



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

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
Master Ciencias Odontológicas

**FOTOTERAPIA LÁSER APLICADA
COMPLEMENTARIAMENTE AL
TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-
QUIRÚRGICO EN PERIODONTITIS CRÓNICA:
ASPECTOS CLÍNICOS E INFLAMATORIOS.**

Saray Calderín Pérez

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



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



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

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

CERTIFICAN: que la presente Memoria titulada “*Fototerapia láser aplicada complementariamente al tratamiento periodontal no-quirúrgico en periodontitis crónica: aspectos clínicos e inflamatorios*” llevada a cabo por **Dña. Saray Calderín Pérez** ha sido realizada bajo nuestra dirección.

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

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

ÍNDICE

1. Introducción	6-17
2. Hipótesis y Objetivos.....	19-20
3. Material y Métodos.....	22-28
4. Resultados.....	30-41
5. Discusión.....	43-50
6. Conclusiones.....	52
7. Bibliografía.....	54-58

1. INTRODUCCIÓN

1. La enfermedad periodontal

La periodontitis crónica es una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes, causada por grupos específicos de microorganismos, que provocan la destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar con la consiguiente formación de bolsas, recesiones o ambas (Armitage, 1999).

La placa bacteriana acumulada en la superficie subgingival o supragingival del diente, desencadena un mecanismo inmunopatogénico, que conlleva la destrucción de hueso y tejido conectivo, con la consiguiente formación de la bolsa periodontal (Page y Kornman., 1997). Inicialmente tiene lugar la formación del biofilm dental, debido a cierta capacidad de las bacterias para adherirse a superficies, produciéndose una interacción superficie - microorganismo - medio líquido. El biofilm que se forma en la cavidad oral es uno de los más complejos que existen en la naturaleza (Potera, 1999; Sokransky y Haffajee 2002) debido en parte a que el diente proporciona una superficie no descamativa y estable para la acumulación de microorganismos, a la vez que provee reservorios a los que no pueden acceder las células del huésped debido a su tamaño. Por otra parte, la placa dificulta que los factores de defensa del huésped localicen y destruyan los microorganismos, a la vez que tienen que enfrentarse a barreras de difusión, enzimas líticas y absorción por parte de estructuras minerales del diente.

La etiopatogenia de la enfermedad periodontal se viene estudiando desde su conocimiento hasta la actualidad. Løe en 1965, dilucidó un modelo inicial, en el que otorgó a las bacterias el papel principal, y asoció de forma evidente la placa bacteriana a la gingivitis tras 21 días de experimento (Løe y cols., 1965). Lindhe por su parte, en 1973, realizó un estudio longitudinal en perros Beagle, en los que fue capaz de inducir una periodontitis experimental gracias a ligaduras (Lindhe y cols., 1973).

A partir de los años 70 y 80 se comenzó a utilizar el término de patógeno periodontal haciendo referencia ya no sólo a un grupo de bacterias, sino a bacterias específicas que variaban la respuesta del huésped. En el Informe Consensuado del Congreso Mundial de Periodoncia de 1996, se designó a *Agregatibacter actinomycescomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) y *Tannerella forsythia* (Tf) como patógenos periodontales.

Estas bacterias acumuladas sobre la superficie del diente, segregan lipopolisacáridos (LPS) y expresan antígenos y factores de virulencia. El huésped pone entonces en marcha una respuesta inmunoinflamatoria, segregando anticuerpos y haciendo llegar por migración polimorfonucleares (PMN) a la zona. En un primer momento se pone en marcha una respuesta mediada por antígeno, que si es inefectiva, consigue atraer a los neutrófilos por quimiotaxis a la superficie de interacción entre las bacterias y la superficie tisular (Page y Kornman., 1997). A su vez estos PMN son una potente fuente de interleucina-1 (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Abbas y cols., 1999). A medida que la microbiota adquiere un componente Gram-negativo cada vez mayor, el sangrado al sondaje se incrementa, y de forma concomitante se incrementa la prostaglandina E-2 (PGE₂) en el fluido gingivocrevicular (FGC), como marcador de la penetración de los lipopolisacáridos (LPS) y de la activación de los monocitos. Esto sugeriría también que la capacidad de los neutrófilos se ha visto excedida, y los LPS han penetrado en los tejidos. Así pues, se incrementa tanto la prostaglandina anteriormente citada, como la IL-1 β y posiblemente TNF- α . Estos mediadores inducen a las células del huésped a la iniciación del catabolismo tisular. Así pues, la magnitud de la severidad clínica estaría directamente relacionada con la respuesta inflamatoria, detectándose niveles incrementados en los factores citados anteriormente.

La IL-1 β regula la producción de prostaglandinas, leucotrienos y factor de activación plaquetario en muchos tipos de células y promueve la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea (Gowen y Mundy 1986, Billingham 1987, Takatis y cols., 1988). El TNF- α también ejerce efecto proinflamatorio por lo que estimula la reabsorción ósea y la producción de colagenasa (Bertolini y cols., 1986, Meikle y cols., 1989). Además, provoca la apoptosis de las células productoras de matriz, limitando así la capacidad reparadora del periodonto (Graves y Cochran 2003; Hock y cols., 2001).

A nivel óseo, durante la periodontitis crónica se produce una pérdida de hueso debido a la reabsorción del mismo. Aunque se creía que los osteoblastos eran los reguladores funcionales principales de la actividad de los osteoclastos, otras muchas células tienen también influencia en la actividad de estos últimos, incluidos los fibroblastos del ligamento, que expresan el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa- β (RANKL) (Kanzaki y cols., 2002, Oshiro y cols., 2002). La identificación de un nuevo receptor, la osteoprotegerina (OPG), ha revelado un mecanismo regulatorio en la diferenciación y actividad de los osteoclastos. El ligando de dicha proteína – el OPGL – ha sido reconocido como el factor putativo de diferenciación de los osteoclastos, siendo expresado en la superficie de células del estroma óseo (Suda y cols., 1995). Dicho ligando señala la diferenciación de los osteoclastos a través de un receptor relacionado con el TNF- α , el Receptor para el Factor de Necrosis Tumoral (TNFR).

El descubrimiento de ambos marcadores ha dado lugar a un nuevo y amplio campo de estudio acerca del tratamiento de las enfermedades relacionadas con pérdida ósea. Determinados factores tales como citocinas (IL-1, -6, -12, y -17), hormonas (vitamina D, hormona paratiroidea), factores de crecimiento (TNF- α y proteína morfogenética de hueso-2) y otras moléculas, estimulan y regulan la expresión del gen

de RANKL en osteoblastos (Hofbauer y cols., 2000; Nakashima y cols., 2000). La interacción entre RANKL/RANK es necesaria para la diferenciación y maduración de las células precursoras de osteoclastos, y para la supervivencia de dichos osteoclastos una vez han madurado.

En contraposición con lo anterior, OPG actúa como señuelo para RANKL, e inhibe el desarrollo de los osteoclastos. Numerosos estudios han demostrado dicha actividad antagónica. La ablación genética de RANKL en ratones resulta en una osteopetrosis, como resultado de la ausencia de osteoclastos (Kong y cols., 1999, Simonet y cols., 1997), mientras que la subsecuente administración de RANKL en estos animales restaura la formación de osteoclastos, incrementándose la resorción ósea y con ello el desarrollo de osteoporosis (Bucay y cols., 1997). La relación entre RANKL/OPG se ve incrementada en la enfermedad periodontal en comparación con individuos sanos. Esto sugiere que esta interacción molecular podría ser importante en la modulación de hueso a nivel local (Mogi y cols., 2004).

2. Tratamiento convencional de la enfermedad periodontal

El objetivo del tratamiento convencional de la enfermedad periodontal supone la detención de la evolución de la enfermedad periodontal, eliminando las bacterias del biofilm – calcificado o no – de las superficies dentarias y tejidos blandos. No obstante, eliminar la totalidad de las bacterias es difícil, por lo que su objetivo realista sería disminuir la concentración bacteriana hasta un punto en el que el paciente mediante unas correctas técnicas de higiene oral, fuera capaz de prevenir la recolonización (O'Leary 1986).

Las bacterias se acumulan en la rugosidad radicular, produciendo lipopolisacáridos que se colocarían encapsulados sobre el cemento, y hasta 1mm de

profundidad en los tejidos blandos (Waerhaug, 1952). Es fundamental limpiar la raíz mediante Raspado y Alisado Radicular (RAR) porque si no, podrían impedir la regeneración de los tejidos conjuntivo o epitelial (Hughes y Smales, 1986).

La eficacia de la eliminación de la placa bacteriana y bolsa en el adecuado mantenimiento de la salud de la periodontal ha sido establecida. Es posible tratar con éxito la enfermedad periodontal y prevenir su progresión, con un exhaustivo control de la placa tras el tratamiento, incluso en casos avanzados (Lindhe y Nymann 1975; Lindhe y cols., 1984).

El desbridamiento es la técnica “*Gold Standard*” porque disminuye la concentración bacteriana, flujo del fluido gingivocrevicular y hace que el pH retorne a un estado neutro. Disminuyen las principales especies periodontopatógenas, pero no desaparecen porque han podido llegar a invadir hasta 1mm de tejidos blandos. Es por ello que se recurre a terapias complementarias tales como antisépticos o antibióticos. A su vez, influyen en el correcto RAR la destreza del operador, la anatomía y evolución de la enfermedad periodontal (Brayer, 1989).

La instrumentación puede ser manual (la sensibilidad es buena, no genera aerosoles, elimina cemento de la raíz, lleva más tiempo, es sensible a la técnica, y el acceso a furcas o base de la bolsa es complicado), sónica (presión neumática que produce que la sonda vibre) y ultrasónica (donde hay una conversión de energía eléctrica en mecánica, haciendo vibrar la punta) (Sbordone y cols., 1990).

Estudios realizados por Badersten en 1981, mostraron la no existencia de diferencias entre la instrumentación manual y la ultrasónica, ni tampoco entre una sola instrumentación y varias. Los instrumentos manuales fueron más efectivos en la remoción del cálculo en comparación con los ultrasonidos, aunque los dos llevaron a cabo dicha tarea. Dichos estudios concluyeron recomendando el alisado de la raíz con

curetas tras una instrumentación ultrasónica (Badersten 1981). En ese mismo año, otro estudio mostró como tras el RAR las bolsas de 1 a 3 mm mantenían el nivel de inserción y obtenían cierta retracción. Bolsas de profundidad moderada (de 4 a 6 mm) aumentaban levemente su nivel de inserción, y bolsas iguales o mayores a 7 mm aumentaban su nivel de inserción; en ellas fue donde se encontraron los mejores resultados (Philstrom y cols., 1981). Otros estudios mostraron sin embargo la efectividad del RAR independientemente de la profundidad de la bolsa (Hill y cols., 1981).

La dinámica del RAR consiste en la sujeción de la cureta a modo de “lapicero modificado”, se introduce en la bolsa con la hoja paralela a la superficie radicular y desde el fondo de la bolsa, angulando la cureta, se realiza un movimiento hacia la corona ejerciendo al mismo tiempo cierta presión contra la superficie dentaria. El ángulo óptimo entre el borde cortante de la cureta y la superficie radicular es de 80°. Si es mayor crea una superficie irregular, y si es menor, se limita a bruñir el cálculo.

El raspado ha de realizarse por cuadrantes, sextantes, hemiarcada o boca completa “*full mouth*”. Quyrinen introdujo este último concepto en el 2006, siendo el procedimiento terapéutico que mejores resultados ofrece, siempre que se emplee el tiempo mínimo necesario por cuadrante (aproximadamente 45 min) (Quyrinen y cols., 2007).

Diversos estudios indican que tanto la anatomía radicular, la morfología y la profundidad de la bolsa periodontal, así como una técnica inadecuada o la propia rugosidad de la superficie del diente, limitan el tratamiento convencional de la enfermedad (Brayer, 1989). Así, tras la instrumentación con curetas se observa cálculo residual y una capa de barrillo dentinario o “*smearlayer*”, constituida por bacterias y mediadores citotóxicos, que podría dificultar la reinsertión de los fibroblastos

retardando la curación del proceso (Stambaugh y cols., 1981). En los últimos años han aparecido nuevos diseños de curetas y ultrasonidos, así como ácidos y polvos abrasivos, que no obstante, presentan igualmente limitaciones sobre todo a nivel subgingival (Breininger y cols., 1987, Berkstein y cols., 1987, Gankerseer y Walmsley, 1987, Lasho y cols., 1983, Thomas y cols., 1994).

3. Tratamiento láser de la enfermedad periodontal:

En la búsqueda de terapias eficaces para lograr una superficie radicular biocompatible, con mayor grado de descontaminación y reducción de la inflamación de los tejidos periodontales adyacentes, aparece la tecnología láser como terapia alternativa o complementaria de los métodos tradicionales. Varios estudios avalan sus efectos beneficiosos en el desbridamiento del surco periodontal, disminución de la carga bacteriana subgingival y descenso de los mediadores inflamatorios (Ando y cols., 1996; Folwaczny y cols., 2002; Schwarz y cols. 2008). Recientemente, en el campo periodontal, también ha sido introducida la Terapia Fotodinámica (Maisch y cols., 2007; Chan y Lai, 2003).

Gracias a los últimos avances, el intervalo de longitudes de onda de emisión de la radiación láser se ha visto ampliado considerablemente, y numerosos estudios sugieren que los láseres pueden ser aplicados en diferentes tipos de tratamientos dentales. Hoy en día, disponemos de diferentes equipos de radiación láser en el campo periodontal (Er:YAG, Er, Cr, YSGG, Nd:YAG, Diodos, CO₂), cada uno con unas características particulares y efectos muy diversos, por lo que se exige la selección del más idóneo para cada tipo de trabajo (Tabla 1). Algunos de estos láseres son eficaces para eliminar el cálculo residual y detoxificar el cemento radicular (Er:YAG) (Aoki y cols., 2008; Schwarz y cols., 2008), otros no pueden eliminar el cálculo pero pueden

actuar sobre los tejidos blandos reduciendo la inflamación al modificar los sistemas de oxidación tisular y las citocinas mediadoras de inflamación (Nd:YAG, diodos) (Gómez y cols., 2011). La aplicación del láser en Periodoncia debe hacerse con el conocimiento de los procesos físicos y biológicos implicados, de ahí la variabilidad de los resultados obtenidos en función de los parámetros láser empleados, tales como: longitud de onda, duración de pulso, la energía/potencia aplicada, velocidad de repetición, el tiempo de exposición, dosificación simple o repetida, tipo de onda, continua (cw) o pulsada y tipo de aplicador.

Tabla 1. Láseres en periodoncia y tipo de interacción que establecen con el tejido periodontal

	Bioestimulación	Fotodinámico	Fotocoagulación	Fotovaporización	Fotoablación
Diodo 635 nm	**	**			
Diodo 650 nm	**	**			
Diodo 675 nm	**	**			
Diodo 690 nm	**	**			
Diodo 810 nm	** _a		**		
Diodo 980 nm	** _a		**	*	
Nd:YAG 1064nm/cw	* _a		**	*	
Nd:YAG 1064nm/pulsed					**
Er,Cr:YSGG 2790 nm					**
Er:YAG 2940 nm					**
CO ₂ 10600 nm				**	

a. A bajo nivel de energía

Actualmente el empleo de la radiación láser dentro de la bolsa periodontal se ha convertido en un tema de mucho interés y en un campo prometedor de la terapia

periodontal. Las ventajas de este tipo de tratamiento incluyen la efectividad y eficiencia en la ablación de tejidos blandos y duros con gran poder hemostático, efecto bactericida, contracción mínima de la herida, minimización de daños colaterales permitiendo una reducción de analgesia local, comodidad de aplicación y su aplicación silenciosa.

3.1 Fototerapia o bioestimulación láser: terapia láser de bajo nivel energético.

La herramienta láser cuenta con una amplia aplicación en el tratamiento de la enfermedad periodontal. Sin embargo, la variedad de efectos biológicos que la radiación láser puede producir en el tejido oral, aún no son plenamente comprendidos. Entre los muchos efectos fisiológicos, es importante reconocer efectos bioestimuladores beneficiosos de la radiación láser en las células del tejido durante la terapia láser, como por ejemplo la contribución a una cicatrización más rápida en el proceso de reparación de los tejidos periodontales, que puede que no ocurra durante la terapia mecánica convencional. Estos efectos biostimuladores se han asociado con el empleo de radiación láser de bajo nivel de energía (Peplow y cols., 2010). Conforme a la primera ley de la fotoquímica, el efecto biológico observado tras la aplicación de la radiación láser de bajo nivel energético, sólo puede ser resultado de la presencia de una molécula fotoaceptora, capaz de absorber la energía fotónica emitida (Karu, 2007). Además, asociado a este efecto no existen mecanismos fototérmicos ni fotoacústicos, por lo que no se observa calentamiento macroscópico. Una diana identificada en la fototerapia láser es una enzima altamente especializada, la Citocromo c oxidasa, que desempeña un papel crucial en la bioenergía celular. Algunos estudios indican que tras la irradiación con láser a 633 nm, se incrementa tanto el potencial de membrana como el gradiente de

protones, provocando cambios en las propiedades ópticas de la mitocondria, aumentando la tasa de intercambio de difosfato de adenosina/trifosfato de adenosina (ADP/ATP) (Alexandratou y cols., 2002). La regulación al alza de ATP tras la irradiación con láser de bajo nivel energético también se acopla con incrementos transitorios de las especies reactivas del oxígeno (ROS), participando a continuación en la transducción de señales intercelulares (Tafur y Mills, 2008). Se ha observado que la modulación del metabolismo celular y de la transducción de señales altera la expresión genética (Snyder y cols., 2002), la proliferación celular (Moore y cols., 2005), el potencial de membrana mitocondrial (Alexandratou y cols., 2002), la de especies reactivas del oxígeno transitorias (Lubart y cols., 2005), el nivel de calcio (Tong y cols., 2000) y el gradiente de protones y el consumo de oxígeno.

De momento, los resultados sobre la aplicación de la radiación láser de baja potencia en la enfermedad periodontal siguen siendo controvertidos. Ribeiro y cols. (Ribeiro y cols., 2008) corroboraron que la utilización del láser de diodo como adyuvante (complemento) del raspado y alisado radicular en un total de 4 veces en los primeros dos días de tratamiento no aportaban ningún beneficio clínico aparente en los dientes con poca y moderada profundidad. Lai y cols. (Lai y cols., 2009) también han observado que la fototerapia utilizada como complemento del tratamiento periodontal no quirúrgico un total de 8 veces en los primeros 3 meses de tratamiento no mejoró la respuesta de curación evaluada mediante parámetros clínicos y radiográficos. En un estudio de Yilmaz y cols., el láser por sí solo no afectó la respuesta inflamatoria más que las instrucciones sobre higiene oral (Yilmaz y cols., 2002). El resultado del grupo que recibió desbridamiento subgingival acompañado de la aplicación de la radiación láser de bajo nivel energético, fue similar al del grupo que recibió exclusivamente desbridamiento subgingival. Sin embargo, existen otros estudios que corroboran la

eficacia de la fototerapia, por ejemplo, Qadri y cols. (Qadri y cols., 2005) observaron una reducción de PPD, PI, GI y FCG y de la MMP-8 significativamente mayor en las zonas tratadas con láser, por lo tanto, el uso de un láser de baja potencia como un complemento al tratamiento de la inflamación periodontal, mostró una influencia positiva sobre la inflamación y la cicatrización. Pejčic y cols. (Pejčic y cols., 2010) mostraron que la radiación láser de baja potencia a 670 nm se puede utilizar como un método físico de éxito como tratamiento adyuvante, que, junto con la terapia periodontal tradicional, conduce a mejores resultados terapéuticos y más duraderos, así los valores de IP, IG y sangrado al sondaje disminuyeron hasta un cierto punto, además de demostrar que el número de aplicaciones láser es importante para obtener mejores resultados, en concreto, después de la quinta aplicación, se logró un considerable efecto anti-inflamatorio. Además, Kreisler y cols. (Kreisler y cols., 2005) utilizando un láser semiconductor de GaAlAs a 809 nm, operando a una potencia de 1,0 W complementando al tratamiento convencional de raspado y alisado radicular, mostraron una reducción significativamente mayor en la movilidad del diente, la profundidad de bolsa, y la pérdida de inserción clínica, probablemente relacionada fundamentalmente con la re-epitelización de las bolsas periodontales que conducen a una mejor reinsertación de tejido conjuntivo. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al índice de placa, índice gingival, sangrado al sondaje, y volumen de FGC.

Conviene resaltar que pese a la gran variedad de estudios publicados desde la introducción de la radiación laser en la terapéutica periodontal, apenas existen estudios que comparen el tratamiento convencional y el tratamiento de Fototerapia láser conjuntamente sobre estos tres aspectos: reducción de los parámetros clínicos, inhibición de ciertos mediadores de la inflamación y modulación de los marcadores osteoinmunológicos. Todo ello hace muy interesante la realización de estudios

sistemáticos que evalúen el potencial que presenta cada tipo de tratamiento (convencional y láser) sobre los aspectos anteriormente comentados, con vistas a una consolidación de la aplicación clínica de la Fototerapia láser en Periodoncia.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los recientes progresos tecnológicos conducen a un continuo desarrollo de nuevas técnicas para tratar la enfermedad periodontal. La necesidad de encontrar tratamientos optimizados es el objetivo a largo plazo de científicos y periodoncistas. En este sentido, recientes investigaciones han mostrado que la radiación láser de bajo nivel energético (en el orden de mW) emitiendo en el intervalo espectral rojo-IR cercano (700-1000 nm), presenta una serie de ventajas útiles en el manejo de la enfermedad periodontal, pues además de sus efectos antiinflamatorios, ofrece efectos positivos sobre la reducción del dolor, reduciendo la necesidad de anestesia y reduciendo también el tiempo de postoperatorio al mejorar la cicatrización. A pesar de estas observaciones, la fotobioestimulación láser tiene todavía limitada aplicaciones clínicas y siguen siendo escasos los estudios publicados que evalúan los efectos de la fototerapia sola o combinada con un tratamiento periodontal convencional no quirúrgico. En base a estas consideraciones, el objetivo principal del presente estudio consistió en evaluar el potencial terapéutico del láser en la práctica periodontal mediante un examen *in vivo* de los efectos clínicos, anti-inflamatorios y osteoinmunológicos de la terapia láser de baja energía (Fototerapia) aplicada en una única dosis o en dosis repetidas, en combinación con la terapia periodontal convencional (RAR), frente al RAR aplicado como monoterapia, en pacientes afectados de periodontitis crónica.

Como objetivos específicos se propusieron:

- Analizar la evolución de los parámetros clínicos durante el estudio:
 - Porcentaje de sangrado en boca total (PPBT), porcentaje de placa en boca total (PBBT), profundidad de sondaje (PS) en mm.

- Analizar la evolución de las concentraciones (pg/ μ L) de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α en el FGC durante el estudio.
- Analizar la evolución de las concentraciones (pg/mL) de las moléculas de señalización ósea RANKL y OPG en el FGC durante el estudio.
- Estudiar la dependencia de estos efectos con la frecuencia de aplicación del tratamiento: una única dosis o repetida en varias sesiones

3. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio y población estudiada:

El presente estudio fue desarrollado en el Departamento de Estomatología III, de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, donde se seleccionaron los sujetos susceptibles de ser estudiados, y donde se realizó la metodología del estudio, el estudio clínico y los test de ELISA. Los resultados se procesaron en el Departamento de Baja Dimensionalidad, Superficies y Materia Condensada del Instituto de Química y Física Rocasolano, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid.

Tras evaluar el estado periodontal de 50 pacientes, 17 fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión. De los pacientes examinados, 33 fueron incluidos en el estudio; de ellos, 6 abandonaron el estudio por distintos motivos, entre los que predominaron la necesidad de toma de medicación por motivos ajenos al estudio y la imposibilidad de acudir a las citas. Por lo tanto, de los 50 pacientes iniciales, 27 pudieron ser sujeto de la investigación, durante el periodo comprendido entre enero de 2010 y junio de 2011.

De esta forma, se estudiaron 27 pacientes (16 eran mujeres y 11 hombres), de 40 a 59 años de edad, todos ellos afectados de periodontitis crónica-moderada, que fueron asignados en tres grupos para seguir tres tipos de tratamiento diferentes (RAR, RAR complementado con fototerapia única y RAR complementado con fototerapia láser repetida). La asignación se realizó aleatoriamente mediante el método de asignación al azar de sobres numerados. La secuencia de tratamiento correspondiente a cada grupo no fue desvelada hasta la realización de las primeras aplicaciones láser.

2. Criterios de inclusión:

Presencia de al menos 4 dientes por cuadrante, y que éstos no fueran portadores de coronas, puentes, apoyo de prótesis removibles, o de amalgamas clase II o IV. A su vez debía haber un mínimo de 6 dientes con una PS mayor o igual a 4 mm, así como una pérdida ósea radiográfica de al menos el 30% (según la clasificación de severidad periodontal basada en la localización de la cresta alveolar).

3. Criterios de exclusión:

Presencia de lesiones de furca clase III, ser fumador, haber recibido tratamiento periodontal o terapia antibiótica o antiinflamatoria en los últimos tres meses previos al estudio o durante el estudio. El uso de colutorios antisépticos, anticoagulantes, corticoides o inmunosupresores, así como aquellos cuyas condiciones sistémicas pudieran afectar al estado periodontal o fiabilidad de los parámetros examinados (como por ejemplo, diabetes mellitus tipo I y II, leucemia o neutropenia).

4. Requisitos éticos

Una vez explicado el tratamiento por los operadores, los pacientes de forma voluntaria decidieron enrolarse en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado del estudio de investigación. Este estudio cuenta con la aprobación de la Unidad de Coordinación de Ensayos Clínicos del Hospital San Carlos de Madrid, con fecha del 25 de junio de 2009.

5. Mediciones clínicas: Porcentaje de placa en boca total, porcentaje de sangrado en boca total y profundidad de bolsa:

Las mediciones fueron tomadas antes del tratamiento y a las 4 semanas y 8 semanas después del tratamiento por un periodoncista calibrado. La calibración del examinador se realizó con 5 pacientes en los cuales se realizó un periodontograma inicial y otro transcurridas 48 horas. La calibración se completó de forma exitosa, una vez que ambas mediciones coincidieron en $> 90\%$.

Las mediciones fueron tomadas en todos los dientes excluyendo los terceros molares; y tomando seis localizaciones por diente: mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual. Se calculó el Porcentaje de placa en boca total (PPBT), Porcentaje de sangrado en boca total (PSBT) y Profundidad de Sondaje (PS) antes de realizar el tratamiento correspondiente a cada grupo.

El PPBT fue determinado mediante una sonda exploratoria de caries (n°23) en seis localizaciones por dientes; registrando la ausencia o presencia de placa. Posteriormente se llevó a cabo la limpieza supragingival para facilitar el sondaje.

Mediante una sonda periodontal calibrada (CP 15 UNC; Hu-Friedy Instrument Co, Chicago, IL, USA), se determinó la PS. De modo concomitante, se determinó el PSBT atendiendo a la presencia o ausencia de sangrado transcurridos 30 segundos del sondaje. Siempre siguiendo la misma sistemática y en las mismas localizaciones para todos los pacientes.

6. Recolección de fluido gingival crevicular (FGC)

Para la toma de muestras de FGC se seleccionan las cuatro localizaciones más profundas de cada cuadrante (excluyendo los terceros molares); por consiguiente, se tomaron cuatro localizaciones por paciente. La toma de muestras se efectuó al día

siguiente de la profilaxis supragingival y periodontograma para evitar tanto el sangrado como la contaminación de las puntas en la toma.

Se aislaron los dientes con rollos de algodón (Hartmann N.1), y se removieron los posibles restos de placa supragingival con curetas (HU Friedy, Chicago, IL, USA), siempre sin tocar encía marginal para la correcta extracción de la muestra. La superficie del diente se secó con la jeringa de aire, y se introdujeron entonces puntas de papel prefabricadas (Periopaper, Oraflow INC., Plainview, NY, USA) en las bolsas periodontales previamente seleccionadas; hasta que la resistencia lo permitiera. Se dejaron 30 segundos para que pudieran absorber correctamente el FGC. Las muestras contaminadas por sangre fueron desechadas.

Una vez recogida la muestra, la punta de papel era colocada en un Periotron 8000 (Pro-Flow Inc., Amityville, New York, USA) para medir el volumen de FGC absorbido. Las lecturas obtenidas fueron convertidas en volumen actual (μL), gracias a la realización previa de una curva calibrada con suero humano de pacientes sanos donantes de sangre, y ajustada a una regresión polinómica de cuarto orden (Chapple y cols., 1999).

Los *periopapers* se almacenaron en viales estériles con filtro, y se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su posterior análisis.

Las muestras de FGC se tomaron antes de realizar el tratamiento para analizar IL-1 β , TNF- α , RANKL y OPG; así como a las 4 y 8 semanas después del tratamiento siguiendo el mismo protocolo y localización.

7. Procesado de las muestras

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

7.1 Medición de IL-1 β y TNF- α

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

7.2 Medición de RANKL y OPG

Muestras diluidas de FGC se analizaron también para determinar la concentración de RANKL y OPG mediante la técnica ELISA. Sus niveles en FGC fueron determinados por duplicado mediante K 1016-96 TestRANKL total-EIA (kit de ELISA para determinación del RANKL) y KB 1011-96 Testosteoprotegerina (kit de ELISA para determinación del OPG), respectivamente, ambos de Immundiagnostik (Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RANKL y OPG en el FGC expresadas en pg/ μ L se calcularon a partir de las curvas estándar creadas para cada estudio, siguiendo el mismo protocolo expuesto en el apartado anterior.

8. Tratamiento periodontal básico e instrucciones de higiene oral

Todos los participantes recibieron tratamiento periodontal básico incluyendo raspado y alisado radicular e instrucciones de higiene oral. Se realizó primeramente una limpieza supragingival con ultrasonidos sonicador SONIflex 3000 de Kavo aplicado con una inclinación de 20-30°. La limpieza subgingival se realizó con curetas Grashey (Hu-Friedy Co., Chicago, IL, USA), a “full mouth” y empleando un mínimo de 45 minutos por cuadrante. Se terminó con un cepillo de profilaxis de cerda natural (Stoddard., diámetro 8mm para contra-ángulo), y pasta abrasiva (Détartine, Septodont) a nivel supragingival. Todos los pacientes fueron anestesiados con lidocaína al 2% (Octocaine 1:100.000, Laboratorios Clarben S.A, Madrid).

Las instrucciones de higiene oral consistieron en la inicial instrucción en la identificación de la placa bacteriana, instrucciones en técnica de cepillado combinada (técnica de Bass y técnica de Stillman) y en la instrucción en la utilización de los cepillos interproximales y el hilo dental. Todo ello apoyado por su reproducción en un tipodonto, así como en el paciente frente a un espejo. La motivación del paciente se hizo imprescindible para la consecución de un correcto control de placa bacteriana.

9. Tratamiento láser de diodo

En los dos grupos sometidos a Fototerapia láser, el tratamiento periodontal básico fue complementado con la radiación con un láser de diodo (PeriowaveTM, Ondine BioPharma), emitiendo a una longitud de onda de $\lambda = 670$ nm, con una potencia de 200 mW, aplicada en toda la cavidad oral.

La radiación se aplica a través de una fibra óptica flexible conectada a una pieza de mano autoclavable de acero inoxidable diseñada para el usuario. La pieza de mano da cabida a una punta difusora de luz configurada de manera similar a una sonda

periodontal para permitir el acceso a la bolsa periodontal. Como ya se ha comentado, todos los tratamientos se realizaron con una potencia continua de 200 mW (comprobada antes de cada tratamiento mediante el empleo de un detector de potencia láser XLP de Gentec en combinación con una consola Gentec-SOLO 2) y tiempo de irradiación de 60 segundos por diente (30 segundos por la cara vestibular y lingual respectivamente), que viene determinado como un ciclo de iluminación por el propio sistema láser. La punta difusora de luz se desplazó suavemente alrededor de la bolsa periodontal de cada diente durante cada ciclo de la iluminación. Paciente, operador y los asistentes utilizaron gafas de protección durante la aplicación láser.

A los nueve pacientes del grupo de fototerapia única se les aplicó el láser 24 horas después de haber realizado el RAR, en una única exposición.

Por otro lado, los otros nueve pacientes del grupo de fototerapia repetida, fueron sometidos al tratamiento láser los días 1, 2, 4, 7 y 11, es decir, cinco sesiones durante las dos semanas primeras semanas del estudio.

10. Análisis estadístico

Se procedió al análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos (media y desviación típica). Se analizaron las diferencias en la evolución de los parámetros clínicos, inflamatorios y osteoinmunológicos (antes del tratamiento, a las 4 y 8 semanas) entre los cinco tipos de tratamientos aplicados: RAR, RAR+FTs, RAR+FTr.

Para establecer comparaciones intragrupos (entre post-terapia y estado basal), el test utilizado para el análisis estadístico fue el test no paramétrico de Wilcoxon, considerándose los valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos. Para establecer comparaciones intergrupos, el test utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney, aceptándose los valores $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

1. Índices clínicos

Se observó una remisión de la enfermedad periodontal crónica en los tres grupos de tratamiento. No se observaron complicaciones durante el periodo de estudio como abscesos o infecciones, por lo que ambos tipos de tratamientos fueron bien tolerados.

1.1 Porcentaje de placa en boca total (PPBT):

Se encontró una marcada reducción del porcentaje de placa en boca total (PPBT) entre el estado inicial (0 semanas) y la primera reevaluación (4 semanas) tanto en el grupo control (RAR) como en el de fototerapia simple (RAR+FTs) y repetida (RAR+FTr) (Figura 1), teniendo lugar un descenso mayor en este periodo en el grupo de RAR+FTr (Figura 2), con una media de un 23% de las superficies con placa.

A las 8 semanas, se mantuvo el descenso en el PPBT en todos los grupos evaluados, y los valores más bajos se siguieron registrando en el grupo de RAR+FTr (Figura 2). Todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la primera y segunda reevaluación (4 y 8 semanas del tratamiento) respecto al estado inicial, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas intergrupos.

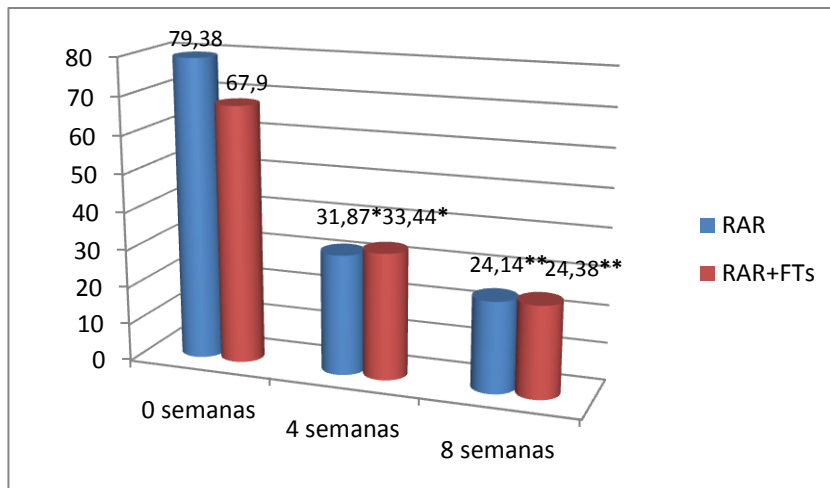


Figura 1- Evolución del PPBT durante el tratamiento grupo control (RAR) y fototerapia única (RAR+FTs)

*: DES intragrupo respecto al baseline a las 4 semanas.

** : DES intragrupo respecto al baseline a las 8 semanas.

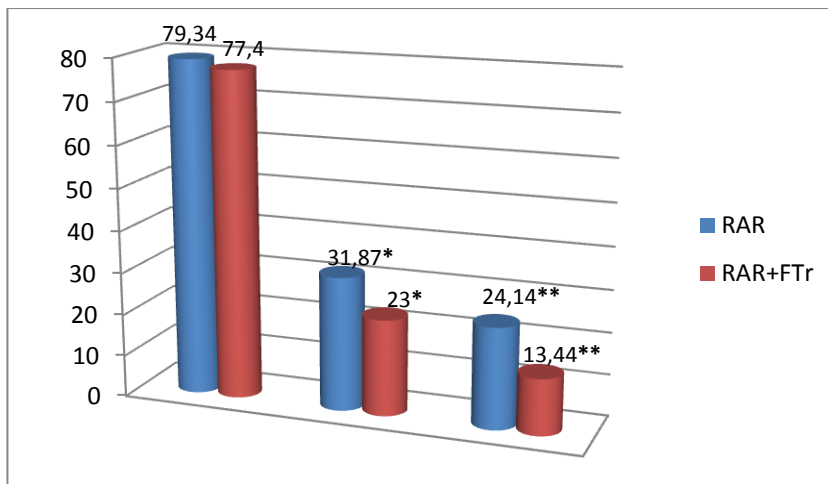


Figura 2- Evolución del PPBT durante el tratamiento en el grupo control (RAR) y fototerapia repetida (RAR+FTr).

*: DES intragrupo respecto al baseline a las 4 semanas.

** : DES intragrupo respecto al baseline a las 8 semanas.

1.2 Porcentaje de sangrado en boca total (PSBT)

Para valorar la reducción en el sangrado gingival con los tratamientos aplicados se calculó el porcentaje de sangrado en boca total (PSBT). En este caso también podemos observar como para los tres grupos evaluados su reducción fue más marcada a las 4 semanas del tratamiento (Figuras 3 y 4), manteniéndose en descenso, aunque menos acusado, hasta las 8 semanas. En este caso los valores mínimos se registraron en

el grupo control presentando un porcentaje de sangrado de un 21,68% en la segunda reevaluación (8 semanas). De nuevo, y al igual que sucede con el PPBT, los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la primera y segunda reevaluación (4 y 8 semanas del tratamiento) respecto al estado inicial; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas intergrupos.

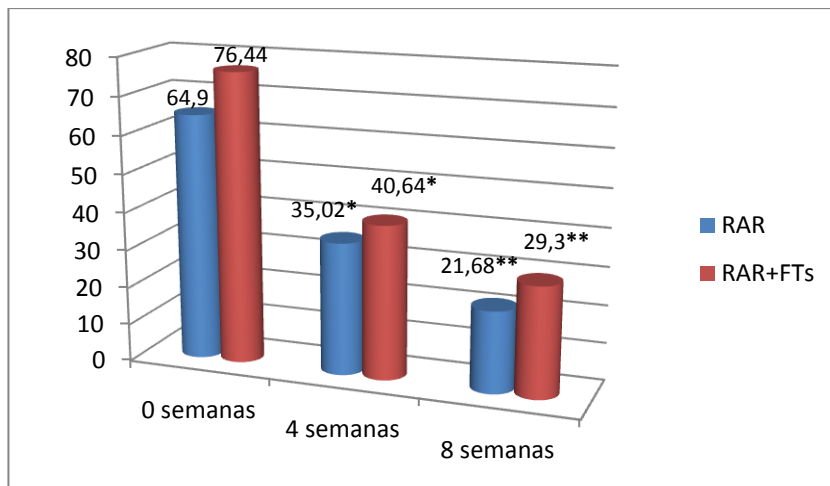


Figura 3- Evolución del PSBT durante el tratamiento en el grupo control (RAR) y fototerapia simple (RAR+FTs).

*: DES intragrupo respecto a baseline a las 4 semanas.
 **: DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas.

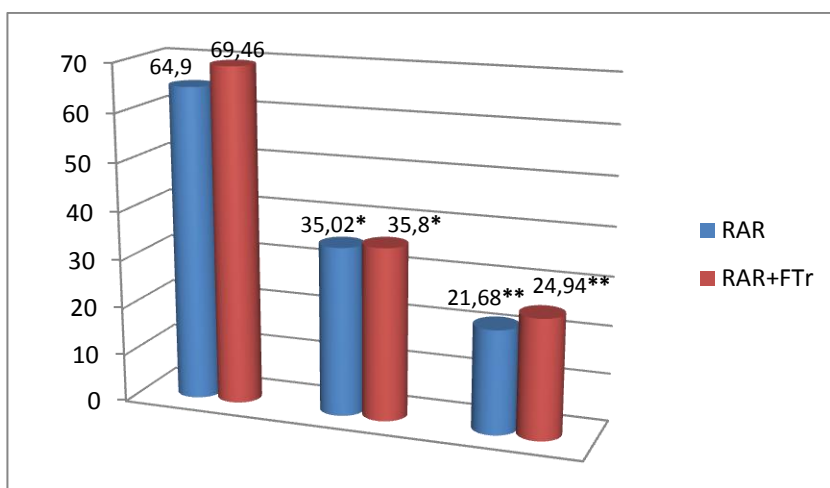


Figura 4- Evolución del PSBT durante el tratamiento en el grupo control (RAR) y fototerapia repetida (RAR+FTr)

*: DES intragrupo respecto a baseline a las 4 semanas.
 **: DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas.

1.3 Profundidad de sondaje (PS)

Observando la profundidad de sondaje media (PS) de los tres grupos observamos que los tres tratamientos resultan efectivos en la reducción de la bolsa, obteniéndose la mayor reducción a las 4 semanas en el grupo control.

Tanto en el grupo control como a los que se les adjuntó fototerapia (simple o repetida), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en las dos reevaluaciones y el estado inicial (Figuras 5 y 6); no obstante, tampoco aquí encontramos diferencias estadísticamente significativas intergrupos.

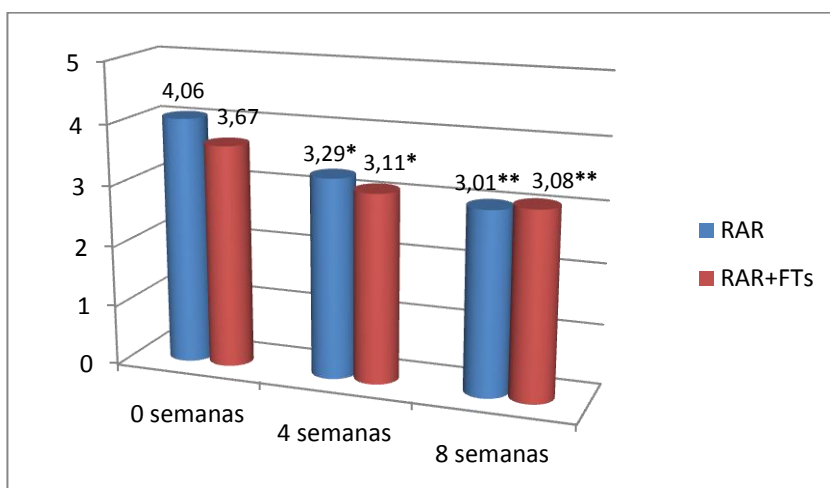


Figura 5- Evolución de la PS durante el tratamiento en el grupo control y fototerapia única (RAR+FTs).

*:DES intragrupo respecto a baseline a las 4 semanas.

** : DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas.

El análisis de diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos mediante el análisis de varianzas de ANOVA complementado por pruebas a posteriori mediante el test de Duncan, no detectó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y ambos grupos de fototerapia en la evolución de los parámetros clínicos estudiados desde el estado inicial y la primera y segunda reevaluación.

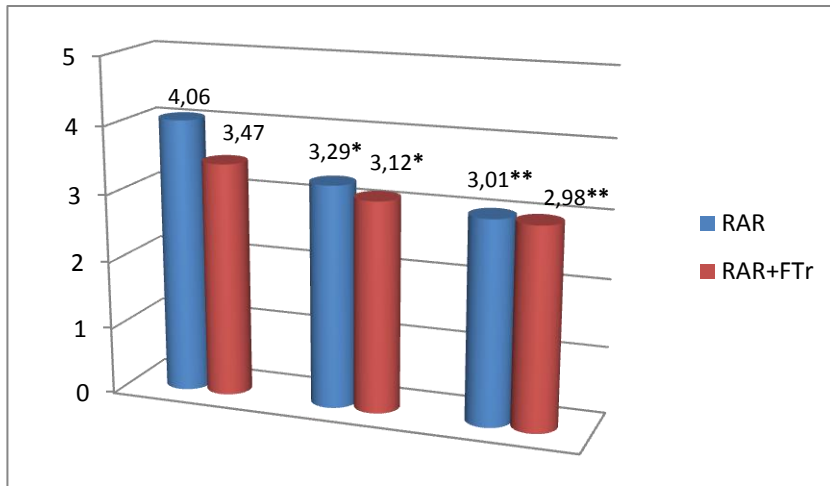


Figura 6- Evolución de la PS durante el tratamiento en el grupo control y fototerapia repetida (RAR+FTr).

*: DES intragrupo respecto a baseline a las 4 semanas.

** : DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas.

Podemos resumir diciendo que el análisis de los parámetros clínicos evaluados nos muestra una mejoría de la enfermedad en los tres grupos de tratamiento, mucho más relevante en las 4 semanas siguientes al mismo. La fototerapia con láser de diodo a 670nm como tratamiento complementario, no conlleva beneficio adicional en dichos parámetros clínicos respecto al tratamiento convencional de raspado y alisado radicular en el tratamiento de la enfermedad periodontal crónica.

2. Mediadores proinflamatorios

2.1 Interleucina-1 β (IL-1 β)

El recuento de esta citocina proinflamatoria aumentó progresivamente en el grupo control, encontrándose niveles más elevados a las 4 y a las 8 semanas, con diferencias estadísticamente significativas en ambos casos respecto al estado inicial (Figuras 7 y 8).

En el grupo de RAR+FTs se encontró que los niveles de IL-1 β estaban ligeramente aumentados a las 4 semanas respecto del estado inicial, para volver a disminuir a las 8 semanas, sin llegar a detectarse diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las reevaluaciones respecto al estado inicial (Figura 7). Sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles de IL-1 β alcanzados en el FGC a las 8 semanas del tratamiento entre los grupos RAR (control) y RAR+FTs.

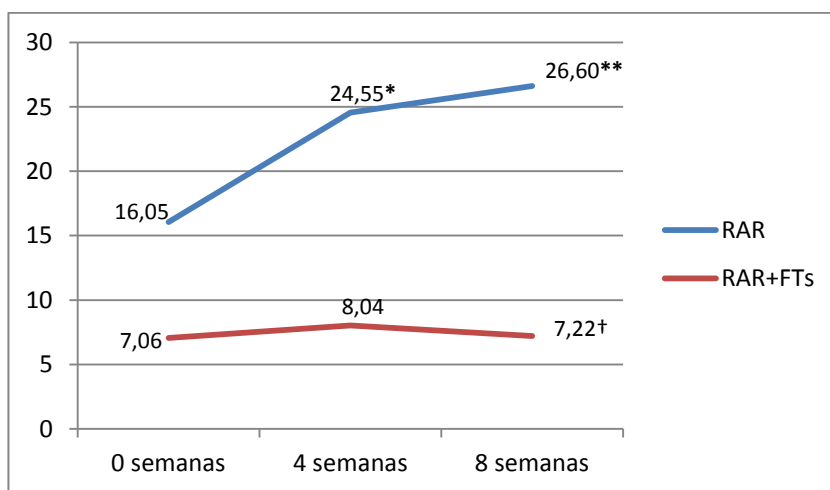


Figura 7- Evolucion de la IL-1 β durante el tratamiento en el grupo control (RAR) y fototerapia única (RAR+FTs)

*: DES intragrupo respecto a baseline a las 4 semanas
 **: DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas
 †: DES intergrupo entre RAR y RAR+FTs

En el grupo de RAR+FTs los niveles de IL-1 β en el FGC se encontraron reducidos tanto a las 4 como a las 8 semanas, siendo esta reducción estadísticamente significativa en la segunda reevaluación respecto a su valor inicial (Figura 8). Aquí se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores obtenidos tanto a las 4 como a las 8 semanas del tratamiento entre los grupos RAR (control) y RAR+FTs (Figura 8).

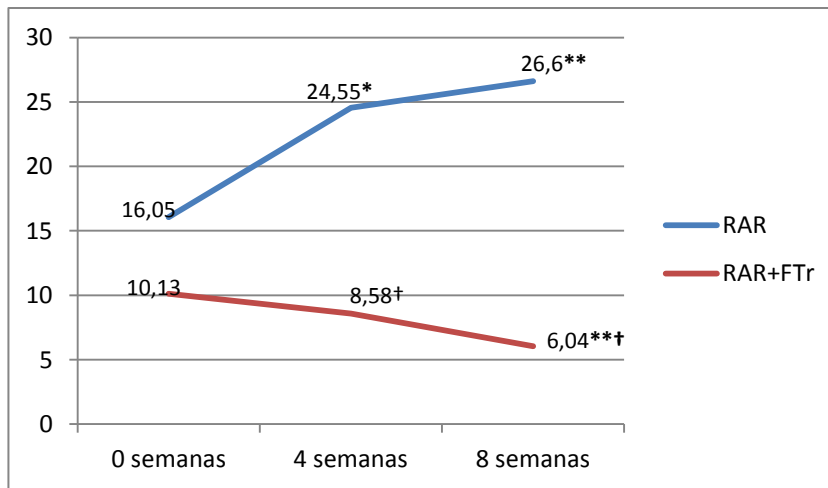


Figura 8- Evolución de los niveles de IL-1 β durante el tratamiento en el grupo control (RAR) y fototerapia repetida (RAR+FTr)

*: DES intragrupo respecto a baseline a las 4 semanas

** : DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas

†: DES intergrupo entre RAR y RAR+FTr

Finalmente, el análisis de diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos mediante el análisis de varianzas de ANOVA complementado por pruebas a posteriori mediante el test de Duncan, detectó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y ambos grupos de fototerapia en la evolución de los niveles de IL-1 β desde el estado inicial y la primera reevaluación; así como también desde dicho estado inicial y la segunda reevaluación, mostrándose de esta manera la fototerapia como un complemento útil y efectivo para la reducción de este mediador.

2.2. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

En el grupo RAR (control), los niveles de TNF- α aumentaron tanto a las 4 como a las 8 semanas, siendo en este último registro donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al estado inicial (Figuras 9 y 10).

Por el contrario, en el grupo de RAR+FTs, los niveles se elevaron en un primer momento a las 4 semanas, para volver a descender a las 8, sin encontrarse diferencias

estadísticamente significativas respecto al estado inicial en ninguno de las dos reevaluaciones (Figure 9).

El análisis estadístico intergrupos mediante el test de Mann-Whitney reveló diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la evolución de los niveles de TNF- α en FGC entre ambos grupos: RAR y RAR+FTs entre el estado inicial y las 8 semanas post-tratamiento (Figure 9).

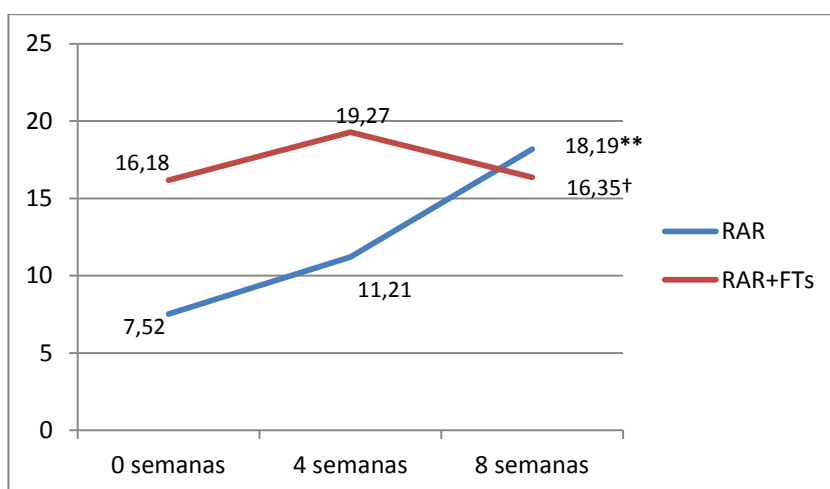


Figura 9- Evolución de los niveles de TNF- α durante el tratamiento para el grupo control (RAR) y fototerapia única (RAR+FTs).

** : DES intragrupo entre baseline y las 8 semanas.

† : DES intergrupo entre RAR y RAR+FTs.

En el grupo de RAR+FTs el descenso fue más marcado, encontrándose diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles de TNF- α en el estado inicial y los obtenidos a las 8 semanas (Figura 10). Aquí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la evolución de los niveles de este mediador proinflamatorio entre ambos grupos (RAR y RAR+FTs) entre el estado inicial y las 4 y 8 semanas después del tratamiento (Figura 10).

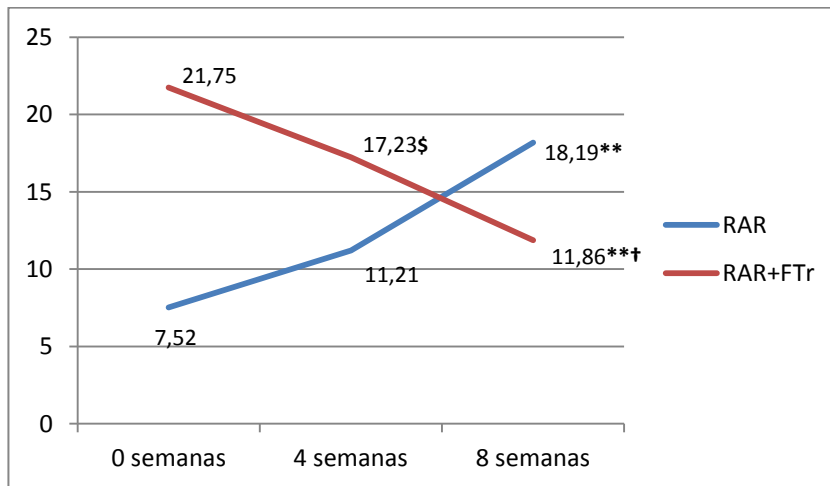


Figura 10- Evolución de los niveles de TNF- α durante el tratamiento en el grupo control (RAR) y fototerapia repetida (RAR+FTr).

** : DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas.

† : DES intergrupo entre RAR y RAR+FTr.

Por último, el análisis de diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos mediante el análisis de varianzas de ANOVA complementado por pruebas a posteriori mediante el test de Duncan, detectó diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de RAR+FTr frente a los grupos RAR y RAR+FTs en la evolución de los niveles de TNF- α desde el estado inicial y la primera reevaluación. También se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RAR+FTr frente al grupo RA+FTs y éste a su vez diferente al grupo RAR en cuanto a la evolución de dichos niveles desde el estado inicial y la segunda reevaluación, mostrándose de esta manera que el empleo de la fototerapia aplicada en dosis repetidas durante las dos primeras semanas del tratamiento sirve como un complemento útil y efectivo para la reducción de este mediador en particular.

3. Cociente RANKL/OPG

En primer lugar, se observó que en el grupo control dicho cociente aumentó de forma leve pero constante, tanto a las 4 como a las 8 semanas; encontrándose diferencias estadísticamente significativas respecto al estado inicial en esta última reevaluación (Figuras 11 y 12).

El grupo correspondiente a RAR+FTs mostró valores inicialmente en ascenso, invirtiéndose este comportamiento entre las 4 y 8 semanas post-tratamiento, pese a que no se registraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores iniciales. El análisis estadístico intergrupos mediante el test de Mann-Whitney reveló diferencias estadísticamente significativas en la evolución del cociente RANKL/OPG, entre los grupos RAR y RAR+FTs entre el estado inicial y las 8 semanas post-tratamiento (Figura 11).

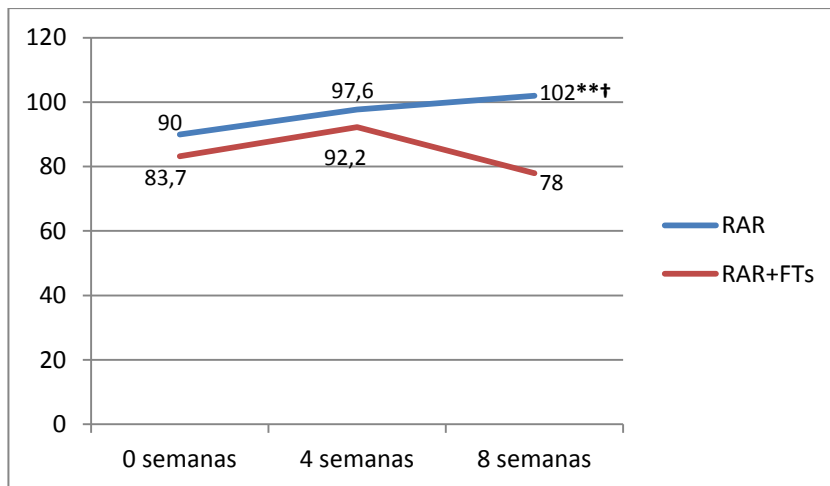


Figura 11- Evolución de RANKL/OPG durante el tratamiento en el grupo control (RAR) y fototerapia única (RAR+FTs).

** : DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas.

† : DES intergrupo entre RAR y RAR+FTs.

Por su parte, en el grupo correspondiente a RAR+FTs, encontramos que el cociente RANKL/OPG sufrió un descenso constante, siendo más acusado a las 4

semanas, y más ligero a las 8. En este caso sí se registraron diferencias estadísticamente significativas intragrupo tanto en la primera como en la segunda reevaluación frente al estado inicial. Además, el test de análisis de Mann-Whitney determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el de RAR+FTr a las 4 y 8 semanas (Figura 12).

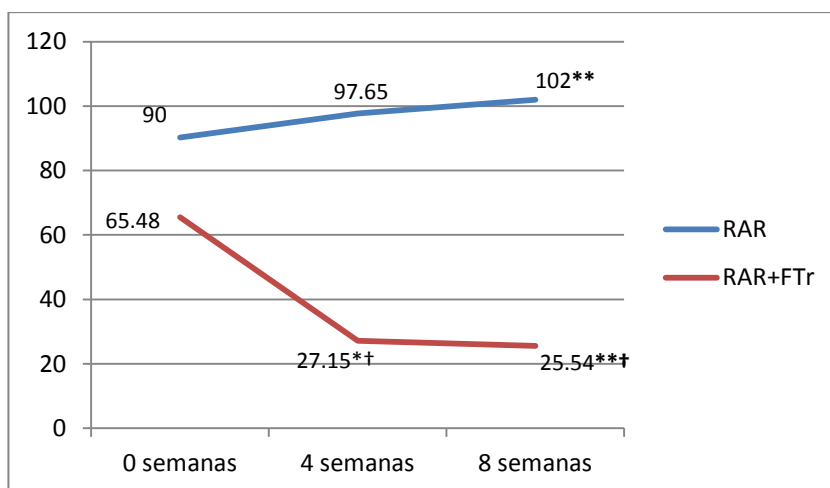


Figura 12- Evolución de RANKL/OPG durante el tratamiento en el grupo control (RAR) y fototerapia repetida (RAR+FTr).

** : DES intragrupo respecto a baseline a las 8 semanas.

† : DES intergrupo entre RAR y RAR+FTr

Para concluir, se llevó a cabo un análisis de diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos mediante el análisis de varianzas de ANOVA complementado por pruebas a posteriori mediante el test de Duncan, detectándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RAR+FTr frente a los grupos RAR y RAR+FTs en la evolución del cociente RANKL/OPG en el FGC desde el estado inicial y la primera reevaluación. También se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RAR+FTr frente al grupo RAR+FTs y este a su vez diferente al grupo RAR en cuanto a la evolución de dicho cociente desde el estado inicial y la segunda reevaluación. Este análisis viene a confirmar que una fototerapia repetida durante el inicio del tratamiento es clave en la reducción de este

cociente y por tanto más efectiva en el tratamiento de la enfermedad crónica periodontal, al mismo tiempo que el simple efecto de una única dosis de fototerapia muestra una interesante acción a medio plazo frente al tratamiento convencional.

5.DISCUSIÓN

El tratamiento periodontal no quirúrgico está dirigido a eliminar eficazmente los microorganismos periodontopatógenos, con el fin de controlar la progresión de la enfermedad. El raspado y alisado radicular subgingival es el procedimiento más importante y su eficacia clínica ha sido demostrada en numerosos estudios clínicos (Umeda y cols., 2004; Machion y cols., 2006), especialmente válido para bolsas periodontales con una profundidad de sondaje de menos de 6 mm. Sin embargo, con el aumento de la profundidad de la bolsa, la eliminación del cálculo y el control de la placa resultan complicados y se recomiendan los procedimientos quirúrgicos (cirugía de colgajo), permitiendo un mejor acceso y control visual de la superficie de la raíz. Las curetas y los sistemas ultrasónicos se utilizan habitualmente para la eliminación del cálculo subgingival y placa bacteriana. Los láseres de bajo nivel de energía han demostrado tener importantes efectos antiinflamatorios (Qadri y cols., 2005; Safavi y cols., 2008). Los láseres de diodo: GaAlAs (Arseniuro de Galio y Aluminio), InGaAlP (Fosfato de Indio-Galio-Aluminio) y GaAs (Arseniuro de Galio), junto con el láser de He:Ne por su longitud de onda, permiten a una intensidad y dosis adecuada producir el efecto fotobiomodulatorio (Yilmaz y cols., 2002; Karu, 2007).

Todavía siguen siendo muy limitados los estudios básicos que evalúan los efectos de la terapia láser de bajo nivel energético, y únicamente hasta la fecha sólo existen unos pocos estudios clínicos publicados sobre los efectos de la terapia adyuvante con láser de bajo nivel energético en el tratamiento periodontal no quirúrgico. Así, en la actualidad, la superioridad de este novedoso tratamiento en comparación con el tratamiento convencional no ha sido demostrada claramente. Por ello, son necesarios estudios clínicos adicionales que demuestren los beneficios de la radiación láser de bajo nivel energético en la terapia periodontal.

Los resultados del presente trabajo de investigación mostraron una mejora de los parámetros clínicos analizados (PPBT, PSBT y PS) tanto a las 4 como a las 8 semanas del tratamiento en todos los grupos estudiados. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas intergrupos. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación que han empleado fototerapia con láser de diodo, incluso con mayor potencia. Kreisler y cols., observaron que la aplicación de radiación láser procedente de un laser de diodo de GaAlAs ($\lambda=810$ nm) a una potencia de 1W (cw), no ejercía un efecto sustancialmente positivo sobre la nueva inserción de células del ligamento periodontal (Kreisler y cols., 2001), sin embargo, resultaba en una reducción más alta y significativa en la morbilidad dentaria, profundidad de sondaje y en la pérdida de inserción clínica, aunque sin diferencias estadísticas importantes en el índice de placa, índice gingival o FGC, pese a que la reducción permanecía mayor en el grupo irradiado (Kreisler y cols., 2005).

Posteriormente, en un estudio de Assaf y cols., comparando “RAR con ultrasonidos” y “RAR con ultrasonidos y láser de diodo” tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto al índice de placa (IP), índice gingival (IG) y profundidad de sondaje (PS), por tanto, ambos grupos de tratamiento respondieron de manera similar a la terapia, desde un punto de vista clínico (Assaf et al., 2007). Más recientemente, los resultados obtenidos por De Michelli y cols., vienen a servir también de apoyo a los resultados obtenidos en el presente estudio, al observar una mejora tanto en el grupo control como en el grupo de aplicación láser (laser de diodo emitiendo a 808 nm, aplicado paralelo a la superficie cementaria, con desplazamiento apical-cervical durante 20s a 1,5W), en los parámetros clínicos de IP y de sangrado al sondaje gingival, pero sin reportar diferencias estadísticamente significativas intergrupos (De Michelli y cols. 2011).

El mecanismo por el que el láser pudiera inhibir la formación de placa aún está por dilucidar. Se necesitan futuros estudios para examinar los efectos de la radiación láser de baja potencia sobre las células vitales en la placa. Los resultados del presente estudio mostraron una reducción algo mayor en el grupo de fototerapia repetida (RAR+FTr), sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En un estudio reciente, llevado a cabo por Pejic y cols, comparando los efectos clínicos del RAR y del RAR complementado con fototerapia láser (mediante la aplicación de radiación láser emitida por un laser semiconductor a 670 nm con una potencia de 150 mW/cm²), no se encontraron diferencias significativas inmediatamente después de la terapia entre ambos grupos en cuanto al IP, pero sí más a largo plazo, en las siguientes revisiones a los 3 y 6 meses. Mientras en el grupo láser el IP seguía decreciendo tras el tratamiento, en el grupo control (RAR), sin embargo, se iba incrementado progresivamente (Pejic y cols., 2010).

Ya que diversos estudios han demostrado que el número de citocinas proinflamatorias son sintetizadas en respuesta a bacterias periodontopatógenas y a sus productos, induciendo y manteniendo una respuesta inflamatoria en el periodonto (Page 1991), nuestro siguiente objetivo fue intentar correlacionar la respuesta clínica del tratamiento con la respuesta antiinflamatoria. IL-1 β y TNF- α son mediadores clave en los procesos inflamatorios y por tanto el establecer si la inflamación puede ser controlada por la radiación láser de baja potencia *via* una inhibición de la producción de estos mediadores, resultaría de gran interés.

La mayoría de los estudios publicados al respecto, muestran la disminución de la concentración de citocinas en surco periodontal después del tratamiento periodontal no quirúrgico, especialmente en cuanto a la reducción de la concentración de IL-1 β se refiere (Tsai y cols., 2005, Gamanol y cols., 2000, Giannopoulou y cols., 2003), lo cual

concuenda con los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto al grupo RAR+ FTr y en menor medida con los obtenidos en el grupo RAR+ FTs, donde los niveles permanecen constantes durante el periodo estudiado. Estudios previos, también llevados a cabo con láser de baja potencia en el intervalo de emisión espectral comprendido entre el rojo y el infrarrojo cercano (lo que se entiende como fototerapia láser), también vienen a confirmar nuestros resultados (Shimuzu y cols, 1995; Nomura y cols. 2001). Por otra parte, los resultados obtenidos en el grupo RAR (control) concordarían más con los resultados obtenidos por Yoshinari y cols., en un estudio donde se investigó la relación entre los cambios clínicos e IL-1 β después de la terapia periodontal convencional en pacientes con periodontitis crónica, observándose clara mejoría de los índices clínicos y ligero aumento de la concentración de IL-1 β (Yoshinari y cols., 2004).

Son menos frecuentes los estudios publicados atendiendo a la evolución de los niveles de la citocina proinflamatoria TNF- α en el FGC tras diversos tipos de terapia periodontal. En estudios previos, nuestro grupo investigador sí que ha observado diferencias significativas en cuanto a las concentraciones de TNF- α entre el grupo RAR y el grupo complementado con otros tipos de radiación láser, como son las radiaciones láser de Nd:YAG ($\lambda=1064$ nm) y de Er:YAG ($\lambda=2.940$ nm) (Gómez y cols., 2011, Domínguez y cols, 2010).

En cuanto a qué mediador proinflamatorio se ve más afectado por la terapia láser, Safavi y cols., tras estudiar la respuesta a la expresión génica de la IL-1 β y del TNF- α tras la irradiación con un láser de He:Ne de baja potencia, observaron una disminución marcada en la expresión génica de la IL-1 β , y ninguna diferencia significativa entre grupos test y control en torno a TNF- α (Safavi y cols, 2008). Nuestros resultados también muestran una reducción más marcada de los niveles de IL-

1β frente a los de $\text{TNF-}\alpha$ en el FGC a lo largo del periodo evaluado cuando el tratamiento ha sido complementado con fototerapia láser.

Está bien establecido que los sistemas inmune e inflamatorio son centrales para el desarrollo de la periodontitis. Más recientemente, ha sido reconocido el papel del sistema inmune en el metabolismo óseo y en la resorción ósea (Takayanagi y cols. 2005). Mientras que un gran número de investigaciones se han centrado en el tratamiento de la inflamación de los tejidos gingivales, los avances en la comprensión del metabolismo óseo están abriendo nuevas puertas de entendimiento sobre la patológica pérdida ósea en la periodontitis. Este conocimiento, junto con el desarrollo de nuevos fármacos o estrategias terapéuticas (donde la tecnología láser podría tener un lugar importante) que puedan inhibir la pérdida/destrucción ósea, proporciona la oportunidad de dirigir no únicamente el tratamiento hacia la inflamación del tejido sino también hacia la destructiva pérdida ósea que se observa en la periodontitis.

RANKL es un mediador clave en el proceso de formación de osteoclastos. Esta proteína transmembrana es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral y es expresado por una variedad de células, incluyendo osteoblastos, fibroblastos y células-T. Durante el metabolismo normal del hueso, RANKL es expresado por los osteoblastos. Sin embargo, en los lugares inflamatorios, RANKL también es expresado por células del sistema inmune como linfocitos-T (Teitelbaum, 2007). La expresión de RANKL también es regulada por otros moduladores del metabolismo óseo incluyendo la hormona paratiroidea, vitamina D3 e interleucina-1L (Lacey y cols. 1998; Matsuzaki y cols. 1998).

La unión de RANKL a su receptor RANK en la superficie de los pre-osteoblastos resulta en la activación de la quinasa c-Jun N-terminal y de la subsecuente activación del factor nuclear κB , conduciendo a la formación de osteoclastos. Un

gran número de estudios han confirmado el papel de RANKL en la resorción ósea periodontal, al mismo tiempo que una elevada expresión de RANKL ha sido apreciada en los tejidos periodontales inflamados (Cochran, 2008). También ha sido demostrada una elevada expresión de RANKL en fibroblastos y en células mononucleares en tejidos periodontales inflamados y esto parece estar íntimamente asociado con los lugares de pérdida ósea (Crotti y cols., 2003).

La OPG, inhibidor natural de RANKL y nuevo miembro de la familia de receptores TNF, actúa como señuelo y bloquea la unión de RANKL con RANK y así prevenir la osteoclastogénesis. La OPG es producida por el ligamento periodontal humano, fibroblastos gingivales y células epiteliales (Kanzaki y cols. 2002; Sakata y cols., 1999), y su expresión es modulada por las citocinas inflamatorias. Existe una reducción en los niveles de OPG en el tejido granulomatoso adyacente al hueso alveolar. Crotti y cols., sugirieron que el balance entre RANKL y los niveles de OPG regulan la destrucción ósea observada en periodontitis (Crotti y cols., 2003).

Un gran número de estudios hasta la fecha han analizado las concentraciones y la distribución de OPG y RANKL en los tejidos periodontales sanos e inflamados. El balance RANKL/OPG en los tejidos inflamados está incrementado, bien por un incremento en RANK o por un descenso en OPG, o ambos, resultados concordantes con los estudios que investigan el papel del balance RANKL/OPG en la resorción ósea en condiciones como la artritis reumatoide. No sólo el balance RANKL/OPG se incrementa en los lugares de la inflamación periodontal, sino que recientes trabajos muestran que este balance también se correlaciona con la severidad de la enfermedad. Por ejemplo, el balance RANKL/OPG está incrementado en el fluido crevicular gingival obtenido de pacientes con periodontitis crónica o agresiva comparado con los obtenidos de pacientes con gingivitis y sanos (Bostanci y cols., 2007). Estos hechos identifican

una prometedora diana terapéutica y animan al desarrollo de fármacos o estrategias terapéuticas que modulen RANKL/RANK/OPG, conduciendo a un incremento de OPG y a un descenso de RANKL, consistente con estado de equilibrio entre la formación ósea y la destrucción ósea.

En el presente estudio, los valores del cociente RANKL/OPG se fueron incrementando durante el periodo evaluado en el grupo control, sin embargo, tanto en el grupo RAR+FTs como en RAR+FTr, dichos valores descendieron, y de manera más marcada e inmediata en el caso del grupo RAR+FTr. Esto podría ser indicativo de que la radiación láser de baja energía aplicada principalmente en dosis repetidas al inicio del tratamiento presenta un efecto beneficioso de modulación ósea a nivel local.

Recientemente Bostanci y cols. llevaron a cabo un estudio de 4 meses de duración, donde establecieron que la terapia periodontal convencional por sí sola no modifica la capacidad tisular de producir dichos factores. Encontraron que los niveles tanto de RANKL como de OPG se elevaban transitoriamente a los 2 meses tras el raspado y alisado radicular (Bostanci y cols, 2011). Esto concordaría con los resultados obtenidos en nuestro estudio con el grupo RAR (control), donde ambos factores se vieron aumentados desde el estado inicial hasta las 8 semanas post-tratamiento. Además, ambos resultados también se verían apoyados por los obtenidos previamente por Santos y cols., en un estudio de cohortes en pacientes con diabetes mellitus (Santos y cols., 2010). Dicha persistencia de niveles elevados en la proporción RANKL/OPG tras el tratamiento convencional podría ser indicativo a su vez de la necesidad de tratamientos adjuntos que modulen la respuesta del hospedador (Salvi y Lang, 2005). En cualquier caso, sería necesario un mayor número de estudios longitudinales a corto y medio plazo que correlacionaran estos factores con índices clínicos e inflamatorios tras

la aplicación de fototerapia láser una vez establecidas las más apropiadas condiciones de irradiación (energía óptima y un tiempo, frecuencia y modos de aplicación adecuados).

6.CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Investigación permiten concluir que:

1.- El tratamiento no quirúrgico de la enfermedad periodontal con RAR y RAR complementado con una única dosis de fototerapia láser ó con dosis repetidas, conduce a una mejoría CLÍNICA de la enfermedad periodontal crónica.

2.- Desde el punto de vista de la INFLAMACIÓN, cualquier tipo de fototerapia láser influye positivamente en la inhibición de la producción de IL-1 β , sin embargo, para lograr una temprana inhibición en la producción de TNF- α , es fundamental la aplicación de una fototerapia en dosis repetidas.

3.- Desde un punto de vista OSTEOINMUNOLÓGICO, cualquier tipo de fototerapia láser influye positivamente en la reducción del cociente RANKL/OPG, de manera más marcada e inmediata con fototerapia repetida y de manera más lenta y sostenida con una sola dosis de fototerapia.

7.BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH & Pober J.S. Cellular and molecular immunology, chapter 3. W.B. Saunders, 1999.
2. Alexandratou E, Yova D, Handris P, Kletsas D. & Loukas S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1(8):547-552, 2002.
3. Ando Y, Aoki A, Watanabe H. & Ishikawa I. Bactericidal effect of erbium YAG laser on periodontopathic bacteria. *Laser. Surg. Med.*19(2):190-200,1996.
4. Armitage G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.* 4: 1-7, 1999.
5. Aoki A, Mizutani K, Takasaki AA, Sasaki KM, Nagai S, Schwarz F, Yoshida I, Eguro T, Zerredo JL & Izumi Y. Current status of clinical laser applications in periodontal therapy. *Gen Dent.*56(7):674-87; quiz 688-9, 767, 2008.
6. Assaf M, Yilmaz S, Kuru B, Ipai SD, Noyun V. & Kadir T. Effect of diode laser on bacteremia associated with dental ultrasonic scaling: a microbiological study. *Photomed. Laser Surg.* 25(4): 250-256, 2007.
7. Badersten A, Nilvéus R & Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 8(1):57-72, 1981.
8. Berkstein S, Reiff RL, McKinney JF & Killoy WJ. Supragingival root surface removal during maintenance procedures utilizing an air-powder abrasive system or hand scaling. An in vitro study. *J. Periodontol.* 58(5): 327-30, 1987.
9. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD & Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* 319: 516-518, 1986.
10. Billingham ME. Cytokines as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.* 43: 350-357, 1987.
11. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, Atilla G, Hughes F J & Belibasakis G N. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J. Clin. Periodontol.* 34: 370–376, 2007.
12. Bostanci N, Saygan B, Emingil G, Atilla G & Belibasakis GN. Effect of periodontal treatment on receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin levels and ratio in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 38: 428–433, 2011.
13. Brayer WK, Mellonig JT, Dunlap RM, Marinak KW & Carson RE. Scaling and root planing effectiveness: the effect of root surface access and operator experience. *J. Periodontol.* 60(1):67-72, 1989.
14. Breininger DR, O'Leary TJ & Blumenshine RV. Comparative effectiveness of ultrasonic and hand scaling for the removal of subgingival plaque and calculus. *J. Periodontol.* 58(1): 9-18, 1987.
15. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ & Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.*12:1260–1268, 1998.
16. Chan Y, & Lai C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* 18(1): 51–55, 2003.
17. Chappel ILC, Landini G, Griffiths GS, Patel NC & Ward RSN. Calibration of the Periotrom 8000[®] and 6000[®] by polynomial regression. *J. Periodontal. Res.* 34: 79-86, 1999.
18. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J. Periodontol.* 79 (8 Suppl.):1569-1576, 2008.
19. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ & Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J. Periodontal Res.* 38: 380-387, 2003

20. De Micheli G, De Andrade AKP, Alves VTE, Seto M, Pannuti CM & Cai S. Efficacy of high intensity diode laser as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized controlled trial. *Lasers Med. Sci.* 26(1):43-8, 2011.
21. Domínguez A, Gómez C, García-Kass AI & García-Núñez JA. IL-1beta, TNF-alpha, total antioxidative status and microbiological findings in chronic periodontitis treated with fluorescence-controlled Er:YAG laser radiation. *Lasers Surg. Med.* 42(19): 24-31, 2010.
22. Folwaczny M, Mehl A, Aggstaller H & Kickel R. Antimicrobial effects of 2.94 micron Er:YAG laser radiation on root surfaces: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.* 29(1): 73-78, 2002.
23. Gamanol J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O & Silva A. Levels of Interleukin 1 β , -8, -10 and RANTES in gingival crevicula fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J. Periodontol.* 71: 1535-1545, 2000.
24. Gankerseer EJ & Walmsley AD. Preliminary investigation into the performance of a sonic scaler. *J. Periodontol.* 58(11): 780-4, 1987.
25. Giannopoulou C, Cappuyns I & Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* 30: 996-1002, 2003.
26. Gómez C, Domínguez A, García-Kass AI & García-Núñez JA. Adjunctive Nd:YAG laser application in chronic periodontitis: clinical, immunological and microbiological aspects. *Lasers Med. Sci.* 26(4): 453-463, 2011.
27. Gowen M & Mundy GR. Actions of recombinant IL- α and interferon- α on bone resorption in vitro. *J. Immunol.* 136: 2478-2482, 1986.
28. Graves DT & Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J. Periodontol.* 74: 391-401, 2003.
29. Hill RW, Ramfjord SP, Morrison EC, Appleberry EA, Caffesse RG, Kerry GJ & Nissle RR. Four types of periodontal treatment compared over two years. *J. Periodontol.* 52(11):655- 62,1981.
30. Hock J, Krishnan V, Onyia J, Bidwell J, Milas J & Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J. Bone Miner. Res.* 16: 975-984, 2001.
31. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ & Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15:2-12, 2000.
32. Hughes FJ & Smales FC. Immunohistochemical investigation of the presence and distribution of cementum-associated lipopolysaccharides in periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* 21:660-667, 1986.
33. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu y & Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner. Res.* 17:210-220, 2002.
34. Karu T. *Ten Lectures on Basic Science of Laser Phototherapy.* Grängesberg, Sweden: Prima Books AB. 2007.
35. Kreisler M, Meyer C, Stender E, Daubländer M, Willershausen-Zönnchen B & d'Hoedt B. Effect of diode laser irradiation on the attachment rate of periodontal ligament cells: an in vitro study. *J Periodontol.* 72(10):1312-7, 2001.
36. Kreisler M, Al Haj H & d'Hoedt B. Clinical efficacy of semiconductor laser application as an adjunct to conventional scaling and root planing. *Lasers Surg. Med.* 37(5): 350-355, 2005.
37. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveiras-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wateham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW,

- Boyle WJ & Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 397:315–323,1999.
38. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliot G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J & Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93: 165-176, 1998.
 39. Lai SML, Zee KY, Lai MK & Corbet EF. Clinical and radiographic investigation of the adjunctive effects of a low-power He-Ne laser in the treatment of moderate to advanced periodontal disease: a pilot study. *Photomed. Laser Surg.* 27(2): 287-293, 2009.
 40. Lasho DJ, O'Leary TJ & Kafrawy AH. A scanning electron microscope study of the effects of various agents on instrumented periodontally involved root surfaces. *J. Periodontol.* 54(4): 210-20, 1983.
 41. Lindhe J, Hamp SE & Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J. Periodontal Res.* 81: 1-10, 1973.
 42. Lindhe J & Nyman S. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *J. Clin. Periodontol.* 2(2):67-79, 1975.
 43. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS & Haffajee AD. Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 11(7):448-58, 1984.
 44. Loe HI, Theilade E & Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 36: 177-187,1965.
 45. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL & Kuo M Y. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J. Periodontal Res.* 41:354–360, 2006.
 46. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H & Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed. Laser Surg.* 26 (1):3-9, 2005.
 47. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?. *Lasers Med. Sci.* 22(2):83–91, 2007.
 48. Machion L, Andia DC, Lecio G, Nociti FH Jr, Casati MZ, Sallum AW & Sallum EA. Locally delivered doxycycline as an adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of smokers: a 2-year follow-up. *J. Periodontol.* 77: 606-613, 2006.
 49. Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, Morinaga T, Toyama Y, Yabe Y, Higashio K & Suda T. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 199-204, 1998.
 50. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy J & Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type 1 collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and IL-1 evidence that breakdown is mediated by metalloproteinase. *J. Periodontal Res.* 24: 207-213, 1989.
 51. Mogi M, Ootogoto J, Ota N & Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J. Dent. Res.* 83:166–169, 2004.
 52. Moore P, Ridgway, TD, Higbee, RG, Howard, EW & Lucroy, MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg. Med.* 36(1): 8-12, 2005.
 53. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H & Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor

- activator of NF-kappaB ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275:768–775, 2000.
54. Nomura K, Yamaguchi M & Abiko Y. Inhibition of interleukin-1beta production and gene expresión in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. *Laser Med Sci.* 16(3): 218-223, 2001
 55. O’Leary TJ. The impact of research on scaling and root planing. *J. Periodontol.* 57:69-75, 1985.
 56. Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y & Sasaki T. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. *Anat Rec.* 266:218–225, 2002.
 57. Page RC. The rol of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 26, 230-242, 1991.
 58. Page RC & Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 14: 9-11, 1997.
 59. Pejcic A, Kojovic D, Kesic L & Obradovic R. The Effects of Low Level Laser Irradiation on Gingival Inflammation. *Photomed. Laser. Surg.* 28(1): 69-74, 2010.
 60. Peplow, PV, Chung TY & Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed. Laser Surg.* 28(3); 291-325, 2010.
 61. Pihlstrom BL, Ortiz-Campos C & McHugh RB. A randomized four-years study of periodontal therapy. *J. Periodontol.* 52(5):227-42,1981.
 62. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 19, 283 (5409): 1837-1839, 1999.
 63. Qadri T, Miranda L, Tuner J & Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J. Clin. Periodontol.* 32, 714–719, 2005.
 64. Quirynen M, Abarca M, Van Assche N, Nevins M, & van Steenberghe D. Impact of supportive periodontal therapy and implant surface roughness on implant outcome in patients with a history of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 34(9):805-15, 2007.
 65. Ribeiro IWJ, Sbrana MC, Esper LA & Almeida AL. Evaluation of the Effect of the GaAlAs Laser on Subgingival Scaling and Root Planing. *Photomed. Lasers Surg.* 26(4):387-391, 2008.
 66. Safavi SM, Kazemi B, Esmaceli M & Fallah A. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN, TGF, bFGF, and PDGF in rat’s gingival. *Lasers Med. Sci.* 23(3): 331-5, 2008.
 67. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H & Kurihara H. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1486-1492, 1999.
 68. Salvi GE & Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J.Clin. Periodontol.* 32(6): 108–129, 2005.
 69. Santos VR, Lima JA, Goncalves TE, Bastos MF, Figueiredo LC, Shibli JA & Duarte PM. Receptor activator of NF-(capital KA,Cyrillic)B ligand/osteoprotegerin ratio in sites of chronic periodontitis of poorly-controlled and wellcontrolled type 2 diabetic subjects. *J. Periodontol.* 81:1455–1465, 2010.
 70. Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, & Iacono V. Recolonization of the subgingivalmicroflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol.* 61(9): 579-84, 1990.
 71. Schwarz, F, Aoki A, Becker J. & Sculean A. Laser application in non-surgical periodontal therapy: a systematic review. *J.Clin. Periodontol.* 35(8); 29-44, 2008.

72. Shimuzu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T & Abiko Y. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J. Dent. Res* 74(7):1382-1388, 1995
73. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R & Boyle WJ. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89:309–319, 1997.
74. Snyder SK, Byrnes KR, Borke RC, Sanchez A & Anders JJ. Quantification of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633nm low power laser treatment. *Lasers Surg. Med.* 31(3):216-222, 2002.
75. Socransky S.S. & Haffajee A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000. 28: 12-55, 2002.
76. Stambaugh RV, Dragoo M, Smith DM & Carasali L. The limits of subgingival scaling. *Int. J. Periodont. Rest. Dent.* 1(5):30-41, 1981.
77. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, & Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. 17: 87S–91S, 1995.
78. Tafur J. & Mills PJ. Low-intensity light therapy: Exploring the role of redox mechanisms. *Photomed. Laser Surg.* 26(4); 323-328, 2008.
79. Takatis DN, Schneerberger G & Dziak R. Recombinant interleukin-1 stimulates prostaglandin E2 production by osteoblastic cells: synergy with parathyroid hormone. *Calcif. Tissue Int.* 42: 358-362, 1988.
80. Takayanagi H, Sato K, Takaoka A & Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol. Rev.* 208: 181-193, 2005.
81. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am. J. Pathol.* 170: 427-435, 2007.
82. Thomas D, Rapley J, Cobb C, Spencer P & Killoy W. Effects of the Nd: YAG laser and combined treatments on in vitro fibroblast attachment to root surfaces. *J. Clin. Periodontol.* 21(1): 38-44, 1994.
83. Tong M, Liu YF, Zhao XN, Yan CZ, Hu ZR. & Zhang ZH. Effects of different wavelengths of low level laser irradiation on murine immunological activity and intracellular Ca²⁺ in human lymphocytes and cultured cortical neurogliaocytes. *Lasers Med. Sci.* 15(3):201-206, 2000.
84. Tsai IS, Tsai CC, Ho YP, Ho KY, Wu YM & Hung CC. Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease. *Cytokine* 31: 34-40, 2005.
85. Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol* 2000 36:98-120, 2004.
86. Waerhaug J. The gingival pocket; anatomy, pathology, deepening and elimination. *Odontol. Tidskr.* 60(Suppl 1):1-186; 70, 1952.
87. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D & Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers. Surg. Med.* 30: 60-66, 2002.
88. Yoshinari N, Kawase H, Mitani A, Ito M, Sugiishi S, Matsuoka M, Shirozu N, Ishihara Y, Bito B, Hiraga M, Arakawa K & Noguchi T. Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA expression of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid and gingival tissues. *J. Periodontal Res.* 39(3):158-67, 2004.