



Universidad Nacional de Cuyo  
Carrera de Especialización en Periodoncia  
Sede formadora: Fundación Independencia

**TRABAJO FINAL INTEGRADOR PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE ESPECIALISTA EN PERIODONCIA**

***“Activación del inflammasoma NLRP3, un receptor de la inmunidad  
innata en la enfermedad periodontal”.***

Alumno: Dra. MARIA EUGENIA VERDE  
Directora Trabajo Final Integrador: Dra. SUSANA GEA  
Directora de la Carrera: Dra. ESTELA M. RIBOTTA

Córdoba, Argentina

2020

**El presente Trabajo Final Integrador fue realizado con el apoyo  
financiero de la Secyt-UNC y CONICET.**

## PRÓLOGO

Las conclusiones de este Trabajo Final de Especialidad vuelven a actualizar la afirmación de Terence: *“No hay trabajo científico que no se pueda resolver con investigación”*, aspirando por cierto a que los resultados obtenidos por la estoica colaboración “tisular” de los pacientes de mi casuística puedan ser utilizados, obviamente ampliados y llevados a las prácticas diagnósticas y terapéuticas de aplicación directa que posibiliten mejorar la **CALIDAD DE VIDA Y LA SALUD HUMANA**.

Por todo ello.

Muchas gracias.

## AGRADECIMIENTOS

A mi Directora, la Dra. Susana Gea, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A todo el equipo docente y no docente de la Especialidad de Periodoncia y en especial a su Directora, la Dra. Estela Ribotta, agradezco de manera muy especial su esfuerzo, dedicación, colaboración y sabiduría para guiarme en el camino a ser un profesional de éxito.

A mi suegra, Norma Inés Szamrey, por ser una mujer excepcional, por su cariño, comprensión, apoyo y paciencia. Gracias por quererme y cuidarme como su hija.

A mis padres, Marta Ester Issaly y Ernesto Andrés Verde, porque con su sacrificio me dieron la posibilidad de llegar a esta instancia, por apoyarme de múltiples formas durante el desarrollo de esta Especialidad, por su constante estímulo, por enseñarme a enfrentar los obstáculos y que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

A mi esposo e hija, Guillermo y Sofía Zuliani. Ambos son la mayor motivación en mi vida encaminada al éxito, fueron el ingrediente perfecto para poder culminar con esta Especialidad y poder disfrutar del privilegio de ser agradecida con esas personas que se preocuparon por mí en cada momento y que siempre quisieron lo mejor para mi porvenir. Les agradezco por tantas ayudas y tantos aportes no solo para el desarrollo de esta Especialidad, sino también para mi vida.

## ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>9</b>
<b>Marco teórico.....</b>	<b>12</b>
1. De la salud a la enfermedad periodontal	
1.1 Hábitat de la cavidad oral	
1.2 Tejidos de la cavidad bucal	
1.3 Respuesta inflamatoria en la enfermedad periodontal	
2. Inmunidad innata del tejido oral	
3. Activación del Inflamasoma NLRP3	
<b>Objetivos.....</b>	<b>31</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>33</b>
1. Selección de pacientes	
2. Determinación del estado periodontal	
3. Determinación del riesgo periodontal	
4. Muestras de biopsias de tejido gingival	
5. Análisis estadístico	
<b>Resultados.....</b>	<b>44</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>67</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>76</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>79</b>

## RESUMEN

La enfermedad periodontal es una afección inflamatoria crónica, compleja y multifactorial caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte del elemento dentario. La patogénesis de la periodontitis está dada por una sinergia entre una disbiosis polimicrobiana y la respuesta inflamatoria del hospedador la cual contribuye al daño en los tejidos y a la pérdida de hueso.

Además de los receptores de inmunidad innata tipo *Toll* (TLR), se han descrito otros receptores citosólicos, que incluyen los receptores tipo *Nod* (NLRs) entre ellos el NLRP3. La estimulación de NLRP3 forma un complejo multiproteico denominado inflammasoma que conduce a la activación de caspasa-1 la cual escinde pro-IL-1 $\beta$  e IL-18 a sus formas activas. Escasos estudios apoyan la activación de estas plataformas multiproteicas en la patogenia de la periodontitis aunque con resultados controvertidos. El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la activación del complejo inflammasoma NLRP3 y respuesta inflamatoria en biopsias de tejido gingival obtenidas de sitios con enfermedad periodontal y correlacionar su activación con los criterios diagnósticos clínicos de la nueva clasificación de las enfermedades y alteraciones periodontales.

Se estudiaron 18 pacientes de ambos sexos, mayores a 21 años de edad, con/sin patología periodontal mediante un estudio descriptivo transversal.

Los resultados obtenidos demostraron, mediante la técnica de inmunofluorescencia, una inmunomarcación positiva de NLRP3, ASC y Pancitoqueratina en los tejidos afectados por la enfermedad periodontal en comparación con los sanos. Por otro lado, en este trabajo de investigación se concluyó en que existe una correlación entre la activación del sistema inflamasoma NLRP3 y el riesgo de progresión periodontal.

El entendimiento de los eventos celulares y moleculares, así como el papel del receptor de la inmunidad innata NLRP3 durante la enfermedad periodontal, contribuirá a responder interrogantes que son claves para el diseño de nuevas estrategias de intervención inmune.

## INTRODUCCIÓN

“Si no conozco una cosa, la investigaré.”

Louis Pasteur

La periodontitis es una afección inflamatoria crónica no trasmisible de causa multifactorial cuya patogénesis está dada por una sinergia entre una disbiosis polimicrobiana y la respuesta inflamatoria del hospedador la cual contribuye al daño en los tejidos y a la pérdida de hueso. El infiltrado inflamatorio presente en la lesión constituye un mecanismo de defensa del hospedero contra las bacterias del biofilm. Sin embargo, los mediadores inflamatorios producidos para limitar la actividad de los periodontopatógenos paradójicamente crean la destrucción del periodonto (1).

Un cuidadoso diagnóstico periodontal reviste máxima importancia en el manejo posterior de la enfermedad periodontal del paciente, siendo el primer paso hacia el desarrollo de un plan de tratamiento apropiado cuya aplicación conduce a la resolución de la infección periodontal. Los nuevos tratamientos para las enfermedades periodontales deben focalizarse a esclarecer la importante contribución de la respuesta inflamatoria del hospedador y su relación con la resorción de hueso periodontal.

Este trabajo abordará la investigación de uno de los receptores de inmunidad innata denominado *Nod Like Receptors* (NLRs) que por su activación forman complejos moleculares llamados inflamomas. Particularmente, se focaliza en el estudio de NLRP3 inflamasoma. Estas plataformas requieren además de la molécula adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) y la activación de caspasa- 1 con la

producción de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18. Además, explora el posible papel de las células epiteliales como blanco de la activación de inflammasomas investigando la expresión de citoqueratinas en este tipo celular.

## MARCO TEÓRICO

“El conocimiento científico no necesita justificación  
sino validación y demostración”.

Jean-Pierre Changeux

## **De la Salud a la Enfermedad Periodontal**

### **Hábitat de la cavidad oral**

La cavidad oral constituye un hábitat para un conjunto de microorganismos que colonizan distintas regiones bucales y establecen una relación simbiótica que da origen a los denominados biofilms bacterianos, en los cuales la diversidad y las interrelaciones que se establecen entre ellos aseguran su crecimiento y sustento. El desarrollo y maduración del biofilm dental está controlado por sistemas de comunicaciones químicas entre los microorganismos y la competencia del sistema inmune, intentando evitar desequilibrios que conducirían a la generación de patologías infecciosas. En un estudio *in vitro* se demostró que cuando se exponía el biofilm bacteriano a células epiteliales humanas se inducía a la apoptosis celular, a la producción de citoquinas pro-inflamatorias y simultáneamente a una subversión microbiana a los mecanismos de defensa (2).

Dentro de la cavidad oral hay distintos microambientes, como las superficies duras de los elementos dentarios que no descaman (incluyendo restauraciones e implantes) y las superficies epiteliales de las mucosas que permiten el crecimiento de distintas bacterias. Estas superficies están expuestas a la saliva o bien al fluido crevicular si se trata de una localización subgingival. El tropismo específico de las bacterias a los tejidos se define por especificidad y avidéz de adherencia, lo que proporciona resistencia a las

fuerzas mecánicas del flujo del líquido crevicular y la masticación. Los colonizadores primarios de las superficies orales son principalmente anaerobios facultativos, mientras que en el área subgingival existe un mayor predominio de anaerobios estrictos debido a las tensiones de oxígeno reducidas. La organización estructural y espacial (biogeografía) de las comunidades microbianas naturales son esenciales para las interacciones físicas y metabólicas entre las distintas especies, la cual puede ser antagonista o cooperativa (3).

Los microorganismos que asientan en las superficies de los dientes (restauraciones/implantes) tienden a formar biopelículas. Estas biopelículas han sido definidas como una comunidad de poblaciones microbianas espacial y funcionalmente organizadas, adheridas unas a otras y/o a las superficies o interfaces, integradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (4). Por el contrario, los biofilms que asientan en las superficies epiteliales requieren de una estrategia de colonización especializada ya que debido a la descamación de los tejidos tienen menos tiempo para la maduración de la biopelícula e incluso algunas de las bacterias que la conforman pueden ingresar y crecer en los tejidos epiteliales e incluso intracelularmente (3).

Normalmente, existe un equilibrio homeostático entre el hospedador y las comunidades microbianas. Se sostiene que la microbiota residente compete y excluye a los patógenos exógenos como un componente de

estabilidad del ecosistema y contribuye al normal desarrollo del sistema inmune (3). El microbioma gingival asociado con la salud periodontal es estable en el tiempo y se encuentra en equilibrio dinámico con el hospedador. La gingivitis es una condición inflamatoria estable y, en muchos sentidos, representa la homeostasis. Mientras que la inflamación excesiva, descontrolada y crónica que produce la destrucción irreversible de los tejidos duros y blandos es conocida como periodontitis. Las bacterias asociadas a la enfermedad periodontal son un componente muy pequeño de la microflora subgingival en la salud y aumentan significativamente con el desarrollo de bolsas periodontales (5). En la salud y en la gingivitis, los organismos parecen autorregularse mediante la competencia interespecies creando una homeostasis microbiana. Sin duda, las bacterias son la causa principal de la gingivitis, pero es la respuesta inmune del hospedador a esas bacterias la que determina si la enfermedad progresa (6).

En la periodontitis, con frecuencia, se detectan organismos gramnegativos del "complejo rojo", como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* (7). Sin embargo, la acción de un conjunto de patógenos periodontales pueden estimular formas más severas de pérdida ósea que el desafío mono-microbiano (8). La sinergia polimicrobiana, definida como un aumento en la capacidad de una bacteria para colonizar / persistir o elevar los síntomas de la enfermedad en presencia de otras bacterias, se extiende más allá de los efectos de la tasa de crecimiento e involucra la señalización entre especies y las interacciones

de respuesta (6). Hallazgos recientes sugieren que los patógenos periodontales, como *Porphyromonas gingivalis*, pueden modificar suficientemente su entorno de manera favorable para su supervivencia y estimular la disbacteriosis (8).

La inflamación promueve un desbalance de la microbiota normal al aumentar el flujo del líquido crevicular que transporta hacia surco gingival productos que resultan de la destrucción del tejido como colágeno degradado y compuestos que contienen hemo. De manera que, cambios en las condiciones ambientales pueden favorecer el crecimiento de patógenos (actualmente denominados patobiontes) y provocar periodontitis en individuos susceptibles (3). Un estudio reciente investigó los cambios fisiológicos de la comunidad bacteriana asociada con la etapa inicial de la disbiosis, y demostraron que existen ciertas actividades características que generan el “quiebre inicial” en la progresión de la periodontitis, tales como: transporte de citrato, hierro, potasio, aminoácidos, biosíntesis de isoprenoide, la motilidad ciliar y flagelar. Sin embargo, el resultado más importante es que toda la comunidad microbiana sería la responsable de un aumento en la virulencia que podría conducir a la progresión de la patología (9).

### **Tejidos de la cavidad bucal**

Los tejidos periodontales poseen ciertas características que permiten la colonización y el desarrollo de numerosas especies de microorganismos,

gran cantidad de ellos relacionados con la evolución de afecciones a nivel periodontal. El periodonto de inserción de los elementos dentarios está constituido por diferentes tejidos: el cemento radicular, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, los cuales se encuentran protegidos del medio bucal por el periodonto de protección constituido por la encía. Para llevar a cabo la función de protección existen tejidos adaptados con características especiales. Entre cada elemento dentario y la encía existe un espacio virtual llamado surco gingival, que, en presencia de infección e inflamación, adquiere la denominación de bolsa periodontal. El epitelio de unión recubre la porción más apical de la vertiente interna del surco gingival. Su estructura es bastante singular ya que no posee uniones estrechas sino que constituye una barrera transcelular adhesiva, permeable y altamente especializada. Esta estructura funciona como filtro, mantiene adherida la encía a la superficie del diente y participa activamente en la respuesta del hospedador permitiendo, de forma selectiva, el paso de antígenos, células y una amplia gama de moléculas defensoras hacia el surco gingival (10). El surco gingival no hospeda solamente bacterias periodontopatógenas, también aloja un trasudado plasmático, denominado fluido gingival o crevicular, el cual lo irriga continuamente y proporciona componentes celulares y antimicrobianos del suero, como anticuerpos y enzimas, que pueden bañar las bacterias y el frente de biofilm subgingival que avanza (1).

El epitelio de la mucosa oral es una barrera que separa los tejidos subyacentes de su entorno. Consta de dos capas, el epitelio escamoso

estratificado en la superficie y la lámina propia más profunda. En la mucosa oral queratinizada, el epitelio está compuesto por las cuatro capas: estrato basal, espinoso, granuloso y córneo. En el epitelio no queratinizado, el estrato basal va seguido del estrato filamentosos y el estrato distendum. La mucosa oral presenta distintos fenotipos de epitelio que la recubren: la mucosa de revestimiento, la mucosa masticatoria y la mucosa especializada. La mucosa de revestimiento tiene un epitelio escamoso no queratinizado, es extensible y se localiza sobre estructuras móviles como paladar blando, mejillas, labios, mucosa alveolar, fondo de surco vestibular y piso de la boca y se encuentra unida libremente a las estructuras adyacentes por un tejido conectivo rico en elastina. La mucosa masticatoria es la cubierta protectora rígida y resistente de la encía y el paladar duro, firmemente unida al hueso subyacente por tejido conectivo denso y su epitelio está queratinizado. La mucosa especializada se localiza en el dorso de la lengua y muestra un epitelio queratinizado que incluye papilas linguales y gustativas como estructuras especializadas.

La barrera epitelial oral es el resultado de numerosas interacciones proteicas estructurales y funcionales que dan como resultado la capacidad de responder a diversas influencias exógenas, posiblemente tóxicas. Los epitelios escamosos poseen propiedades estructurales como estratificación y cornificación de los queratinocitos e interacciones específicas de célula a célula para mantener su función de barrera. Ahora se reconoce que las células epiteliales no son espectadores pasivos, sino que son

metabólicamente activas y capaces de reaccionar a estímulos externos sintetizando una serie de citoquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, quimioquinas y metaloproteasas de la matriz (11). Los tejidos gingivales brindan defensa para resistir las fuerzas de fricción de la masticación, así como para defender los tejidos blandos contra el desafío químico o microbiano (12).

Las citoqueratinas son un componente principal del citoesqueleto epitelial y pertenecen al grupo de filamentos intermedios de proteínas citoesqueléticas. La distribución de las citoqueratinas es muy específica y varía según el tipo de epitelio, el sitio y el grado de diferenciación, por lo que la expresión de queratina es un marcador sensible y específico de diferenciación en las células epiteliales (13). En los tejidos gingivales y epidérmicos como ejemplos de epitelios cornificantes, las queratinas K1 y K10 están presentes mientras que los epitelios de la mucosa bucal o del esófago las queratinas K4 y K13 son las que principalmente se expresan. Las células epiteliales suprabasales del paladar duro y la encía expresan además K2. Aparte del patrón de queratina expresado por la encía adherida, algunas células epiteliales especializadas dentro de la encía muestran un patrón de queratina distinto. El epitelio sulcular y las células del margen gingival expresan K4 y K13. Por el contrario, el epitelio de unión adyacente a la superficie del diente sintetiza K8, K13, K16, K18 y K19 (14).

La composición de la barrera epitelial gingival es bastante compleja ya que su estructura se compone de una gran cantidad de moléculas diferentes. Para mantener su función, los epitelios estratificados, incluida la mucosa oral, tienen que mantener una estrecha adhesión célula a célula que implica uniones intercelulares estrechas y adherentes que se conectan al citoesqueleto de actina.

### **Respuesta inflamatoria en la enfermedad periodontal**

En las primeras etapas del proceso patológico, mientras el periodonto está clínicamente sano, la colonización bacteriana inicial se encuentra confinada al margen gingival. En este estado, el fluido crevicular es relativamente escaso y está constituido sobre todo por un trasudado de proteínas plasmáticas, que fluye de los tejidos gingivales hacia el surco gingival. Sin embargo, al cabo de 2-4 días de acumularse la biopelícula bacteriana, empieza la lesión inicial de gingivitis. Un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos subepiteliales, con la consiguiente salida de plasma de la circulación ocasiona eritema, edema y pérdida del punteado en el tejido conectivo gingival y la formación de bolsas y sangrado al sondaje. Este exudado es esencialmente un medio de crecimiento de sostén de las células y los tejidos del hospedador pero también puede actuar como una excelente fuente de nutrientes para los gérmenes subgingivales y contiene factores que son necesarios para la proliferación de ciertas especies bacterianas patógenas. A nivel histológico también se observa la presencia de un exudado de neutrófilos polimorfonucleares, que migran

desde el tejido hacia el surco gingival, y que producen mediadores quimiotácticos y vasoactivos que perpetúan la respuesta inflamatoria del hospedador (15).

La gingivitis acontece con un estado inmuno-inflamatorio controlado que resulta en la pérdida de colágeno local pero no compromete la integridad de los tejidos de soporte del diente y es reversible tras la resolución de la inflamación. Sin embargo, esta lesión inflamatoria crónica en ciertos individuos puede convertirse en una periodontitis destructiva e irreversible, que conlleva la destrucción de los tejidos periodontales de soporte del elemento dentario (6). El metabolismo microbiano y los productos de la respuesta inmune del hospedador derivados del daño de los tejidos sumado a la profundización del surco gingival, facilitan el crecimiento y la dominación de la comunidad microbiana por microorganismos asociados a un estado disbiótico. Una vez que la comunidad ha hecho la transición hacia el desequilibrio bacteriano, éste persistirá por un período prolongado de tiempo (3).

Cuando se supera la barrera epitelial comienza a actuar la respuesta inmunitaria adaptativa, en la cual las citoquinas conforman uno de los elementos claves. Estas son una serie de proteínas que median las interacciones complejas entre los linfocitos, las células inflamatorias y otras células del tejido conectivo, siendo su función asistir en la regulación y el desarrollo de células inmunes efectoras y establecer la comunicación entre

una célula y demás funciones efectoras directas (autócrina-parácrina-endócrina). El desarrollo y la regulación de una respuesta inmunitaria dependen en gran parte de la producción local de cierta cantidad de citoquinas que pueden determinar si la respuesta será protectora o no (16). Estas citoquinas son producidas por distintos tipos de células en el periodonto, tales como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, osteoclastos, células epiteliales, leucocitos polimorfonucleares, monocitos, linfocitos y mastocitos. Junto a la síntesis de los mediadores de la inflamación por parte de los monocitos, también se produce la presentación de los antígenos. Este componente de la respuesta del hospedador desencadena la respuesta inmunitaria de adaptación, con una respuesta inicial de los linfocitos T cooperadores de tipo 1 (proinflamatoria, IL-2, TNF e interferón  $\gamma$ ) y un posterior cambio hacia una respuesta dominante de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (antiinflamatorios, IL 4, 5, 10 y 13 y linfocitos B que se diferencian a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas) (17).

De manera que, la etiología de la periodontitis es multifactorial, más específicamente polimicrobiana y hospedador dependiente, pero la patogénesis es inflamatoria caracterizada por una falla en la resolución de la inflamación que tiene un impacto directo en el microbioma del hospedador que amplifica aún más la respuesta iniciando un ciclo que deriva en la pérdida de la integridad de los tejidos, pérdida de inserción y pérdida ósea.

Estudios han demostrado que durante la pérdida ósea se produce un proceso de degradación extracelular que libera péptidos de los extremos carboxi- y aminoterminal de las moléculas de proteolágeno que son los que pasan al torrente sanguíneo (18) (19) o bien saliva (20) y constituiría un biomarcador de resorción ósea (beta crosslaps -  $\beta$ CTX) que podría ser de utilidad en la práctica clínica para el diagnóstico de la enfermedad periodontal.

La respuesta aberrante del hospedador puede manifestarse como una hiper o hiporreactividad y/o una falta de resolución de las reacciones inflamatorias (21). La resolución de la inflamación, el retorno de la homeostasis tisular y el restablecimiento de un microbioma con una biopelícula verdaderamente comensal que está en relación homeostática con el hospedador no parece ocurrir espontáneamente debido a la gran carga bacteriana y la diversidad de especies impulsado por el entorno inflamatorio y la bolsa periodontal. El microbioma de la placa subgingival disbiótica impulsa una mayor inflamación que perpetúa la enfermedad. La respuesta inflamatoria y el microbioma residente están vinculados en un equilibrio bidireccional en la salud y un desequilibrio bidireccional en la enfermedad. Si esta interacción constante entre los microorganismos y la respuesta inflamatoria del hospedador se considera un continuo circuito de alimentación autosostenible, entonces se hace evidente que las bacterias específicas no pueden considerarse agentes causales iniciales en la patogénesis de la periodontitis. Lo más probable es que las bacterias

específicas que hasta ahora se han identificado como asociadas con periodontitis aparecen debido al desarrollo de la enfermedad y como contribuyentes tardíos. Es importante comprender la secuencia temporal y espacial de eventos en periodontitis y formación de bolsas periodontales, porque la inflamación siempre precede al sobrecrecimiento del "patógeno periodontal". Por lo tanto, parece probable que sea la respuesta del hospedador y no los microorganismos *per se*, la que determina el resultado final de las interacciones microorganismos/hospedador dentro de las bolsas periodontales (6).

### **Inmunidad innata del tejido oral**

La inmunidad innata del tejido oral está representada por células como macrófagos, células dendríticas, linfocitos *natural killer* (NK), polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y mastocitos. Elementos importantes en esta respuesta está constituida por un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales son capaces de reconocer diferentes ligandos o patrones moleculares presentes en los patógenos (PAMPs). Las células epiteliales expresan varios PRRs como, receptores lectina tipo C (CLRs), inducible por ácido retinoico (RLRs), receptores tipo *Toll* (TLRs) y los *Nod like receptors* (NLRs), estos últimos son capaces de ensamblar diferentes plataformas denominadas inflamomas y sintetizar una variedad de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Las bacterias orales residentes interactúan permanentemente con las células epiteliales del hospedador. Dependiendo de su composición, las biopelículas modifican

diferencialmente las respuestas inmunitarias celulares del epitelio. Los principales patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* poseen una serie de estrategias diferentes para escapar de la inmunidad innata y sobrevivir en los tejidos, lo que afecta la barrera epitelial al modificar la expresión e integridad de las diferentes uniones célula-célula (22).

Los PAMPs pueden ser de diversos orígenes: glucídicos ( $\beta$ -glucano), proteicos (flagelina) o componentes de la pared celular bacteriana tales como el peptidoglicano y el lipopolisacárico (LPS), y todos ellos son reconocidos por el sistema inmune innato. Dependiendo de los PRR, las células epiteliales pueden secretar citoquinas, quimioquinas e incluso promover la adhesión y diferenciación de neutrófilos a través de la interacción con bacterias y sus productos; lo que nos indica que las células epiteliales juegan un rol crítico en la respuesta inmune (23).

Para explicar cómo el sistema inmune es capaz de distinguir bacterias comensales no patogénicas de microorganismos patogénicos, se sugirió que la activación del sistema inmune no se basa solamente en el reconocimiento de PAMPs, sino también en la presencia de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés danger-associated molecular patterns), tales como cristales de ácido úrico, ATP (Adenosina trifosfato), HMGB1 (del inglés, high mobility group box 1) o proteínas de choque térmico (HSP) 70 y HSP 90, que son liberados por células dañadas. Durante las infecciones, el

organismo sufre daño tisular y lisis celular que desencadenan la liberación de moléculas del propio organismo o DAMPs, y el reconocimiento de estos DAMPs por el sistema inmune va a permitir, además de detectar la infección y reclutar más células inmunes, iniciar la reparación del tejido dañado (6). Por lo tanto, el sistema inmune innato no solo inspecciona el ambiente celular en busca de patógenos invasores, sino que también es capaz de reconocer los daños que éstos causan, debido a la aparición de estrés tisular (24).

Se ha demostrado que la IL-1  $\beta$ , IL-4 e IL-8 funcionan en concierto con otros miembros de la red de citoquinas para regular la respuesta inflamatoria en la lesión (23).

La unión del PRR a su ligando induce una cascada de señalización que genera múltiples efectos, incluida la activación de células del sistema inmune innato y la producción de citoquinas/quimioquinas para reclutamiento de células inmunes al sitio de infección o daño tisular. Una función clave del sistema inmune innato es la activación de los NLRs inflamasomas; en respuesta a PAMP o DAMP (25).

Los inflamasomas son complejos multiproteicos citosólicos que desencadenan la activación de las caspasas inflamatorias- 1 (inflamasma canónico) y 11 (inflamasma no canónico). La conversión de las pro-caspasas en proteasas enzimáticamente activas, dará lugar a la producción

de las citoquinas proinflamatorias activas IL-1 $\beta$  e IL-18, así como también conducirá a la muerte celular. Los inflamomas canónicos están formados por un receptor citosólico PRR (bien NLR o ALR), una molécula adaptadora ASC (del inglés apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD - caspase recruitment domain) que también se conoce como Pycard y una proteasa de cisteína llamada caspasa-1 (26). La secuencia de eventos que lleva al ensamblaje del inflamoma aún no está totalmente dilucidada en cada uno de los inflamomas que pueden originarse.

Los inflamomas se activan en las células mieloides, incluidos los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos. Sin embargo, también pueden activarse en los queratinocitos, los fibroblastos gingivales y dérmicos, y las células epiteliales de la mucosa. La activación del inflamoma es un proceso altamente inflamatorio que a menudo es iniciado durante infecciones ocasionadas por patógenos o durante la inflamación estéril por detección de desechos proinflamatorios. Su activación induce la maduración de las citoquinas proinflamatorias interleuquina-1 $\beta$  e interleuquina-18 a través de su escisión por la caspasa-1. Con la excepción de los monocitos humanos, la activación del inflamoma requiere de dos señales secuenciales para que se produzca la formación y activación del inflamoma. La primera señal está dada por la regulación positiva transcripcional y traslacional de los componentes del inflamoma, la caspasa-1 y la interleuquina-1 $\beta$ . El segundo propósito es la modificación postraduccional del PRR y la molécula adaptadora, ASC (23). La pre-

activación del inflamasoma se produce mediante el reconocimiento de varios PAMP o DAMPS que activan un subconjunto de múltiples receptores tipo *Toll*, NOD1 o NOD2, o por las citoquinas, el factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-1 $\beta$ , que conducen a una regulación positiva transcripcional de los componentes del inflamasoma principalmente a través de la activación del factor de transcripción factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Luego de su activación pone en movimiento el ensamblaje continuo del inflamasoma por la unión de PRR al adaptador ASC seguido de la unión de caspasa-1 a ASC (27) (28) (29) (30) (31).

### **Activación del inflamasoma NLRP3**

El inflamasoma NLRP3 (también llamado NALP3, PYPAF1 o criopirina), es el inflamasoma mejor caracterizado hasta la fecha y en el que se centrará este estudio. Este inflamasoma contiene elementos típicos de los NLRs: el dominio LRR, el dominio NBD o NOD y el dominio PYD N-terminal. En respuesta a un estímulo activador del inflamasoma NLRP3, la proteína NLRP3 oligomeriza. Una vez que oligomeriza, la proteína NLRP3 recluta la proteína adaptadora ASC a través de interacciones de los dominios PYD. Durante esta activación, se forma un único agregado por célula, que es el encargado de reclutar y activar la caspasa-1 a través de interacciones de los dominios CARD. La activación de la caspasa-1 desencadena finalmente un proceso de muerte celular inflamatoria conocido como piroptosis, que va precedida por la liberación de citoquinas proinflamatorias.

El inflamasoma NLRP3 es una plataforma que conduce a la activación de caspasa-1, que controla la maduración y secreción de las interleuquinas IL-1 $\beta$  e IL-18, cuyas actividades proinflamatorias producen una respuesta a infecciones y a daño en el organismo de forma directa. El “priming” ocurre a través de la activación de receptores que señalizan vía MyD88/TRIF o bien a través de otras vías de PRRs capaces de activar NF- $\kappa$ B, como las que incluyen los TLRs, IL-1R, TNFR (tumour necrosis factor receptor) y NOD2. El principal papel del “priming” es aumentar la producción de NLRP3 hasta que la célula alcance los niveles necesarios para el ensamblaje del inflamasoma por un segundo estímulo. También se debe inducir la producción de pro-IL-1 $\beta$  a través de NF- $\kappa$ B (23) (25) (32) (26). Una vez que las células han sido preactivadas, es necesario activar la caspasa-1 para que se produzca la maduración de pro-IL-1 $\beta$ . Existen numerosos estímulos capaces de desencadenar el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, aunque los mecanismos a través de los que tiene lugar dicha activación aún no están totalmente dilucidados. Entre la amplia variedad de señales capaces de activar el inflamasoma se encuentran microorganismos como parásitos (33), bacterias, virus y patógenos fúngicos, así como también toxinas formadoras de poros derivadas de bacterias. Además de estas señales asociadas a patógenos, también existen diversas señales de estrés celular capaces de activar el inflamasoma NLRP3, como el ATP extracelular.

Sin embargo, NLRP3 no solo se expresa en células inmunes, sino también en algunas células no inmunes como las células epiteliales y osteoblastos (34).

Recientes estudios apoyan la activación de estas plataformas multiproteicas en la patogenia de la enfermedad periodontal aunque con resultados controvertidos. (23) (25) (35) (36) (37) (38) (39) (40).

El presente trabajo analizó el estudio de receptores de la inmunidad innata como el inflamasoma NLRP3 cuya activación en el contexto bacteriano induciría células inmunes y moléculas inflamatorias, algunas vinculadas en el metabolismo óseo, los cuales constituyen actores claves en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

## OBJETIVOS

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie

### **Objetivo general:**

- Evaluar la activación del complejo inflamasoma NLRP3 y respuesta inflamatoria en biopsias de tejido gingival obtenidas de sitios con enfermedad periodontal y correlacionar su activación con los criterios diagnósticos clínicos de la nueva “Clasificación de las enfermedades y alteraciones periodontales 2017” establecida por la Academia Americana de Periodontología (AAP) y la Federación Europea de Periodontología (EFP).

### **Objetivos específicos:**

En pacientes con enfermedad periodontal y con salud clínica periodontal evaluar:

- La activación del complejo **inflammasoma NLRP3** y respuesta inflamatoria en **biopsias de tejido** a través del estudio de la proteína **ASC, NLRP3** y **pancitoqueratina** en el tejido gingival de lesiones de pacientes con enfermedad periodontal.
- Los **cambios histopatológicos** en secciones de tejido gingival con patología periodontal en secciones de tejido coloreadas con hematoxilina y eosina.
- La asociación de la activación del complejo **inflammasoma NLRP3** con el **riesgo periodontal**.
- La asociación de la activación del complejo **inflammasoma NLRP3** sobre los **parámetros clínicos** de los sitios de donde se obtuvo la muestra (nivel de inserción clínica, profundidad de sondaje, registro de placa bacteriana y registro de hemorragia).

## MATERIALES Y MÉTODOS

“Usa el método científico: probando  
varias veces, llegarás a la verdad.”

Marco Tulio Cicerón

## **Selección de pacientes**

Se estudiaron 18 pacientes de ambos sexos, mayores a 21 años de edad, con/sin patología periodontal mediante un estudio descriptivo transversal, de los cuales se obtuvieron 14 muestras de tejido gingival (n:3 corresponden al grupo control y n:11 al grupo de estudio).

La metodología para la incorporación de los pacientes fue la siguiente:

1. Admisión: en ese momento se confeccionó la historia clínica y se firmó el consentimiento informado el cual ha sido avalado y aprobado previamente por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología - UNC (asignándole como n° de Repis: 36).
2. Confección de la ficha periodontal y diagnóstico de enfermedad periodontal.
3. Obtención de la muestra de tejido gingival.

Se establecieron como criterios de exclusión para esta investigación:

- Pacientes que recibieron tratamiento terapéutico con antibióticos, antiinflamatorios, contraceptivos o glucocorticoides durante un período de 6 meses previos al inicio del estudio.

- Pacientes que recibieron tratamiento periodontal durante un período de 6 meses previos al inicio de la investigación.
- Pacientes fumadores.
- Pacientes embarazadas o en período de lactancia.

### **Determinación de estado periodontal**

El método objetivo disponible para evaluar y clasificar la inflamación gingival es el registro de “hemorragia al sondaje” (RH %) (41). Este ha sido considerado como un posible predictor de enfermedad periodontal (42) (43) (44). Sin embargo, como la hemorragia en estas situaciones es inducida por la penetración de la sonda periodontal, fue necesario poner gran atención durante el procedimiento para evitar errores en su interpretación. Este registro es calculado como la proporción de zonas sangrantes (evaluación dicotómica sí/no) al ser estimuladas por una sonda periodontal con una fuerza controlada (0,2 N) en el extremo apical del surco en 6 localizaciones (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual) de todos los dientes presentes. El método elegido para determinar la gravedad de este registro se basó en porcentajes estableciendo la clasificación (45):

- leve:  $\leq 10\%$
- moderada: 10-30 %
- grave:  $\geq 30\%$  de las localizaciones

El método para registrar el biofilm bacteriano supragingival (RBB) se calculó como la proporción de sitios con biofilm positivo (evaluación dicotómica sí/no) al ser evaluados recorriendo con sonda periodontal la zona próxima al margen gingival en cuatro localizaciones (mesiovestibular, vestibular, distovestibular y lingual/palatino) de todos los elementos dentarios presentes. Cabe destacar que cuando su valor es superior al 20 % dificulta la posibilidad de mantener un equilibrio entre el hospedador y las bacterias favoreciendo posibles infecciones (46) es por ello que se estableció como punto de quiebre este porcentaje para determinar su influencia en la patología y se consideró la siguiente clasificación (47):

-bajo:  $\leq 20\%$

-elevado:  $\geq 20\%$

Además, se realizaron registros de profundidad de sondaje (PS) y nivel de inserción clínica (NIC) expresados en mm y registros de hipermovilidad. Las piezas dentarias fueron examinadas en seis sitios por elemento dentario utilizando una sonda periodontal tipo North Carolina (mesiobucal, bucal, distobucal, linguobucal, lingual, distolingual) para los registros de NIC, recesión y PS. Mientras que el registro de hipermovilidad se realizó por elemento dentario. Además, se realizaron estudios radiográficos para confirmar diagnóstico clínico periodontal y descartar otras patologías.

Se consideró profundidad de bolsa a la distancia del margen gingival al fondo de la bolsa, se mide por medio de una sonda graduada en milímetros.

Se consideró nivel de inserción clínica a la distancia desde el límite cemento-adamantino hasta el fondo de la bolsa, se mide con una sonda graduada en milímetros. Nos indica los milímetros perdidos de inserción periodontal.

Todos los registros fueron realizados por el mismo investigador y los datos obtenidos fueron registrados electrónicamente mediante un software denominado Go-Probe (Florida Probe Corporation, Florida, USA).

Se aplicó la nueva "Clasificación de las enfermedades y alteraciones periodontales 2017" establecida por la Academia Americana de Periodontología (AAP) y la Federación Europea de Periodontología (EFP), para definir los casos analizados en este trabajo (48).

Se definió como concepto de **salud clínica**, según se considere al sitio o la boca en su conjunto (paciente), como un sitio que presenta salud clínica en un periodonto intacto, cuando no hay sangrado al sondaje, eritema ni edema, y que presenta niveles fisiológicos óseos (rango de 1 a 3 mm apical al límite amelocementario) (45). Mientras que un paciente es considerado un "**caso de periodontitis**" cuando (49):

1. Se detecta pérdida de inserción clínico interdental en dos o más dientes no adyacentes, o

2. Se detecta pérdida de inserción clínica en caras libres  $\geq 3$  mm con PS  $\geq 3$  mm en  $\geq 2$  dientes pero la pérdida de inserción clínica no se debe a situaciones diferentes a la periodontitis como causas relacionadas con

a) recesión gingival de origen traumático;

b) caries dental que se extiende en el área cervical del diente;

c) presencia de pérdida de inserción clínica en distal de un segundo molar asociado a la mala posición o extracción de un tercer molar,

d) lesión endodóntica que drena a través del periodonto marginal;

e) ocurrencia de una fractura o fisura vertical de raíz.

3. Un caso individual de periodontitis debe caracterizarse utilizando el ESTADÍO y el GRADO de la enfermedad. El ESTADÍO depende en gran medida de la gravedad de la enfermedad y la presentación, así como la complejidad del tratamiento de la enfermedad y además incluye una descripción de la extensión y distribución en la dentición. El GRADO proporciona información sobre las características biológicas de la enfermedad incluyendo: la historia y análisis basada en la tasa de progresión de la periodontitis, la evaluación de riesgo de mayor progresión y el análisis de posibles pobres resultados del tratamiento.

## **Determinación del riesgo periodontal**

Para determinar el riesgo de avance periodontal se consideró el gráfico de araña (sistema Go-Probe) que muestra seis variables a evaluar (50)

- El porcentaje de sangrado al sondaje
- El número de bolsas periodontales mayores a 4 mm
- El número de dientes perdidos
- La pérdida de soporte periodontal en relación a la edad del paciente
- Condiciones sistémicas y genéticas
- Factores ambientales, como el hábito de fumar.

Porcentaje de localizaciones con sangrado al sondaje: El sangrado al sondaje refleja cuál es el estado de inflamación de los tejidos periodontales y cuál es el grado de higiene oral del paciente, aunque no está claro cuál es el valor a partir del cual aumenta el riesgo. En este diagrama se ha establecido que entre un 0-9% el riesgo es bajo, entre un 10-25% el riesgo es medio y mayor a 25% es alto.

Prevalencia de bolsas periodontales mayores a 4 mm: Según Lang y Tonetti (50), individuos con hasta 4 bolsas periodontales mayores a 4 mm se consideran que están en bajo riesgo, de 4 a 8 bolsas en riesgo moderado y más de 8 bolsas en riesgo alto.

Pérdida de dientes de un total de 28: Aunque no conozcamos las razones de las pérdidas dentarias, el número de dientes refleja la funcionalidad de la dentición. No está claro que las arcadas reducidas sean menos funcionales o que conduzcan a una disfunción mandibular, sin embargo, el número de dientes parece reflejar la historia de enfermedades orales o traumas a los que han estado sometidos los dientes, por lo que parece lógico incluir este parámetro en el análisis del riesgo. Se considera que los pacientes que han perdido hasta 4 dientes de 28 se encuentran en bajo riesgo, de 4 a 8 dientes en riesgo moderado y más de 8 dientes en riesgo alto.

Pérdida de inserción en función de la edad: La pérdida de inserción en función de la edad del paciente parece ser un buen predictor del riesgo de una futura pérdida de inserción y de la progresión de la patología. En base al porcentaje de pérdida ósea radiográfica y la división entre la edad del paciente, se establece un cociente cuyos valores determinan el riesgo de recurrencia de la enfermedad. Valores de hasta 0.5 implican un bajo riesgo, entre 0,5-1 un riesgo moderado y mayor a 1 un riesgo elevado.

Condiciones sistémicas: patologías como la diabetes mellitus están asociadas con un mayor riesgo y severidad de la enfermedad periodontal, además de una peor respuesta al tratamiento, especialmente en aquellos pacientes que tienen un mal control de la glucemia. Es por ello razonable pensar que los pacientes diabéticos se encuentren en un riesgo elevado de

recurrencia de la enfermedad. Otro aspecto que se tiene en cuenta en este apartado es el de los polimorfismos genéticos. La presencia de una condición que modifique el avance de la patología determina que el sujeto se encuentra en un riesgo elevado, mientras que la ausencia implica un riesgo bajo.

Tabaco: El tabaco constituye uno de los factores de riesgo más importantes asociados a la enfermedad periodontal. El tabaco se ha asociado a una peor higiene oral y a alteraciones del sistema inmunológico y, con ello, a una menor capacidad de defensa frente a los periodontopatógenos, lo que determina una mayor severidad de la enfermedad periodontal sumado a una respuesta deficiente al tratamiento. Es por ello que parece razonable pensar que los pacientes fumadores poseen un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad. Se considera que los pacientes no fumadores y los exfumadores de más de 5 años se encuentran en bajo riesgo de recurrencia, los fumadores de menos de 20 cigarrillos al día en riesgo moderado y los de más de 20 en riesgo alto.

Una vez analizados los factores antes mencionados, es necesario determinar el riesgo del paciente. Se considera:

**Riesgo bajo:** cuando posee los 6 parámetros dentro de la zona de bajo riesgo, o como mucho, uno en el de riesgo moderado.

**Riesgo moderado:** cuando posee por lo menos 2 parámetros en la categoría de riesgo moderado y como mucho uno en el de riesgo alto.

**Riesgo alto:** cuando posee por lo menos 2 parámetros en la categoría de riesgo alto.

### **Muestras de biopsias de tejido gingival.**

Las muestras de tejidos gingivales sanos (grupo control) fueron obtenidos, previa anestesia local del sitio seleccionado, retiro de placa supragingival y aislamiento relativo con torundas de algodón, en sitios sin pérdida de inserción y con PS igual o inferior a 3 mm y sin evidencia radiográfica de pérdida ósea, durante el procedimiento quirúrgico en elementos dentarios que requieran un alargamiento de corona clínica a los fines de restaurarlos o bien que requieran su exodoncia por indicaciones ortodóncicas. Mientras que las muestras de tejidos gingivales enfermos (grupo estudio) fueron obtenidas durante el tratamiento periodontal, siendo elementos con indicación de exodoncia debido a su pronóstico desfavorable.

Las muestras de tejidos fueron fijadas con formaldehído al 10 % V/V en PBS 1x, y posteriormente deshidratadas en sacarosa 30% p/V en PBS 1x para luego conformar tacos de OCT y realizar cortes de 5 a 7 micras.

Algunas muestras se utilizaron para llevar a cabo la técnica de hematoxilina/eosina y otras para inmunofluorescencia. Para inmunofluorescencia las muestras fueron bloqueadas con PBS y BSA al 2%

(p/v) e incubadas *over-night* a 4°C con anticuerpos primarios anti-ASC (EMD Millipore, California, USA), anti-NLRP3 (Abcam, Cambridge, England) y anti-pancitoqueratina (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Después del lavado, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo (Alexa 546 y Alexa 488). Los núcleos fueron coloreados utilizando fluorocromo Hoechst 33258 (2 µg/ml).

### **Análisis estadístico**

Los datos se presentan como media ± desviación estándar.

Se empleo para evaluar la correlación entre las variables cualitativas el test de Chi-cuadrado (Prueba exacta de Fisher) mientras que las variables cuantitativas estudiadas fueron comparadas usando Test de Wilcoxon Mann-Whitney. Para determinar la relación entre las variables analizadas se utilizó el programa **GraphPad Software**. Se consideró como valor estadísticamente significativo  $p \leq 0.05$ .

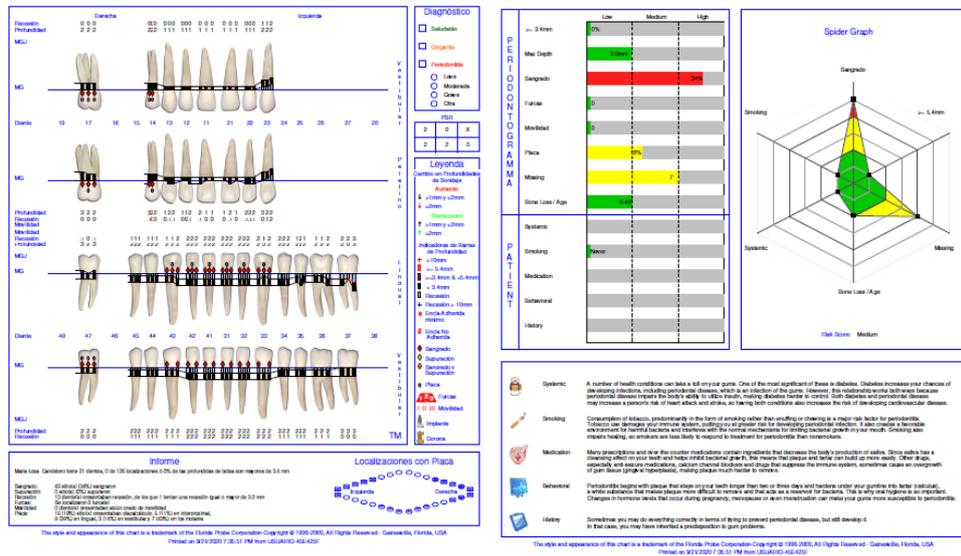
## RESULTADOS

“Existe un principio que se resiste a toda información, que se resiste a toda investigación, que nunca deja de mantener al hombre en una ignorancia perenne. . . Es el principio de desestimar lo que no se ha investigado.”

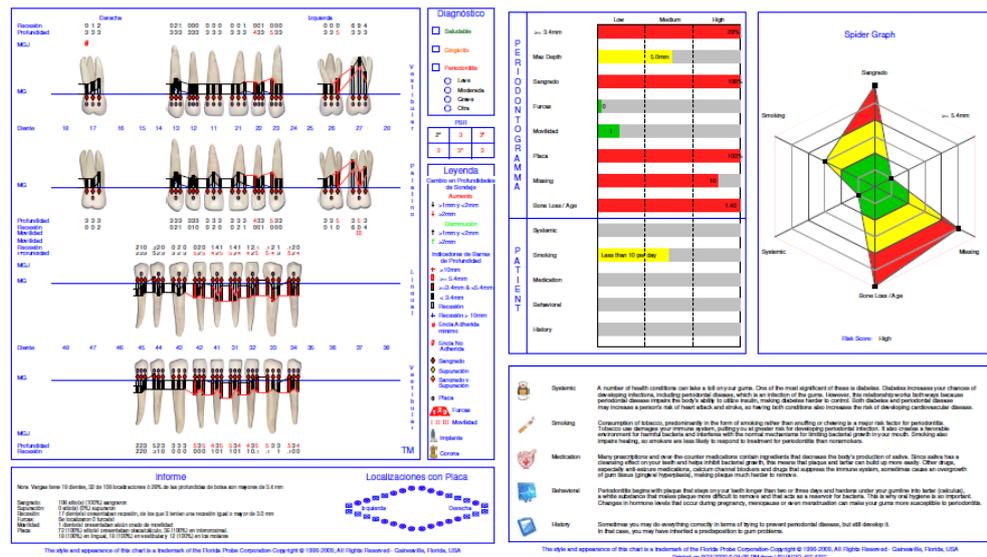
Herbert Spencer

Se estructuran los resultados en función de los objetivos señalados. En el primer apartado se analizan las características clínicas entre los grupos estudiados, luego se analiza la activación del inflammasoma en biopsias de tejido gingival mediante la técnica de inmunofluorescencia y se describen las características morfológicas de los cortes para posteriormente asociar los datos obtenidos con los parámetros clínicos y el riesgo periodontal.

# Evaluación periodontal de los pacientes involucrados en el estudio.

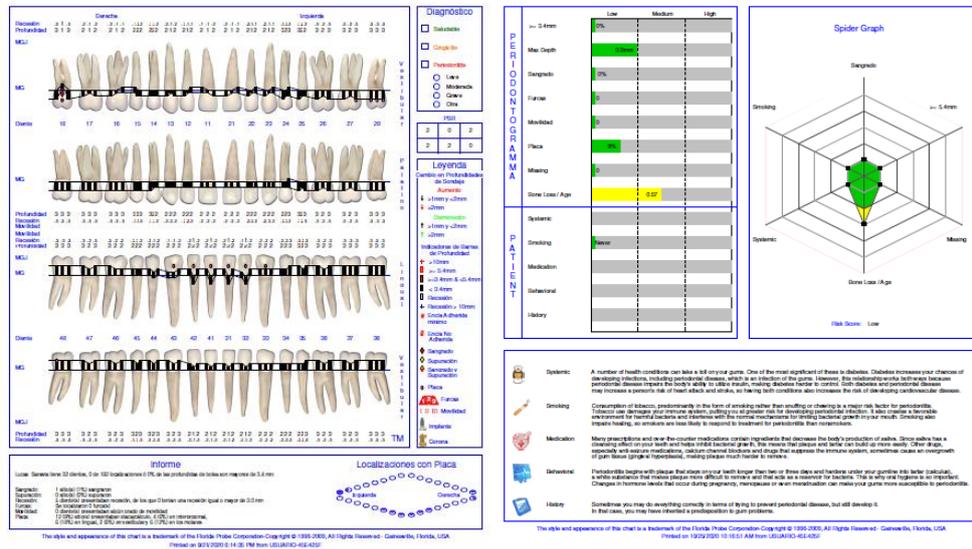


**Figura 1.** El caso N°1 se trata de un caso de periodontitis Estadio II: porque presenta una pérdida de inserción interdental en la zona más significativa entre los 3-4 mm, profundidad de sondaje menor a 5mm, pérdida ósea mayormente horizontal y pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio coronal de la raíz. De extensión generalizada porque afecta más del 30% de los elementos dentarios y Grado B porque presenta un porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad mayor a 0.25 hasta 1 (0.49) con la destrucción proporcional a los depósitos de biofilm.

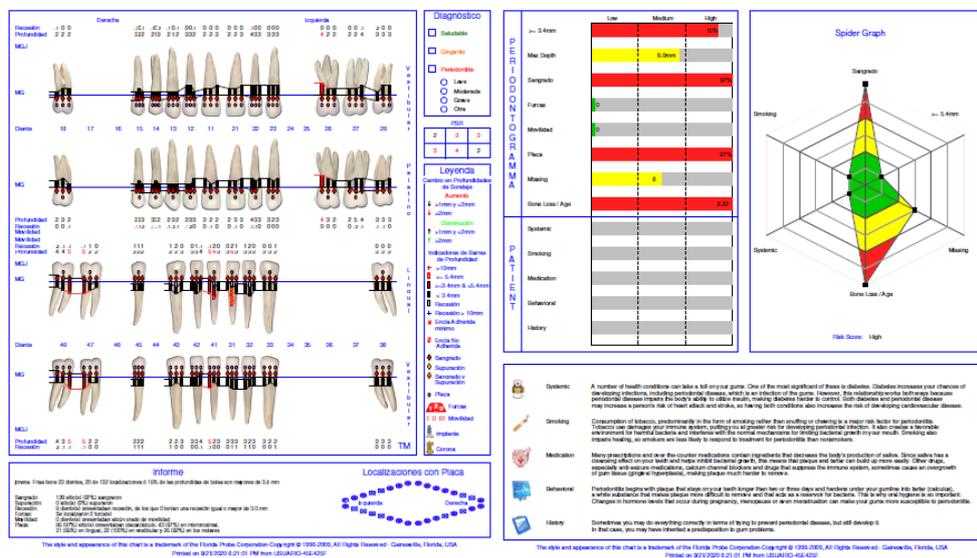


**Figura 2.** El caso N°2 se trata de un caso de periodontitis Estadio IV porque presenta una pérdida de inserción interdental en la zona más significativa mayor a los 5 mm, profundidad de sondaje mayor a 6mm, pérdida ósea vertical mayor a 3 mm, pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio medio/apical de la raíz en

varios sitios y movilidad grado III en el elemento 27. De extensión localizada porque afecta menos del 30% de los elementos dentarios y Grado C porque presenta un porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad mayor a 1 (1.40), la destrucción supera las expectativas según los depósitos de biofilm.

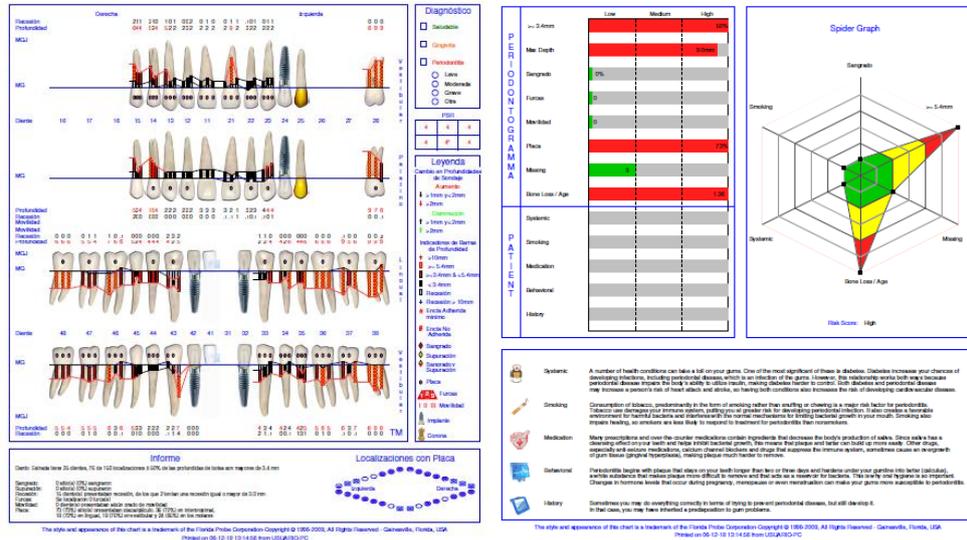


**Figura 3.** El caso N°3 se trata de un caso salud periodontal en un periodonto intacto porque no se detecta pérdida de inserción clínico interdental ni pérdida ósea radiográfica, presenta una profundidad de sondaje menor o igual 3mm y presenta hemorragia al sondaje menor a al 10%.

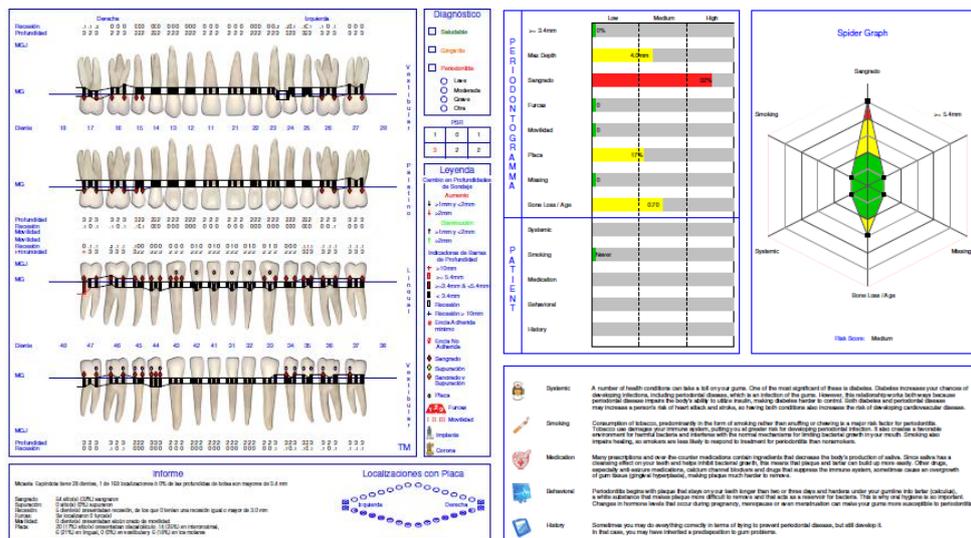


**Figura 4.** El caso N°4 se trata de un caso de periodontitis Estadio II porque presenta una pérdida de inserción interdental en la zona más significativa entre los 3-4 mm, profundidad de sondaje menor a 5mm, pérdida ósea mayormente horizontal y pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio coronal de la raíz. De extensión generalizada porque afecta más del 30% de los elementos dentarios y Grado C porque presenta un

porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad mayor a 1 (2.22), cuya destrucción supera las expectativas según los depósitos de biofilm.

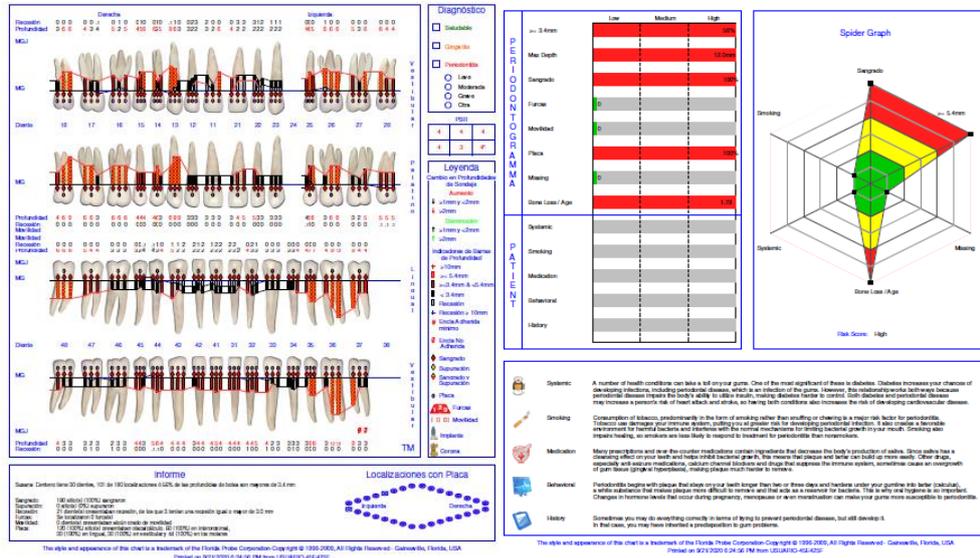


**Figura 5.** El caso N°5 se trata de un caso de periodontitis Estadio III porque presenta una pérdida de inserción interdental en la zona más significativa mayor a los 5 mm, profundidad de sondaje mayor a 6mm, pérdida ósea vertical mayor a 3 mm y pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio medio/apical de la raíz en varios sitios. De extensión generalizada porque afecta más del 30% de los elementos dentarios y Grado C porque presenta un porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad mayor a 1 (1.36) donde la destrucción supera las expectativas según los depósitos de biofilm.

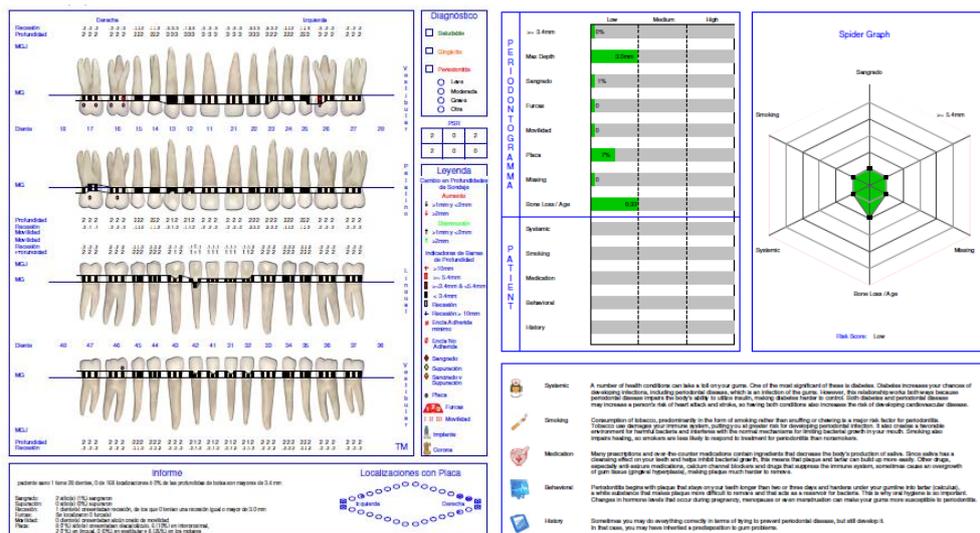


**Figura 6.** El caso N°6 se trata de un caso de periodontitis Estadio II porque presenta una pérdida de inserción interdental en la zona más significativa entre los 3-4 mm, profundidad de sondaje menor a 5mm, pérdida ósea mayormente horizontal y pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio coronal de la raíz. De extensión generalizada porque afecta más del 30% de los elementos dentarios y Grado B porque presenta un

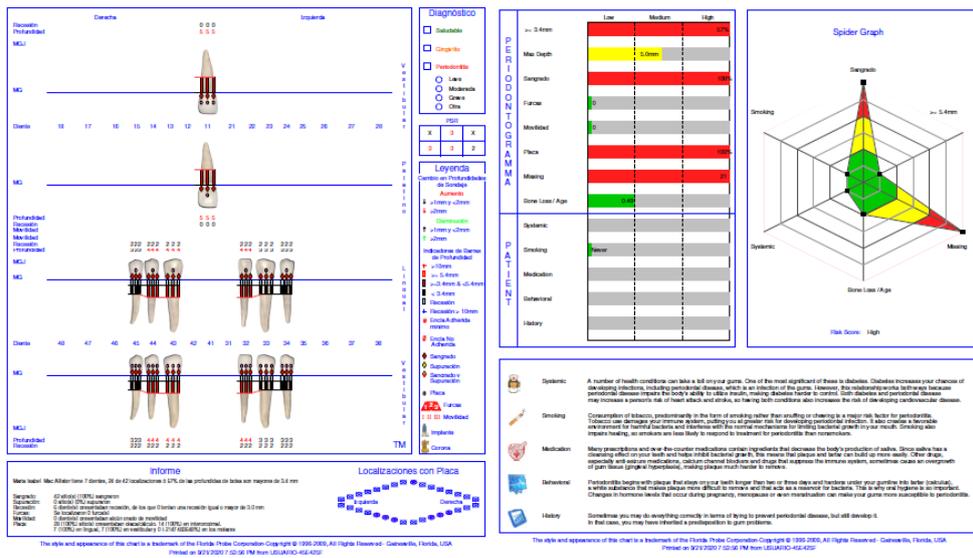
porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad entre 0.25 y 1 (0.7), la destrucción es proporcional a los depósitos de biofilm.



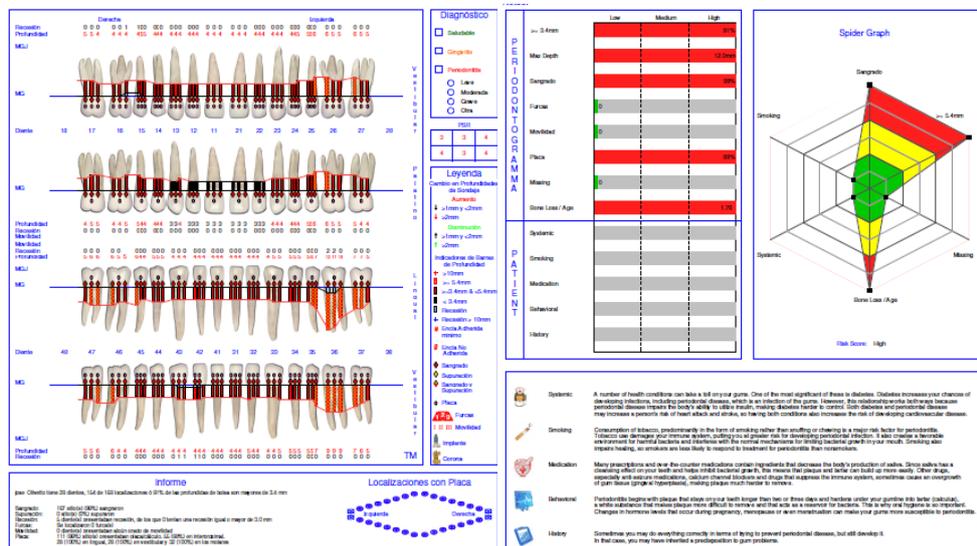
**Figura 7.** El caso N°7 se trata de un caso de periodontitis Estadio III porque presenta una pérdida de inserción interdentaria en la zona más significativa mayor a los 5 mm, profundidad de sondaje mayor a 6mm, pérdida ósea vertical mayor a 3 mm y pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio medio/apical de la raíz en varios sitios. De extensión generalizada porque afecta más del 30% de los elementos dentarios y Grado C porque presenta un porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad mayor a 1 (1.78) donde la destrucción supera las expectativas según los depósitos de biofilm.



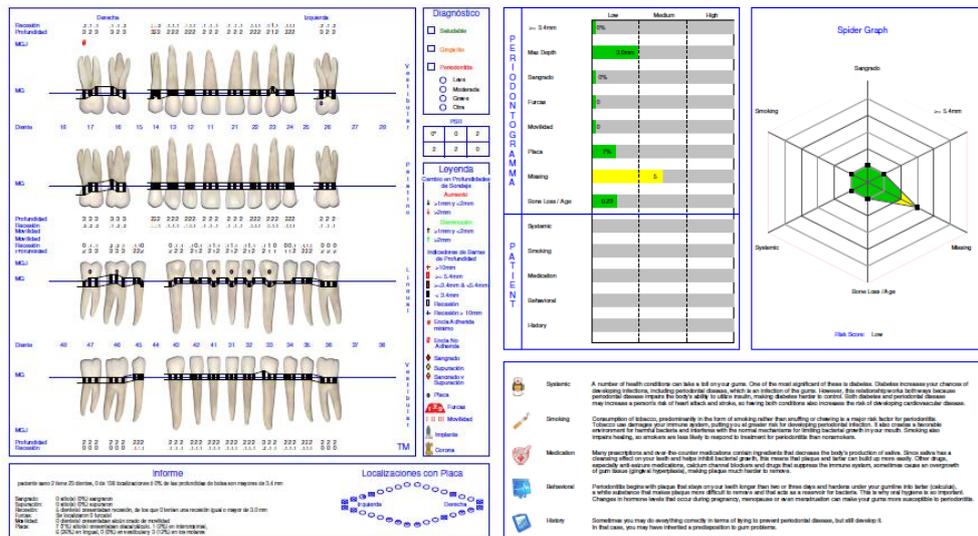
**Figura 8.** El caso N°8 se trata de un caso de salud periodontal en un periodonto intacto porque no se detecta pérdida de inserción clínica interdentaria ni pérdida ósea radiográfica, la profundidad de sondaje es menor o igual 3mm y el registro de hemorragia al sondaje menor a 10%.



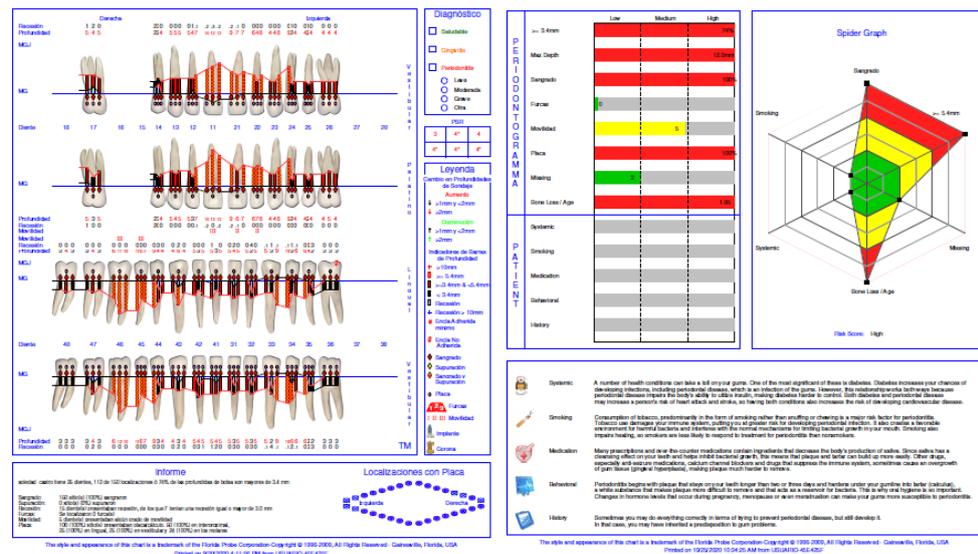
**Figura 9.** El caso N°9 se trata de un caso de periodontitis Estadio III porque presenta una pérdida de inserción interdental en la zona más significativa mayor a los 5 mm, profundidad de sondaje mayor a 6mm, pérdida ósea vertical mayor a 3 mm y pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio medio/apical de la raíz en varios sitios. De extensión generalizada porque afecta más del 30% de los elementos dentarios y Grado B porque presenta un porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad entre 0.25 y 1 (0.49) cuya destrucción es proporcional a los depósitos de biofilm.



**Figura 10.** El caso N°10 se trata de un caso de periodontitis Estadio III porque presenta una pérdida de inserción interdental en la zona más significativa mayor a los 5 mm, profundidad de sondaje mayor a 6mm, pérdida ósea vertical mayor a 3 mm y pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio medio/apical de la raíz en varios sitios. De extensión localizada porque afecta menos del 30% de los elementos dentarios y Grado C porque presenta un porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad mayor a 1 (1.76), la destrucción supera las expectativas según los depósitos de biofilm.

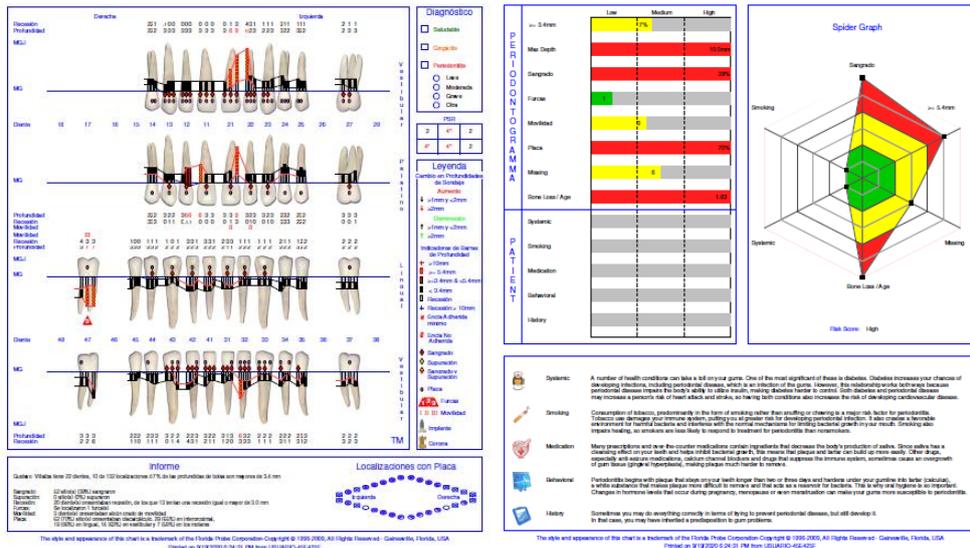


**Figura 11.** El caso N°11 se trata de un caso salud periodontal en un periodonto intacto porque no se detecta pérdida de inserción clínica interdental ni pérdida ósea radiográfica, la profundidad de sondaje es menor o igual 3mm y presenta un registro de hemorragia al sondaje menor a al 10%.

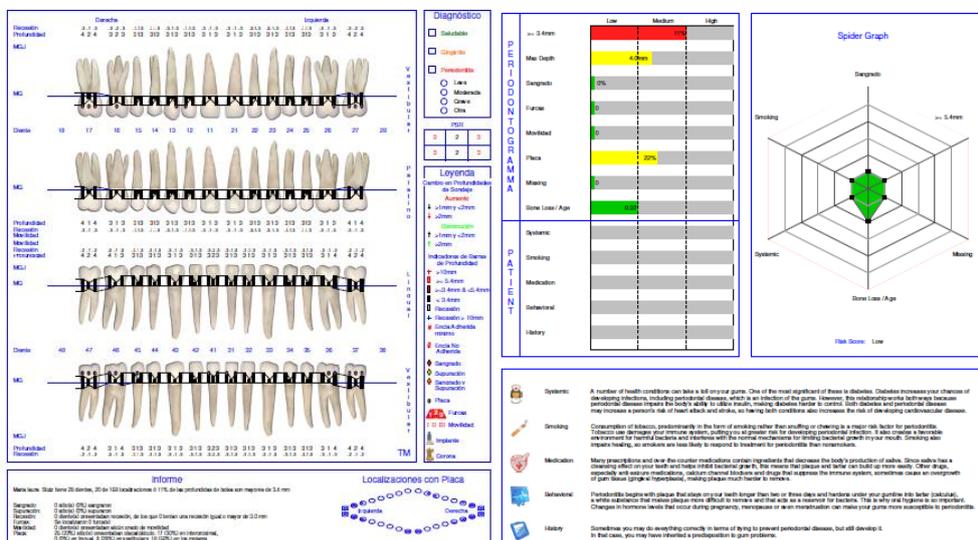


**Figura 12.** El caso N°12 se trata de un caso de periodontitis Estadio IV porque presenta una pérdida de inserción interdental en la zona más significativa mayor a los 5 mm, profundidad de sondaje mayor a 6mm, pérdida ósea vertical mayor a 3 mm, pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio medio/apical de la raíz en varios sitios y movilidad grado III en los elementos 11, 45 y 46. De extensión localizada porque afecta menos del 30% de los elementos dentarios y Grado C porque presenta un porcentaje de pérdida ósea en relación a la edad mayor a 1 (1.95), la destrucción supera las expectativas según los depósitos de biofilm.





**Figura 15.** El caso N°15 se trata de un caso de periodontitis Estadio IV porque presenta una pérdida de inserción interdentaria en la zona más significativa mayor a los 5 mm, profundidad de sondaje mayor a 6mm, pérdida ósea vertical mayor a 3 mm, pérdida ósea radiográfica con una extensión que alcanza el tercio medio/apical de la raíz en varios sitios y movilidad grado III en el elemento 47. De extensión localizada porque afecta menos del 30% de los elementos dentarios y Grado C porque presenta un porcentaje de pérdida ósea radiográfica en relación a la edad mayor a 1 (1.83), la destrucción supera las expectativas según los depósitos de biofilm.



**Figura 16.** El caso N°16 se trata de un caso salud periodontal en un periodonto intacto porque no se detecta pérdida de inserción clínico interdentaria ni pérdida ósea radiográfica, profundidad de sondaje es menor o igual 3mm y un registro de hemorragia al sondaje menor a al 10%.



## **Análisis de las características clínicas entre el grupo de estudio y grupo control**

Las **características clínicas** de los pacientes con salud periodontal y de los individuos con periodontitis incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 1. Las muestras estudiadas fueron las siguientes, 13 pacientes periodontales con un rango de edad  $53,46 \pm 15,76$ . Mientras que en el grupo control se analizaron 5 pacientes diagnosticados con salud periodontal con un rango de edad  $41,80 \pm 9,445$ . Los registros clínicos como RH y RBB se obtuvieron de un promedio de todos los sitios de la cavidad bucal.

Se realizó un Test de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar diferencias entre los grupos estudiados. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas respecto a la edad lo que evidenció la similitud de los grupos estudiados en cuanto al rango etario. Por el contrario, si se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al analizar el registro de biofilm bacteriano ( $p= 0.0004$ ) y hemorragia ( $p= 0.0014$ ).

**Tabla 1. Características clínicas de los individuos estudiados (media ± DS)**

Características clínicas	Grupo Control (n=5)	Pacientes con periodontitis (n= 13)	p valor
Edad (años)	41,80 ± 9,445	53,46 ± 15,76	0,1106
RBB (%)	8,400 ± 9,450	81,23 ± 27,64	0,0004
RH (%)	0.200 ± 0,4472	68,77 ± 40,82	0,0014

Los valores representan la media ± desviación estándar de las características clínicas: edad (años) y porcentaje de sitios positivos para los registros de biofilm bacteriano (RBB) y hemorragia (RH) de la población estudiada. Se consideró una  $p \leq 0.05$

### **Activación del complejo Inflamasoma NLRP3 y respuesta inflamatoria en relación a los criterios diagnósticos clínicos de la nueva clasificación**

Este estudio se realizó en muestras de tejido gingival mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se registró la marcación negativa o positiva de cada preparación, para luego permitir el análisis de las variables mediante la utilización del Prueba exacta de Fisher. Se consideró como valor estadísticamente significativo un valor de  $p \leq 0.05$ .

En las tablas 2, 3 y 4 se muestran los datos generales en estos ensayos. Cuando se analizó la presencia de inmunofluorescencia positiva/negativa con anticuerpos anti- Pan-citoqueratina (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA), NLRP3 (Abcam, Cambridge, England) y ASC (EMD Millipore, California, USA) en relación al estado de salud o patología

periodontal se observó que los tres presentaban inmunomarcación positiva cuando se estudiaron pacientes con patología periodontal.

**Tabla 2.** Inmunofluorescencia para Pancitoqueratina en relación al estado periodontal

Pancitoqueratina	Salud periodontal	Patología periodontal
Inmunofluorescencia positiva	1	9
Inmunofluorescencia negativa	2	0

Prueba exacta de Fisher p 0,0455

**Tabla 3.** Inmunofluorescencia para NLRP3 en relación al estado periodontal

NLRP3	Salud periodontal	Patología periodontal
Inmunofluorescencia positiva	0	6
Inmunofluorescencia negativa	2	0

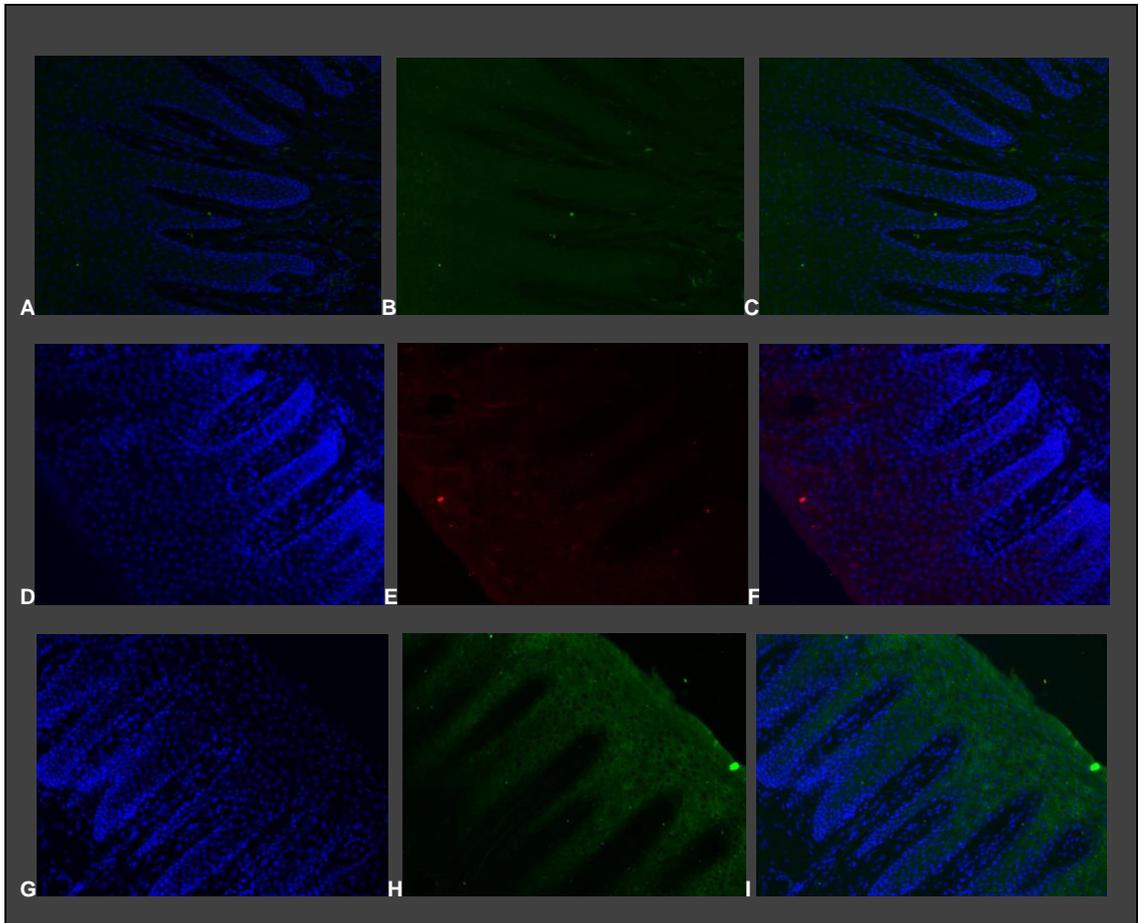
Prueba exacta de Fisher p= 0,0357

**Tabla 4.** Inmunofluorescencia para ASC en relación al estado periodontal

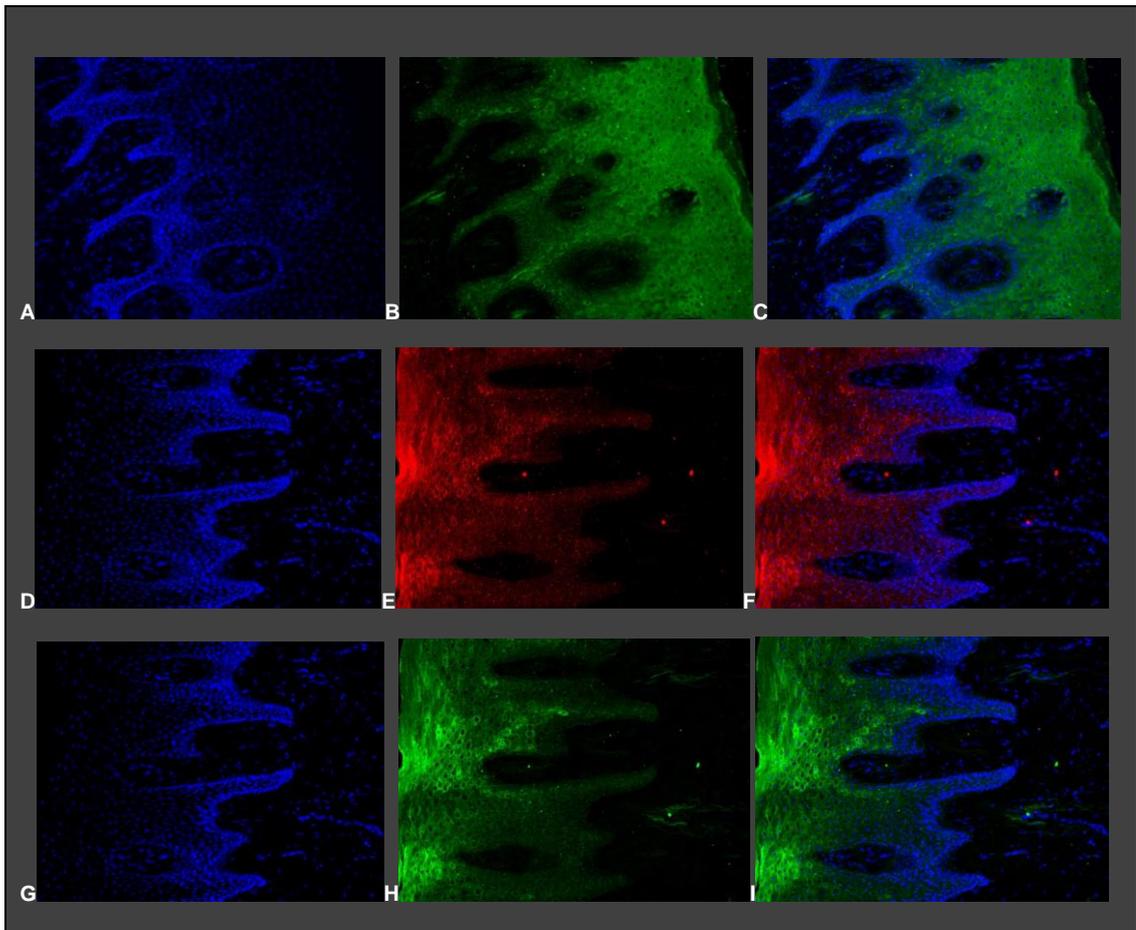
ASC	Salud periodontal	Patología periodontal
Inmunofluorescencia positiva	0	11
Inmunofluorescencia negativa	3	0

Prueba exacta de Fisher p= 0,0027

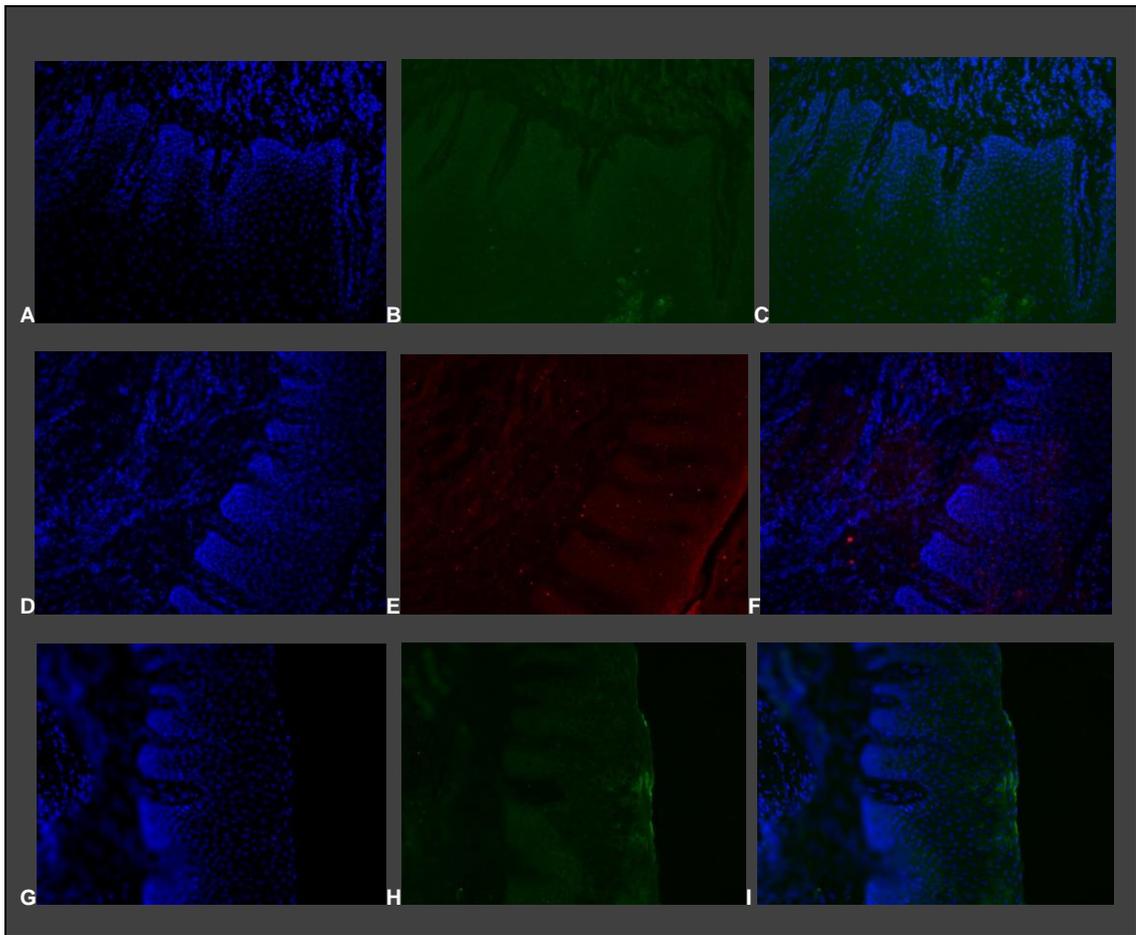
## Evaluación de la activación del complejo inflamasoma NLRP3 en biopsias de tejido gingival.



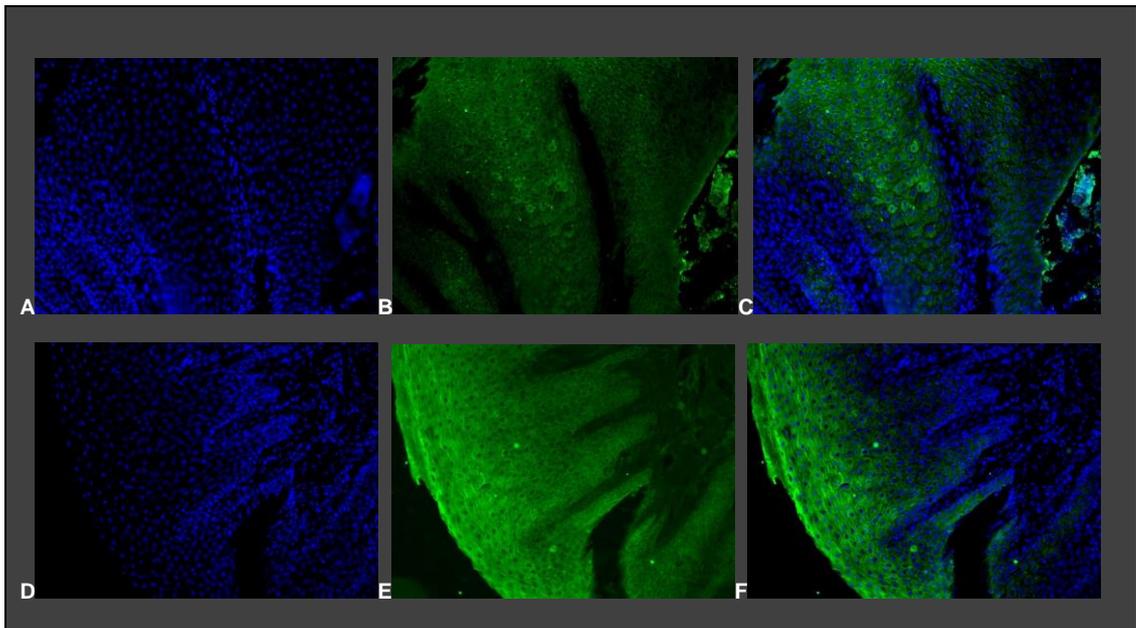
**Figura 19.** Imágenes de microscopía por inmunofluorescencia indirecta de la muestra de encía de paciente con salud periodontal. **A, D y G.** Se observan los núcleos de las células del epitelio y del tejido conectivo a 20x mediante la marcación con fluorocromo Hoechst en canal azul. **B.** Inmunofluorescencia indirecta en células epiteliales con inmunomarcación negativa (canal verde) para la proteína ASC a 20x. **C.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y verde (proteína ASC) genera una tercera imagen que demuestra la negatividad de la marcación. **E.** Inmunofluorescencia indirecta en células epiteliales expresando una marca negativa para la proteína NLRP3 a 20x en canal rojo. **F.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y rojo (proteína NLRP3). **H.** Inmunofluorescencia indirecta en células del tejido epitelial expresando la proteína Pancitoqueratina a 20x en canal verde. **I.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y verde (proteína Pancitoqueratina) genera una tercera imagen que facilita la identificación de células positivas en el tejido epitelial mediante inmunomarcación.



**Figura 20.** Imágenes de microscopía por inmunofluorescencia indirecta de la muestra de encía de paciente con patología periodontal (Estadio III Grado C). **A, D y G.** Se observan los núcleos de las células del epitelio y del tejido conectivo a 20x mediante la marcación con fluorocromo Hoechst en canal azul. **B.** Inmunofluorescencia indirecta en células epiteliales con inmunomarcación positiva (canal verde) para la proteína ASC a 20x. **C.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y verde (proteína ASC) genera una tercera imagen que demuestra la inmunomarcación positiva. **E.** Inmunofluorescencia indirecta en células epiteliales expresando una marca positiva para la proteína NLRP3 a 20x en canal rojo. **F.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y rojo (proteína NLRP3). **H.** Inmunofluorescencia indirecta en células del tejido epitelial expresando la proteína Pancitoqueratina a 20x en canal verde. **I.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y verde (proteína Pancitoqueratina) genera una tercera imagen que facilita la identificación de células positivas en el tejido epitelial mediante inmunomarcación.

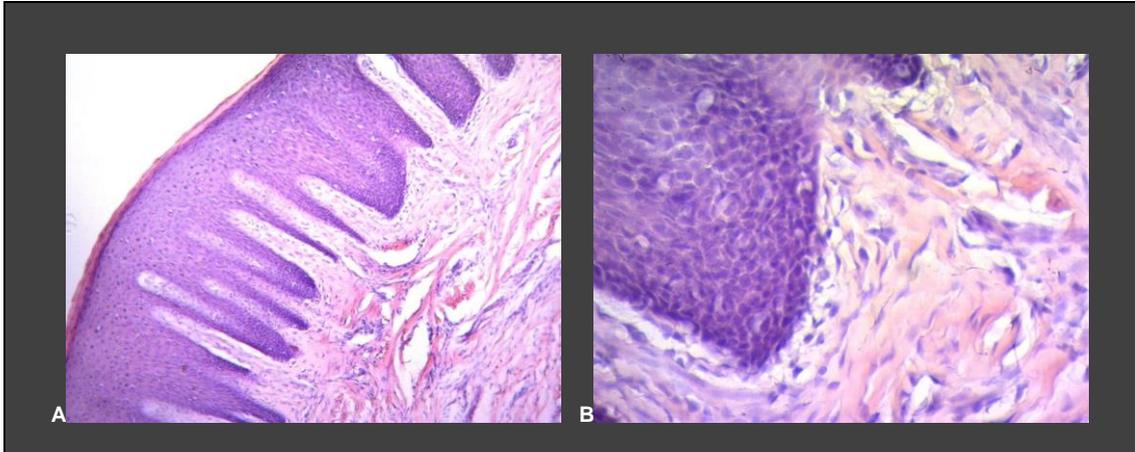


**Figura 21.** Imágenes de microscopía por inmunofluorescencia indirecta de la muestra de encía de paciente con salud periodontal. **A, D y G.** Se observan los núcleos de las células del epitelio y del tejido conectivo a 20x mediante la marcación con fluorocromo Hoechst en canal azul. **B.** Inmunofluorescencia indirecta en células epiteliales con inmunomarcación negativa (canal verde) para la proteína ASC a 20x. **C.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y verde (proteína ASC) genera una tercera imagen que demuestra la negatividad de la marcación. **E.** Inmunofluorescencia indirecta en células epiteliales expresando una marca negativa para la proteína NLRP3 a 20x en canal rojo. **F.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y rojo (proteína NLRP3). **H.** Inmunofluorescencia indirecta en células del tejido epitelial expresando la proteína Pancitoqueratina a 20x en canal verde. **I.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y verde (proteína Pancitoqueratina) genera una tercera imagen que facilita la identificación de escasas células positivas en el tejido epitelial mediante inmunomarcación.

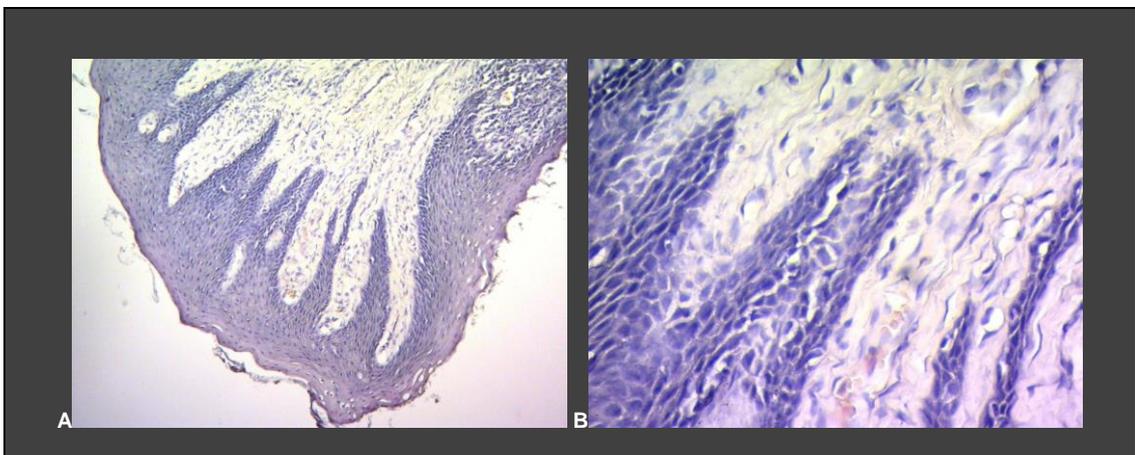


**Figura 22.** Imágenes de microscopía por inmunofluorescencia indirecta de la muestra de encía de paciente con patología periodontal (Estadío IV Grado C). **A y D.** Se observan los núcleos de las células del epitelio y del tejido conectivo a 20x mediante la marcación con fluorocromo Hoechst en canal azul. **B.** Inmunofluorescencia indirecta en células epiteliales con inmunomarcación positiva (canal verde) para la proteína ASC a 20x. **C.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y verde (proteína ASC) genera una tercera imagen que demuestra la inmunomarcación positiva. **E.** Inmunofluorescencia indirecta en células del tejido epitelial expresando la proteína Pancitoqueratina a 20x en canal verde. **F.** Sobreposición (merge) de los canales azul (núcleos) y verde (proteína Pancitoqueratina) genera una tercera imagen que facilita la identificación de células positivas en el tejido epitelial mediante inmunomarcación.

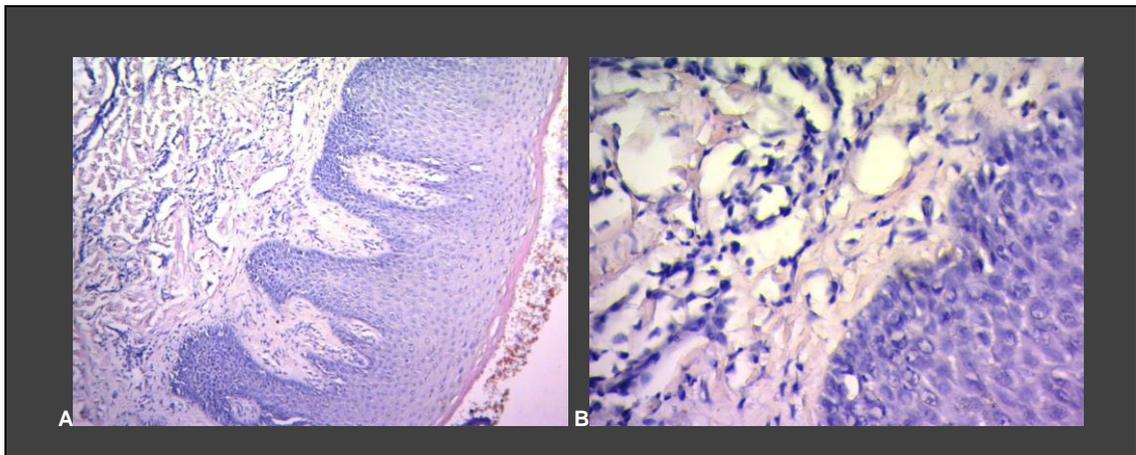
## Estudio histopatológico del tejido gingival



**Figura 23.** Imágenes microscópicas de encía de paciente sano (sin enfermedad periodontal), M.O H/E. **A.** Se observa epitelio escamoso estratificado hiperparaqueratinizado con sector hiperortoqueratinizado y tejido conectivo denso con células estromales (fibroblastos) con escaso infiltrado inflamatorio, 10X H/E. **B.** Se observa a nivel del tejido epitelial acantosis y proyección de crestas epiteliales hacia el tejido conectivo, 40X H/E.



**Figura 24.** Imágenes microscópicas de encía, de paciente con patología periodontal (Caso de periodontitis Estadío III Grado C) representativa, M.O H/E. **A.** Se observa prolongación de crestas epiteliales, poca exocitosis, figuras de degeneración hidrópica y tejido conectivo fibroso denso con células estromales (fibroblastos) e inflamación crónica moderada en sector superior derecho, 10X H/E. **B.** Se observa epitelio con acantosis, papilomatosis, prolongación de crestas epiteliales y tejido conectivo fibroso denso con células estromales (fibroblastos) e inflamación crónica leve, 40X H/E.



**Figura 25.** Imágenes microscópicas de encía, de paciente con patología periodontal (Caso de periodontitis Estadio IV Grado C), M.O H/E. **A.** Se observa epitelio escamoso estratificado hiperortoqueratinizado con áreas de acantopailomatosis y tejido conectivo fibroso denso, 10X H/E. **B.** Se observa tejido epitelial estratificado y tejido conectivo fibroso denso con células estromales (fibroblastos) e inflamación crónica moderada, rico en linfocitos 40X H/E.

Los hallazgos histológicos encontrados en el presente trabajo nos permiten afirmar que existe una estrecha relación de éstos con el diagnóstico clínico (Tabla 5).

**Tabla 5.** Hallazgos histológicos en relación al estado periodontal

Hallazgos histológicos	Salud periodontal	Patología periodontal
Escaso/nulo infiltrado inflamatorio	2	1
Moderado/intenso infiltrado inflamatorio	0	9

Prueba exacta de Fisher p 0,0455

## Inmunomarcación del inflammasoma NLRP3 y su relación con el riesgo periodontal

Los datos analizados en conjunto se muestran en las tablas 6 y 7 identifican al complejo inflammasoma NLRP3 / ASC, como un posible biomarcador de riesgo de progresión de la periodontitis. La presencia de los marcadores de activación del inflammasoma se detectaron en células epiteliales marcadas con anticuerpos anti-pancitoqueratina.

**Tabla 6.** *Inmunofluorescencia para ASC en relación al riesgo periodontal*

ASC	Riesgo alto	Riesgo moderado	Riesgo bajo
Inmunofluorescencia positiva	9	2	0
Inmunofluorescencia negativa	0	0	3

Prueba exacta de Fisher p= 0,0009

**Tabla 7.** *Inmunofluorescencia para NLRP3 en relación al riesgo periodontal*

NLRP3	Riesgo alto	Riesgo moderado	Riesgo bajo
Inmunofluorescencia positiva	4	2	0
Inmunofluorescencia negativa	0	0	2

Prueba exacta de Fisher p= 0,0183

Cuando se analizó la presencia de inmunofluorescencia positiva/negativa para anticuerpos anti- Pan citoqueratina, NLRP3 y ASC en relación con los parámetros clínicos (PS, NIC, RBB, RH) mediante la Prueba exacta de Fisher, los resultados observados demuestran exclusivamente una

asociación de inmunomarcación positiva de ASC en relación a NIC, RBB y RH y no así con la PS (Tablas 8, 9, 10, 11).

**Tabla 8.** *Inmunofluorescencia para ASC en relación al Nivel de inserción clínico*

ASC	Nivel de inserción bajo	Nivel de inserción elevado
Inmunofluorescencia positiva	2	9
Inmunofluorescencia negativa	3	0

Prueba exacta de Fisher p 0,0275

**Tabla 9.** *Inmunofluorescencia para ASC en relación al porcentaje del registro de biofilm bacteriano*

ASC	Registro biofilm bacteriano bajo	Registro biofilm bacteriano elevado
Inmunofluorescencia positiva	1	10
Inmunofluorescencia negativa	3	0

Prueba exacta de Fisher p 0,0110

**Tabla 10.** *Inmunofluorescencia para ASC en relación al porcentaje del registro de hemorragia*

ASC	Registro hemorragia leve	Registro de hemorragia moderado-grave
Inmunofluorescencia positiva	1	10
Inmunofluorescencia negativa	3	0

Prueba exacta de Fisher p 0,0110

**Tabla 11.** Relación entre ASC, NLRP3 y Pancitoqueratina y su relación con los parámetros clínicos.

Características clínicas	ASC	NLRP3	Pancitoqueratina
PS (mm sitio)	p 0,1923	p >0,9999	p 0,1818
NIC (mm sitio)	p 0,0275*	p 0,4286	p 0,0909
RBB (%)	p 0,0110*	p 0,1071	p 0,0545
RH (%)	p 0,0110*	p 0,1071	p 0,1091

Análisis de Prueba exacta de Fisher \*  $p \leq 0.05$

**PS:** Profundidad de sondaje. **NIC:** Nivel de inserción clínica. **RBB:** Registro de biofilm bacteriano. **RH:** Registro de hemorragia al sondaje.

## DISCUSIÓN

“La ciencia son hechos; de la misma manera que las casas están hechas de piedras, la ciencia está hecha de hechos; pero un montón de piedras no es una casa y una colección de hechos no es necesariamente ciencia.”

Henri Poincaré

La enfermedad periodontal es una patología multifactorial en la que el biofilm bacteriano es el factor iniciador. Sin embargo, la manifestación y la progresión está determinada por la naturaleza de la respuesta inmune en relación con el biofilm bacteriano. Esta respuesta se encuentra influenciada por una amplia variedad de determinantes, como la susceptibilidad del huésped y factores de riesgo (51).

El avance de la enfermedad periodontal se correlaciona con modulaciones de la inmunidad innata, en particular, con niveles elevados y / o producción desequilibrada de citoquinas proinflamatorias, que pueden conducir a un daño tisular severo. Los complejos inflamasomas están emergiendo como reguladores principales del sistema de defensa inmune innato del hospedador en enfermedades inflamatorias crónicas, y su papel contra patógenos microbianos se está volviendo de crucial importancia para controlar y limitar los microorganismos invasores (38) Estos sistemas parecen asumir un rol fundamental en la progresión de la periodontitis (25) (36) (37) (40).

Diversos autores han planteado la posibilidad de que la activación del complejo inflamasoma NLRP3 favorezca la evolución de la enfermedad periodontal. No obstante, los resultados obtenidos en estas investigaciones, realizados en su gran mayoría sobre modelos animales, fueron poco concluyentes. En este estudio transversal se tuvo como objetivo investigar la activación del complejo inflamasoma NLRP3 y respuesta inflamatoria en

biopsias de tejido gingival y correlacionar su activación con los criterios diagnósticos clínicos de la nueva clasificación de las enfermedades y alteraciones periodontales (48).

Estudios clínicos limitados han explorado la presencia de NLRP3 en relación con la enfermedad periodontal (23) (52) (40) (53). Si bien en el presente trabajo no estudiamos la producción de IL1 $\beta$  e IL18, ambos productos de la activación del inflamasoma NLRP3, la detección de éstas y el complejo inflamasoma NLRP3 ha sido revelado en un estudio clínico en muestras de tejido gingival de pacientes con tres formas de enfermedad periodontal (gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva generalizada) en comparación con sujetos sanos cuyos análisis también demostraron un aumento significativo en la expresión del ARNm de NLRP3 en la periodontitis crónica y una expresión aún mayor, pero no estadísticamente significativa, en la anteriormente denominada periodontitis agresiva en comparación con muestras gingivales sanas (52). Resultados similares han sido obtenidos por Xue *et al.* en el año 2015, quienes evidenciaron por inmunohistoquímica que el nivel general de expresión de NLRP3 fue significativamente mayor en muestras de tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica y agresiva en la capa del epitelio, aunque se observaron diferentes patrones de distribución (23).

Además, diversas investigaciones exploraron las relaciones de esos biomarcadores con la composición del microbioma subgingival. Un estudio

informó que el aumento de los niveles de expresión de IL1 $\beta$  e IL18 observados en sitios clínicamente sanos de pacientes con periodontitis sugiere que las respuestas inflamatorias posiblemente ocurren temprano, antes de que puedan verse clínicamente, y quizás sean causadas por la mayor colonización de las especies bacterianas del complejo rojo (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*) y naranja (*Fusobacterium nucleatum*) que por predisposición genética (53).

Evidencia reciente, demostró que, en un examen de boca completa junto con mediciones basadas en ELISA de muestras representativas de saliva de individuos con diferentes afecciones periodontales, si bien no se observó una variación significativa en los niveles salivales de caspasa-1 que pudiera ser de valor predictivo con respecto a estado de salud/ enfermedad, si existieron aumentos significativos en los niveles de NLRP3, ASC e IL1 $\beta$  en los grupos de periodontitis en comparación con los controles sanos, lo que sugiere que la vía de señalización del inflamasoma NLRP3 puede constituir un mecanismo fundamental para la patogénesis periodontal (40).

Los datos obtenidos en el presente estudio, aunque limitados, incrementan la evidencia del mecanismo de activación de la inmunidad innata a través de los componentes del inflamasoma NLRP3 en muestras de tejidos en presencia de inflamación periodontal.

Este estudio arroja resultados que subrayan las conclusiones obtenidas en gran parte de los trabajos previos de este campo, ya que se observaron cambios en la expresión de NLRP3 y ASC en el epitelio con la técnica de inmunofluorescencia en relación al estado de salud/enfermedad periodontal. Nuestros hallazgos son consistentes con los autores anteriormente mencionados, quienes demostraron que la expresión incrementada de los complejos de inflamomas puede ser un indicador de la presencia de enfermedad periodontal. Sin embargo, no mostraron diferencias en los niveles de expresión entre las diferentes alteraciones periodontales, lo que sugiere que esos complejos pueden no usarse para determinar la gravedad de la patología (52) (23) (40).

Otro hallazgo importante fue la expresión más pronunciada de NLRP3 y ASC en la capa epitelial, lo que indica que el epitelio usa el complejo inflamoma NLRP3 de la inmunidad innata del hospedador como mecanismo de resistencia a la invasión bacteriana en los tejidos. Parece que incluso cuando la inflamación sólo está presente en los tejidos gingivales y aún no implica la reabsorción ósea, los niveles de NLRP3 ya están aumentados (expresión aumentada 7.7 veces en muestras gingivales de gingivitis en comparación con controles sanos) (52). De esta manera, se considera que las células epiteliales gingivales regulan la homeostasis de los tejidos periodontales en la salud y la enfermedad (54). En este contexto, las citoqueratinas, proteínas principales del citoesqueleto epitelial que pertenecen al grupo de filamentos intermedios, son consideradas como

marcadores sensibles y específicos de diferenciación de las células epiteliales con una distribución característica que varía según el tipo de epitelio, el sitio y el grado de diferenciación (13). En este estudio se observó una mayor expresión de citoqueratinas en el epitelio gingival de la vertiente externa de casos que presentaban patología periodontal en comparación al grupo control de salud periodontal lo que podría ser un marcador de la elevada diferenciación de las células epiteliales para afrontar el desafío bacteriano presente en la periodontitis.

Actualmente hay suficiente evidencia científica que sugiere que la periodontitis se caracteriza por cambios histológicos específicos. Estos cambios incluyen, aumento significativo en el número de células inflamatorias en el tejido conectivo supracrestal, y cambios significativos en la distribución de frecuencias de las distintas poblaciones de células inflamatorias. En este trabajo pudimos observar que el epitelio oral presentaba diferencias a simple vista entre las muestras correspondientes al grupo control respecto del grupo de estudio, lo que podría indicar un fenómeno de defensa local frente a diferentes noxas agresivas. Mientras que las observaciones más importantes que encontramos a nivel del tejido conectivo, coincidiendo con el estudio de Zappa (55), fue un mayor infiltrado inflamatorio (principalmente a predominio linfo-plasmocitario) en cortes de tejido gingival con patología periodontal respecto de los sanos.

Otro de los objetivos de este estudio fue investigar la asociación de los parámetros clínicos como NIC, PS, RH y RBB con la activación del complejo inflamasoma NLRP3. Los resultados de este trabajo demostraron una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones/expresión de ASC en cortes de tejido gingival con respecto a los parámetros clínicos RH, RBB y NIC, al igual que los resultados publicados por Isaza et al. (44) en muestras obtenidas de saliva total. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron NLRP3 y Pancitoqueratina. Existen varias explicaciones posibles para estos resultados, una de ellas probablemente se deba al número reducido de muestras, de manera tal que resulta necesario ampliar el tamaño muestral para obtener mayor precisión y poder estadístico. Por otro lado, debe señalarse que el margen gingival como criterio principal para establecer la gravedad de la periodontitis, no es un punto de referencia fijo desde el que se puede medir para valorar los cambios longitudinales de la inserción clínica. Sin embargo, la profundidad del sondaje es de gran importancia en la valoración de la localización y el tamaño del principal hábitat (bolsas periodontales) de las bacterias subgingivales. Durante los períodos de progresión de la enfermedad, la liberación de mediadores inflamatorios aumenta en todas las zonas de la boca del paciente, tanto estables como progresivas. Además, las zonas clínicamente sanas en pacientes con enfermedad progresiva son, probablemente, diferentes de las zonas sanas de pacientes sanos, que albergan diferente biofilm bacteriano (56) y exhiben una respuesta del

hospedador distinta (57). Aunque la enfermedad progresa de forma diferente en cada zona a causa de sus características específicas (57), la respuesta del hospedador es más global y sigue el mismo patrón en todas las zonas del interior de la boca de cada individuo. Esto fue confirmado por Figueredo *et al.* (58), quienes constataron que los niveles de IL1 en el fluido gingival aumentaban en las muestras de pacientes con periodontitis, independientemente de la gravedad de la enfermedad en la zona de muestreo.

Aunque en una periodontitis de mayor severidad los parámetros clínicos de profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica son mayores en asociación a una mayor historia de pérdida de hueso alveolar acumulada, no necesariamente significa que un individuo con periodontitis severa esté sufriendo un mayor proceso de activa destrucción ósea en comparación a uno con severidad de enfermedad menor en un momento determinado. Estas observaciones proporcionan un fuerte argumento para el uso combinado de registros clínicos como profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica, entre otros; para la determinación del riesgo periodontal en relación a la influencia de las citoquinas en este proceso. El resultado más sorprendente que se puede observar a la luz de los resultados de este estudio es cuando se analizó la activación del complejo inflamasoma NLRP3 con el riesgo periodontal y se demostró que la expresión de NLRP3 y ASC puede asociarse con un riesgo elevado de progresión de la patología periodontal de una manera más certera que la pérdida de inserción clínica;

conocimiento que nos aproxima cada vez más a comprender con mayor detalle la etiopatogenia de la enfermedad periodontal.

El presente estudio demostró que el aumento de expresión de NLRP3, ASC y pancitoqueratinas en los tejidos gingivales se correlaciona positivamente con el estado periodontal, lo que sugiere la participación de este inflammasoma en células epiteliales de la mucosa bucal en la patogenia de enfermedad periodontal. En consecuencia, con base en los resultados presentados, sería posible asumir que la activación del complejo inflammasoma NLRP3 puede desencadenar una potente respuesta inmune amplificando el proceso inflamatorio que posteriormente interviene en la destrucción de tejidos y resorción ósea observada en la periodontitis.

## CONCLUSIONES

“Duda siempre de ti mismo, hasta que  
los datos no dejen lugar a dudas.”

Louis Pasteur

El estudio de la activación del complejo inflammasoma NLRP3 a través del análisis de la proteína ASC, NLRP3 y pancitoqueratina en el tejido gingival de lesiones de pacientes con enfermedad periodontal, mediante la técnica de inmunofluorescencia, sugieren su participación en la periodontitis. Por tanto, esta vía de señalización de citoquinas puede ser crucial en el control regulador de las respuestas inflamatorias de las patologías periodontales.

- Los hallazgos histopatológicos observados en secciones de tejido gingival coloreados con hematoxilina y eosina procedentes de sitios con/sin patología periodontal se correlacionaron con el diagnóstico clínico periodontal.

- Al analizar la activación del complejo inflammasoma NLRP3 con el riesgo periodontal se observó una asociación entre las características clínicas que determinan el riesgo de progresión periodontal y la expresión de NLRP3 y ASC. Dado que la respuesta del hospedador es un factor clave en la patogenia de la enfermedad periodontal, la medición de los niveles de mediadores de la inflamación, como el sistema inflammasoma NLRP3, podría ser útil para evaluar el «riesgo»: que un diente o una zona, pierda la inserción clínica y el hueso alveolar o el riesgo de que un individuo desarrolle la enfermedad periodontal.

- Los resultados observados en la expresión de NLRP3, ASC y Pancitoqueratina en relación a las características clínicas (PS, NIC, RH y RBB) demostraron una asociación de inmunomarcación positiva de ASC en relación a NIC, RBB y RH y no así con la PS.

- Estos hallazgos sientan las bases de uno de los mecanismos inmunes poco estudiados involucrados en la patogénesis de esta enfermedad bucal. Sin embargo, el tamaño de la muestra deberá ser incrementado para lograr mayor precisión y poder estadístico en estas afirmaciones.

- El estudio de la línea de trabajo de citoquinas y enfermedad periodontal es un aspecto importante para futuras investigaciones porque podría conducir o se espera que conduzca al diseño de nuevas metodologías, utilización de fármacos y/o estrategias tendientes a modular la respuesta inmune a fin de controlar la infección periodontal y minimizar las secuelas locales y consecuencias sistémicas de ésta.

## BIBLIOGRAFÍA

“El científico no tiene por objeto un resultado inmediato.  
Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas.  
Su deber es sentar las bases para aquellos que  
están por venir, y señalar el camino”.

Nikola Tesla

1. Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*. 2003 Feb;31(1):55–76.
2. Guggenheim B, Gmür R, Galicia JC, Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Meier A, et al. In vitro modeling of host-parasite interactions: the “subgingival” biofilm challenge of primary human epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2009;9(1):280.
3. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Dec 9;16(12):745–59.
4. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar;44:S5–11.
5. Kirst ME, Li EC, Alfant B, Chi Y-Y, Walker C, Magnusson I, et al. Dysbiosis and Alterations in Predicted Functions of the Subgingival Microbiome in Chronic Periodontitis. Drake HL, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Jan 15;81(2):783–93.
6. Van Dyke TE, Bartold PM, Reynolds EC. The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. *Front Immunol*. 2020 Mar 31;11(March):1–9.
7. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005 Jun;38(1):72–122.
8. Huang N, Gibson FC. Immuno-Pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. *Curr Oral Heal Reports*. 2014 Jun 22;1(2):124–32.
9. Yost S, Duran-Pinedo AE, Teles R, Krishnan K, Frias-Lopez J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med*. 2015 Dec 27;7(1):27.
10. Carolina N, Offenbacher S, Carolina N, Hill C. Periodontal Diseases : Pathogenesis. *Ann Periodontol* . 1996;1(1):821–78.
11. Groeger SE, Meyle J. Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol 2000*. 2015 Oct;69(1):46–67.

12. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13(1):91–120.
13. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008 Jun 7;129(6):705–33.
14. Dale BA, Salonen J, Jones AH. New Approaches And Concepts in The Study of Differentiation of Oral Epithelia. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1990 Jul;1(3):167–90.
15. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017 Oct;75(1):116–51.
16. Van Dyke TE, Sima C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: Is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? *Periodontol 2000*. 2020 Feb 18;82(1):205–13.
17. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004 Jun;35(1):21–41.
18. Calvo MS. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev*. 1996 Aug 1;17(4):333–68.
19. Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2008 Dec 16;19(12):1683–704.
20. Gursoy UK, Könönen E, Huumonen S, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen AL, et al. Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2013 Jan;40(1):18–25.
21. Zhang S, Yu N, Arce RM. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. *Periodontol 2000* [Internet]. 2020 Feb 18;82(1):129–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/prd.12267>
22. Groeger S, Meyle J. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2019 Feb 14;10(FEB):1–22.
23. Xue F, Shu R, Xie Y. The expression of NLRP3, NLRP1 and AIM2 in the gingival tissue of periodontitis patients: RT-PCR study and immunohistochemistry. *Arch Oral Biol*. 2015 Jun;60(6):948–58.
24. Seong S-Y, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jun;4(6):469–78.

25. Marchesan JT, Girnary MS, Moss K, Monaghan ET, Egnatz GJ, Jiao Y, et al. Role of inflammasomes in the pathogenesis of periodontal disease and therapeutics. *Periodontol 2000*. 2020;82(1):93–114.
26. Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J Cell Sci*. 2017;130(23):3955–63.
27. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012;481(7381):278–86.
28. Lechtenberg BC, Mace PD, Riedl SJ. Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling. *Curr Opin Struct Biol*. 2014 Dec;29:17–25.
29. Afonina IS, Zhong Z, Karin M, Beyaert R. Limiting inflammation—the negative regulation of NF- $\kappa$ B and the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2017 Aug 19;18(8):861–9.
30. Place DE, Kanneganti T-D. Recent advances in inflammasome biology. *Curr Opin Immunol*. 2018 Feb;50:32–8.
31. Shao B-Z, Xu Z-Q, Han B-Z, Su D-F, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol*. 2015 Nov 5;6(NOV):1–9.
32. Aral K, Milward MR, Kapila Y, Berdeli A, Cooper PR. Inflammasomes and their regulation in periodontal disease: A review. *J Periodontal Res*. 2020 Jan 20;(December 2019):jre.12733.
33. Paroli AF, Gonzalez P V., Díaz-Luján C, Onofrio LI, Arocena A, Cano RC, et al. NLRP3 inflammasome and caspase-1/11 pathway orchestrate different outcomes in the host protection against *Trypanosoma cruzi* acute infection. *Front Immunol*. 2018;9(MAY):1–12.
34. Lu WL, Song DZ, Yue JL, Wang TT, Zhou XD, Zhang P, et al. NLRP3 inflammasome may regulate inflammatory response of human periodontal ligament fibroblasts in an apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC)-dependent manner. *Int Endod J*. 2017 Oct;50(10):967–75.
35. Shibata K. Historical aspects of studies on roles of the inflammasome in the pathogenesis of periodontal diseases. *Mol Oral Microbiol*. 2018 Jun;33(3):203–11.
36. Rocha FRG, Delitto AE, de Souza JAC, González-Maldonado LA, Wallet SM, Rossa Junior C. Relevance of Caspase-1 and Nlrp3 Inflammasome on Inflammatory Bone Resorption in A Murine Model of Periodontitis. *Sci Rep*. 2020 Dec 8;10(1):7823.
37. Yamaguchi Y, Kurita-Ochiai T, Kobayashi R, Suzuki T, Ando T. Regulation of the NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis*-

- accelerated periodontal disease. *Inflamm Res*. 2017;66(1):59–65.
38. Yilmaz Ö, Lee K. The Inflammasome and Danger Molecule Signaling: At the Crossroads of Inflammation and Pathogen Persistence in the Oral Cavity. *Periodontol 2000*. 2015;Oct 69(1):83–95.
  39. Bostanci N, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Curtis MA, et al. Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(3):415–22.
  40. Isaza-Guzmán DM, Medina-Piedrahíta VM, Gutiérrez-Henao C, Tobón-Arroyave SI. Salivary Levels of NLRP3 Inflammasome-Related Proteins as Potential Biomarkers of Periodontal Clinical Status. *J Periodontol*. 2017 Dec;88(12):1329–38.
  41. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45(October 2017):S44–67.
  42. 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 Jul;13(6):590–6.
  43. Joss A, Adler R, Lang NP. Bleeding on probing. A parameter for monitoring periodontal conditions in clinical practice. *J Clin Periodontol* [Internet]. 1994 Jul;21(6):402–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-051X.1994.tb00737.x>
  44. Lang NP, Joss A, Tonetti MS. Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol 2000*. 1996 Oct;12(1):44–8.
  45. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45(March):S68–77.
  46. Clatfey N, Nylund K, Kiger R, Garrett S, Egelberg J. Diagnostic predictability of scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth for probing attachment loss. *J Clin Pharm Ther*. 1992 Apr;17(2):108–14.
  47. Claffey N, Egelberg J. Clinical indicators of probing attachment loss following initial periodontal treatment in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1995;22(9):690–6.
  48. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman

- KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45(March):S1–8.
49. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45(December 2017):S162–70.
  50. Lang NP, Tonetti MS. Periodontal risk assessment for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral Heal Prev Dent*. 2003;1:7–16.
  51. Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016 Jun;71(1):22–51.
  52. Bostanci N, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Curtis MA, et al. Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. *Clin Exp Immunol*. 2009 Sep;157(3):415–22.
  53. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol*. 2010 Jan;81(1):89–98.
  54. Guo W, Ye P, Yu H, Liu Z, Yang P, Hunter N. CD24 activates the NLRP3 inflammasome through c-Src kinase activity in a model of the lining epithelium of inflamed periodontal tissues. *Immunity, Inflamm Dis*. 2014 Dec;2(4):239–53.
  55. Zappa U, Reinking-Zappa M, Graf H, Espeland M. Cell populations and episodic periodontal attachment loss in humans. *J Clin Periodontol*. 1991;18(7):508–15.
  56. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000 Sep;27(9):648–57.
  57. Tanner A, Kent R, Maiden MFJ, Taubman MA. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Periodontal Res*. 1996 Apr;31(3):195–204.
  58. Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fischer RG, Gustafsson A. Increased Interleukin-1 $\beta$  Concentration in Gingival Crevicular Fluid as a Characteristic of Periodontitis. *J Periodontol*. 1999 Dec;70(12):1457–63.

## ANEXO

### CERTIFICADO DE COMITÉ DE BIOÉTICA

Formulario, apartado no 22020C, ENMIENDAS, V. 1, 2014

Ministerio de  
SALUD



GOBIERNO DE LA  
PROVINCIA DE  
CÓRDOBA

**REGISTRO PROVINCIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
(RePIS)**

**INVESTIGACIONES NO PATROCINADAS POR LA  
INDUSTRIA FARMACEUTICA: ENMIENDAS**

N° DE RePIS  
INVESTIGACIÓN  
ORIGINAL

**36**

N° DE  
INSCRIPCIÓN  
DE LA ENMIENDA

#### I. INVESTIGACIÓN

Título de la investigación y versión: Evaluación de Infeccitos B productores de IL-17 y su relación con enfermedad periodontal" Versión 1, Junio 2017  
Respuesta inmuno-inflamatoria en la patogenia de la enfermedad periodontal". Versión 2, Marzo 2018

#### II. INVESTIGADOR

Nombre Investigador Principal: Verde, María Eugenia

467

#### III. CIEIS - COMITÉ CAPACITACIÓN Y DOCENCIA - COMITÉ ACADÉMICO DONDE SE PRESENTO EL ESTUDIO

Nombre: Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud - Facultad de Odontología UNC

#### IV. ENMIENDA AL PROTOCOLO

Versión de Enmienda: Versión 2, Marzo 2018

Fecha de la Enmienda: 20/03/2018

Tipo de Enmienda:  Administrativa  Seguridad  Tamaño muestra  Diseño del ensayo  Otra

Alcance de la Enmienda:  Al centro  A centros de Argentina  Internacional

Resultado Evaluación CIEIS:  Aprobada  Aprobada con recomendación  Rechazada

#### V. ENMIENDA AL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Versión de Enmienda: Versión 2, Marzo 2018

Fecha de la Enmienda: 20/03/2018

Tipo de Enmienda:  Administrativa  Seguridad  Tamaño muestra  Diseño del ensayo  Otra

Alcance de la Enmienda:  Al centro  A centros de Argentina  Internacional

Resultado Evaluación CIEIS:  Aprobada  Aprobada con recomendación  Rechazada

La información de este formulario tiene carácter de declaración jurada por lo que no se aceptarán inscripciones manuales ni enmiendas.

Fecha: 22/03/18

22/03/18  
Fecha

MARIA EUGENIA VERDE  
ODONTOLOGA  
C.I.E.I.S.

#### VI. PÓLIZA DE SEGURO

No aplica

Compañía Aseguradora: San Cristobal - Seguros Generales

Fecha de vencimiento (deber tener vigencia mayor a 15 días al momento de presentar este formulario): 03/10/2018

Prof. Dra. Alicia del V. Simbion  
Fecha Autoridad Responsable: 20/03/18  
Coordinadora C.I.E.I.S.  
C.I.E.I.S. - C.C.D. - Comité académico Facultad de Odontología UNC