimorfismo (117).

■ **Origen de la variación genética: Tipos de mutación.** La mayor parte de nuestra discusión se centrará en las mutaciones que tienen lugar en el ADN codificador o en las secuencias reguladoras, puesto que las mutaciones que ocurren en otros segmentos del genoma no suelen provocar consecuencias clínicas.

Un tipo importante de **mutación monogénica** es la sustitución de un par de bases, en la que un par de bases es reemplazado por otro par. Ello puede originar un cambio en la secuencia de aminoácidos, aunque, debido a la degeneración del código genético, muchas de estas mutaciones no alteran las secuencias de aminoácidos y por lo tanto no tienen consecuencias. Estas últimas se denominan *sustituciones silenciosas* o *silentes*. A su vez, las sustituciones de pares de bases pueden ser de dos tipos básicos: las *mutaciones con cambio de sentido*, provocan un cambio en un único aminoácido, mientras que las *mutaciones sin sentido*, producen uno de los tres codones de terminación en el ARNm: UAA, UGA o UGA. Estos codones finalizan la traducción del ARNm, y, por lo tanto, provocan la terminación prematura de la cadena polipeptídica. A la inversa, cuando un codón de interrupción se altera de modo que codifica un aminoácido, se produce un polipéptido anormalmente alargado. Las alteraciones en

las secuencias de aminoácidos pueden tener profundas consecuencias. Muchas de las enfermedades genéticas graves son consecuencia de las sustituciones de pares de bases.

El segundo tipo importante de mutación consiste en **las deleciones o inserciones** de uno o más pares de bases. Estas mutaciones, que pueden originar la adición o la pérdida de aminoácidos en una proteína, a menudo son patológicas. Un ejemplo de este tipo de mutación es la deleción de 3pb que provoca la mayoría de casos de fibrosis quística diagnosticados en individuos de raza blanca. Las deleciones e inserciones tienden a ser especialmente nocivas cuando el número de pares de bases perdidas o adicionales no es un múltiplo de 3. Puesto que los codones constan de 3pb, estas inserciones o deleciones pueden alterar todos los codones subsiguientes. Por ejemplo, la inserción de una única base (una A en el segundo codón) convertiría una secuencia leída como 5'-ACT GAT

TGC GTT-3' en una 5'-ACT GAA TTG CGT-3'. Ello transformaría una secuencia de aminoácidos de Thr-Asp-Cys-Val en una de Thr-Glu-Leu-Arg. Estas mutaciones se denominan *mutaciones de cambio de la pauta de lectura*.

Otros tipos de mutaciones alteran la regulación de la transcripción o de la traducción. Una *mutación del promotor* puede reducir la afinidad de la ARN-polimerasa por un *locus* promotor, provocando a menudo una disminución de la producción de ARNm. El resultado final es la reducción de la producción de una proteína determinada.

Las *mutaciones del potenciador* también pueden presentar efectos similares. Las mutaciones también pueden interferir en el proceso de corte y unión de los intrones cuando se forma el ARNm maduro a partir del ARNm transcrito primario.

Las *mutaciones en los lugares de corte y unión* que se producen en los límites intrón-exón, alteran la señal necesaria para la escisión apropiada de un intrón. Ello puede ocurrir en la secuencia GT que siempre define el *locus donante* 5' o en la secuencia AG que define el *locus receptor* 3' (Fig.10).

Existen varios tipos de secuencias de ADN capaces de propagar copias de sí mismas; a continuación, estas copias se insertan en otras localizaciones cromosómicas. La inserción de estos *transposones* (o elementos móviles) puede causar mutaciones de cambio de la pauta de lectura. Hasta una fecha reciente, no se había aclarado si este fenómeno, que se había comprobado en experiencias con animales, como la mosca de la fruta, ocurría en el hombre. En la actualidad, ya se ha comprobado que la inserción de elementos móviles ocasiona casos aislados de neurofibromatosis de tipo 1 y hemofilia A (un trastorno de la coagulación) en humanos.

El último tipo de mutación que consideramos, se ha descubierto recientemente y afecta **secuencias de ADN repetidas en tándem**, que aparecen en el interior o cerca de algunos genes patológicos. Un individuo normal tiene un número relativamente pequeño de estas repeticiones en tándem (por ejemplo de 20 a 40). Por motivos todavía no conocidos, el número de repeticiones puede aumentar de forma espectacular durante la meiosis o, posiblemente, durante el inicio del desarrollo fetal, de modo que un recién nacido puede tener cientos o incluso miles de repeticiones. Cuando ello ocurre en determinadas regiones del genoma, provoca una enfermedad genética. Igual que otras mutaciones, estas *repeticiones expandidas* pueden transmitirse a la descendencia del paciente. Hoy en día se conocen al menos siete enfermedades genéticas causadas por repeticiones expandidas.

■ **Origen de la variación genética: Causas de mutación.** Se conoce un gran número de agentes que causan *mutaciones inducidas*. Estas mutaciones, que pueden atribuirse a una causa medioambiental conocida, pueden compararse con las *mutaciones espontáneas*, que se originan de modo natural durante el proceso de replicación del ADN. A los agentes que causan mutaciones inducidas se les denominan colectivamente como *mutágenos*. Los estudios en animales han demostrado que la *radiación* constituye una clase importante de mutágeno. La *radiación ionizante*, tanto la producida por los rayos X como la de los accidentes nucleares, puede expulsar electrones de los átomos, formando iones con carga eléctrica. Cuando estos iones se sitúan en la molécula de ADN o en su proximidad, pueden provocar reacciones químicas que alteran las bases del ADN. La radiación ionizante también puede romper el ADN de doble cadena. Esta forma de radiación puede afectar todas las células del cuerpo, incluyendo las germinales.

La *radiación no ionizante* no forma iones cargados, pero puede excitar los electrones desde una órbita interna a otra más externa del átomo, que se vuelve químicamente inestable. La radiación ultravioleta (UV), que forma parte de la luz solar, es un ejemplo de radiación no ionizante. La radiación UV causa la formación de puentes covalentes entre bases pirimidínicas adyacentes (es decir, citosina o timina). Estos *dímeros pirimidínicos* (un dímero es una molécula constituida por dos subunidades) no pueden emparejarse de modo apropiado con las purinas durante la replicación del ADN, originando la sustitución de un par de bases. Puesto que la epidermis absorbe la radiación UV, ésta no llega a la línea germinal, si bien puede provocar cáncer cutáneo.

Una diversidad de agentes químicos puede inducir también mutaciones, a veces debido a su similitud química con las bases del ADN. A causa de esta semejanza, estos *análogos de las bases*, como el

5-bromouracilo, pueden reemplazar una base auténtica del ADN durante la replicación. El análogo no es exactamente igual a la base que sustituye, de modo que pueden provocar errores de emparejamiento durante las replications subsiguientes. Otros mutágenos químicos como los colorantes de acridina, pueden insertarse físicamente a sí mismos entre las bases existentes, distorsionando la hélice del ADN y ocasionando mutaciones de cambio de la pauta de lectura. Otros mutágenos pueden alterar directamente las bases del ADN, ocasionando errores de replicación. Un ejemplo de esto último lo constituye el ácido nitroso, que elimina un grupo amino de la citosina, transformándola en uracilo. Aunque el uracilo se encuentra normalmente en el ARN, simula la acción de emparejamiento de la timina. Por lo tanto, se empareja con la adenina, en vez de emparejarse con la guanina, como haría la citosina original. El resultado final es la sustitución de un par de bases.

En la actualidad se conocen cientos de agentes químicos mutagénicos que se utilizan en animales de laboratorio. Entre éstos se encuentran la mostaza nitrogenada, el cloruro de vinilo, los agentes alquilantes, el formaldehído, el nitrito sódico y la sacarina. Debe resaltarse que algunas de estas sustancias químicas son mutágenos mucho más potentes que otras. Por ejemplo, la mostaza nitrogenada, es un mutágeno potente, mientras que la sacarina es un compuesto mutágeno relativamente débil. Aunque la cafeína (un análogo de la purina) es mutagénica en algunos organismos, como las levaduras y los hongos, no se ha comprobado de forma concluyente que sea mutagénica en el ser humano. Ello se debe, en parte, a que la reparación del ADN está muy desarrollada en los organismos superiores.

Considerando que en cada división celular se han de replicar tres mil millones de bases de ADN y teniendo en cuenta el gran número de mutágenos a los que estamos

expuestos, la replicación del ADN es sorprendentemente exacta. Uno de los motivos fundamentales de esta exactitud es el proceso de *reparación del ADN*, que tiene lugar en todas las células normales de los organismos superiores. Varias docenas de enzimas diferentes intervienen en la reparación del ADN alterado. Estas enzimas identifican colectivamente una base alterada, la eliminan cortándola del filamento del ADN, la reemplazan por la base correcta (determinada por el filamento complementario) y vuelven a sellar el ADN. Se calcula que estos mecanismos de reparación corrigen el 99.9% de los errores iniciales.

Las tasas de mutación varían considerablemente en diferentes partes del genoma. En general, es más probable que los genes más grandes, debido a su mayor tamaño, experimenten mutaciones, que los genes pequeños. También se conoce la existencia de puntos calientes de mutación, especialmente en secuencias de dinucleótidos CG. En las enfermedades monogénicas, existe un

aumento notable del riesgo de mutación por edad paterna avanzada (117).

I.7 DIVERSIDAD DEL GENOMA. POLIMORFISMOS.

El ADN genómico nuclear es una entidad extremadamente variable, no sólo entre individuos de especies diferentes (variación máxima, interespecie), sino también entre individuos de una misma especie (variación mínima, intraespecie).

Esta diversidad es responsable de fenómenos biológicos de tanta trascendencia como la evolución de las especies y, dentro de cada especie, de la presencia de características diferenciales en cada individuo, únicas e irrepetibles.

La *diversidad o variabilidad genética* se debe a variaciones en la secuencia del genoma; por tanto, en un sentido amplio el concepto de *diversidad* se hace sinónimo de *poli-*

morfismo (muchas formas en su significado literal,) o, más correctamente, polimorfismo genético, cromosómico, de secuencia o de ADN.

El polimorfismo afecta tanto a regiones codificantes del genoma (*polimorfismo génico*) como no codificantes (*polimorfismo genético*, en general). En ambos casos puede consistir en la variación de un solo par de bases del ADN o, menos frecuentemente, de millones de pb (macromutación). El primer caso se conoce hoy día como polimorfismo de un sólo nucleótido o **SNP** (acrónimo inglés de single-nucleotide polymorphism; coloquialmente, “*snip*”). Cualquier variación puede tener lugar en células germinales o reproductoras, con lo que se transmite a la descendencia (polimorfismo hereditario, por ejemplo en las enfermedades congénitas), o bien en células somáticas, no reproductoras, en cuyo caso no se transmite (polimorfismo no hereditario, por ejemplo en la mayoría de los cánceres).

Inicialmente, la definición de polimorfismo se refería a las proteínas, y luego a sus genes. Hoy día, se debe definir como la “existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado”, sea éste génico o no. Los *alelos* son variaciones de la secuencia de ADN presente en un *locus* o posición definida en un cromosoma; consecuentemente, en una célula diploide cada locus autosómico está ocupado por dos alelos, uno de origen paterno y otro materno, situados en sendos cromosomas homólogos. *El grado de polimorfismo* de una población es tanto mayor cuantos más individuos contenga, viene determinado por el número de alelos distintos existentes para un locus concreto y se refleja en

el grado de *heterocigosis*, o proporción de individuos heterocigóticos que forman parte de la población.

Lógicamente, la causa última de la existencia de un polimorfismo es la mutación del ADN. La distinción entre el uso de los términos *mutación* y *polimorfismo* no es clara ni unánime, pero en general se asocia el primero con situaciones excepcionales, en especial patológicas, mientras que se habla de polimorfismo cuando la variación genética es razonablemente común en la población y, por tanto, estable y nada o poco perjudicial. Por convenio, se dice que un locus es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más del 1% de la población.

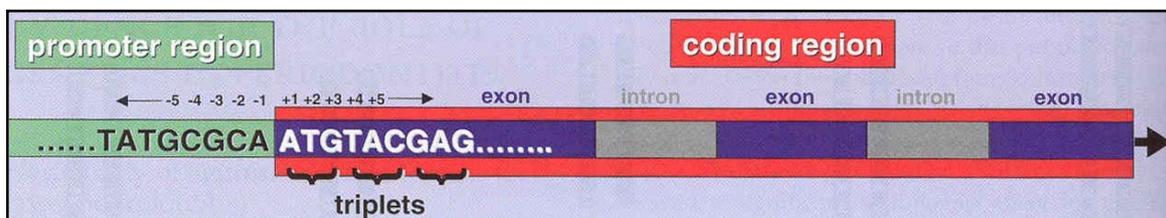


Figura 10 Representación esquemática de un gen. Un gen consta de una región promotora y otra codificadora. Dentro de la región codificadora, existen áreas que no codifican denominadas intrones. Los exones, contienen tripletes de nucleótidos (codones) que codifican para un aminoácido específico (21).

Todo polimorfismo es pues, reflejo del genotipo de los individuos (constitución alélica para un locus determinado o para un conjunto de ellos). Surge, por tanto, el concepto de *individualidad genética*, entendida como la presencia en todo individuo de un genoma con una secuencia característica, única para ese individuo (118).

■ **Consecuencias funcionales del polimorfismo.** El polimorfismo puede tener distinta trascendencia desde el punto de vista funcional, dependiendo de si afecta a regiones no codificantes, reguladoras o codificantes del genoma, y también del modo como afecte al mensaje genético de estas últimas.

I. Polimorfismo en regiones codificantes, o polimorfismo génico.

De la parte codificante del genoma humano (alrededor de 30.000 genes), se cree que unas tres cuartas partes son *monomorfos*, genes únicos compartidos sin variación por todos los individuos. Éstos constituyen la parte del genoma común o “de refe-

rencia”, que define la especie y determina sus características (por ejemplo, en humanos, presencia de cabeza, tronco, extremidades, etc.). Tales genes son casi idénticos a los correspondientes en la especie más cercana (en nuestro caso, el chimpancé con un 97.8% de similitud). El resto, una cuarta parte del total (unos 75.000 genes), son *polimorfos*, sus variaciones, en muchos casos mínimas, determinan el polimorfismo *génico*.

Dentro del polimorfismo génico, se pueden distinguir dos situaciones de acuerdo con su trascendencia funcional, es decir, su efecto sobre el fenotipo.

A) Sin efecto fenotípico. Aun estando la variabilidad localizada en una secuencia codificante, el polimorfismo puede no tener consecuencias sobre el fenotipo (es decir, sobre el producto génico), principalmente por dos motivos: que no se altere la secuencia proteica codificada (como consecuencia de la degeneración del código genético, es

el caso de las *mutaciones silenciosas*) o que la variación ocurra en una región de la proteína que no es esencial para su función (entre otras, las *mutaciones conservadoras*). Podrían incluirse también en este último caso los polimorfismos que afectan a los intrones, regiones génicas, pero no codificantes (que, por tanto, pueden considerarse también polimorfismos no génicos).

Este tipo de polimorfismo es el más común, responsable de una diversidad genética enteramente normal. Las proteínas formadas por los distintos alelos de un locus de este tipo son variantes relativamente comunes, con secuencias y estructuras idénticas o similares y manteniendo una funcionalidad similar. Aparece, por ejemplo en proteínas plasmáticas como inmunoglobulinas, α -antitripsina, haptoglobina, transferrina y ceruloplasmina, y en otras proteínas tanto intracelulares como extracelulares. Durante años, estas formas *múltiples o variantes* de proteínas fueron el principal

producto *apreciable* del polimorfismo, gracias a su separación, principalmente mediante electroforesis.

B) Con alteración del fenotipo. En otros casos, la variación en la secuencia del gen modifica la secuencia de la proteína de tal forma que afecta a su funcionalidad. Aunque esta modificación puede ser beneficiosa (base de la evolución), lo más común es encontrar un polimorfismo patológico o deletéreo (perjudicial). La alteración puede modificar las características bioquímicas, fisiológicas o incluso morfológicas de la célula, pudiendo llegar a originar procesos patológicos, en función de la gravedad de dicho efecto fenotípico. Se puede distinguir entre:

- Variaciones fenotípicas que no influyen en la susceptibilidad a enfermedades, caso de los polimorfismos responsables de la estatura, el color del pelo, el grupo sanguíneo, etc.

- Variaciones fenotípicas que influyen de forma leve o mínima en la susceptibilidad a ciertos procesos patológicos, tales como los polimorfismos responsables de rasgos morfológicos complejos.

- Variaciones fenotípicas que desempeñan un papel importante en la aparición de una patología. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, con las hemoglobinas anormales, que se manifiestan en forma de enfermedades genéticas. Precisamente, el concepto de *enfermedad genética* constituye la manifestación más obvia y a veces más extrema de un cambio genético (118).

II. Polimorfismo en regiones génicas no codificantes. Teniendo en cuenta la definición más completa de gen, que se establece bajo un criterio funcional, existen regiones del ADN que forman parte del gen, pero no codifican su producto génico. Tal es el caso de las regiones reguladoras (promotores), los intrones y las regiones 5' y 3' que, aunque se conservan en el ARNm, no son

traducidas. Se debe por ello considerar la posibilidad de polimorfismos en estas regiones génicas no codificantes. Evidentemente aunque tal polimorfismo no afectará a la secuencia de la proteína, puede afectar a su expresión, dependiendo de la función que ejerza la secuencia no codificante que lo sufre. Muchos polimorfismos en los intrones no tendrán efecto alguno, y serán equivalentes al polimorfismo en regiones no génicas. Otros podrán afectar al corte y empalme, resultando un polimorfismo proteico.

Las variaciones en secuencias promotoras probablemente perturben la expresión del gen. Por tanto, el polimorfismo en regiones génicas no codificantes puede manifestarse o no en un efecto fenotípico (118).

III. Polimorfismo en regiones no génicas. La mayor parte de las mutaciones del genoma ocurren en regiones del ADN que no codifican ningún producto, debido a su mayor abundancia en el genoma humano y de otros eucariotas. Por tanto, los

cambios de bases en este ADN no tienen efecto fenotípico alguno: no se altera la secuencia, la estructura o la función proteica, de ahí que tampoco tengan un interés patológico directo. Son, sin embargo, polimorfismos de gran interés aplicado; principalmente, para la búsqueda de genes relacionados con enfermedades y para la identificación genética de individuos.

La elevada cantidad de loci polimórficos que se encuentran en ADN no codificante, junto a la falta de trascendencia funcional de sus alteraciones (que permite que se perpetúe libremente en sucesivas generaciones), hacen que sea éste el ADN que más difiere de unos a otros individuos. Como consecuencia, una de las propiedades más notables del genoma de un individuo es la exclusividad de su perfil genético (salvo para los hermanos gemelos univitelinos, individuos clónicos que tendrán los mismos alelos en cada uno de sus loci, aunque incluso en este caso pueden existir diferencias debidas a mutaciones somáticas). Se

puede, por tanto, utilizar el análisis de estos polimorfismos para la identificación de una persona, con una fiabilidad igual o superior a la de las huellas dactilares, lo que ha dado lugar al término *huella genética* o *huella dactilar genética*. Con este objeto se emplean principalmente los polimorfismos en las regiones de ADN mini- y microsatélite. Por otra parte, puesto que las secuencias no codificantes no proporcionan información sobre características especiales de las personas (posibles enfermedades, cualidades físicas o psíquicas, etc.), el análisis basado en polimorfismos de regiones no codificantes posee la ventaja de evitar cualquier conflicto ético (118).

I.8 EL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA IL-1. SU RELACIÓN CON LA ENFER- MEDAD PERIODONTAL.

Una vez descrita la enfermedad periodontal, los factores etiológicos que la rodean, la respuesta inmunológica del huésped y ciertos conceptos necesarios de genética médica. Hemos llegado a este último apartado, donde el tema principal de nuestra investigación, el polimorfismo de los genes de la IL-1, adquiere el máximo interés.

Como ya se ha visto anteriormente, son tres los productos bioquímicos presentes en la respuesta inflamatoria del huésped, los cuales están fuertemente asociados a la severidad y progresión de la enfermedad periodontal; las interleuquinas (IL-1), las prostaglandinas (PGE2) y las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). De ellas nos hemos centrado en la **IL-1** y en particular en su forma **beta**.

La IL-1, presenta dos formas distintas de expresión en lo que concierne a su configuración. Una forma α y otra forma β . Aunque las dos formas sólo presentan un 27% de aminoácidos homólogos, se unen con idéntica afinidad al mismo receptor (119). Tanto la forma α como la forma β , tienen la propiedad de ser potentes mediadores de la reabsorción ósea (120). En especial la IL-1 β , la cual inhibe la formación ósea, estimulando la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (121,122).

La IL-1ra, es la tercera molécula dentro de la familia de la IL-1. Se une al mismo receptor que las anteriores, aunque no presenta ninguna actividad biológica (123).

Diferentes estudios han demostrado que la IL-1 β es 15 veces más potente que la IL-1 α y 500 veces más potente que la TNF α y la linfoxina en la mediación de la reabsorción ósea "in vitro" (121). Además la IL-1 β y el TNF α se han aislado en (FGC) de lugares con

periodontitis, en mayor cantidad que la IL-1 α (124,125). Estas cantidades de IL-1 β son de 10 a 50 veces mayores con respecto a la IL-1 α (126). Estas son dos de las principales razones por las que nos decantamos por esta forma de la proteína.

La producción de la interleuquina-1 (IL-1) viene regulada por la presencia de tres genes diferentes. El gen de la interleuquina-1alpha (IL-1A), el gen de la interleuquina-1beta (IL-1B) y por último el gen de la interleuquina antagonista del receptor (IL-RN) (127).

Estos tres genes, se encuentran localizados en el cromosoma 2q13, y todos ellos muy próximos entre sí.

El gen de la **IL-1A**, controla la producción y síntesis de la proteína mediadora de la inflamación interleuquina-1alpha (**IL-1 α**); el gen de la **IL-1B**, controla la producción y

síntesis de la proteína mediadora de la inflamación interleuquina-1beta (**IL-1 β**), mientras que el gen de la **IL-RN**, controla la producción y síntesis de la proteína antagonista (**IL-ra**), encargada de anular la acción de las proteínas IL-1 α e IL-1 β .

Como ya hemos visto en apartados anteriores, la pareja de alelos que se encuentran ubicados en el locus de cada gen, puede variar de un individuo a otro. Aquellos genes, en los que se descubre esta posible variación, reciben el nombre de genes polimórficos. Por tanto, los genes de la IL-1A y de la IL-1B son genes polimórficos.

El polimorfismo genético que sufren los genes de la IL-1A y de la IL-1B, tiene lugar en un sólo nucleótido (SNP) del total de nucleótidos que constituyen un alelo, sustituyéndose un par de bases nitrogenadas por otro par de bases distintas.

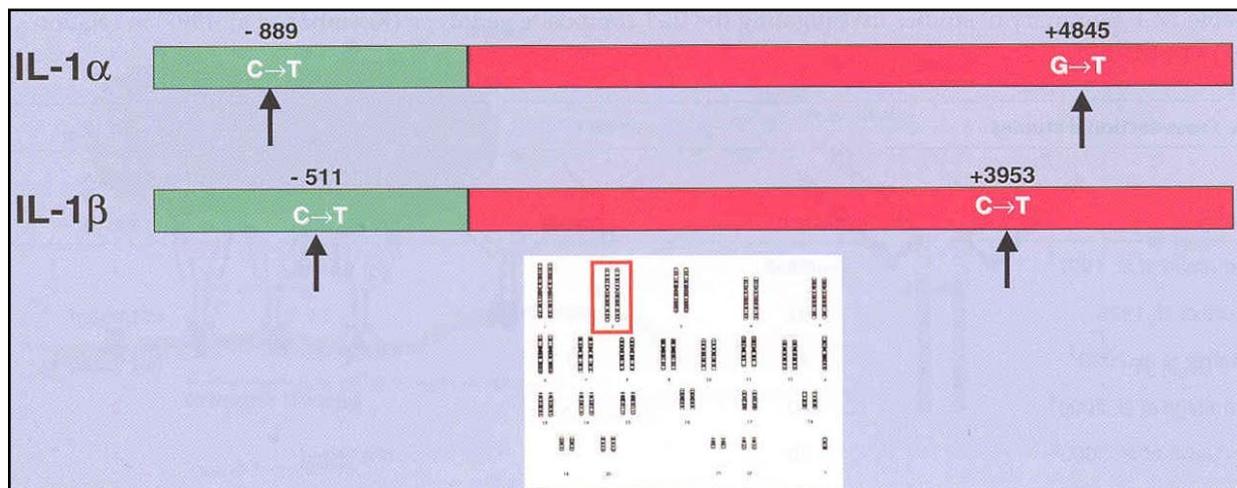


Figura 11 Los genes para la IL-1 α y la IL-1 β , localizados en el cromosoma 2. Se indican con flechas negras donde se encontrarían los posibles polimorfismos de ambos genes. (21).

Esta sustitución de pares de bases, puede presentarse tanto en uno como o en ambos alelos (*Fig. 11*).

Según Kornman (128), se considera a un individuo “**genotipo positivo**” para los genes de la IL-1, cuando posee al menos un polimorfismo (alelo 2) en uno de sus dos alelos para el gen de la IL-1A y al menos un polimorfismo (alelo 2) en uno de sus dos alelos para el gen de la IL-1B.

El término “**alelo 2**” se emplea para definir la segunda forma más frecuente de encontrarnos una secuencia de nucleótidos de un determinado alelo.

Podemos definir a los tres genes que codifican la proteína IL-1, como genes autosómicos dominantes. Esto se debe a que cuando aparece un polimorfismo aunque tan sólo sea en uno de los alelos, se aprecian cantidades mayores de proteína IL-1, la cual está fuertemente asociada a la actividad de la enfermedad periodontal.

Una vez definido el término genotipo positivo para la IL-1, expondremos una serie de apartados donde se observa, como estos pacientes presentan una serie de características particulares debidas a su genotipo.

■ ***Pacientes genotipo positivo para los genes de la IL-1 y su mayor respuesta inflamatoria frente a microorganismos.*** Numerosos artículos han demostrado una clara asociación entre el estado periodontal del paciente y una mayor concentración de IL-1 en el fluido crevicular, en especial de su forma beta.

Stashenco y colaboradores (129), tomaron muestras de IL-1 β en tres zonas diferentes; con actividad de la enfermedad, con inactividad de la enfermedad y lugares sanos, todas estas muestras se tomaron de 12 pacientes con enfermedad periodontal del adulto. Observaron que en las zonas con actividad de la enfermedad, la concentración de IL-1 β aislada era significativamente mayor al de las zonas sanas. Otros artículos

con un diseño similar han llegado a los mismos resultados (130,131,-132).

Gonzáles y colaboradores, en un modelo de estudio de gingivitis experimental, tomaron muestras a 12 pacientes sanos de IL-1 β en FGC en los días 0, 7, 14 y 18. Demostraron claramente un incremento en la concentración de IL-1 β en las zonas con gingivitis experimental (133). Idénticos resultados han obtenido otros investigadores en estudios similares (134,135).

Según los resultados obtenidos en diferentes estudios, se llega a la conclusión de que la concentración de IL-1 β en zonas sanguinolentas con enfermedad periodontal, es aproximadamente 10 veces mayor que en zonas sanas (136,137,138).

Con respecto al papel que desempeña el tabaco en las concentraciones de IL-1 β y de IL-1ra en GCF, Boström y colaboradores (139), realizaron un estudio donde tomaron muestras a 22 pacientes

periodontales fumadores y a 18 pacientes periodontales no fumadores. Tras analizar las muestras de IL-1 β y de IL-1ra, observaron que no existían diferencias significativas en cuanto a las concentraciones que presentaban los dos grupos de estudio.

La IL-1 y el TNF- α son potentes estimuladores de la reabsorción ósea. Por lo tanto, una sobreproducción de cualquiera de estas dos citoquinas provocada por algún tipo de polimorfismo genético, se cree que pueda ser uno de los mecanismos responsables de la destrucción del tejido periodontal. Así mismo, un estudio experimental realizado en monos, observó que la inhibición simultánea de la IL-1 y del TNF, prevenía en su mayor parte de la reabsorción ósea de la enfermedad periodontal (140).

Algunos individuos, que producen mayor cantidad de IL-1 que otros, no sólo lo hacen en una medición concreta, sino que sus niveles de IL-1 están incrementados

siempre. Además está particularidad, tiende a heredarse dentro de una misma familia.

Hoy en día, sabemos que las variaciones en ciertos genes de la IL-1, son responsables de provocar una sobreproducción de esta proteína al estar el individuo expuesto a una carga bacteriana.

En algunos estudios *in vitro*, se procedió a aislar células sanguíneas de la serie blanca, las cuales han sido incubadas en el laboratorio junto a productos de bacterias gram-negativo, observándose significativamente una mayor producción de IL-1 β en aquellas células procedentes de individuos con genotipo positivo (141,142,143).

Pociot y colaboradores, realizaron un estudio “*in vitro*” acerca de la producción de IL-1 β por parte de monocitos de pacientes de los cuales no se conocía su estado periodontal. Informaron que los individuos heterocigóticos positivos (al menos un alelo 2) para el gen de

la IL-1B +3953, producían entre un 30-40% más de IL-1 β frente a LPS de *E.coli* que los individuos genotipo negativo para el mismo polimorfismo. Mientras que los individuos homocigóticos positivos para el gen de la IL-1B +3953, producían un 50% más de IL-1 β que los individuos genotipo negativo (143).

En un estudio reciente, se observó que los niveles de IL-1 β en FCG eran significativamente mayores en pacientes genotipo positivo, que en pacientes genotipo negativo (144). De hecho, las diferencias más significativas entre los pacientes genotipo positivo y genotipo negativo, se encontraron en bolsas periodontales < 4mm. En las zonas donde se presentaban formas leve-moderada de la enfermedad, los individuos genotipo positivo, presentaban valores de IL-1 β en FGC 2.5 veces mayores que individuos genotipo negativo con una ($p = 0.03$).

En otro estudio, se observó que el presentar un polimorfismo genético denominado alelo 2 en el locus del gen IL-1A, en su posición -889. Está asociado a un incremento en los niveles de la proteína IL-1 α . Este incremento de proteína en pacientes con periodontitis severa es aproximadamente cuatro veces mayor de lo normal. Estas diferencias se evidencian, con mayor claridad, en individuos no fumadores (145).

Kornman y colaboradores, realizaron un estudio con sujetos de herencia norte europea que no eran fumadores, observaron que el polimorfismo compuesto de la IL-1 α en la posición -889 y el de la IL-1- β en la posición +3953 (genotipo positivo), era significativamente más frecuente en sujetos con periodontitis avanzada (67% OR=18.9), en comparación con los sujetos con periodontitis leve o sin enfermedad periodontal (22%). Este estudio nos sugiere que el llevar presente el alelo

2 tanto en forma homocigótica como heterocigótica en ambos locus, predispone en mayor medida a estos individuos a desarrollar la enfermedad periodontal en su estado severo (128).

Otro estudio realizado con no fumadores o ex fumadores con una historia de < 5 paquetes/año, investigó la presencia de polimorfismos en otro conjunto de genes, IL-1 α (+4845) e IL-1 β (+3954). Se concluyó que el presentar estos dos polimorfismos de manera conjunta, supone un riesgo mayor (OR=3.8-5.3) de padecer enfermedad periodontal severa, en comparación con los sujetos sin variaciones genéticas (146).

En otros dos estudios donde sólo se estudió el polimorfismo del gen IL-1B en la posición +3953, se observó que existía una clara asociación entre el presentar este polimorfismo genético y padecer la enfermedad periodontal del adulto. A pesar de incluir pacientes fumadores en el estudio, fueron capaces de

encontrar diferencias significativas (147,148).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que hay suficiente documentación capaz de evidenciar una fuerte relación entre los individuos genotipo positivo para los genes de la IL-1 y una sobreproducción de IL-1 β en FGC. Así mismo, la relación entre los individuos genotipo positivo para el gen de la IL-1 y la presencia de la enfermedad periodontal, también dispone de una contrastada evidencia científica.

■ ***Pacientes genotipo positivo para los genes de la IL-1 y una mayor presencia de bacterias y patógenos asociados con la enfermedad periodontal activa.***

Socransky y col., estudiaron durante muchos años el papel que desempeñaban determinadas bacterias en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Identificaron grupos específicos de bacterias que se encontraban en conjunto en la progresión de la enfermedad periodontal. Las

especies bacterianas más comúnmente asociadas al progreso de la enfermedad periodontal las denominaron *complejos rojo y naranja*.

En un estudio más reciente, se encontró que los individuos genotipo positivo para el gen de la IL-1, presentaban valores mayores de los complejos rojo y naranja que los individuos genotipo negativo (149). Las bacterias pertenecientes a los complejos rojo y naranja, dependen de los productos titulares para crecer y multiplicarse. Una posible explicación a esta asociación, puede ser que las bacterias de estos complejos son capaces de activar el proceso inflamatorio dentro de los tejidos. Y por lo tanto en aquellos individuos genotipo positivo para el gen de la IL-1 se puede encontrar con una exagerada inflamación y sangrado, proveyendo nutrientes extra para el crecimiento de los patógenos.

■ ***Pacientes genotipo positivo para los genes de la IL-1 y su peor respuesta al tratamiento periodontal y a la osteointegración de los implantes.*** McGuire y Nunn, realizaron un estudio en una población de pacientes que habían sido sometidos a un mantenimiento periodontal por un periodo de tiempo de entre 5 y 14 años. Evaluaron las causas de la pérdida dentaria, pero éstas fueron evaluadas tras el tratamiento periodontal completo y durante las fases de mantenimiento. Los investigadores sólo encontraron dos factores significativos capaces de predecir la pérdida dentaria: por un lado el ser genotipo positivo para el gen de la IL-1 y por otro, el ser un paciente gran fumador (más de 40 paquetes/año). El poseer un genotipo positivo para el gen de la IL-1, incrementó el riesgo de pérdida dentaria en 2.7, mientras que el ser un paciente gran fumador (más de 40 paquetes/año) lo incrementó en 2.9. Además, aquellos pacientes que siendo grandes fumadores presentaron un genotipo positivo para el gen de la IL-1, el riesgo de pérdida

dentaria se incrementó hasta un 7.7. El resto de parámetros clínicos tradicionalmente usados para determinar el pronóstico de un diente, sólo fue válido para pacientes genotipo negativo para el gen de la IL-1 y que además fuesen no fumadores (150).

Lang y colaboradores realizaron un estudio en una población de pacientes en mantenimiento periodontal. A los 323 pacientes del estudio, se les practicó un examen periodontal que incluía mediciones de profundidad de sondaje y de zonas sangrantes tras el sondaje. Además se les tomó una muestra sanguínea para determinar su genotipo para el gen de la IL-1A y de la IL-1B. Dentro del grupo de pacientes no fumadores, se encontraron diferencias significativas ($p=0.03$) entre los individuos genotipo positivo para el gen de la IL-1 y un incremento en las zonas sangrantes tras el sondaje. De hecho, los pacientes genotipo negativo para el gen de la IL-1 presentaban un 50%

menos de zonas sangrantes tras el sondaje. Concluyen que el aumento de zonas sangrantes tras el sondaje en sujetos genotipo positivo, indica que aquellos individuos presentan una respuesta inflamatoria genéticamente predeterminada, la cual se observa en la respuesta clínica de los tejidos periodontales (151).

En otro estudio, se evaluaron los resultados obtenidos tras el empleo de técnicas quirúrgicas de regeneración tisular guiada en zonas con pérdida de inserción periodontal. En ninguno de los 40 pacientes tratados con cirugía, se detectó diferencias significativas en cuanto a los resultados clínicos después del primer año de tratamiento. Transcurridos cuatro años de la cirugía de regeneración, los pacientes que presentaron un genotipo negativo para el gen de la IL-1, manifestaron un 73% de zonas estables tras el tratamiento (se pierde menos de 1mm de inserción clínica), en cambio, los pacientes que presentaron un genotipo positivo para el gen

de la IL-1, manifestaron tan sólo un 21.4% de zonas estables tras el tratamiento de regeneración (152).

Actualmente los implantes dentales se han convertido en una parte integral de la periodoncia y la odontología restauradora. Sin embargo, a pesar de las recientes publicaciones acerca de la predictibilidad de los tratamientos con implantes, existen muy pocos estudios relacionando la influencia de la genética con el éxito de los implantes.

En uno de estos estudios, investigaron la relación existente entre diferentes factores tales como: el genotipo de la IL-1, el hábito de fumar y la edad. Con la supervivencia de los implantes en relación con su osteointegración. Se compararon 27 pacientes que habían perdido 33 implantes, o al menos perdido un 50% de hueso alrededor del mismo, con 38 pacientes sin pérdida ósea o de implantes. Se demostró que el tabaco incrementaba el riesgo de pérdida de implantes en al menos 2.5. Por el contrario, no se detectaron

diferencias significativas en los otros dos factores que se estudiaron, ni la edad, ni el tener genotipo positivo para los genes de la IL-1 incrementaban el riesgo de pérdida de implantes (153).

Rogers y colaboradores, en un estudio más reciente, tampoco encontraron diferencias significativas entre pacientes de raza caucásiana con genotipo positivo para la IL-1A (-899) y para la IL-1B (+3953) y una mayor riesgo de pérdida de implantes (154).

En otro estudio cuyos objetivos se centraban en: 1) investigar la relación entre el polimorfismo específico del gen de la IL-1 y la pérdida ósea periimplantaria en implantes dentales ITI®. 2) explorar la asociación entre ésta variación alélica del gen de la IL-1 y la inflamación periimplantaria de la mucosa. En una población con individuos fumadores y no fumadores. Sugirieron que en aquellos pacientes con un gran hábito de fumar y que además

presentaban polimorfismo positivo del gen de la IL-1, se les asoció un mayor riesgo de sufrir pérdida ósea peri-implantaria después de la rehabilitación protésica y durante las fases de mantenimiento periodontal (155).

■ ***Pacientes genotipo positivo para los genes de la IL-1. Su prevalencia.*** Con respecto a la frecuencia en la aparición de polimorfismos genéticos, existen numerosos estudios capaces de afirmar que el polimorfismo del gen de la IL-1, se distribuye de manera similar en la mayoría de las poblaciones. Siendo aproximadamente el 30% de la población caucasiana, quien presenta este tipo de polimorfismo genético.

Como hemos descrito anteriormente, Kornman (128) considera a un individuo “**genotipo positivo**” para el gen de la IL-1, cuando posee al menos un polimorfismo (alelo 2) en uno de sus dos alelos para el gen de la IL-1A y al menos un polimorfismo (alelo 2) en uno de sus dos alelos para el gen de la IL-1B.

Partiendo de este concepto, podemos afirmar que la prevalencia de individuos genotipo positivos en una población Norte-Europea es de un 29.1% (128).

Así mismo, la prevalencia en una población suiza es del 35.3% (151). Muy similar al de una población italiana, donde se encontró una prevalencia del 35% (152).

En lo que respecta a la población norte-americana se han encontrado diferentes resultados según cada estudio, McGuire y colaboradores, encontraron una prevalencia del 38% (150), Engebrestson y colaboradores del 29% (144), mientras que McDevitt y colaboradores, encontraron una prevalencia del 34% (146).

Mientras en la población hispana, la prevalencia de individuos genotipo positivos es del 26% (156). Mientras que dentro de la población griega es del 40% (157).

Como se puede observar, la prevalencia del polimorfismo compuesto de los genes de la IL-1A y la IL-1B, es muy similar entre las distintas poblaciones de raza caucásica. Sin embargo, esta homogeneidad se ve alterada en otras etnias. Varios ejemplos de esta discrepancia, se contemplan en la población china, afro-americana y tailandesa.

Armitage y col. (158), encontraron que la prevalencia de individuos genotipo positivos dentro de una población china era del 2.3%. Así mismo, Anusaksathien y col., encontraron una prevalencia del 1.6% en una población tailandesa (159). Esta cifra es muy similar a la encontrada por Armitage.

Los resultados encontrados por Walker y col., demostraron otra discrepancia con la raza caucásica.

Siendo la prevalencia de individuos genotipo positivos dentro de una población Afro-Americana del 15% (160).

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO

1. Determinar la concentración de IL-1 β en el fluido gingival crevicular, en el grupo de pacientes con enfermedad periodontal y en el grupo control de individuos sanos.
2. Comparar los niveles de IL-1 β en el fluido gingival crevicular entre los dos grupos de estudio. Un grupo de casos (pacientes con enfermedad periodontal) y un grupo de controles (sin enfermedad periodontal).
3. Encontrar posibles asociaciones y/o correlaciones entre la concentración de IL-1 β en el fluido gingival crevicular y algunos parámetros clínicos periodontales (sangrado al sondaje, profundidad de la bolsa...), en ambos grupos del estudio.
4. Determinar el genotipo de la IL-1A y el de la IL-1B, en el grupo de pacientes con enfermedad periodontal y en el grupo de pacientes sanos.
5. Comparar el genotipo de la IL-1A y el de la IL-1B entre los dos grupos de estudio.
6. Relacionar las concentraciones de IL-1 β en el fluido gingival crevicular con el genotipo para el gen de la IL-1 entre los dos grupos que integran el estudio.
7. Identificar la prevalencia de individuos que presentan el polimorfismo del gen de la IL-1 en una población española.

III. PACIENTES Y MÉTODOS

III.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Nuestra investigación se puede describir como un estudio observacional, transversal y retrospectivo. Por tanto el diseño del estudio coincide con el modelo de Casos y Controles. Comprende una población de 50 individuos, agrupados en dos grupos de 25 sujetos: un grupo de enfermos periodontales y otro de control, sanos.

A los pacientes se les solicitó que rellenasen un historial médico y dental, en el que figuraban datos de filiación, edad, sexo, raza, hábitos, lugar de nacimiento suyo y de sus progenitores y otros datos de interés. Así mismo, se les entregó una hoja de consentimiento informado, sobre la que se les explicó y se les requirió que diesen su conformidad, en el caso de estar de acuerdo con la investigación que se iba a realizar.

Los pacientes que reunieron los criterios necesarios para entrar a formar parte del estudio, fueron sometidos a un estudio periodontal

completo, al cual se le añadió la toma de muestras de IL-1 β del fluido gingival crevicular. Posteriormente se procedió a determinar la cantidad y concentración de IL-1 β con la ayuda de unos kits de “Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay” (E-LISA). Todos estos procesos se realizaron en el Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Posteriormente los pacientes fueron conducidos a la Unidad Coronaria de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, para la extracción de una muestra sanguínea, con la cual obtener una analítica general del paciente. Parte de esta muestra sanguínea nos sirvió para obtener el ADN necesario para determinar el genotipo de los genes de la IL-1A e IL-1B. Estos pasos se realizaron en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

III.2 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Las personas que integraron nuestro estudio, fueron seleccionadas a partir de pacientes consecutivos que reunían los criterios de inclusión, pertenecientes al Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. El tamaño muestral del estudio se constituyó con 50 pacientes divididos en dos grupos de 25 personas cada uno. En función de los criterios de inclusión, que más adelante se expondrán, los pacientes formaron parte de un grupo de enfermos periodontales o de un grupo de pacientes sanos (control).

El grupo de paciente con enfermedad periodontal activa, estuvo formado por 12 hombres y 13 mujeres con enfermedad periodontal del adulto de grado moderada-severa. Sus edades se comprendían entre los 25 y 50 años (media $n = 41.96 \pm 8.31$). Los pacientes eran de raza caucásica y nacidos en España, al igual que sus progenitores.

El grupo de pacientes control, estuvo formado por 12 hombres y 13 mujeres sanos, con ausencia de gingivitis y enfermedad periodontal. Sus edades se comprendían entre los 25 y 47 años (media $n = 36.56 \pm 6.75$). Los pacientes eran de raza caucásica y nacidos en España, al igual que sus progenitores.

■ Criterios de inclusión (comunes a los dos grupos):

1. Pacientes con edades comprendidas entre 25-60 años.
2. Pacientes de cualquiera de los dos sexos.
3. Pacientes de raza caucásica y nacidos en España, al igual que sus progenitores.
4. Pacientes no fumadores (no haber fumado nunca, o al menos llevar 5 años sin fumar).
5. Aceptar y firmar el consentimiento informado.
6. Presentar al menos 20 piezas permanentes en boca, excluyendo los terceros molares. Debía de existir al menos un molar y un premolar en cada uno de los cuadrantes.

■ **Criterios de exclusión (comunes a los dos grupos):**

1. Padecer enfermedades sistémicas como: VIH, diabetes, hepatitis, desordenes inmunitarios, problemas de coagulación, etc.
2. Ser fumador
3. En el caso de ser mujeres, no estar embarazadas, ni en periodo de lactancia o recibiendo tratamiento hormonal femenino.
4. No tomar medicamentos de forma crónica: inmunosupresores, AINES, antidiabéticos, antibióticos, etc.
5. No haber tomado antiinflamatorios, antibióticos en los últimos 6 meses antes del comienzo del estudio.
6. No aceptar firmar el consentimiento informado.

■ **Criterios de inclusión (grupo control):**

7. Ausencia de enfermedad periodontal. Determinada, por la ausencia de bolsas periodontales, de pér-

dida de inserción y de reabsorción ósea.

8. Ausencia de signos de gingivitis. Un nivel de sangrado al sondaje $\leq 15\%$.
9. Pérdida de inserción en todas las piezas dentales $\leq 2\text{mm}$.
10. Profundidad de sondaje en todas las piezas dentales $\leq 3\text{mm}$.

■ **Criterios de inclusión (grupo con enfermedad periodontal):**

1. Pacientes con enfermedad periodontal crónica de grado moderada-severa; debían presentar al menos dos dientes por cada cuadrante con una pérdida de inserción de $\geq 5\text{mm}$ y sangrado al sondaje.
2. Evidencia radiográfica de pérdida ósea de al menos un 30%.
3. No haber recibido tratamiento periodontal en el último año, ni estar en un programa de mantenimiento periodontal.

III.3 OBTENCIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICOS.

Con el objetivo de identificar a todos aquellos pacientes que pudieran reunir los criterios de inclusión de nuestro estudio, se les entregó un documento donde se recopilaron los aspectos más importantes referentes a la historia médica y dental de cada uno de los pacientes que acudían al Máster de Periodoncia de la Facultad de Odontología. Los pacientes que superaron los criterios médicos y dentales, pasaron a la toma de registros, de los siguientes parámetros clínicos:

1. **Profundidad de sondaje:** definida por la distancia en mm comprendida entre el margen gingival libre de la encía y el fondo de la bolsa (la sonda se introduce hasta el comienzo del tejido conectivo).

2. **Recesión gingival:** definida por la distancia en mm comprendida entre el margen gingival libre de la encía y la línea amelocementaria (LAC), que es la unión entre el

esmalte de la corona y el cemento de la raíz.

3. **Pérdida de inserción:** definida por la suma algebraica de la profundidad de sondaje y la recesión gingival.

4. **Movilidad dentaria:** definida por la movilidad que presenta el diente en mm, tras ejercer fuerzas horizontales con dos instrumentos rígidos contrapuestos. Se clasificó en: movilidad 0 = no presenta movilidad, movilidad I = presenta una movilidad horizontal menor a 1 mm, movilidad II = presenta una movilidad horizontal mayor a 1 mm y movilidad III = presenta movilidad vertical (intrusión).

5. **Presencia de furca:** definida por el grado de exposición de furca de aquellos dientes con 2 o más raíces. Se clasificó en: clase I = la sonda se introduce menos de 2 mm en la furca, clase II = la sonda se introduce más de 2 mm en la furca y clase III = la sonda atraviesa por completo la furca.

6. **Índice de placa dental:** se registra como una variable dicotómica, presencia o ausencia de placa. Se calcula como la cantidad de superficies con placa, multiplicada por 100 y dividida por el número total de superficies.

7. **Índice de sangrado al sondaje:** se registra como una variable dicotómica, presencia o ausencia de sangrado al sondaje. Se calcula como la cantidad de superficies con sangrado, multiplicada por 100 y dividida por el número total de superficies. Una vez que se sonda la superficie, se espera entre 15 – 30 segundos para registrar el sangrado.

El registro de todos estos parámetros clínicos, así como la toma de muestras de IL-1 β del fluido gingival crevicular, fue realizado por un único profesional.

Para el registro de todos los parámetros clínicos se empleó una sonda periodontal calibrada de 3 mm

en 3 mm. Se tomaron 6 registros para todos los parámetros clínicos, a excepción de la presencia de furca y movilidad. Estos registros se realizaron en las superficies: mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual y disto-lingual de cada diente.

III.4 RECOGIDA DE MUESTRAS DE IL-1 β EN (FGC) Y SU RECUENTO.

Después de haber registrado los parámetros clínicos de todos los pacientes, se dispuso de la suficiente información para conocer los que reunían los criterios de inclusión de nuestro estudio. En aquellos pacientes que cumplían con los requisitos, se procedió a explicarles la hipótesis y objetivos del estudio, y se les hizo entrega de un consentimiento informado para su aprobación.

■ *Recogida de la muestra de IL-1 β en (FGC):*

En el momento justo antes de tomar la muestra de IL-1 β , se retiró la placa y el cálculo supragingival, para facilitar la entrada de la tira de papel en el surco gingival.

Dentro del grupo de pacientes sanos se tomaron dos muestras de IL-1 β . La superficie mesiovestibular de los primeros molares superiores (izquierdo y derecho) fue la localización elegida para la obtención de cada una de ellas. En aquellos casos donde el primer molar superior estuvo ausente, la muestra se tomó de la pieza más próxima a este molar. La elección de estas localizaciones se debió a que en la mayoría de enfermos periodontales, la ubicación de bolsas profundas se encuentra en los sectores posteriores. Y que al tomar las muestras en piezas de la arcada superior, se evita en mayor medida la contaminación por saliva. Además, las localizaciones mesiovestibulares facilitan la entrada de las tiras de papel.

Dentro del grupo de pacientes con enfermedad periodontal, también se tomaron dos muestras de IL-1 β . Las localizaciones elegidas fueron aquellas que presentaron una mayor profundidad al sondaje junto con signos de actividad de la enfermedad. Al tratarse de un estudio transversal no se pudo reevaluar al paciente y determinar como zona activa aquella que experimentase una nueva pérdida de inserción > 2 mm, por ello sólo nos pudimos ayudar del signo clínico “sangrado al sondaje” para detectar la actividad de la enfermedad. Por lo tanto, se tomó una muestra de la bolsa activa de mayor profundidad de la arcada superior izquierda y otra muestra de la bolsa activa de mayor profundidad de la arcada superior derecha.

Antes de tomar la muestra del FGC se aisló la zona, para ello nos ayudamos de unas torundas de algodón. Con el eyector de saliva colocado en la boca del paciente, procedimos a aplicar aire con la jeringa del equipo, el tiempo de apli-

cación no fue superior a 5 segundos y con una angulación casi paralela al eje longitudinal del diente. Es importante no desecar el surco gingival; si esto sucede, debemos esperar unos 30 segundos a que se vuelva a embeber de los componentes que se encuentran en el fluido gingival crevicular (Fig.12).



(Figura 12)

Una vez aislada la zona, se tomó una tira de papel precortada, estéril (Harco electronics, Tustin, CA. USA.) y se colocó en el lector del periotron 8000 (Harco electronics, Irving, CA. USA.). Este lector debe estar siempre seco y descon-taminado. Incluso, entre una muestra y la siguiente se deberá limpiar y secar perfectamente (Fig.13).



(Figura 13)

La primera tira de papel siempre deberá calibrarse, para ello nos servimos de la rueda de calibración del periotrón, ajustando a cero la cifra de la pantalla digital (Fig.14).



(Figura 14)

El periotrón 8000 (Harco electronics, Irving, CA. USA.), también requirió de una calibración

previa. El procedimiento empleado para la calibración del periotrón fue descrito por González y col. (133). Para ello, se emplearon tiras de papel mojadas con suero humano y agua destilada. Estas tiras se mojaban con unos volúmenes conocidos ($0.1 \mu\text{l}$ – $0.8 \mu\text{l}$), una vez colocadas en el lector del periotrón, se anotaban los datos numéricos que aparecían en la pantalla digital. Como siempre, antes de empezar a medir las tiras con suero, se calibró el periotrón a cero con una tira de papel seca. Con todos los datos del periotrón y los volúmenes conocidos de suero, se construyó la curva de calibración del periotrón, que nos sirvió posteriormente para determinar las concentraciones de las proteínas que deseamos cuantificar.

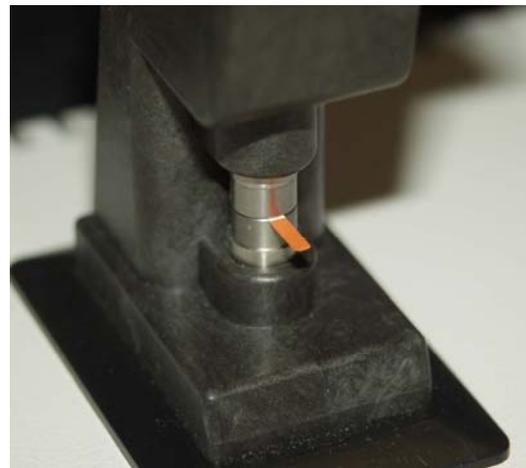
Después de haber calibrado la tira de papel, ésta se introdujo en el interior del surco (angulación aproximada de 45° respecto a la corona del diente) hasta percibir una suave resistencia. Se esperaron 30 segun-

dos y se retiró la tira de papel (Fig.15).



(Figura 15)

Posteriormente se volvió a depositar la tira de papel en el lector del periotrón (las tiras de papel contaminadas con saliva o sangre, fueron desechadas), el cual nos facilitó una cifra referente al volumen de la muestra (en unidades de periotrón) que fue registrada en la ficha del paciente (Fig.16).



(Figura 16)

Posteriormente, se introdujo la tira de papel en un tubo eppendorf estéril con filtro, que previamente había sido rotulado con un código específico (Fig.17) y (Fig.18).



(Figura 17)

Todas las muestras se ubicaron en una caja de corcho llena de hielo, transportándose de esta manera al laboratorio de la Facultad de Odontología, donde fueron almacenadas a -70°C para su posterior recuento (Fig.19).

El procedimiento empleado para la obtención de las muestras de IL-1 β en (FGC) fue descrito por Gonzáles y col. (133).



(Figura 18)



(Figura 19)

■ **Recuento de la IL-1 β :**

Una vez reunida la totalidad de las muestras, se procedió a determinar la cantidad de IL-1 β que había en cada una de ellas. Para ello nos servimos de la ayuda de tres kits de ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay). El kit empleado, fue el Bio-Source Internacional, Inc. Human Interleukin-1 Beta (IL-1 β) Carmarillo, CA. USA. Los pasos que se siguieron fueron los indicados por el

fabricante, para ello, nos servimos de las instrucciones que venían en cada uno de los kits.

En primer lugar, se tomó del kit un bote de 25 ml que contenía el buffer de disolución estándar. Con la ayuda de una micropipeta, vertimos 200 μ l del buffer en cada uno de los tubos eppendorf. Con ello conseguimos eluir la proteína (IL-1 β) de las tiras de papel. La disolución se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los eppendorf se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos (Fig.20).



(Figura 20)

Al centrifugarse, la solución atravesó los filtros del eppendorf, y se procedió a desechar tanto los filtros

como las tiras de papel que ya no contenían ningún resto de proteína (Fig.21).



(Figura 21)

Se extrajo del kit la plataforma que contenía en su interior 96 pocillos para el análisis de las muestras. Las dos primeras columnas se utilizaron para elaborar la curva patrón del kit, vertiendo cantidades conocidas de IL-1 β . En los demás pocillos, se vertieron 50 μ l de cada muestra en dos pocillos contiguos.

A estos 50 μ l de muestra, se añadieron 100 μ l de anticuerpo IL-1 β . Todos los pocillos se cubrieron con un papel biofilm y se dejaron reposar durante 2 horas. Transcurrido este tiempo los pocillos se lavaron y aspiraron al menos 4 veces

con una solución limpiadora. Posteriormente se secaron y se añadieron 100 μ l de una solución de streptavidin-peroxidasa, dejándose incubar durante 30 minutos. Se volvieron lavar y aspirar los pocillos 4 veces, y se añadieron 25 μ l de cromógeno estabilizador, dejándose incubar por 25 minutos en un lugar oscuro y a temperatura ambiente.

Finalmente se añadieron 100 μ l de una solución destinada a parar la reacción; los pocillos cambiaron de color azul a amarillento (*Fig.22*).



(Figura 22)

La tabla de pocillos se transportó al lugar donde se encontraba el espectrofotómetro y se procedió a su lectura a una longitud de onda de 450 nm.

III.5 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA Y EXTRACCIÓN DEL ADN.

Una vez registrados los parámetros clínicos y haber tomado las muestras de fluido gingival crevicular, se citó al paciente una semana más tarde con el fin de acompañarlo a su extracción sanguínea.

■ **Obtención de la muestra Sanguínea.** Siete días después de haber sido diagnosticado al paciente y antes de comenzar sus sesiones de raspado y alisado radicular, se le solicitó que acudiese por la mañana a su primera cita de tratamiento media hora antes de comenzar el tratamiento y en ayunas. Se le acompañó a la Unidad de Cardiología de la Facultad de Medicina de la UCM, donde se le extrajeron al paciente 10 ml de sangre. La muestra sanguínea se empleó para realizar una analítica del paciente, necesaria para determinar los valores de los componentes sanguíneos. Con ello se confirmaba

que los pacientes no debían padecer ninguna enfermedad sistémica. Por otro lado la muestra sanguínea se empleó para la extracción del ADN a partir células nucleadas.

■ **Extracción del ADN.** Todo el proceso de extracción del ADN, así como la detección de posibles polimorfismos genéticos en los genes de la IL-1, fueron realizados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid El método seguido, fue fundamentalmente, el descrito por Miller y colaboradores (162). Para la extracción del ADN de células nucleadas, se necesitaron una serie de reactivos químicos:

1. Tampón de lisis: compuesto por 10 mM de Tris-HCl (trizma base), 400 mM de NaCl (cloruro sódico) y 2 mM de EDTA. Para nuestro estudio se necesitó un volumen de aproximadamente 150

ml. La solución se ajustó a un pH = 8.2

2. SDS 10% (Lauril sulfato): El volumen de disolución aproximado fue de 10 ml.

3. Proteinasa K: a una concentración de 20 mg/ml. El volumen de disolución aproximado fue de 8 ml.

4. NaCl 6M: (solución saturada), un volumen aproximado de 50 ml.

Para extraer la serie blanca de la sangre, se emplearon tubos de 5ml con sangre de cada paciente. Los tubos se centrifugaron a una temperatura de 4°C, a una velocidad de 2000 rpm y por un tiempo de 5 minutos. Se tomaron nuevos tubos estériles de 5 ml, en los que se depositaron: 3 ml de tampón de lisis, 200 µl de SDS al 10% y 150 µl de solución de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml. A esta mezcla, se le añadió la serie blanca de la sangre centrifugada. Y se dejó incubar toda la noche a una temperatura de 37°C (Fig.23).



(Figura 23)

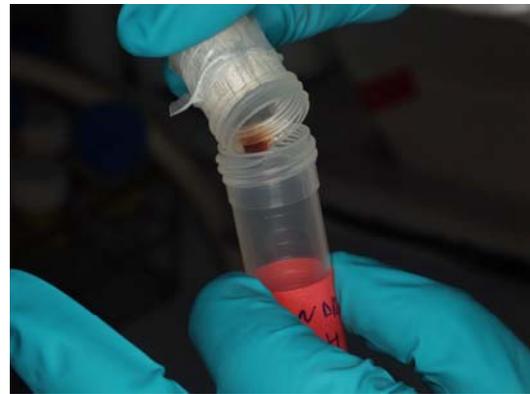
A la mañana siguiente se procedió a extraer el ADN, añadiendo 1 ml de cloruro sódico y se agitó vigorosamente durante 15 segundos (Fig.24).



(Figura 24)

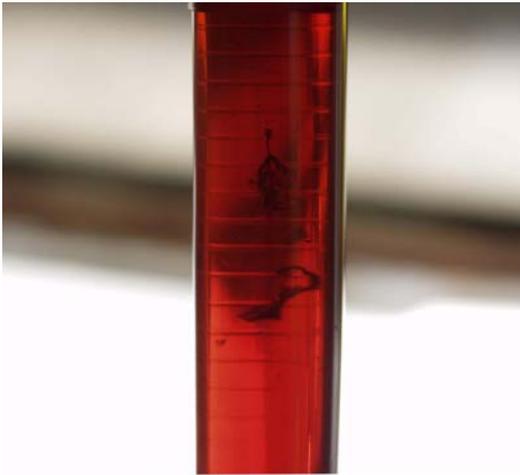
Se centrifugó a una velocidad de 2500 rpm, una temperatura de 4°C y un tiempo de 15 minutos. Con la

ayuda de las micropipetas recogió y recolectó el ácido nucleico que se encontraba en la parte superior del tubo, las proteínas sobrantes que se hallaban en la parte inferior y de consistencia semisólida se desecharon (Fig.25).

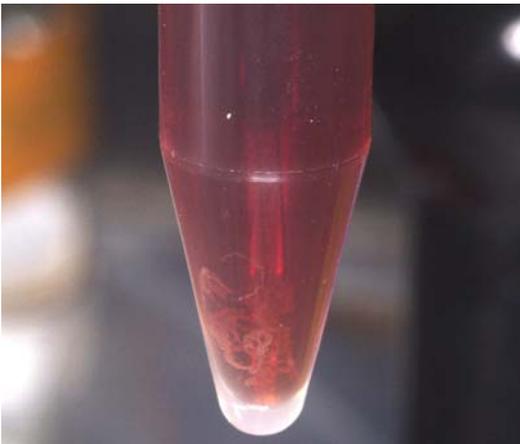


(Figura 25)

Posteriormente se procedió a medir el volumen de ácido nucleico extraído, y se depositó en un nuevo tubo estéril de 15 ml. A este tubo, se añadió el doble del volumen obtenido de alcohol absoluto. Se mezclaron las disoluciones hasta que el ADN precipitó (aparecen unas hebras en suspensión); (Fig.26) y (Fig.27)



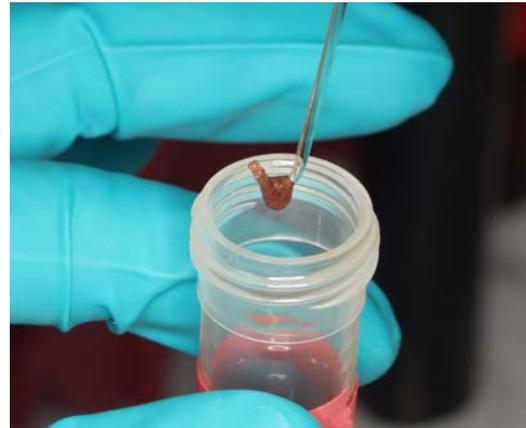
(Figura 26)



(Figura 27)

en el caso de que no aparezcan las hebras, se deja la disolución toda la noche en reposo a una temperatura de 4°C.

A continuación, con la ayuda de una sonda de cristal se capturaron las hebras que se encontraban suspendidas en el tubo (Fig.28).



(Figura 28)

Posteriormente se procedió a resuspender las hebras de ADN en unos tubos eppendorf estériles, a los cuales se había añadido 200 µl de agua estéril. Una vez recolectado el ADN en los eppendorf, se dejaron reposar durante dos horas a una temperatura de 37°C. Este periodo de tiempo fue suficiente para su disolución antes de proceder a su determinación cuantitativa (Fig.29).



(Figura 29)

Pasado este tiempo se guardaron las muestras de ADN en el congelador a una temperatura de -70°C hasta su posterior estudio.

III.6 DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO EN LOS GENES DE LA IL-1A Y DE LA IL-1B.

En estudios anteriores, los investigadores buscaban la presencia de polimorfismos en el locus (-889) del gen de la IL-1A y en el locus (+3953) del gen de la IL-1B. Actualmente, se ha demostrado una concordancia del 100% entre el antiguo locus (-889) y el locus actual (+4845) del gen de la IL-1A (161), siendo esta localización mucho más sencilla para la identificación de cualquier polimorfismo. En lo que respecta al locus (+3953) del gen de la IL-1B, en la actualidad se denomina locus (+3954). Esto se debe a la nueva renumeración acor-

dada por la comunidad científica, quien ha decidido que el comienzo de la transcripción sea a partir de la cifra +1, y no de cero que era como estaba establecida antiguamente.

■ *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):*

Las disoluciones, tampones y enzimas empleadas para la amplificación de los genes a estudiar, fueron:

- *Disolución de nucleótidos.*

Contiene los 4 desoxinucleótidos fosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) a una concentración de $10\ \mu\text{M}$.

- *Disolución de cloruro de magnesio.* La concentración de MgCl_2 es de $25\ \mu\text{M}$.

- *Tampón de reacción PCR.* Tris-HCL $100\ \mu\text{M}$, pH 8.3 y KCL $500\ \mu\text{M}$.

- *Disolución de cebadores (primers).* Cada disolución contiene un cebador a una concentración de $10\ \mu\text{M}$.

- *Amplitaq Gold* (Perkin Elmer®). Se conserva en un buffer especial; Tris-HCL 20 µM, pH 9.0, KCL 100 µM, EDTA 0.1 µM, DTT 1 µM, Tween 20 ® 0.5% y glycerol 50%.

Los cebadores, utilizados para amplificar las 50 muestras de cada uno de los pacientes fueron:

▀ **Para IL-1A (+4845)** descritos por Walker (162)

Dir. 5'-ATG GTT TTA GAA ATC ATC AAG CCT AGG GCA -3'

Inv. 5' -AAT GAA AGG AGG GGA GGA TGA CAG AAA TGT -3'

▀ **Para IL-1B (+3954)** descritos por Kornman (128).

Dir. 5' -CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA -3'

Inv. 5' -GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG -3'

La mezcla de reacción se introduce en un tubo de ensayo especial para PCR de 0.2 ml de capacidad. La disolución tendrá un volumen final de 50 µl y contendrá

lo siguiente: tampón de reacción PCR 5 µl; disolución de DNTPs, 1 µl; enzima Taq polimerasa, 1 µl y agua 41 µl. Los volúmenes de las disoluciones de los cebadores y las concentraciones de MgCl₂ dependieron de las condiciones del programa y de la clase de enzima utilizada. En todas las series de ensayos se utilizó un tubo en blanco que contenía todas las sustancias de la reacción salvo el cebador y que fue sometido a los mismos procesos que los de las muestras. Se llevan los tubos de PCR al aparato de amplificación (Fig.35) y se depositan en los pocillos específicos para los tubos de PCR (Fig.36), introducimos el programa de amplificación específico y se espera a que finalice.

El programa de amplificación para la PCR consistió en los siguientes pasos o etapas:

▀ **Para IL-1A (+4845)** descritos por Walker (162)

1^a. Temperatura: 95°C. Tiempo: 10 min con la Taq polimerasa de

Perkin Elmer®. Proceso: Inicio de la desnaturalización de la doble hélice de ADN.

Las etapas 2^a, 3^a y 4^a se repitieron durante 35 ciclos.

2^a. Temperatura: 94°C. Tiempo: 30 sg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de ADN en el proceso cíclico.

3^a. Temperatura: 53°C. Tiempo: 30 sg. Proceso: Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de ADN.

4^a. Temperatura: 74°C. Tiempo: 30 sg. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo.

5^a. Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final.

6^a. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞
Proceso: Mantenimiento.



(Figura 36)



(Figura 35)

Para *IL-1B* (+3954) descritos por Kornman (128).

1^a. Temperatura: 95°C. Tiempo: 10 min con la Taq polimerasa de *Perkin Elmer*®. Proceso: Inicio de la desnaturalización de la doble hélice de ADN.

Las etapas 2^a, 3^a y 4^a se repitieron durante 38 ciclos.

2^a. Temperatura: 95°C. Tiempo: 30 sg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de ADN en el proceso cíclico.

3^a. Temperatura: 50°C. Tiempo: 30 sg. Proceso: Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de ADN.

4^a. Temperatura: 74°C. Tiempo: 30 sg. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo.

5^a. Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final.

6^a. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞
Proceso: Mantenimiento.

Si no se procede a observar el resultado de la amplificación en el momento de finalización del programa, el producto de PCR, se puede almacenar a una temperatura de -20°C.

■ **Análisis electroforético.** El procedimiento seguido ha sido descrito por Sambrook y colaboradores (163). Las disoluciones y tampones utilizados han sido:

- *Tampón TAE:* Tris-acetato pH 9.1, 40 µM y EDTA, 1 µM.

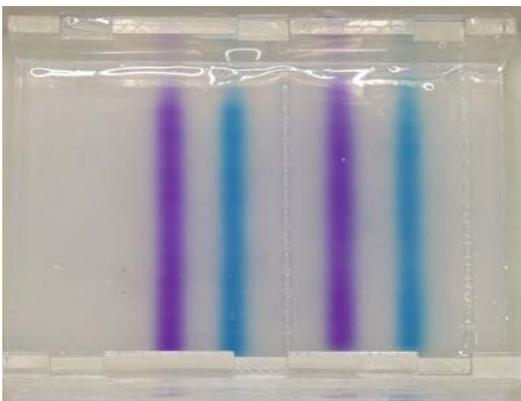
- *Tampón de muestra:* Azul de bromofenol, 0.25%; Xilencianol,

0.25%, Glicerol 30% en agua destilada.

- *Disolución de bromuro de etidio:* Se disuelve 1gr de bromuro de etidio en agua agitando durante varias horas. La disolución se debe guardar al amparo de la luz y a temperatura ambiente.

Para la preparación de los geles de agarosa se disuelven 2ml de TAE en 98 ml de agua y se mezclan con una cantidad de agarosa que varía según el tamaño de los fragmentos de ADN que se deseen visualizar. En nuestro caso, se preparó agarosa al 0.8% para visualizar la cantidad y calidad del ADN extraído de cada uno de los pacientes. Agarosa al 1.5% para visualizar el resultado de la amplificación del producto de PCR y confirmar el tamaño de la banda obtenida. Y por último se preparó agarosa al 3% para visualizar el resultado de la digestión enzimática.

La mezcla se calienta a 60°C, preferentemente en un horno microondas, hasta que la agarosa se haya disuelto, y, después de esperar unos minutos a que la temperatura descienda aproximadamente a 45°C, se agregan 3 µl de la disolución de bromuro de etidio, se agita y se vierte lentamente sobre el molde con el peine incorporado. Una vez solidificado el gel, éste se introduce en la cámara de electroforesis, se agrega el buffer de electroforesis hasta cubrir el gel (aproximadamente 1 mm) y se colocan las muestras de ADN en los pocillos de carga previamente diluidas con 1-2 µl de tampón de muestra.



(Figura 30)

Posteriormente se cubre con la tapa la cámara electroforética y se conectan los electrodos de la fuente de alimentación. Se aplica un voltaje de 90 V/cm y el proceso se da por finalizado cuando la mancha correspondiente al azul de bromofenol emigra cerca del borde del gel (aproximadamente 30 min) (Fig.31).



(Figura 31)

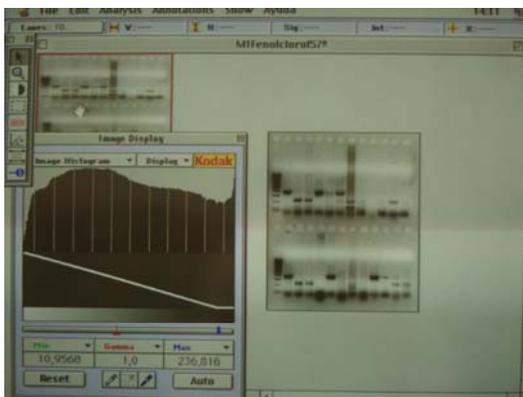


(Figura 32)

Los geles se examinan a la luz ultravioleta donde se visualizan los fragmentos de ADN y, generalmente se fotografían (Fig.33) y (Fig.34).



(Figura 33)



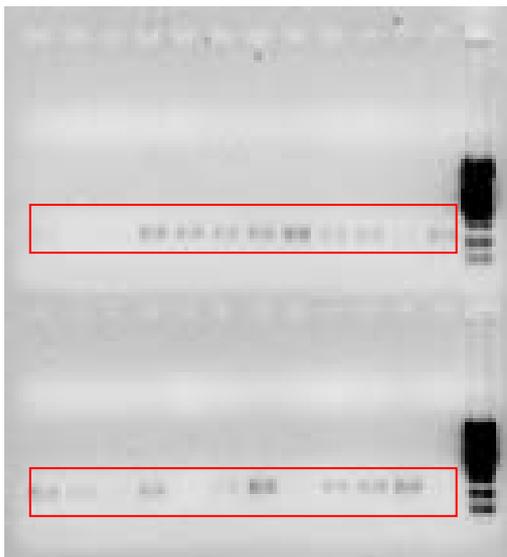
(Figura 34)

■ **Marcadores de tamaño de fragmentos de DNA:**

- λ -Hind III. Es un marcador que se utiliza para visualizar frag-

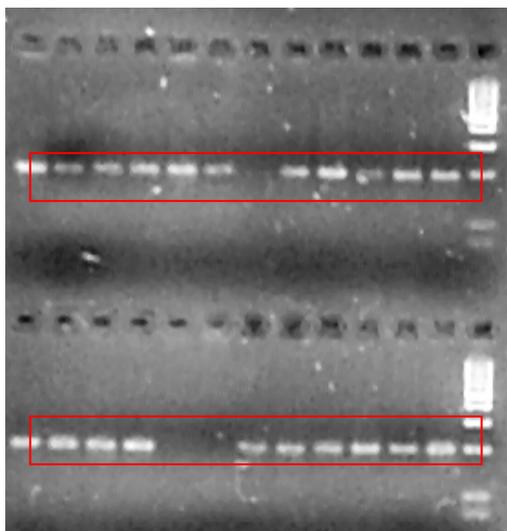
mentos de ADN con tamaños superiores a 500 pb. Para ello se toman 20 μ l de DNA del fago λ , 1.5 μ l de tampón de la enzima de restricción, 2 μ l de la enzima Hind III y se añaden 23 μ l de agua destilada. La disolución se mantiene a 37°C hasta la completa digestión, añadiéndose a continuación 300 μ l de agua destilada y 50 μ l de tampón de carga. El preparado se puede almacenar a -20°C hasta su utilización.

- *Ladder-100TM*. Es un marcador que se utiliza para visualizar fragmentos de ADN de tamaños superiores a 100pb. La preparación es una mezcla de fragmentos de ADN cuyo tamaño se diferencia en 100 pb. La cantidad de fragmento del tamaño de 800 pb es el doble que el del resto, para facilitar la identificación de fragmentos de ADN de tamaño igual o superior.



(Figura 35)

En la (Fig.35) podemos observar el resultado de la amplificación por PCR del gen IL-1A en un gel de agarosa al 1.5%.



(Figura 36)

En la (Fig.36) podemos observar el resultado de la amplifica-

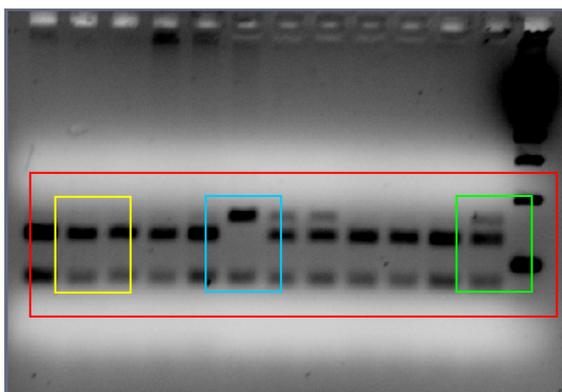
ción por PCR del gen IL-1B en un gel de agarosa al 1.5%. En la hilera superior se colocaron las muestras de pacientes controles y en la inferior de pacientes con enfermedad periodontal. El marcador empleado fue el *Ladder-100TM*.

■ *Digestión enzimática de los genes de la IL-1:*

Las enzimas de restricción que se emplearon fueron las siguientes:

■ **Para IL-1A (+4845):** se empleó la **Fnu 4H1** endonucleasa de restricción. Una vez realizada la PCR para el gen de la IL-1A (+4845), se tomaron 26 μ l de producto de PCR que se mezclaron con una “*premix*” que contenía: 0.5 μ l de la enzima Fnu 4H1 y 3 μ l de Buffer (4) a 10x. Todo junto se centrifugó y se incubó a 37°C por un tiempo de 2 horas. Las muestras se almacenaron a -20°C cuando no se procedió a su visualización inmediata.

Los fragmentos que se pueden observar son: dos fragmentos de 124 pb y 29 pb en sujetos homocigóticos para el alelo “1” (*Fig.37 recuadro amarillo*), 1 sólo fragmento de 153 pb en sujetos homocigóticos para el alelo “2” (*Fig.37 recuadro azul*) y los tres fragmentos en sujetos heterocigóticos alelo “1 y 2” (*Fig.37 recuadro verde*).

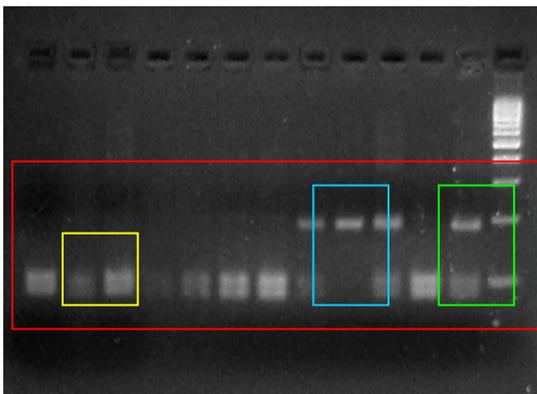


(Figura 37)

En la (*Fig.37*) podemos observar el resultado de la digestión enzimática del producto de PCR del gen IL-1A en un gel de agarosa al 3%. En este caso se corresponde con muestras del grupo con enfermedad periodontal.

■ **Para IL-1B (+3954):** se empleó la **Taq1** endonucleasa de restricción. Una vez realizada la PCR para el gen de la IL-1B (+3954), se tomaron 25.5 µl de producto de PCR que se mezclaron con una “*premix*” que contenía: 0.5 µl de la enzima Taq1, 1 µl BSA a 10x y 3 µl de Buffer NEB (3) a 10x. Todo junto se centrifugó y se incubó a 65°C por un tiempo de 2 horas. Las muestras se almacenaron a -20°C cuando no se procedió a su visualización inmediata.

Los fragmentos que se pueden observar son: 2 fragmentos de 97 pb y 85 pb en sujetos homocigóticos para el alelo “1” (*Fig.37 recuadro amarillo*), 1 sólo fragmento de 182 pb en sujetos homocigóticos para el alelo “2” (*Fig.37 recuadro azul*) y los 3 fragmentos en sujetos heterocigóticos alelo “1 y 2” (*Fig.37 recuadro verde*).



(Figura 38)

En la (Fig.38) podemos observar el resultado de la digestión enzimática del producto de PCR del gen IL-1B en un gel de agarosa al 3%. En este caso se corresponde con muestras del grupo control.

III.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se realizó en el Departamento de Apoyo a la Investigación de los Servicios Informáticos de la Universidad Complutense de Madrid. El programa estadístico SPSS 12.0 de Microsoft fue el empleado para el manejo de datos.

Se emplearon test estadísticos no paramétricos, tras comprobar que los dos grupos del estudio no se ajustaban a los criterios de normalidad. La prueba de normalidad empleada fue la de Kolmogorov-Smirnov.

Para correlacionar las variables cuantitativas entre si, se empleó el test de correlación Rho de Spearman. Y para correlacionar una variable cuantitativa con otra cualitativa, se emplearon las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, dependiendo del número de categorías que posea la variable cualitativa a estudiar. A continuación se utilizó el chi-cuadrado como estadístico de contraste.

IV. RESULTADOS

IV.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

Nuestro estudio comprende dos grupos de 25 individuos cada uno. Un **grupo control** y otro **grupo con enfermedad periodontal (EP)**. De acuerdo al tamaño de nuestra muestra, se procedió a realizar pruebas de ajuste a la normalidad entre ambos grupos para poder emplear test estadísticos paramétricos.

La prueba de normalidad empleada, fue la de Kolmogorov-Smirnov *Tabla 1*. Observándose una significación estadística, con lo cual se demuestra que nuestra población de estudio no presenta una distribución normal que se ajuste a la campana de Gauss. Por tanto todos los test estadísticos que se emplearon fueron, test no paramétricos.

Tabla 1. Pruebas de normalidad.

VARIABLES	GRUPO	Kolmogorov-Smirnov (a)			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
[IL-1 β] izq	1 EP	.217	25	.004	.916	25	.042
	2 CONTROL	.170	25	.061	.862	25	.003
[IL-1 β] dch	1 EP	.184	25	.028	.908	25	.028
	2 CONTROL	.181	25	.034	.897	25	.016
BOLSA izq	1 EP	.317	25	.000	.838	25	.001
	1 EP	.384	25	.000	.571	25	.000
SANGRADO	1 EP	.074	25	.200(*)	.978	25	.841
	2 CONTROL	.116	25	.200(*)	.954	25	.302
PLACA	1 EP	.123	25	.200(*)	.921	25	.053
	2 CONTROL	.114	25	.200(*)	.960	25	.422
EDAD	1 EP	.102	25	.200(*)	.971	25	.677
	2 CONTROL	.114	25	.200(*)	.952	25	.278

(*) Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a Corrección de la significación de Lilliefors

b BOLSA izq, es una constante cuando Grupo = 2 CONTROL y se ha desestimado.

c BOLSA dch, es una constante cuando Grupo = 2 CONTROL y se ha desestimado.

■ **Variables cuantitativas.** En las tablas 2, 3 y 4, se muestran las variables: concentración de la proteína IL-1 β en FGC (pg/ μ l) tomada en la bolsa periodontal derecha [IL-1 β] dch e izquierda [IL-1 β] izq,

profundidad de sondaje registrada en milímetros de la bolsa periodontal derecha e izquierda, sangrado al sondaje (ausencia/presencia), índice de placa (ausencia/presencia) y edad media de los pacientes. Podemos

Tabla 2. Frecuencias de ambos grupos

	N		Media	Error típ. de la media	Mediana	Desv. típ.
	Válidos	Perdidos				
[IL-1 β] izq	50	0	3.23320	.343221	2.57500	2.426939
[IL-1 β] dch	50	0	3.20014	.332769	2.51250	2.353030
BOLSA izq	50	0	4.60	.242	4.00	1.714
BOLSA dch	50	0	4.62	.257	4.00	1.817
SANGRADO	50	0	41.430	4.9928	28.600	35.3045
PLACA	50	0	42.412	5.3038	22.950	37.5036
EDAD	50	0	39.26	1.128	38.50	7.974

Tabla 3. Frecuencias del Grupo EP

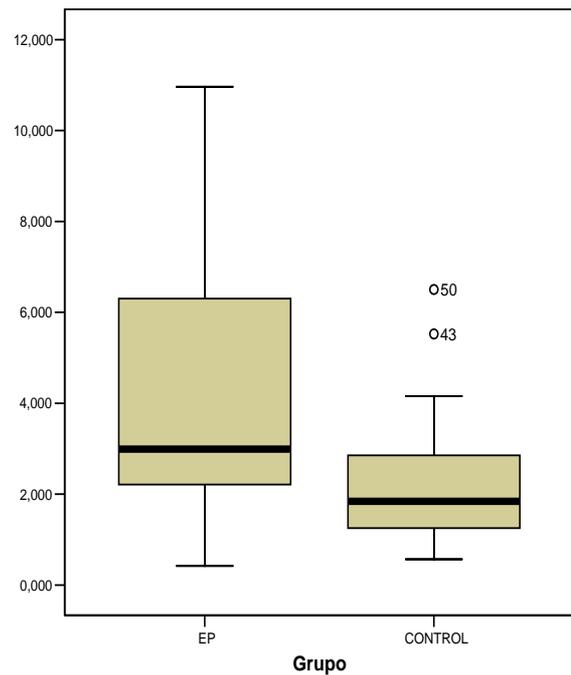
	N		Media	Error típ. de la media	Mediana	Desv. típ.
	Válidos	Perdidos				
[IL-1 β] izq	25	0	4.16176	.569145	2.99100	2.845727
[IL-1 β] dch	25	0	4.02016	.561400	2.83000	2.806999
BOLSA izq	25	0	6.20	.163	6.00	.816
BOLSA dch	25	0	6.24	.226	6.00	1.128
SANGRADO	25	0	74.692	3.0030	74.800	15.0152
PLACA	25	0	77.068	3.7844	78.100	18.9218
EDAD	25	0	41.96	1.663	43.00	8.314

Tabla 4. Frecuencias del Grupo Control

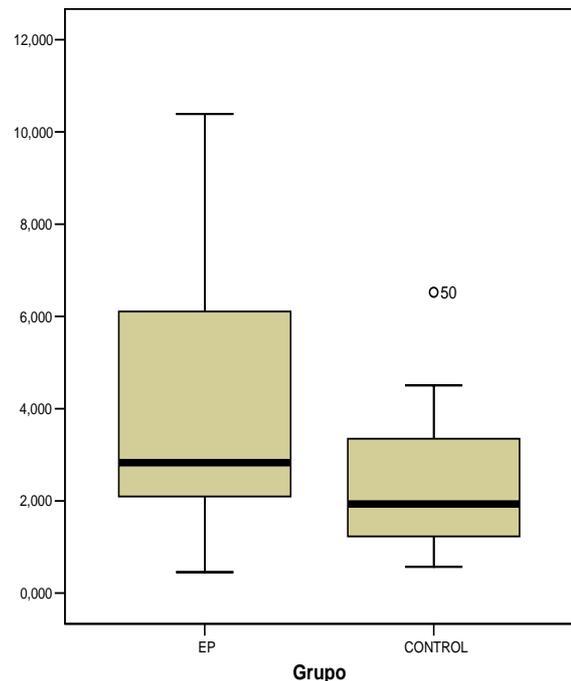
	N		Media	Error típ. de la media	Mediana	Desv. típ.
	Válidos	Perdidos				
[IL-1 β] izq	25	0	2.30464	.291961	1.84300	1.459803
[IL-1 β] dch	25	0	2.38012	.284538	1.93300	1.422692
BOLSA izq	25	0	3.00	.000	3.00	.000
BOLSA dch	25	0	3.00	.000	3.00	.000
SANGRADO	25	0	8.168	.7582	8.100	3.7912
PLACA	25	0	7.756	.6769	7.300	3.3845
EDAD	25	0	36.56	1.349	36.00	6.746

observar que la concentración media tomada de la bolsa derecha no difiere al de la bolsa izquierda dentro del mismo grupo. Sin embargo, la concentración media es aproximadamente el doble en el grupo con enfermedad periodontal. La profundidad media de las bolsas, el sangrado al sondaje y el índice de placa presentan unas claras diferencias entre ambos grupos, éstas se deben a los criterios de inclusión y exclusión del estudio. La edad media del grupo con enfermedad periodontal es ligeramente superior al del grupo control.

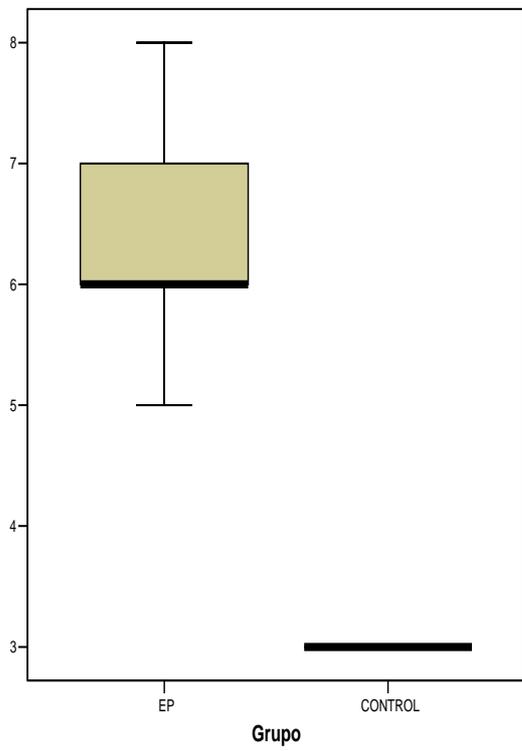
Las gráficas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 muestran la distribución de las variables cuantitativas tanto en el grupo control como en el grupo EP. Los datos pequeños que se observan en algunas gráficas, representan valores perdidos que no se incluyen en la representación.



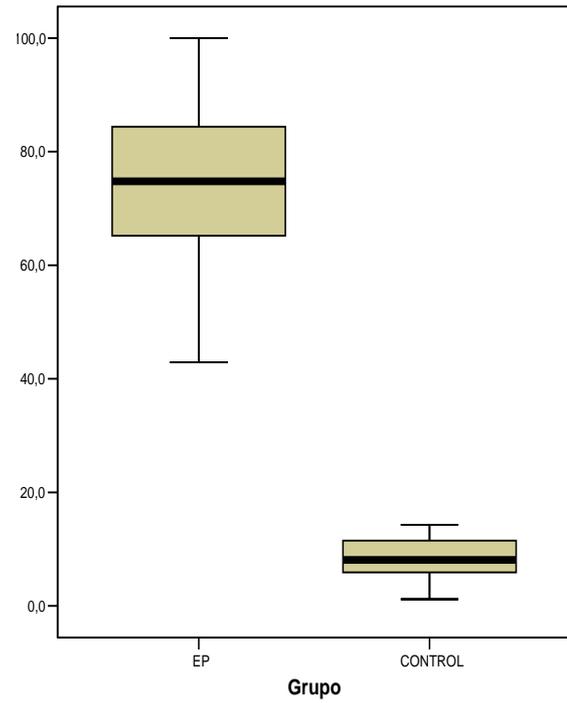
Gráfica 1. Distribución de la [IL-1 β] izq



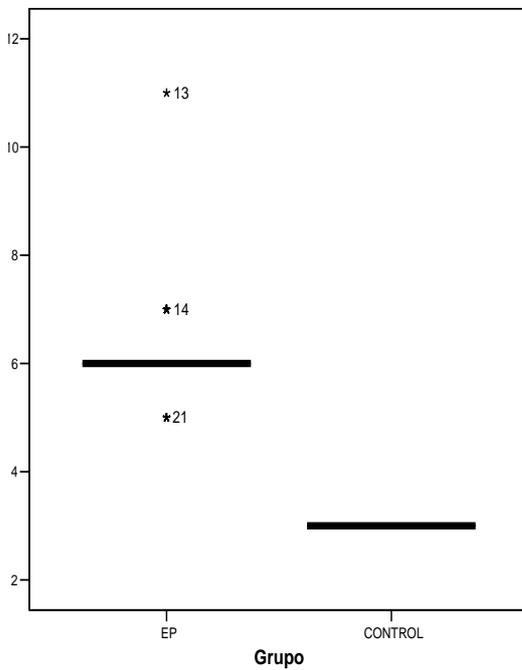
Gráfica 2. Distribución de la [IL-1 β] dch



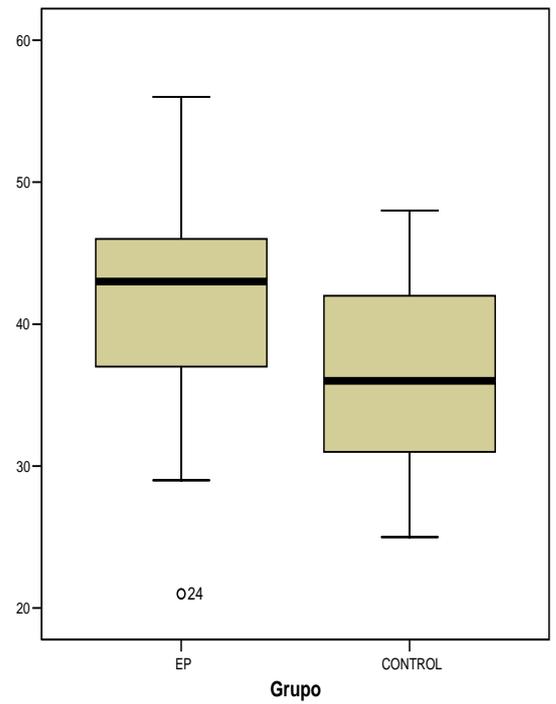
Gráfica 3. Distribución de la Bolsa izq



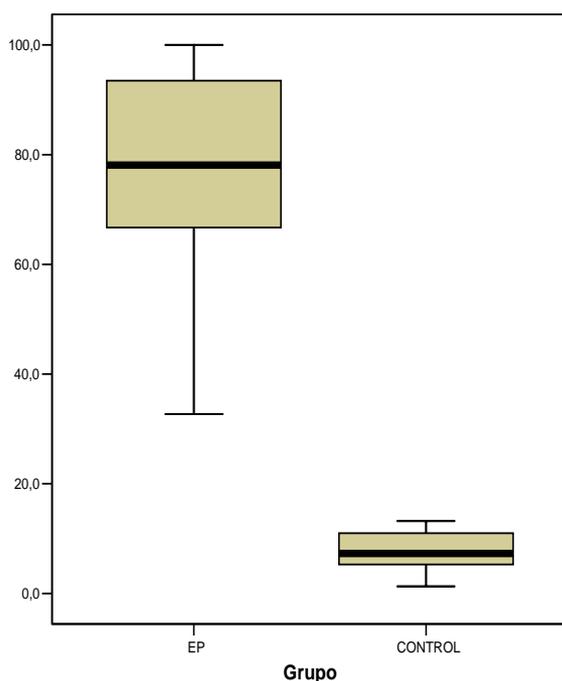
Gráfica 5. Distribución del sangrado



Gráfica 4. Distribución de la Bolsa dch



Gráfica 6. Distribución de la edad



Gráfica 7. Distribución de la placa

■ **Variables cualitativas.** Las tablas 5, 6, 7, 8, 9 y 10 nos describen las variables: **sexo** (varón o mujer), **genotipo de la IL-1A** (1,1: homocigótico para el alelo 1, no existe polimorfismo), (1,2: heterocigótico, existe polimorfismo en uno de los dos alelos), (2,2: homocigótico para el alelo 2, existe polimorfismo en los dos alelos

del gen), **genotipo de la IL-1B** (1,1: homocigótico para el alelo 1, no existe ningún polimorfismo), (1,2: heterocigótico, existe polimorfismo en uno de los dos alelos), (2,2: homocigótico para el alelo 2, existe polimorfismo en los dos alelos del gen), **genotipo de la IL-1A** (expresado en **alelo 1**: cuando no existe ningún polimorfismo y **alelo 2**: cuando existe al menos un polimorfismo en uno de los dos alelos del gen), **genotipo de la IL-1B** (expresado en **alelo 1**: cuando no existe ningún polimorfismo y **alelo 2**: cuando existe al menos un polimorfismo en uno de los dos alelos del gen) y **genotipo positivo (positivo (+))**: cuando existe al menos un polimorfismo en uno de los dos alelos del gen IL-1A y además, existe al menos un polimorfismo en uno de los dos alelos del gen IL-1B. **negativo (-)**: cuando no se cumple lo anterior.

Tabla 5. Distribución según el sexo para ambos grupos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	M	26	52.0	52.0	52.0
	V	24	48.0	48.0	100.0
	Total	50	100.0	100.0	

Tabla 6. Distribución según el genotipo del gen IL-1A para ambos grupos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1.1	27	54.0	54.0	54.0
	1.2	18	36.0	36.0	90.0
	2.2	5	10.0	10.0	100.0
	Total	50	100.0	100.0	

Tabla 7. Distribución según alelo 1 o alelo 2 del gen IL-1A para ambos grupos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Alelo 1	27	54.0	54.0	54.0
	Alelo 2	23	46.0	46.0	100.0
	Total	50	100.0	100.0	

Tabla 8. Distribución según el genotipo del gen IL-1B para ambos grupos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1.1	28	56.0	56.0	56.0
	1.2	20	40.0	40.0	96.0
	2.2	2	4.0	4.0	100.0
	Total	50	100.0	100.0	

Tabla 9. Distribución según alelo 1 o alelo 2 del gen IL-1B para ambos grupos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Alelo 1	28	56.0	56.0	56.0
	Alelo 2	22	44.0	44.0	100.0
	Total	50	100.0	100.0	

Tabla 10. Distribución según genotipo positivo o negativo para ambos grupos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	negativo	32	64.0	64.0	64.0
	positivo	18	36.0	36.0	100.0
	Total	50	100.0	100.0	

La *Tabla 5* nos muestra que el porcentaje de hombres y mujeres es muy similar en ambos grupos, por lo que el sexo no influirá en los resultados del estudio. Una vez analizados los datos obtenidos en las *tablas 6 y 8*, observamos que el porcentaje de individuos heterocigóticos para el polimorfismo del gen IL-1A es muy similar al de los individuos heterocigóticos para el polimorfismo del gen IL-1B. Por el contrario, cuando analizamos los individuos homocigóticos para el polimorfismo, observamos que el gen IL-1A presenta más del doble de individuos que el que presenta el gen IL-1B. Además en la *tabla 10* se contempla que el porcentaje de individuos genotipo positivo, es menor que el de aquellos con polimorfismo en tan sólo uno de los genes. Concluyendo que el presentar un polimorfismo en el gen IL-1A, no implica el presentarlo en el gen IL-1B.

IV.2 ESTADÍSTICA ANALÍTICA

Comparaciones entre los dos grupos. En las siguientes tablas y gráficas, se compararon las variables entre los dos grupos, con el objetivo de encontrar alguna diferencia significativa. El nivel de significación aceptado fue el de $p < 0.05$, con el cual la probabilidad de que las diferencias observadas sean debidas al azar corresponden a un 5%. En la *Tabla 11* se observan las variables cuantitativas de los dos grupos del estudio. Y en la *Tabla 12* se muestra la prueba estadística empleada para determinar el grado de significación. En este caso, la U de Mann-Whitney fue la prueba seleccionada. Se pueden observar las diferencias significativas que existen en todas las variables cuantitativas estudiadas de ambos grupos.

Tabla 11. Variables cuantitativas de ambos grupos

	Grupo	N	Rango promedio	Suma de rangos
[IL-1 β] izq	1 EP	25	30.48	762.00
	2 CONTROL	25	20.52	513.00
	Total	50		
[IL-1 β] dch	1 EP	25	29.76	744.00
	2 CONTROL	25	21.24	531.00
	Total	50		
BOLSA izq	1 EP	25	38.00	950.00
	2 CONTROL	25	13.00	325.00
	Total	50		
BOLSA dch	1 EP	25	38.00	950.00
	2 CONTROL	25	13.00	325.00
	Total	50		
SANGRADO	1 EP	25	38.00	950.00
	2 CONTROL	25	13.00	325.00
	Total	50		
PLACA	1 EP	25	38.00	950.00
	2 CONTROL	25	13.00	325.00
	Total	50		
EDAD	1 EP	25	30.46	761.50
	2 CONTROL	25	20.54	513.50
	Total	50		

Tabla 12. Prueba estadística entre ambos grupos

	[IL-1 β] izq	[IL-1 β] dch	BOLSA izq	BOLSA dch	SANGRADO	PLACA	EDAD
U de Mann-Whitney	188.000	206.000	.000	.000	.000	.000	188.500
W de Wilcoxon	513.000	531.000	325.000	325.000	325.000	325.000	513.500
Z	-2.416	-2.066	-6.570	-6.634	-6.065	-6.065	-2.411
Sig. asintót. (bilateral)	.016	.039	.000	.000	.000	.000	.016
Sig. exacta (bilateral)	.015	.039	.000	.000	.000	.000	.015
Sig. exacta (unilateral)	.008	.019	.000	.000	.000	.000	.008
Probabilidad en el punto	.000	.001	.000	.000	.000	.000	.000

Anteriormente, se ha señalado que las diferencias estadísticamente significativas que se han encontrado entre los dos grupos respecto a las variables: profundidad de la bolsa, índice de sangrado e índice de placa, son debidas a los criterios de inclusión y exclusión propuestos para este estudio. Por el contrario, las diferencias encontradas en las *tablas 11 y 12* en cuanto a la concentración de IL-1 β tanto en la surco derecho como en el izquierdo fueron estadísticamente significativas, registrándose los valores más altos en el grupo con enfermedad periodontal.

También se observaron diferencias estadísticamente significativas según la edad, siendo los pacientes de mayor edad los que presentaron mayor prevalencia de la enfermedad periodontal. En la *Tabla 13* se comparan los resultados obtenidos entre los dos grupos respecto al sexo. Y en la *Tabla 14* se observa la prueba estadística empleada, que en este caso fue el Chi-cuadrado de Pearson. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo entre ambos grupos.

Tabla 13. Distribución en cuanto al sexo de ambos grupos

			SEXO		Total
			M	V	
Grupo	1 EP	Recuento	13	12	25
		% de Grupo	52.0%	48.0%	100.0%
	2 CONTROL	Recuento	13	12	25
		% de Grupo	52.0%	48.0%	100.0%
Total		Recuento	26	24	50
		% de Grupo	52.0%	48.0%	100.0%

Tabla 14. Prueba estadística entre ambos grupos

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.000(b)	1	1.000		
N de casos válidos	50				

En la *Tabla 15* se equiparon los datos para el genotipo IL-1A de los dos grupos (expresado en **1,1; 1,2 y 2,2**). Y en la *Tabla 16* se muestra el resultado de la prueba estadística empleada, el Chi-cuadrado de Pearson. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al genotipo IL-1A entre ambos grupos. Sin embargo en el grupo control, se hallaron los porcentajes más elevados

de polimorfismos. En la *Tabla 17* se exponen los datos respecto al genotipo IL-1A de los dos grupos (expresado en **alelo 1 y alelo 2**). Y en la *Tabla 18* se indica el la prueba estadística empleada, el Chi-cuadrado de Pearson. Como anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al genotipo IL-1A entre ambos grupos.

Tabla 15. Distribución respecto al genotipo IL-1A de ambos grupos

			IL-1A			Total
			1.1	1.2	2.2	
Grupo	1 EP	Recuento	16	7	2	25
		% de Grupo	64.0%	28.0%	8.0%	100.0%
	2 CONTROL	Recuento	11	11	3	25
		% de Grupo	44.0%	44.0%	12.0%	100.0%
Total		Recuento	27	18	5	50
		% de Grupo	54.0%	36.0%	10.0%	100.0%

Tabla 16. Prueba estadística entre ambos grupos

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.015(a)	2	.365
N de casos válidos	50		

Tabla 17. Distribución respecto al genotipo IL-1A de ambos grupos

			IL-1A		Total
			Alelo 1	Alelo 2	
Grupo	1 EP	Recuento	16	9	25
		% de Grupo	64.0%	36.0%	100.0%
	2 CONTROL	Recuento	11	14	25
		% de Grupo	44.0%	56.0%	100.0%
Total		Recuento	27	23	50
		% de Grupo	54.0%	46.0%	100.0%

Tabla 18. Prueba estadística entre ambos grupos

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.013(b)	1	.156		
Corrección por continuidad(a)	1.288	1	.256		
N de casos válidos	50				

En la *Tabla 19* presentan los datos para el genotipo IL-1B de los dos grupos (expresado en **1,1; 1,2 y 2,2**). Y en la *Tabla 20* se muestra el resultado de la prueba estadística empleada, el Chi-cuadrado de Pearson. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al genotipo IL-1B entre ambos grupos. Sin embargo en el grupo control, se volvieron a hallar los porcentajes más

elevados de polimorfismos. En la *Tabla 21* se equiparon los datos para el genotipo IL-1B de los dos grupos (expresado en **alelo 1 y alelo 2**). Y en la *Tabla 22* se indica la prueba estadística empleada, el Chi-cuadrado de Pearson. Como anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al genotipo IL-1A entre ambos grupos.

Tabla 19. Distribución respecto al genotipo IL-1B de ambos grupos

			IL-1B			Total
			1.1	1.2	2.2	
Grupo	1 EP	Recuento	16	8	1	25
		% de Grupo	64.0%	32.0%	4.0%	100.0%
	2 CONTROL	Recuento	12	12	1	25
		% de Grupo	48.0%	48.0%	4.0%	100.0%
Total		Recuento	28	20	2	50
		% de Grupo	56.0%	40.0%	4.0%	100.0%

Tabla 20. Prueba estadística entre ambos grupos

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.371(a)	2	.504
N de casos válidos	50		

Tabla 21. Distribución respecto al genotipo IL-1B de ambos grupos

		IL-1B			Total
		Alelo 1	Alelo 2		
Grupo	1 EP	Recuento	16	9	25
		% de Grupo	64.0%	36.0%	100.0%
	2 CONTROL	Recuento	12	13	25
		% de Grupo	48.0%	52.0%	100.0%
Total		Recuento	28	22	50
		% de Grupo	56.0%	44.0%	100.0%

Tabla 22. Prueba estadística entre ambos grupos

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.299(b)	1	.254		
Corrección por continuidad(a)	.731	1	.393		
Razón de verosimilitud	1.305	1	.253		
Estadístico exacto de Fisher				.393	.197
Asociación lineal por lineal	1.273	1	.259		
N de casos válidos	50				

En la *Tabla 23* se exponen los datos del genotipo positivo de los dos grupos (expresado en **genotipo positivo si** y **genotipo positivo no**). Y en la *Tabla 24* se indica la prueba estadística empleada, el Chi-cuadrado de Pear-

son. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al genotipo positivo entre ambos grupos. Sin embargo, en el grupo control, se halló el mayor porcentaje de genotipo positivo.

Tabla 23. Distribución respecto al genotipo positivo de ambos grupos

			Genotipo Positivo		Total
			no	si	
Grupo	1 EP	Recuento	17	8	25
		% de Grupo	68.0%	32.0%	100.0%
	2 CONTROL	Recuento	15	10	25
		% de Grupo	60.0%	40.0%	100.0%
Total		Recuento	32	18	50
		% de Grupo	64.0%	36.0%	100.0%

Tabla 24. Prueba estadística entre ambos grupos

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.347(b)	1	.556		
N de casos válidos	50				

■ **Correlaciones.** Se ha estudiado la posible correlación entre las concentraciones de IL-1 β en FGC y las demás variables analizadas. La *Tabla 25* muestra las correlaciones entre las concentraciones de IL-1 β en FGC y las variables cuantitativas: bolsas, sangrado, placa y edad en ambos grupos. La prueba estadística empleada fue la correlación Rho de Spearman. Se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre: [IL-1 β] izq y [IL-1 β] dch ($r = 0.945$, $p < 0.001$), [IL-1 β] izq y sangrado ($r = 0.321$,

$p < 0.023$), [IL-1 β] dch y bolsa dch ($r = 0.337$, $p < 0.017$), [IL-1 β] dch y sangrado ($r = 0.302$, $p < 0.033$), bolsa dch y bolsa izq ($r = 0.882$, $p < 0.001$), bolsa izq y sangrado ($r = 0.862$, $p < 0.001$), bolsa izq y placa ($r = 0.827$, $p < 0.001$), bolsa izq y edad ($r = 0.376$, $p < 0.007$), bolsa dch y sangrado ($r = 0.822$, $p < 0.001$), bolsa dch y placa ($r = 0.798$, $p < 0.001$), bolsa dch y edad ($r = 0.404$, $p < 0.004$), sangrado y placa ($r = 0.890$, $p < 0.001$), sangrado y edad ($r = 0.441$, $p < 0.004$), placa y edad ($r = 0.425$, $p < 0.002$).

Tabla 25. Correlación Rho de Spearman entre IL-1 β en FGC y las bolsas periodontales, sangrado, placa y edad en ambos grupos .

			[IL-1 β] izq	[IL-1 β] dch	BOLSA izq	BOLSA dch	SANGRADO	PLACA	EDAD
Rho de Spearman	[IL-1 β] izq	Coeficiente de correlación		.945(**)	.269		.321(*)	.256	.142
		Sig. (bilateral) N		.000 50	.059 50		.023 50	.073 50	.325 50
	[IL-1 β] dch	Coeficiente de correlación	.945(**)			.337(*)	.302(*)	.235	.187
		Sig. (bilateral) N	.000 50			.017 50	.033 50	.101 50	.194 50
	BOLSA izq	Coeficiente de correlación	.269			.882(**)	.862(**)	.827(**)	.376(**)
		Sig. (bilateral) N	.059 50			.000 50	.000 50	.000 50	.007 50
	BOLSA dch	Coeficiente de correlación		.337(*)	.882(**)		.822(**)	.798(**)	.404(**)
		Sig. (bilateral) N		.017 50	.000 50		.000 50	.000 50	.004 50
	SAN-GRADO	Coeficiente de correlación	.321(*)	.302(*)	.862(**)	.822(**)		.890(**)	.441(**)
		Sig. (bilateral) N	.023 50	.033 50	.000 50	.000 50		.000 50	.001 50
	PLACA	Coeficiente de correlación	.256	.235	.827(**)	.798(**)	.890(**)		.425(**)
		Sig. (bilateral) N	.073 50	.101 50	.000 50	.000 50	.000 50		.002 50
	EDAD	Coeficiente de correlación	.142	.187	.376(**)	.404(**)	.441(**)	.425(**)	
		Sig. (bilateral) N	.325 50	.194 50	.007 50	.004 50	.001 50	.002 50	

La *Tabla 26* muestra la correlación entre las concentraciones de IL-1 β en FGC y el sexo de ambos grupos. Y en la *Tabla 27* se indica la prueba estadística empleada para encontrar diferencias estadísticamente significa-

tivas, esta fue la U. de Mann-Whitney. No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa cuando se estudiaron ambos grupos juntos. La *Tabla 28* expresa la correlación entre las concentraciones de IL-1 β en FGC

y el genotipo IL-1A (expresado en **1,1; 1,2 y 2,2**) en ambos grupos. Y en la *Tabla 29* se muestra el resultado de la prueba estadística empleada, Kruskal-Wallis. No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa cuando se estudiaron ambos grupos juntos. La *Tabla 30* muestra la correlación entre las concentraciones

de IL-1 β en FGC y el genotipo IL-1A (expresado en **alelo 1 y alelo 2**) en ambos grupos. Y en la *Tabla 31* se indica el resultado de la prueba estadística empleada, U. de Mann-Whitney. No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa cuando se estudiaron ambos grupos juntos.

Tabla 26. Correlación entre [IL-1 β] y el sexo en ambos grupos

	SEXO	N	Rango promedio
[IL-1 β] izq	V	24	29.42
	M	26	21.88
	Total	50	
[IL-1 β] dch	V	24	29.21
	M	26	22.08
	Total	50	

Tabla 27. Prueba estadística entre ambos grupos

	[IL-1 β] izq	[IL-1 β] dch
U de Mann-Whitney	218.000	223.000
W de Wilcoxon	569.000	574.000
Z	-1.825	-1.728
Sig. asintót. (bilateral)	.068	.084
Sig. exacta (bilateral)	.069	.086
Sig. exacta (unilateral)	.035	.043

Tabla 28. Correlación entre [IL-1 β] y el genotipo IL-1A en ambos grupos

	IL-1A	N	Rango promedio
[IL-1 β] izq	11	27	25.74
	12	18	24.61
	22	5	27.40
	Total	50	
[IL-1 β] dch	11	27	25.96
	12	18	24.56
	22	5	26.40
	Total	50	

Tabla 29. Prueba estadística entre ambos grupos

	Pr_IL1b_Iz	Pr_IL1b_Dr
Chi-cuadrado	.159	.122
gl	2	2
Sig. asintót.	.923	.941

La *Tabla 32* muestra la correlación entre las concentraciones de IL-1 β en FGC y el genotipo IL-1B (expresado en 1,1; 1,2 y 2,2) en ambos grupos. Y en la *Tabla 33* se indica el resultado de la prueba estadística empleada, Kruskal-Wallis. No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa cuando se estudiaron ambos grupos juntos.

Tabla 30. Correlación entre [IL-1 β] y el genotipo IL-1A en ambos grupos

	IL-1A	N	Rango promedio
[IL-1 β] izq	Alelo 1	27	25.74
	Alelo 2	23	25.22
	Total	50	
[IL-1 β] dch	Alelo 1	27	25.96
	Alelo 2	23	24.96
	Total	50	

Tabla 32. Correlación entre [IL-1 β] y el genotipo IL-1B en ambos grupos

	IL-1B	N	Rango promedio
[IL-1 β] izq	11	28	25.89
	12	20	25.20
	22	2	23.00
	Total	50	
[IL-1 β] dch	11	28	25.89
	12	20	25.00
	22	2	25.00
	Total	50	

La *Tabla 34* expresa la correlación entre las concentraciones de IL-1 β en FGC y el genotipo IL-1B (expresado en alelo 1 y alelo 2) en ambos grupos. Y en la *Tabla 35* se indica el resultado de la prueba estadística empleada, U. de Mann-Whitney. No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa cuando se estudiaron ambos grupos juntos.

Tabla 31. Prueba estadística entre ambos grupos

	[IL-1 β] izq	[IL-1 β] dch
U de Mann-Whitney	304.000	298.000
W de Wilcoxon	580.000	574.000
Z	-.127	-.243
Sig. asintót. (bilateral)	.899	.808
Sig. exacta (bilateral)	.908	.817
Sig. exacta (unilateral)	.454	.408

Tabla 33. Prueba estadística entre ambos grupos

	Pr_IL1b_Iz	Pr_IL1b_Dr
Chi-cuadrado	.088	.046
gl	2	2
Sig. asintót.	.957	.977

La *Tabla 36* muestra la correlación entre las concentraciones de IL-1 β en FGC y el genotipo positivo (expresado en **genotipo positivo si** y **genotipo positivo no**) en ambos gru-

pos. Y en la *Tabla 37* se muestra el resultado de la prueba estadística empleada, U. de Mann-Whitney. No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa cuando se estudiaron ambos grupos juntos.

Tabla 34. Correlación entre [IL-1 β] y el genotipo IL-1B en ambos grupos

	IL-1B	N	Rango promedio
[IL-1 β] izq	Alelo 1	28	25.89
	Alelo 2	22	25.00
	Total	50	
[IL-1 β] dch	Alelo 1	28	25.89
	Alelo 2	22	25.00
	Total	50	

Tabla 35. Prueba estadística entre ambos grupos

	[IL-1 β] izq	[IL-1 β] dch
U de Mann-Whitney	297.000	297.000
W de Wilcoxon	550.000	550.000
Z	-.215	-.215
Sig. asintót. (bilateral)	.830	.830
Sig. exacta (bilateral)	.839	.839
Sig. exacta (unilateral)	.419	.419

Tabla 36. Correlación entre [IL-1 β] y el genotipo positivo en ambos grupos

	Genotipo positivo	N	Rango promedio
[IL-1 β] izq	NO	32	25.53
	SI	18	25.44
	Total	50	
[IL-1 β] dch	NO	32	25.91
	SI	18	24.78
	Total	50	

Tabla 37. Prueba estadística entre ambos grupo

	[IL-1 β] izq	[IL-1 β] dch
U de Mann-Whitney	287.000	275.000
W de Wilcoxon	458.000	446.000
Z	-.020	-.263
Sig. asintót. (bilateral)	.984	.793
Sig. exacta (bilateral)	.992	.802
Sig. exacta (unilateral)	.496	.401

V. DISCUSIÓN

V.1 CONCENTRACIÓN DE IL-1 β EN FGC.

■ **Relación entre la [IL-1 β] en FGC y el estado periodontal del paciente.** En este estudio se ha determinado la concentración de IL-1 β en FGC en dos localizaciones contrólaterales. Por un lado en localizaciones sanas de un grupo control y por otro lado en localizaciones activas de un grupo con enfermedad periodontal crónica.

En nuestros resultados se hallaron concentraciones de IL-1 β en FGC en todas las localizaciones de ambos grupos, tanto en las localizaciones sanas como en las enfermas. Preiss y Meyle (131), al igual que Rawlison y colaboradores (136,178) en estudios anteriores, encontraron resultados muy similares a los obtenidos por nosotros. Por el contrario otros autores (164,130,168) no fueron capaces de detectar [IL-1 β] en pacientes sanos. Estas discrepancias pueden deberse a los diferentes métodos de recolección de muestras y/o al empleo de diferentes kits de ELISA.

Actualmente no existe ninguna “gold standard” para identificar localizaciones con actividad de la enfermedad periodontal. Un criterio bastante fiable es el denominado método de la tolerancia descrito por Listgarten (165), quien emplea la pérdida de inserción como parámetro valorable. Considera activa una bolsa periodontal, cuando en un intervalo de dos meses se produce un aumento de ≥ 2.5 mm en la pérdida inserción. Pero, la única conclusión que se puede obtener es que en algún momento dentro de ese intervalo de tiempo, la bolsa periodontal estuvo activa. El criterio empleado en nuestro estudio, para determinar la actividad de la bolsa periodontal y teniendo en cuenta que se trata de un estudio transversal, fue el de Lang y colaboradores (166) que se basa en determinando la actividad de la bolsa según la presencia o ausencia del sangrado al sondaje.

Cuando comparamos las concentraciones de IL-1 β en FGC entre los dos grupos del estudio, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), observándose

las [IL-1 β] más elevadas en el grupo con enfermedad periodontal activa, estas concentraciones en el grupo EP son casi del doble que en el grupo control. Nuestros resultados coinciden con otros estudios (137,138,164,167, 171) que observan tanto la presencia de IL-1 β en FGC como su incremento en sujetos con periodontitis. Y ponen de manifiesto que la IL-1 β está fuertemente relacionada con la condición inflamatoria del periodonto. Stashenko y colaboradores (129) encontraron que en los lugares con una pérdida de inserción ≥ 2.5 mm en un intervalo de dos meses se detectaban los niveles más altos de IL-1 β . Estos niveles eran 2.5 veces mayores que en los lugares enfermos pero que no poseían una pérdida tan marcada de inserción, y 4.6 veces mayores que en las localizaciones sanas. Masada y colaboradores (130) en un estudio con 15 pacientes con enfermedad periodontal de carácter moderada-severa, además de detectar valores de IL-1 α y de IL-1 β en FGC, observó como esos valores disminuyeron después del tratamiento periodontal. Salvi y colaboradores (172) al igual que nosotros

también detectaron niveles de IL-1 β en FGC aumentados en pacientes con periodontitis moderada-severa cuando los compararon frente a pacientes con gingivitis y periodontitis leve. Tanto Faizuddin y colaboradores (173) como Preiss y Meyle (131) observaron que los valores de IL-1 β en FGC de pacientes con gingivitis sin pérdida y con pérdida de inserción periodontal eran mayores que el los de los pacientes periodontalmente sanos. Rawlison y colaboradores (136) similar a nuestro estudio, tomaron una serie de precauciones para evitar que las muestras de IL-1 β en FGC se contaminasen con saliva o con sangre, ya que según Dinarello 1991 (177) y Tizard 1995 (178) estos dos fluidos contienen cantidades de IL-1 β y podrían alterar los datos obtenidos. Tras localizar las bolsas activas sangrantes, antes de tomar la muestra se esperó el tiempo necesario hasta que la lesión dejase de sangrar y además, para evitar la posible contaminación con saliva, se procedió a aislar la zona con rollos de algodón, se empleó el eyector de saliva y se decidió a elegir piezas dentales del maxilar en vez de

la mandíbula. Dichos autores en su estudio dejaban 3 minutos la tira de papel en el interior del surco, siguiendo las conclusiones a las que llegaron Reinhardt y colaboradores (175), quienes propusieron que el tiempo de espera de 30 segundos era insuficiente para tomar una adecuada cantidad de muestra. Observaron que las [IL-1 β] en FGC más elevadas las obtuvieron las localizaciones profundas y sangrantes, los valores intermedios los poseían las localizaciones profundas y no sangrantes y por último, las localizaciones sanas mostraron los niveles más bajos. Por el contrario, estos mismos investigadores Rawlison y colaboradores (176) tres años más tarde en un estudio similar donde incluyeron un grupo fumador y otro no fumador, observaron que las [IL-1 β] en FGC más bajas se encontraban en las localizaciones con enfermedad periodontal. Esto sucedía en ambos grupos. Por el contrario, los valores más elevados se encontraban en las localizaciones sanas. Dichos autores sugieren que estas diferencias pueden deberse a la recalibración del periotrón. Ésta se llevó a cabo con una

mezcla de sueros, en lugar de con suero salino como en el primer estudio. Añaden que actualmente el fluido más indicado para la calibración del periotrón es la mezcla de sueros. Engebreston y colaboradores (179) en un estudio longitudinal de 24 semanas, registraron los niveles de IL-1 β en FGC en “base line” y los compararon después de realizar el tratamiento periodontal básico, que consistió en raspado y alisado radicular. Los niveles más elevados se registraron en pacientes con enfermedad periodontal severa y los más bajos en pacientes con enfermedad periodontal leve. A las 2 semanas del tratamiento, las [IL-1 β] en FGC se redujeron en todos los pacientes. A las 24 semanas, esa [IL-1 β] se mantuvo disminuida en los pacientes con una enfermedad periodontal más leve, mientras que en los pacientes con enfermedad periodontal más severa, estos niveles volvieron a recuperar los valores previos al tratamiento. Cuando la profundidad de sondaje se contempló como una variable en el registro de IL-1 β , se observó que los niveles más elevados se encontraban en las bolsas menos

profundas. Giannopoulou y colaboradores (180) en un estudio anterior al nuestro, también observaron que los niveles más elevados de IL-1 β en FGC los poseían los grupos con enfermedad periodontal cuando se compararon con los grupos de gingivitis y de control. Además, las localizaciones activas en los grupos con periodontitis, presentaban niveles más elevados de IL-1 β en FGC que los de las localizaciones inactivas. Tanto la IL-1 β , como la IL-6 y la IL-8 están asociadas con la destrucción periodontal. Por el contrario, la IL-4 muestra un efecto protector respecto al estado periodontal, encontrándose los valores más altos en las localizaciones sanas. No se encontró ningún tipo de asociación entre el hecho de ser un paciente fumador y los niveles de IL-1 β en FGC, pero se encontró con respecto al estrés, viéndose aumentados los niveles de IL-1 β , de IL-6 y de IL-8 en pacientes con estrés.

■ ***Correlación entre la [IL-1 β] en FGC y los parámetros clínicos.*** Cuando se analizaron los dos grupos de nuestro estudio por separado, las

únicas correlaciones que se encontraron fueron: entre la [IL-1 β] en FGC de la bolsa derecha y la [IL-1 β] en FGC de la bolsa izquierda ($r = 0.965$, $p < 0.001$ en el grupo EP y $r = 0.872$, $p < 0.001$ en el grupo control). Y entre el sangrado al sondaje y la presencia de placa dental ($r = 0.547$, $p < 0.005$ en el grupo EP y $r = 0.566$, $p < 0.003$ en el grupo control). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Figueredo y colaboradores (171), quienes describieron una correlación entre las distintas localizaciones de un mismo paciente respecto a la [IL-1 β] en FGC, independientemente de la profundidad de sondaje de las localizaciones. Estos autores afirman que los niveles de IL-1 β son característicos de cada paciente. No se encontró ninguna correlación entre el resto de parámetros clínicos. La falta de correlación encontrada por nosotros, fue descrita anteriormente por Masada y colaboradores (130), quienes no encontraron ningún tipo de correlación entre los niveles de IL-1 β en FGC y la profundidad de la bolsa. Manifiestan que esta falta de correlación era de esperar, ya que la profundidad de la

bolsa periodontal refleja la evolución acumulada en la historia de la enfermedad, y no tiene que mostrar la actividad de la periodontitis. Wilton y colaboradores (168) tampoco encontraron ningún tipo de correlación entre la concentración de IL-1 β en FGC y los parámetros clínicos que estudiaron: profundidad de sondaje, pérdida de inserción e índices gingival y de placa dental. Por el contrario Hou y colaboradores (169), observaron que la cantidad total, pero no la concentración de IL-1 β en FGC estaba correlacionada tanto con el índice gingival como con la profundidad de sondaje. Cavanaugh y colaboradores (170) al contrario que en nuestro estudio, hallaron la presencia de una correlación entre los niveles de IL-1 β en FGC y la máxima pérdida de hueso en altura. Stashenko y colaboradores (129) también encontraron una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-1 β y la cantidad de pérdida de inserción producida en un intervalo de dos meses. Sin embargo, no encontraron correlación ni con el sangrado al sondaje ni con la supuración. Engebreston y colabora-

dores (179) sí observaron una asociación estadísticamente significativa entre la [IL-1 β] en FGC y la profundidad al sondaje y la pérdida de inserción.

■ **Relación entre la [IL-1 β] en FGC y la presencia de polimorfismos en los genes de la IL-1.** Después de comparar las [IL-1 β] en FGC y los distintos genotipos para los genes de la IL-1 entre los miembros de nuestro estudio, no se observó ninguna correlación estadísticamente significativa. Se analizaron tanto los dos grupos por separado como los dos grupos juntos, y en ninguna de las dos circunstancias se pudo encontrar correlación. Sobre la base de los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos afirmar que no existe ningún tipo de relación entre el genotipo de los genes de la IL-1 y la producción de IL-1 β presente en el FGC. En un estudio anterior al nuestro *in vitro*, Mark y colaboradores (141) encontraron resultados similares a los nuestros. Observaron que la producción de IL-1 β por parte de monocitos aislados que fueron enfrentados a patógenos perio-

dontales, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a ser genotipo positivo o negativo para los genes de la IL-1. Santtila y colaboradores (181) también observaron una disminución en la producción de IL-1 β por parte de células mononucleares periféricas en aquellos individuos que presentaban polimorfismo en el gen IL-1B en la posición +3953. Gore y colaboradores (148), en un estudio donde entraban pacientes fumadores, encontraron una asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen IL-1B en la posición +3953 con una mayor producción de IL-1 β por parte de células polimorfonucleares periféricas. Aunque encontraron una asociación, ésta no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, Pociot y colaboradores (143) concluyeron que aquellos individuos que eran heterocigóticos para el polimorfismo del gen IL-1B en su posición +3953 sin tener en cuenta su estado periodontal, producían de un 30% a un 40% más cantidad de IL-1 β frente a LPS de *E.coli* que individuos genotipo negativo. Esta producción estaba

aumentada en un 50% en los individuos homocigóticos. Engebretson y colaboradores (144), en contra posición a los resultados obtenidos en nuestro estudio, observaron anteriormente que los individuos genotipo positivo producían mayor cantidad de IL-1 β en FGC que los individuos genotipo negativo. Antes de recibir tratamiento periodontal, las bolsas periodontales < 4 mm en los pacientes genotipo positivo, presentaban un 40% aumentada la concentración de IL-1 β respecto a los pacientes genotipo negativo. Las bolsas profundas antes del tratamiento, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en función de ser genotipo positivo o negativo. Observaron que tras el tratamiento periodontal, las [IL-1 β] en FGC disminuían un 18.5% en los pacientes genotipo negativo, mientras que en los pacientes genotipo positivo permanecían iguales. Shirodaria y colaboradores (145) demuestran una asociación estadísticamente significativa entre el presentar polimorfismos solamente en el gen IL-1A en la posición +4845 y una mayor concentración de IL-1 α en FGC en

pacientes no fumadores. Galbraith y colaboradores (147) incluyendo fumadores en sus grupos de estudio, observaron que la producción de IL-1 β por parte de los PMN tendía a ser mayor en los pacientes que presentaban polimorfismo en el gen IL-1B en la posición +3953, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

No se ha encontrado una explicación plausible para estas discrepancias. Puede ser que la producción de la IL-1 β esté regulada por otro locus genético además de por el locus +3953 del gen de la IL-1B.

V.2 RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA IL-1 Y LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Uno de los objetivos de nuestro estudio era intentar relacionar la presencia de polimorfismos genéticos de la IL-1 con una mayor prevalencia de

la enfermedad periodontal. Los resultados de nuestro estudio, no reflejaron ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto al estado periodontal y la presencia de polimorfismos en los genes: IL-1A en la posición +4845, IL-1B en la posición +3953 y el genotipo positivo (presencia de polimorfismos tanto en el gen IL-1A en la posición +4845 como en el gen IL-1B en la posición +3953) entre los dos grupos del estudio. Según estos resultados, podemos afirmar que la presencia de polimorfismos en los genes IL-1A +4845 e IL-1B +3953 tanto juntos como por separado, no suponen un factor de riesgo para la aparición de la enfermedad periodontal crónica. Walker y colaboradores (160) obtuvieron unos resultados idénticos en cuanto a la periodontitis juvenil localizada, pero en la población afro-americana de la zona oeste de Carolina del Norte. Hodge y colaboradores (182) tampoco encontraron diferencias entre un grupo de pacientes con periodontitis generalizada rápidamente progresiva y otro grupo control de raza caucásica y origen Europeo, en lo que respecta a la

presencia de polimorfismos de los genes IL-1A en la posición +4845 e IL-1B en la posición +3953 tanto juntos como por separado. Rogers y colaboradores (154) al igual que nosotros, tampoco encontraron diferencias significativas en cuanto al polimorfismo del gen IL-1A en la posición +4845 o a ser genotipo positivo entre un grupo con enfermedad periodontal crónica y periodontitis rápidamente progresiva y otro grupo sano. También determinaron que la posesión de polimorfismos en los genes de la IL-1 no aumentaba la susceptibilidad en la pérdida de implantes. Otros autores como Papapanou y colaboradores (183) fueron incapaces de encontrar diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia respecto a ser genotipo positivo o negativo entre un grupo de pacientes con enfermedad periodontal y otro grupo de pacientes sanos. Pociot y colaboradores (143) ya habían encontrado resultados similares a los nuestros, determinaron que la severidad de la enfermedad periodontal era la misma tanto para individuos con genotipo positivo como para

individuos con genotipo negativo. Galbraith y colaboradores (147), incluyendo fumadores en sus grupos de estudio, observaron una relación estadísticamente significativa entre el hecho de presentar polimorfismos en el gen de la IL-1B en la posición +3953 y el padecer la enfermedad periodontal avanzada. Estos autores concluyen que los individuos con este tipo de polimorfismos son tres veces más susceptibles de padecer la enfermedad que aquellos que no presentan dicho polimorfismo. Gore y colaboradores (148) en un estudio donde también se incluían pacientes fumadores, encontraron una mayor frecuencia de polimorfismos en el gen IL-1B en la posición +3953 en pacientes con enfermedad periodontal severa. Aunque estas diferencias no eran estadísticamente significativas, estos resultados difieren de los encontrados por Kornman y colaboradores (128). Estos autores encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con enfermedad periodontal grave que eran no fumadores y el hecho de presentar polimorfismos genéticos. Pero esta asociación sólo-

mente aparecía cuando los polimorfismos se encontraban tanto en el gen IL-1A como en el gen IL-1B (genotipo positivo). Shirodaria y colaboradores (145) contemplaron una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de polimorfismos en el gen IL-1A en la posición +4845 y un mayor riesgo de padecer enfermedad periodontal grave en pacientes no fumadores. Aunque esta asociación sólo la observaron en el gen IL-1A, no descartaron que aquellos individuos que además presentasen otro polimorfismo en el gen IL-1B, podrían manifestar una mayor predisposición de padecer la enfermedad. McDevit y colaboradores (146) a pesar de encontrar diferencias entre los grupos con enfermedad periodontal y control respecto a si son genotipo positivo o negativo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Aún así, consideran un factor de riesgo de padecer la enfermedad periodontal crónica el expresar ambos polimorfismos. Por el contrario, cuando sólo tuvieron en cuenta a los pacientes no fumadores, si observaron diferencias estadísticamente significativas entre

los dos grupos. Por tal razón, ha de tenerse en cuenta la importancia del tabaco en la etiología de la enfermedad. Cullinan y colaboradores (144) concluyen que el ser genotipo positivo para los genes de la IL-1, contribuye a la susceptibilidad de adquirir la enfermedad periodontal, pero no es un factor esencial en el desarrollo de la misma. Thomson y colaboradores (185) describen una asociación entre un determinado compuesto genotípico, (homocigótico para el alelo-1 en el gen IL-1A +4845 y homocigótico para el alelo-2 en el gen IL-1B +3953) y una mayor prevalencia de la enfermedad periodontal en individuos con 26 años de edad. Aunque sugieren que estos resultados podrían estar sujetos a algún tipo de error debido al diseño del estudio. Anteriormente Jepsen y colaboradores (186) ya habían encontrado resultados similares a los nuestros. Fueron incapaces de hallar la influencia del factor genético de la IL-1 referente a la aparición de la gingivitis. En un estudio bastante completo realizado en el 2002, Meisel y colaboradores (187) no encontraron correlación entre ser genotipo positivo

para la IL-1, presentar polimorfismo en el gen IL-1B +3953 o presentar polimorfismo en el gen IL-1A +4845 y una mayor pérdida ósea o cualquier otro parámetro clínico estudiado. Un año más tarde, estos mismos autores (188) observaron que sólo los pacientes fumadores con genotipo positivo para la IL-1 poseían un mayor riesgo de padecer la enfermedad periodontal que los controles. Concluyen que debe existir una asociación sinérgica entre el factor genético y el tabaco. Siguiendo con esta pauta, en el 2004 Meisel y colaboradores (189) han vuelto a reincidir que los pacientes con genotipo positivo para la IL-1 que eran fumadores, poseían un mayor riesgo de padecer la enfermedad periodontal. Concluyen que el tabaco constituye un factor de riesgo más importante que el factor genético. Puesto que en las personas sin ese hábito el factor genético es incapaz de expresarse y, por tanto, desaparece su implicación en la aparición y progresión de la enfermedad.

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica realizada y los resul-

tados aportados en este trabajo, podemos concluir que los estudios más recientes, tienden a no considerar la relación entre la presencia de polimorfismos en los genes de la IL-1 y la prevalencia de la enfermedad periodontal, afirmando que los polimorfismos en los genes de la IL-1 no son unos marcadores genéticos fiables para determinar la susceptibilidad de la enfermedad periodontal.

V.3 PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LA IL-1.

Conociendo las limitaciones que presenta el tamaño y distribución de las muestras obtenidas, consideramos que el conocer la prevalencia de los polimorfismos de la IL-1 en una población de origen español y de raza caucásica, puede ser útil para posteriores estudios sobre esta línea de investigación.

Nuestros resultados muestran la siguiente prevalencia de los polimorfis-

mos: para el genotipo positivo un 36% (en la población total del estudio) y un 32% (sólo en el grupo con enfermedad periodontal). Para el alelo 2 del gen IL-1A +4845 un 46% (en la población total del estudio) y un 36% (sólo en el grupo con enfermedad periodontal). Para el alelo 2 del gen IL-1B +3953 un 44% (en la población total del estudio) y un 36% (sólo en el grupo con enfermedad periodontal).

Dentro de la raza caucasiana, y aún existiendo ciertas diferencias respecto a la prevalencia en los polimorfismos de los genes de la IL-1, la mayoría de las poblaciones presentan porcentajes muy similares. Así, dentro del continente Europeo y Australiano, Thomson y colaboradores (185) encontraron resultados casi idénticos a los nuestros, con una prevalencia para el genotipo positivo del 34.3%, del 49.2% para el alelo 2 del gen IL-1A +4845 y del 40.8% para el alelo 2 del gen IL-1B +3953 en una población de Nueva Zelanda. Sakellari y colaboradores (157) observaron en la población griega una prevalencia del 40% para el genotipo positivo.

Kornman y colaboradores (128) hallaron una prevalencia para el genotipo positivo del 29.1% en una población Norte-Europea. Por el contrario, Hodges y colaboradores (182) en una población Norte-Europea encontraron una prevalencia para el genotipo positivo del 46.4%, del 34.4% para el alelo 2 del gen IL-1A +4845 y del 31.2% para el alelo 2 del gen IL-1B +3953. Así mismo, Meisel y colaboradores, (187) descubrieron una prevalencia para el genotipo positivo del 43.5%, del 56.5% para el alelo 2 del gen IL-1A +4845 y del 48% para el alelo 2 del gen IL-1B +3953 en una población de origen alemán. Por su parte, Papapanou y colaboradores (183) encontraron una prevalencia para el genotipo positivo del 42.9% en una población sueca. Lang y colaboradores (151) encontraron una prevalencia para el genotipo positivo del 35.3% en una población de origen suizo. Resultados muy similares hallaron DeSanctis y colaboradores (152) con una prevalencia para el genotipo positivo del 35% en una población italiana.

Por otro lado, en las diferentes poblaciones norte-americanas, Cullinan y colaboradores (144) observaron una prevalencia del 38.9% para el genotipo positivo. Por su parte, McDevit y colaboradores (146) encontraron una prevalencia para el genotipo positivo del 34% en una población de Atlanta. Similares resultados obtuvieron Galbraith y colaboradores (147) quienes contemplaron una prevalencia del 37.6% para el alelo 2 del gen IL-1B +3953 en una población de Carolina del Sur. Así mismo, McGuire y colaboradores (150) también encontraron una prevalencia para el genotipo positivo del 38% en una población de Houston. Además, Caffesse y colaboradores (156) encontraron una prevalencia para el genotipo positivo del 26% en una población hispana de origen mejicano. Por otra parte, Engebrestson y colaboradores (144) observaron una prevalencia para el genotipo positivo del 29% en una población de Nueva York.

Notables diferencias se han encontrado respecto a la prevalencia del genotipo positivo entre poblaciones de distintas etnias. Tanto la etnia africana como las etnias del lejano oriente, presentan los porcentajes de prevalencia más bajos al ser comparados con los datos de nuestro estudio. Así, Armitage y colaboradores (158) encontraron una prevalencia del 2.3% en una población china. Anusakathien y colaboradores (159) también encontraron una prevalencia baja del 1.6% en una población tailandesa. Mayor fue la prevalencia encontrada por Walker y colaboradores (160) un 12.8% en una población Afro-Americana.

También son apreciables las diferencias que se han descrito respecto a la prevalencia del alelo 2 para el gen IL-1A +4845 entre poblaciones de distintas etnias. De nuevo, tanto en la etnia africana como en las etnias del lejano oriente, se observan las prevalencias más bajas cuando son comparadas con las de nuestro estudio.

Así, Armitage y colaboradores (158) observaron una prevalencia del 17% en una población china. Por el contrario, Sakellari y colaboradores (157) encontraron una prevalencia del 29% en la población griega. Parecido resultado observaron Walker y colaboradores (160) con una prevalencia del 28.4% en una población Afro-Americana. Diferentes resultados contemplaron Shirodaria y colaboradores (145) observando una prevalencia del 73.7% en una población inglesa.

No menos apreciables, son las diferencias que se han encontrado respecto a la prevalencia del alelo 2 para el gen IL-1B +4845 entre poblaciones de distintas etnias. Una vez más tanto en la etnia africana como en las etnias del lejano oriente, ofrecen las prevalencias más bajas cuando son comparadas con las de nuestro estudio. Así, Armitage y colaboradores (158) detectan una prevalencia del 3.3% en una población china. En cambio, Sakellari y colaboradores (157) observan una prevalencia del 29.7% en la población griega. Esta prevalencia es similar a la encontrada

por Walker y colaboradores (160) en una población Afro-Americana, un 24.1%.

Sobre la base de la revisión bibliográfica realizada y los resultados expuestos en este estudio, se puede concluir que los polimorfismos de los genes de la IL-1, guardan cierta homogeneidad en relación a su prevalencia en la raza caucásica. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad y discrepancia entre las razas china, tailandesa y afro-americana.

VI. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con enfermedad periodontal crónica activa presentan concentraciones de IL-1 β en FGC más elevadas que la de los pacientes sanos.
2. Existe una evidente correlación de la concentración de IL-1 β en FGC entre las bolsas periodontales activas de un mismo individuo.
3. La respuesta inflamatoria del periodonto en un mismo individuo, tiene una intensidad muy similar en la cavidad bucal, cuando está estimulada por microorganismos periodontopatógenos.
4. La IL-1 β se puede considerar un buen marcador para determinar la severidad y progresión de la enfermedad periodontal crónica.
5. La expresión de polimorfismos genéticos en la posición +4845 del gen de la IL-1A y/o en la posición +3953 del gen de la IL-1B, no son factores de riesgo para padecer la enfermedad periodontal crónica. Por lo que no se pueden considerar como marcadores genéticos de la enfermedad periodontal crónica.
6. La expresión de polimorfismos genéticos en la posición +4845 del gen de la IL-1A y/o en la posición +3953 del gen de la IL-1B, no implica una sobreproducción de IL-1 β en FGC.
7. La prevalencia de polimorfismos genéticos en la población española de raza caucasiana para los genes IL-1A e IL-1B, presentan valores similares al de otras poblaciones de idéntica raza.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; May 21; 284 (5418): 1318-1322
2. Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36: 177-187
3. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res* 1966; 1: 1-13
4. Løe H, Theilade E, Jensen SB, Schiott CR. Experimental gingivitis in man III: influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodont Res* 1967; 2 (4): 282-289
5. Lindhe J, Hamp SE, Løe H. Plaque-induced periodontal disease in beagle dogs: a 4-years clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodont Res* 1975; 10 (5): 243-255
6. Løe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man: rapid, moderate and no loss of attachment of Sri Lankan laborers 14-46 of age. *J Clin Periodontol* 1986 ; 13: 431-440
7. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5: 78-111
8. Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goene RJ, Abbas F, Graff J. Occurrence of *bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 1990;17: 392-399
9. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* 1970;49: 203-222

10. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1976;84: 1-10
11. Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis A summary of recent work. *J Clin Periodontol* 1986;13: 912-917
12. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *porphyromona gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000* 1999;20: 82-121
13. Albandar JM, DeNardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn M. Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2001;72: 1463-1469
14. Asss AM, Rossow I, Preus HR, Gjermmo P. Incidence of early periodontitis in a group of young individuals during 8 years: associations with selected potencial predictors. *J Periodontol* 1994;65: 814-819
15. DiRienzo JM, Slots J, Sixou M, Sol MA, Harmon R, Mckay TL. Specific genetic variations of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun* 1994;62: 3058-3065
16. Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *porphyromona gingivalis* in periodontal disease: introduction. *Periodontol 2000* 1999;20: 7-13
17. Albandar JM, Olsen I, Gjermmo P. Associations between six DNA probe detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *ACTA Odontol Scand* 1990;48: 415-423
18. Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1999;68: 973-981

19. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65: 260-267
20. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995;66: 23-29
21. Lindhe J. Periodontología clínica e implantología odontológica. *Tercera edición* Ed: panamericana 2000 capítulos: 5 y 13
22. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Sapnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycescomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 1984;63: 412-417
23. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 1999;70: 13-29
24. Albandar JM, Kingman A, Brown LJ, Løe H. Gingival inflammation and subgingival calculus as determinants of disease progression in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998 ; 25: 231-237
25. Albandar JM. Periodontal disease in North America. *Periodontol* 2000 2002; 29:31-69
26. Baelum V, Scheutz F. Periodontal diseases in Africa. *Periodontol* 2000 2002;29:79-103
27. Corbet EF, Zee KY, Lo ECM. Periodontal diseases in Asia and Oceania. *Periodontol* 2000 2002;29: 122-152
28. Gjermo P, Rösing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in South and Central

- America. *Periodontol 2000* 2002;29: 70-78
29. Brown LJ, Oliver RC, Løe H. Evaluating periodontal status of U.S. employed adults. *J Am Dent Assoc* 1990;121: 226-232
30. Oliver RC, Brown LJ, Løe H. Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol* 1998;69: 269-278
31. Papapanou PN, Wennström JL, Gröndahl K. Periodontal status in relation to age and tooth type. A cross-sectional radiographic study. *J Clin Periodontol* 1998;15:469-478
32. Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann Periodontol* 1998;3: 88-101
33. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year old individual. *J Clin Periodontol* 1998;25: 297-305
34. Bergström J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol* 2000;27: 61-68
35. Bergström J, Preber H. Tobacco use as risk factor. *Periodontol 2000* 1994;65 (suppl.): 545-550
36. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dungford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65: 260-267
37. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995;66: 23-29
38. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol* 2000;71: 743-751

39. Jette AM, Feldman HA, Tennstedt SL. Tobacco use: a modifiable risk factor for dental disease among the elderly. *Am J Public Health* 1993;83: 1271-1276
40. Chen X, Wolff L, Aeppli D, Guo Z, Luan W, Baelum V, Fejeskov O. Cigarette smoking, salivary/gingival crevicular fluid cotinine and periodontal status. A 10 years longitudinal study. *J Clin Periodontol* 2001;28: 331-339
41. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000;71: 1874-1881
42. Krall EA, Garvey AJ, Garcia RI. Alveolar bone loss and tooth loss in male cigar and pipe smokers. *J Am Dent Assoc* 1999;130: 57-64
43. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ* 2002;65: 313-321
44. Bergström J, Floderus-Myrhed B. Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community dent Oral Epidemiol* 1983;11: 113-116
45. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol* 2000;27: 417-424
46. Preber H, Bergström J, Linder LE. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol* 1992;19: 667-671
47. Hioka T, Tanaka M, Ojima M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S. Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol* 2000;71: 1846-1851
48. Boström L, Linder LE, Bergström J. Cical expresion

- of TNF- α in smoking-associated periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998;25: 767-773
49. Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1999;26: 352-257
50. James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblast. *J Periodontol* 1999;70: 518-525
51. Alpar B, Leyhausen G, Sapotnick A, Gunay H, Geurtsen W. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingiva fibroblast cultures. *Clin Oral Investig* 1998;2: 40-46
52. Jin L, Wong KY, Leung WK, Corbet EF. Comparison of treatment response patterns following scaling and root planing in smokers and non-smokers with untreated adult periodontitis. *J Clin Dent* 2000;11: 35-41
53. Papantonopoulos GH. Smoking influences decision making in periodontal therapy: a retrospective clinical study. *J Periodontol* 1999;70: 1166-1173
54. Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol* 1998;3: 20-29
55. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Haung L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;105: 1117-1124
56. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE₂, IL-1 β , TNF- α responses of diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol* 1998;3: 40-50

57. Hobbs HC, Rowe DJ, Johnson Pw. Periodontal ligament cells from insulin-dependent diabetics exhibit altered alkaline phosphatase activity in response to growth factors. *J Periodontol* 1999; 70: 736-742
58. Tylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998;3: 30-39
59. Iughetti L, Marino R, Bertolani MF, Bernasconi S. Oral health in children and adolescents with IDDM- a review. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12: 603-610
60. Michalowicz BS, Aepli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ, Pihlstrom BL. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991;62: 293-299
61. Spektor MD, Vandesteen GE, Page RC. Clinical studies of one family manifesting rapidly progressive, juvenile and prepubertal periodontitis. *J Periodontol* 1985;56: 93-101
62. Baab DA, Page RC, Morton T. Studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J Periodontol* 1985;56: 403-409
63. Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol* 1994;65: 479-488
64. Altman LC, Page RC, Vandesteen GE, Dixon LI, Bradford C. Abnormalities of leukocyte chemotaxis in patients with various forms of periodontitis. *J Periodont Res* 1985;20: 553-563
65. Lopez NJ. Clinical and immunological studies of a family with high prevalence of generalized prepubertal and juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1992;63: 457-468
66. Shapra K, Bruestenger M, Bimstein E. Possible autosomal-dominant inheritance of prepubertal periodontitis. *J*

- Clin Periodontol* 1997;24: 388-393
67. Butler JH. A familial pattern of juvenile periodontitis (periodontosis). *J Periodontol* 1969;17: 67-72
68. Melnick M, Shields ED, Bixler D. Periodontosis: a phenotypic and genetic analysis. *Oral Surg* 1976;42: 32-41
69. Molvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, Nielsen LS, Svejgaard A, Nerup J. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand J Immunol* 1998;27: 705-716
70. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* 1998;3: 327-338
71. Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Diете A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28: 483-488
72. Henning BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Dinucleotide repeat polymorphism in the interleukin-10 gene promoter (IL-10.G) and genetic susceptibility to early-onset periodontal disease. *Genes Immun* 2000;1: 402-404
73. Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphism at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodont Res* 1999;34: 379-386
74. Nisengard RJ. The role of immunology in periodontal disease. *J Periodontol* 1977; 48: 505-509
75. Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Association between systemic and local antibody and periodontal disease. In Genco RJ, Mergenhagen

- SE, eds, Host Parasite Interactions in Periodontal Disease. Washington, DC, *American Society for Microbiology* 1982: 283-287
76. Genco RJ, Slots J. Host responses in periodontal disease. *J Dent Res* 1984;63: 441-446
77. Carranza FA, Newman MG. Periodontología clínica. *Octava edición* Ed: McGraw-Hill Interamericana 1997 capítulos: 8 y 9
78. Schenkein HA. The complement system in periodontal disease. In Genco RJ, Mergenhagen SE, eds. Host Parasite Interactions in Periodontal Disease. Washington, DC, *American Society for Microbiology* 1982: 299-305
79. Kinane DF, Goudie RB, Karim SN, Garioch JJ, Moughal NA, Al Badri A. Heterogeneity and selective localisation of T cell clones in human skin and gingival mucosa. *J Periodont Res* 1993;28: 497-499
80. Kinane DF, Adonogianaki E, Moughal N, Mooney J, Thornhill M. Immunocytochemical characterisation of cellular infiltrate, related endothelial changes and determination of GCF acute phase proteins during human experimental gingivitis. *J Periodont Res* 1991;26: 286-288
81. Brex MC, Lehman B, Siegwart CW, Gerh P, Lang NP. Observation on the initial stages of healing following human experimental gingivitis. A clinical and morphometric study. *J Clin Periodontol* 1988;15: 123-129
82. Lindhe J, Liljenberg B, Listgarten M. Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J Periodontol* 1980;51: 267-269
83. Wahl SM. Mononuclear cell-mediated alterations in connective tissue. In Genco GJ, Mergenhagen SE, eds. Host-Parasite Interactions in Periodontal Disease. Washington,

- DC, American Society for Microbiology. 1982: 132-136
84. Fullmer HM, Gibson W. Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature* 1966; 209: 728-729
85. Ohlsson K, Olsson I, Tynelius-Brathall G. Neutrophil leukocyte collagenase, elastase and serum protease inhibitors in human gingival crevices. *Acta Odontologica Scandinavica* 1973;31: 51-59
86. Kowashi Y, Jaccard F, Cimasoni G. Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. *Archives of Oral Biology* 1979;34: 645-650
87. Larivee J, Sodek J, Ferrier JM. Collagenase and collagenase inhibitor activities in crevicular fluid of patients receiving treatment for localised juvenile periodontitis patients. *J Periodont Res* 1986;21: 702-715
88. Makela E, Soderling E, Paunio K, Talonpoika J, Hyypa T. Protein composition of crevicular fluid before and after treatment. *J Dent Res* 1991;99: 413-423
89. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. *J Periodontol* 1993;64: 474-484
90. Attström R, Tynelius-Brathall G, Egerlberg J. Effects of experimental leukopenia on gingival inflammation in dogs II. Induction of leukopenia by heterologous anti-neutrophil serum. *J Periodont Res* 1971; 7: 200-210
91. Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane DF. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. *J periodont Res* 1992;27: 623-630
92. Murray MC, Mooney J, Kinane DF. The relationship

- between elastase and lactoferrin in healthy, gingivitis and periodontitis. *Oral Diseases* 1995;1: 106-109
93. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PG2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993;64: 432-444
94. Offenbacher S, Collins JG, Heasman PA. Diagnostic potential of host response mediator. *Advances in Dent Res* 1993;7: 175-181
95. Grawford JM, Hopp B. Junctional epithelium expresses the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *J Periodont Res* 1990;25: 254-256
96. Kuby J. *Immunology*. New York, WH Freeman 1992
97. Morley H. Prostaglandins and lymphokines in arthritis. *Prostaglandins* 1974;8: 315-320
98. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodont Res* 1991;26: 213-217
99. Wilson ME, Bronson PM, Hamilton RG. Immunoglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity* 1995;63: 1070-1075
100. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4 and IL-6 producing cells in human periodontal disease tissue. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 1994;23: 347-353
101. Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cells functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease. *Clinical Experimental Immunology* 1995;99: 384-391
102. Gemsa D, Steggemann L, Menzel J. Release of cyclic AMP from macrophages by stimulation with prostaglandins. *J Immunol* 1975;144: 1422-1428
103. Ranney RR. Immunologic mechanisms of pathogenesis

- in periodontal diseases: An assessment. *J Periodont Res* 1991;26: 243-248
104. Charon JA, Luger TA, Mergenhagen S, Oppenheim JJ. Increased thymocyte activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infect Immun* 1982;38: 1190-1195
105. Malberg K, Mölle A, Streuer D, Gängler P. Determination of lymphocyte populations and subpopulations extracted from chronically inflamed periodontal tissues. *J Clin Periodontol* 1992;19: 155-159
106. McFarlane CG, Meikle MC. Interleukin-2, interleukin-2 receptor and interleukin-4 levels are evaluated in the sera of patients with periodontal disease. *J Periodont Res* 1990; 25: 156-161
107. Genco RJ. Host responses in periodontal tissues: Current concepts. *J Periodontol* 1984; 63: 441-446
108. Seymour GF, Cole KL, Powell RN. Interleukin-2 production and bone resorption activity *in vitro* by unstimulated lymphocytes extracted from chronically-inflamed human periodontal tissues. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 481-487
109. Swain S. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Curr Opin Immunol* 1991;3: 304-309
110. Gordon S, Fraser I, Nath D. Macrophages in tissues and *in vitro*. *Curr Opin Immunol* 1992;4: 25-31
111. Perussia B. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol* 1991;3: 49-54
112. Paulnock DM. Macrophage activation by cells. *Curr Opin Immunol* 1992;4: 344-349
113. Bartoid PM, Haynes DR. Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J*

- Periodont Res* 1991;26: 339-344
114. Malefyt R, Yssel H, Roncarola MG, Spits H, Vries J. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 1992;4: 314-320
115. Myers CD. Role of B cell antigen processing and presentation in the humoral immune response. *FASEB J* 1991;5: 2547-2556
116. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 1991;26: 230-235
117. Jorde LB, Carey JC, White RL. *Genética Médica*. Ed: Harcourt Brace. 1998 capítulo: 3
118. Luque J, Herráez A. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Ed: Harcourt Brace. 2002 tema: 26
119. Sims JE, March CJ, Cosman D. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1988;241:585
120. Gowen M, Wood DD, Ihrle EJ, McGuire MK, Russell RG. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 1983; 306: 378-380
121. Stashenko P, Dewhirst EE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunology* 1987; 138: 1464-1468
122. Tatakis DN, Schneeberger G, Dziak R. Recombinant interleukin-1 stimulates prostaglandin E2 production by osteoblastic cells: synergy with parathyroid hormone. *Calcified Tissue International* 1988; 42: 358-361
123. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87: 2095-2147
124. Jandinski JJ, Rynar JE, Steinle M, Leung CE, Deasey.M.J, Stashenko P.

- Localization of Interleukin 1 α and tumor necrosis factor α in human gingiva. *J Dent Res* 1989; 68. (Special Issue) abstr 526
125. Jandinski JJ, Stashenko P, Feder LS, Leung CC, Rynar JE, Deasy MJ. Localization of interleukin-1 beta in human periodontal tissue. *J Peririodontol* 1991;62: 36-43
126. Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol* 1993; 64: 416-431
127. Nicklin MJH, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, beta and interleukin 1 receptor antagonist genes. *Genomics* 1994;19: 382-384
128. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovani FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;24: 72-77
129. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1991;18: 548-554
130. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 1990;25: 156-163
131. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1994;65: 423-428
132. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66: 852-859
133. González JR, Hermann JM, Boedeker RH, Franez PI, Biesalski H, Meyle J.

- Concentration of interleukin-1 β and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 2001;28: 544-549
134. Heasman PA, Collins JG, Offenbacher S. Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumor necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J Periodont Res* 1993;28: 241-247
135. Kinane DF, Winstanley FP, Adonogianaki E, Moughal NA. Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingivitis crevicular fluid during experimental gingivitis. *Archives of Oral Biology* 1992;37: 153-156
136. Rawlinson A, Dalati MHN, Rahman S, Fairclough AL. Interleukin-1 and IL-1 receptor antagonist in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 2000;27: 738-743
137. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1995;22: 885-890
138. Ishihara Y, Nishihara T, Koroyanagi T, Shirozu N, Yamagishi E, Ohguchi M, Koide M, Ueda N, Amano K, Noguchi T. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodont Res* 1997;32: 524-529
139. Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and GCF levels of IL-1 β and IL-1ra in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2000;27: 250-255
140. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;160: 403-409

141. Mark LL, Haffajee AD, Socransky SS, Kent Jr RL, Guerrero D, Kornman K, Newman M, Stashenko P. Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1beta expression in subjects with adult periodontitis. *J Periodont Res* 2000;35: 172-177
142. di Giovine FS, Cork MJ, Crane A. Novel genetic association of an IL-1 β gene variation a +3953 with IL-1 β protein production and psoriasis. *Cytokine* 1995;7: 606
143. Pociot F, Molving J, Wogensen L. A Taq1 polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992;22: 396-402
144. Engebrestson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, et al. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1999;70: 567-573
145. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1 α 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
146. McDevitt MJ, Wang HY, Knobelman C, Newman MG, di Giovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol* 2000;71: 156-163
147. Galbraith GMP, Hagan C, Steed RB. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. *J Periodontol* 1997;68: 832-838
148. Gore E, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GMP. Interleukin-1 β +3953 allele 2: association with di-

- sease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 781-785
149. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Duff GW. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphism in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2000;27: 810-818
150. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome, IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol* 1999; 70: 49-56
151. Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of the interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in periodontal maintenance population. *J Periodont Res* 2000;35: 102-107
152. DeSanctis M, Zuchelli G. Interleukin-1 gene polymorphisms and long-term stability following guided tissue regeneration. *J Periodontol* 2000; 71: 606-613
153. Thomas G, Wilson Jr, Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and the implant loss. Initial data. *J Periodontol* 1999;70: 724-729
154. Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AES, Davies G, Henry PJ, Price P. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants?. *J Periodont Res* 2002;37: 37-41
155. Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Bürgin W, Brägger U, Duff GW, Kornman KS. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factor for periimplant bone loss in a well maintained population. *Clin Oral Impl Res* 2003;14: 10-17
156. Caffese RG, De LaRosa MR, De LaRosa MG, Mota LF. Prevalence of interleukin

- 1 periodontal genotype in a Hispanic dental population. *Quintessence Int* 2002;33: 190-194
157. Sakellari D, Koukoudetsos S, Arsenakis M, Konstantinidis A. Prevalence of IL-1A and IL-1B polymorphisms in a greek population. *J Clin Periodontol* 2003;30: 35-41
158. Armitage GC, Wu Y, Wang H-Y, Sorrell J, di Giovine F, Duff G. Low prevalence of a periodontitis associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol* 2002; 71: 164-171
159. Anasaksathien O, Sukboon A, Sitthiphong P, Teanpaisan R. Distribution of interleukin-1 +3954 and IL-1A -889 genetic variations in a thai population group. *J Periodontol* 2003;74: 1796-1802
160. Walker SJ, Van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, di Giovine FS, Hart TC. Genetic polymorphisms of the IL-1A and IL-1B genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol* 2000; 71: 723-728
161. di giovani FS, Chaundhary. Unpublished observation.
162. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1215-1216
163. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. 1. (A laboratory manual) 2end. The Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
164. Pongsawat Suwatanapongched, Penpan Laohapand, Rudee Surarit, Yasukazu Ohmoto, Kiat Ruxrungham. Interleukin-1 β level in gingival crevicular fluid of patients with active periodontitis. *Asian Pacific J of allergy and immunology* 2000;18: 201-207
165. Listgarten MA. A prospective on periodontal diagnosis.

- J Clin Periodontol* 1986;13: 175-81
166. Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1986;13: 590-596
167. Gamonal J, Jorge O, Silva A. Interleuquina-1 β e interleuquina-8 en pacientes adultos con periodontitis destructiva: efectos del tratamiento periodontal. *Av. Periodon Implantol O* 1999;11: 183-193
168. Wilton JMA, Bampton JLM, Griffiyhs GS. Interleukin-1 beta (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1992;19: 53-7
169. Hou LT, Liu CM, Rosso-mando EF. Crevicular interleukin-1 β in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *J Clin Periodontol* 1995;22: 162-7
170. Cavanaugh PF, Meredith MP, Buchanan W, Doyle MJ, Reddy MS, Jeffcoat MK. Coordinate production of PGE2 and IL-1 β in the gingival crevicular fluid in adults with periodontitis: its relationship to alveolar bone loss and disruption by daily treatment with ketolacromethamine oral rinse. *J Periodont Res* 1998;33: 75-82
171. Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fischer RG, Gustafson A. Increased intreleukin-1 beta concentration in gingival crevicular flui as a character of periodontitis. *J Periodontol* 1999;70: 1457-1463
172. Salvi GE, Yalda B, Collins JG. Inflammatory mediator response as a potencial risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diadetes mellitus patients. *J Periodontol* 1997;68: 127-135
173. Faizuddin M, Bhararathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin-1 β levels in the gingival crevicular fluid in

- health and inflammatory periodontal disease. *J Periodont Res* 2003;38: 111-114
174. Rawlison A, Grummitt JM, Walsh TF, Douglas CWI. Interleukin 1 and receptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers versus non-smokers. *J Clin Periodontol* 2003;30: 42-48
175. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, Du Bois LM, Kornman KS, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison A. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1994;20: 225-231
176. Rawlinson A, Grummitt JW, Walsh TF, Douglas CWI. Interleukin 1 and receptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers versus non-smokers *J Clin Periodontol* 2003;30: 42-48
177. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77: 1627-1652
178. Tizard IA. Immunology: an introduction, 4th edn. Florida: Saunders College Publishing.
179. Engebreston SP, Grbic JY, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1 β profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29: 48-53
180. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine levels. *J Clin Periodontol* 2003;30: 145-153
181. Snattila S, Savinainen K, Murme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (ILI-1RN*2) is associated with enhanced IL-1 β production *in vitro*. *Scand J Immunol* 1998;47: 195-198
182. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28: 430-436
183. Papapanou PN, Neiderud A-M, Sandros J, Dahlén G.

- Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. *J Clin Periodontol* 2001;28: 389-396
184. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, Seymour GJ. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol* 2001;28: 1137-1144
185. Thomson WM, Edwards SJ, Dobson-Le DP, Tompkins GR, Poulton R, Knight DA, Braithwaite AW. IL-1 genotype and adult periodontitis among young New Zealanders. *J Dent Res* 2001;80(8): 1700-1703
186. Jepsen S, Eberhard J, Fricke D, Hedderich J, Siebert R, Acil T. Interleukin-1 gene polymorphisms and experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003;30: 102-106
187. Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1 α , IL-1 β and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 2002;73: 27-32
188. Meisel P, Siegemund A, Grimm R, Herrmann FH, John U, Schwahn C, Kocher T. The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based ship study. *J Dent Res* 2003;83(3): 189-193
189. Meisel P, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, John U, Kocher T. Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *J Periodontol* 2004;75: 236-242