

01421
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**FLUIDO CREVICULAR COMO MEDIO DE
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL**

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

ERIC AGUILAR UGARTE GARCIA

DIRECTOR: C.D. FERNANDO BETANZOS SÁNCHEZ

11050

MÉXICO D. F.

NOVIEMBRE 2003

A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA:

A mi mamá y a mi papá, que aunque ya no estés físicamente, sé que siempre me apoyaste y que te hubiera gustado recibir este trabajo, a mi hermano Jorge por haberme apoyado incondicionalmente y sobre todo por enseñarme que no solo se nace y se vive sino solo lo haces una vez...

AGRADECIMIENTOS:

Mi mayor agradecimiento a Rocío J.M, por el apoyo incondicional y los sacrificios que vivimos para la realización de este trabajo y por alentarme ser mejor cada día...

A mis primos Héctor, Edgar, Christian y a todos ellos. Y a mis amigos especiales como a Verónica J.M., A Fernando V.Z. A Daniel J.M. y a todos los que han estado conmigo....

A la UNAM que me permitió crecer en sus aulas y por permitirme conocer a gente importante en mi vida...

A todos los que siempre me dieron ánimos para salir adelante en mis proyectos y quienes directamente me brindaron su apoyo, muy especialmente a la Fam. García Montes de Oca, por tener el gusto de formar parte de ella y a la gran Fam. Jara Medina por ese amor único que siempre me han dado...

A mi director de tesina CD. Fernando Betanzos Sánchez, a la Mtra. Amalia Cruz Chávez, CD. Arturo Flores y a todos aquellos que amorosamente me han dado libertad y apoyo para desarrollarme en esta profesión, y por haberme permitido realizar una de mis metas más importantes en la vida...

MIL GRACIAS

B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Introducción.

Los estudios sobre el fluido crevicular(GCF) abarcan un periodo de casi 50 años. Las primeras investigaciones de Waerhaug en los inicios de los 50s` ,fueron enfocados a la anatomía del surco y a su transformación a bolsa gingival durante el curso de una periodontitis. A finales de los 50s` e inicio de los 60s` una serie de estudios encabezados por Brill , fueron enfocados a la fisiología, formación y composición del GCF. Los estudios de Løe et al contribuyeron a este conocimiento y fundamentaron la investigación del uso del GCF como un indicador para la enfermedad periodontal. Egelberg continuo el análisis del GFC enfocando sus estudios a los vasos sanguíneos dentogingivales y su permeabilidad, así como su relación con el flujo del GCF

La presencia y función de las proteínas, especialmente las enzimas en el GCF fueron primeramente investigadas por Sueda, Bang y Cianasoni. Y fue observado que las enzimas están relacionadas con el tejido periodontal dañado y poseen un enorme potencial para el diagnóstico de la enfermedad periodontal.

La revisión de Griffiths, examina la hipótesis de Alfano, sobre la presencia de GCF en la salud, que representa un trasudado del fluido intersticial presente en el tejido gingival, pero en el desarrollo de una gingivitis o una periodontitis se transforma en un verdadero exudado inflamatorio. El porcentaje de fluido puede incrementarse cerca de 30 puntos durante la periodontitis, comparándolo con un surco sano, sin embargo el volumen se incrementa algunas veces con la formación de bolsas gingivales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En este trabajo, se mencionan los más recientes estudios de las enzimas derivadas de las células que pertenecen al proceso de la enfermedad periodontal, se enfoca a las metaloproteinasas de la matriz, porque ellas forman un grupo importante de proteinasas que se han implicado en los procesos de enfermedad destructivos, incluyendo a las enfermedades periodontales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Introducción

CAPITULO I..... Origen

1.1 Origen y función de los componentes celulares del fluido crevicular.....	5
1.2 Composición del fluido crevicular.....	7

CAPITULO II Las proteinasas

2.1 Las proteinasas del epitelio.....	8
2.4 Los neutrófilos como enzimas del fluido.....	11
2.5 Las proteinasas del neutrófilo.....	13
2.6 La elastasa, la catepsina-G y la proteinasa-3 del neutrófilo.....	14

CAPITULO III.....Las metaloproteiniasas.

3.1 La matriz metaloproteinasa de los neutrófilos.....	18
3.2 El activador plasminógeno del neutrófilo.....	19
3.3 La aminotransferasa espartato.....	21
3.4 Métodos de recolección y medida, el lavado gingival.....	22
3.5 Métodos para estimar el volumen recolectado.....	24
3.6 Los problemas de la recolección.....	27

CAPITULO IV.....Las relaciones del fluido.

4.1 El fluido crevicular y placa dentobacteriana.....	29
4.2 Relación del fluido con el proceso salud-enfermedad.....	30
4.3 Potencial del fluido crevicular como parámetro predictor de riesgo de la enfermedad periodontal.....	33
4.4. Uso de los mediadores inflamatorios en el fluido crevicular, como un indicador de riesgo para la enfermedad periodontal.....	34
4.4 Niveles en el fluido crevicular de los mediadores inflamatorios en salud, gingivitis y otras formas severas de periodontitis.....	36

- Conclusiones.

- Referencias

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 1

-ORIGEN

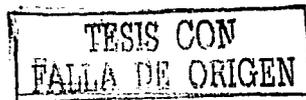
-COMPOSICION

Origen del fluido crevicular

En 1952, Jens Waerhaug administró tinta de la india en el surco gingival sano de un perro. Después de 1hr, observó que presentaba transudación el fluido, junto con un aumento y migración de leucocitos, dentro de las próximas 48 hrs. el fluido, había eliminado a la mayoría de las partículas de tinta del surco gingival. El mismo año, Waerhaug & Steen introdujo cultivos de bacterias patológicas dentro del surco libre de gérmenes patógenos. Después de una necrosis epitelial inicial, la inflamación clínica siguió con la formación de un exudado inflamatorio. Sin embargo, El surco saludable se restableció hasta después de 48 hrs.

De los resultados de estos experimentos se sugirió que había un 'lavado' originado por el fluido del surco gingival y que este podía ayudar al retiro de bacterias y partículas patógenas del surco. Esta propuesta mantuvo el fundamento del descubrimiento y caracterización de fluido del surco gingival (GCF) en los 1950s y 1960s.

Brill & Krasse, trabajó con perros experimentales, a los que les fueros inyectados agentes fluorescentes intravenosamente en las piernas posteriores de los animales, descubriendo que penetraron en el epitelio del surco gingival. Los agentes fluorescentes, también podían colectarse en tiras de papel filtro introducidas dentro del surco, En cerca del 90% de los animales, se registraron niveles en 1 a 1.5 minutos después de la administración. Sin embargo, ninguna tinta se descubrió en otras zonas de la boca, como los dientes, lengua, paladar, y la mucosa oral, e incluso en sitios de mucosas extra-orales. (1)

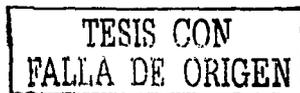


Estos resultados sugirieron que el epitelio de la línea del surco gingival es permeable a los compuestos de poco peso molecular, y que el paso del fluido por el tejido en el surco actúa como un mecanismo de la defensa. En los años subsecuentes se investigó la naturaleza del fluido y fue descubierto que puede aislarse de surcos gingivales sanos.

Hoy, se establece bien que este fluido proviene del plexo gingival de los vasos sanguíneos gingivales, subyacentes al espacio del epitelio de la línea dentogingival. Por consiguiente, la composición del fluido fue obtenida por medio de las investigaciones, y pronto se nombró a los componentes individuales del fluido. Se describe como una mezcla de moléculas que provienen de la sangre, los tejidos del huésped y de la placa subgingival, que incluyen: a los electrólitos, pequeñas moléculas orgánicas, proteínas, citocinas, anticuerpos específicos, antígenos bacterianos, y enzimas tanto del huésped como de origen bacteriano

Las observaciones del fluido, también indican que contiene una población diversa de células, que incluyen a las bacterias de la placa, células epiteliales descamadas que se lavan pasivamente fuera del surco, en la cavidad oral por el flujo exterior del fluido crevicular y transmigrando por los leucocitos, [incluso por las células polimorfonucleares (PMNs), monocitos, macrófagos, y linfocitos]. La presencia de eritrocitos o células rojas en el fluido crevicular debe ser considerada como un hallazgo auxiliar, indicando una posible lesión micro vascular, que es característica de la inflamación.

En las reacciones inflamatorias, hay dos tipos de componentes: 1) la respuesta del fluido, que deriva de la formación del exudado inflamatorio de los tejidos. 2) la respuesta celular, en la cual, las células inflamatorias emigran en los tejidos.



Capítulo 2

Las proteinasas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las Proteinases del Epitelio

Las células epiteliales han sido consideradas como células relativamente pasivas, cuya única función es proteger el cuerpo, emigrando al tejido o zona atacada, cubriendo al tejido expuesto durante el proceso de cicatrización. Está claro ahora, que las células epiteliales, pueden responder a los factores exógenos y por consiguiente pueden mostrar fenotipos diferentes. Las células epiteliales producen una variedad de moléculas bioactivas, que contienen autocrina y paracrina, que son reguladas en las diferentes situaciones fisiológicas y patológicas.(3)

Cuando se activan las células epiteliales estas pueden comportarse de manera muy agresiva, emigrando, proliferando, y produciendo varias citosinas y demás enzimas proteolíticas. Por consiguiente estas juegan un papel activo en la inflamación y en la defensa contra los microbios.

Las células de epiteliales, pueden producir colagenazas después de una exposición a ciertos estímulos. En un estudio que imita la proliferación de las células epiteliales del tejido conectivo, se demostró, que estas degradan a la matriz de colágena.

Está claro que hay otras metaloproteinases de la matriz, que también juegan un papel importante dentro del proceso fisio-patológico del epitelio en la periodontitis.

Gelatinasa (MMP-2) se ha encontrado en el epitelio de la bolsa inflamada y en el epitelio del surco durante la migración celular.

Gelatinasa B (MMP-9) es una de las MMPs más abundantes expresada por las células del epitelio, esta enzima puede degradar rápidamente al colágeno tipo IV y su producción es estimulada por las células epiteliales y por la citosina, sobre todo el TNF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y por algunos productos bacterianos como el lipopolisacárido- C y de la fosfolipasa.

La matrilisina (MMP-7) es otra MMP epitelial, que tiene un amplio espectro de sustratos. esta puede degradar a la fibronectina, a la laminina, elastina, entactina, tenascina, proteoglicanos y al colágeno tipo IV. Esta enzima raramente se produce por células del tejido conectivos, pero se expresa constitutivamente en muchas células epiteliales adultas, siendo el más notable el epitelio glandular de piel, pulmones, órganos reproductores, y las glándulas salivales. La Matrilisina está envuelta en la mucosa de reparación del epitelio respiratorio, así como en la córnea, esta también media los procesos reguladores de algunas células.

El fluido crevicular contiene un repertorio grande de proteínas de suero, mediadores inflamatorios, productos celulares de degradación del huésped y metabolitos microbianos.

Se han descubierto en el fluido crevicular una gran variedad de enzimas que degradan a las proteínas, como son los proteoglicanos, los lípidos y los carbohidratos.(3)

Las enzimas, sobre todo las proteinasas, son la parte central en la salud del tejido periodontal así como también en su destrucción, originando a las enfermedades periodontales.(4)

La recolección y análisis de muestras de fluido crevicular proporcionan un análisis no invasivo, que evalúa el estado de la fisiopatología del periodonto de una manera muy clara y específica.

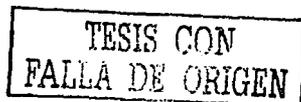
Los métodos actualmente usados para la cuantificación de enzimas son sensibles y, en algunos casos, son procedimientos relativamente sencillos.

Por consiguiente se han puesto buenas expectativas a las enzimas del fluido crevicular, en la búsqueda de nuevos indicadores que guiaran al médico, a un descubrimiento temprano de enfermedades periodontales así como para supervisar la salud del tejido a una siguiente terapia.(4)

Los neutrófilos, como enzimas del fluido.

Los neutrófilos forman la primera línea de defensa contra las infecciones microbianas, estos son llevados a los tejidos periodontales infectados por los factores quimiotácticos de las células del huésped, o por la degradación del mismo tejido.

Los neutrófilos por si mismos causan lesión a los tejidos y promueven su propia quimiotaxis, su acumulación se multiplica rápidamente en los sitios de inflamación. De hecho cerca del 90% de los leucocitos del fluido son neutrófilos. Su número es de 7,104 a 20,104 por el ml durante la conversión de un surco gingival sano a uno enfermo. Concurrentemente, el fluido crevicular aumenta, adyacente a la superficie de diente de 1 a 5 l/min. Por consiguiente en cualquier momento dado, hay 15 veces más neutrófilos que emigran hacia una bolsa periodontal, que los que hay en un periodonto saludable.(5)



Los neutrófilos contienen morfológicamente una membrana limitante intra citoplasmática que guarda vesículas dónde se encuentran las moléculas de defensa del huésped. Los gránulos de los neutrófilos se clasifican de la siguiente forma, los del grupo azurofílico o primario, seguido por los específicos o secundarios y por último las gelatinasas o grupo terciario.

Los gránulos del grupo azurofílico contienen enzimas neutras hidrolíticas, como la elastasa, el catepsin G, la uroquinasa, mieloperixidasa, lisosimas y manosidasa, así como a las hidrolasas activas al pH ácido, incluso la catepsin B, catepsin D y la glucoronidasa. Estos gránulos, también contienen cuatro tipos de defensas (HNP1 a HNP4), que son péptidos antimicrobianos de poco peso molecular que comprenden el 40% del volumen total de los gránulos azurofílicos, en el tipo específico o secundario, los gránulos contienen lactoferrina, colagenasa, y lisosima.

El principal componente de los gránulos de gelatinasa o grupo terciario, es el compuesto gelatinolítico MMP-9. Además de estos tipos de gránulos, existe un cuarto tipo de gránulos que son los llamados neutrófilos maduros.

Hay marcadas diferencias en la salida de los distintos gránulos en la estimulación del neutrófilo. El orden de salida después de ser estimuladas las vesículas secretorias, es dado por los gránulos de gelatinasa, seguido por los gránulos específicos y al último los gránulos azurofílicos.

La gran mayoría de los gránulos azurofílicos se dirigen hacia los fagolisosomas, que son los que se encargan de la degradación intracelular del material extraño durante el proceso de fagocitosis.(5)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Menos de un 10% de estos gránulos, han sido descubiertos por estudios in-vitro, mediante un estímulo fuerte así como también en la piel inflamada in-vivo. Una gran parte del contenido de estos gránulos azurofílicos, son excretados normalmente, por el neutrófilo, sin embargo, hay algunos componentes bacterianos, como el componente de la membrana exterior del *Treponema denticola*, que puede activar la salida de los gránulos azurofílicos del neutrófilo, sin que tengan un efecto bactericida en las células.

Las proteinasas del neutrófilo.

El papel de estas enzimas en el inicio y progreso de la enfermedad periodontal, es sumamente importante, ya que estos, juegan un papel protector. En las aberraciones de función de los neutrófilos, estos pueden llegar a ser destructivos y así progresar rápidamente a una franca enfermedad periodontal, porque las proteínas que contiene los neutrófilos como son, la lisosima, la mieloperoxidasa y la lactoferrina actúan sobre las bacterias, inhibiendo así su crecimiento.

El papel de las proteinasas, como son la colagenasa, la elastasa y la catepsina G, en la conducta protectora de los neutrófilos no es menos obvia. Sin embargo, la elastasa y la catepsina G tienen poco efecto microbicida sobre varias bacterias, incluyendo al *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y algunas especies de *Campylobacter*. Es interesante el efecto microbicida que parece estar relacionado con las propiedades proteolíticas y no proteolíticas de las enzimas.(5)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La importancia de las proteinasas, en la defensa antimicrobiana, es evidente desde el punto de vista de los estudios hechos en ratones con genes carentes de elastasa en los neutrófilos, y por lo tanto, dañan a la defensa del huésped contra el ataque de bacterias Gram-negativas

Una de las principales funciones de las proteinasas neutras del neutrófilo, es la de facilitar su movimiento así como el de las moléculas inflamatorias derivadas del suero creando un ambiente propicio para una defensa eficaz contra microbios reforzando así la quimiotaxis y la fagocitosis de las bacterias patógenas.

Además, de estas funciones, las proteinasas, tienen funciones específicas muy diferentes, que controlan a las reacciones inflamatorias, que son en parte dadas por el estímulo de las células inflamatorias, que producen una "bioactivación" de las proteínas y de los péptidos de las moléculas precursoras de citosinas.

La Elastasa, la Catepsina-G y la Proteinasa-3 del Neutrófilo.

Estas enzimas son proteinasas séricas que en su sitio catalizador contienen un residuo del aminoácido de la serina, que es esencial para la actividad de esta enzima. Estas proteinasas séricas, son activas en un pH neutro o en uno ligeramente alcalino. Estas se excretan por la salida de gránulos azurofilicos durante la fagocitosis del neutrófilo, y la lisis celular. Parte de estas proteinasas se adosan a la superficie de la membrana celular después del transporte de los gránulos.(5)

La estimulación de los lipopolisacáridos por sí mismos, son un factor de necrosis (TNF) al igual que la interleucina-8 (IL-8) que resulta de un aumento en los pliegues de la membrana limitante, así como un aumento de la catépsina G y la proteinasa-3. Estas enzimas se unen a la membrana celular por medio de interacciones iónicas. Por ejemplo la elastasa del leucocito de la membrana limitante, que tiene una fuerte actividad contra la fibronectina y contra el colágeno tipo IV (la membrana basal). Por consiguiente la elastasa puede ser una enzima importante que facilita la trasmigración del neutrófilo a través de los espacios subendoteliales y a través de las membranas subepiteliales. La elastasa secretada tiene un alto potencial para la degradación de la matriz extracelular. Otro ejemplo, es la catépsina-G que se encuentra en la membrana, y que puede convertir a la angiotensina inactiva, en angiotensina activa II, por lo tanto, la Catépsina-G puede regular la permeabilidad vascular y la quimiotaxis del monocito.

Otras proteínas, como la fibronectina, son degradadas rápidamente por la mayoría de estas proteinasas en los estudios in-vitro. Sin embargo, cada una de estas proteinasas de la serina tiene proteínas primarias, que al madurar adquieren un papel específico en la fisiología del tejido. Además de las moléculas degradantes que posee la matriz extracelular, las proteinasas de la serina, parecen tener funciones específicas, en la regulación de reacciones inflamatorias.(5)

La proteinasa-3 puede excretar y activar a las moléculas del precursor de IL-1 y al factor de necrosis de los macrófagos, originando una actividad similar a la metaloproteinasa desintegradora.

Los fragmentos de las proteínas de la matriz extracelular, originados por las proteinasas, también pueden dirigir las reacciones inflamatorias. Por ejemplo, se han encontrado fragmentos de proteínas generados por el surco gingival como son la fibronectina y laminina, que regulan la adherencia celular, la migración y la proliferación de los fibroblastos y células epiteliales, actuando como quimio-atrayentes para los leucocitos. Además, los fragmentos de fibronectina pueden inducir la secreción de metaloproteinasa de la matriz del fibroblasto.

Las proteinasas de la serina, tienen el potencial de circular por todo el tejido y de degradar una variedad de proteínas del tejido, por eso su actividad tiene que ser bien controlada. Los inhibidores específicos, como el llamado serpins, que restringen la actividad de la proteinasa en los tejidos. El más abundante de la familia del serpine, es el 1-proteinasa inhibidora, que la produce principalmente el hepatocito, pero también los neutrófilos. (6,7,8)

El factor inhibidor, tiene una fuerte actividad contra la elastasa y la proteinasa-3, además del serpins, la 2-macroglobulina, pueden inhibir a la serina y a las metaloproteinasa de la matriz. Se supone que bajo las condiciones fisiológicas normales, las proteinasas del neutrófilo sólo son eficaces en el medio pericelular, pero se cree que son las responsables de la proteólisis focal, que es mediada por las proteinasas de la membrana limitrofe.

La membrana a su vez es protegida del efecto de los inhibidores locales por tres factores. Primero, la obstrucción del estrato, que puede impedir el contacto de las enzimas para una posición adecuada.(8)

Segundo, la adhesión del neutrófilo a la matriz extracelular cubriendo el área de contacto para los inhibidores. Tercero, algunas proteinasas pueden degradar a los propios inhibidores. Por ejemplo la elastasa, que puede degradar a su propio inhibidor natural, que es la 1-proteinasa- inhibidora.

Bajo condiciones normales, hay un equilibrio entre las actividades de las enzimas proteolíticas y los inhibidores de estas enzimas. En sitios muy inflamados, se filtran los neutrófilos a los tejidos, así como otras células inflamatorias productoras de proteinasa, aunque los fibroblastos y células epiteliales, pueden secretar a las proteinasas neutras. Si los inhibidores de las enzimas están presentes en cantidades más pequeñas, que las enzimas activas, puede ocurrir una degradación extensa del tejido. Por consiguiente, se pueden usar a las enzimas proteolíticas como indicadores de la destrucción del tejido, pero es más exacto medir la cantidad de enzimas activas, en lugar de la cantidad de enzima totales.

Además de la matriz extracelular degradante y de las proteínas del plasma, como son la serina y las proteinasas, estas pueden actuar en las células para activar a los procesos destructivos.(8)

La elastasa y la catepsina-G, son enzimas capaces de activar a las células del epitelio para producir IL-8, IL-6 y prostaglandinas, con un consiguiente aumento de la quimiotaxis, y por lo tanto un aumento en la proliferación celular, así como en la degradación del tejido inflamado. El daño al tejido puede ser resultado de la degradación de célula-célula, y de las moléculas de adherencia de la propia célula así como la degradación del surco de proteínas de la superficie celular.

Capítulo 3

Las miceloproteínas

Los receptores proteasas activados comprenden a una familia de receptores de proteína-G, acoplados a la superficie celular que se activan durante la proteólisis. La proteólisis puede inducir a la separación celular, y puede aumentar la permeabilidad de epitelio.

La activación de las células del epitelio también produce citosinas en pro de la inflamación, como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral, que es el que ejerce los efectos destructivos en las células. Para engañar a los efectos potencialmente perjudiciales de las proteinasas de los neutrófilos, las células epiteliales producen sus propios inhibidores de proteinasas de la serina, como son el inhibidor de leucoproteasa. Estas proteínas de poco peso molecular se han descubierto en el pulmón y epitelio del intestino, pero también tienen otras funciones, como la antimicrobiana y antiinflamatoria.(8)

La matriz Metaloproteínasa de los Neutrófilos.

Las metaloproteinasas más abundantes de los neutrófilos son las MMP-8 (colagenasa-2) y la MMP-9 (gelatinasa B). La MMP-8 degrada fácilmente a los colágenos intersticiales, la MMP-9 es una enzima gelatinolítica, que degrada varias proteínas de la matriz extracelular, incluso a la colágena de la membrana basal (tipo IV) de la colágena.

Ambas enzimas pueden volver inactivo al inhibidor-1 de la proteínasa, que aumenta a su vez la actividad sérica-proteínasa en el tejido gingival.

Las MMP-8 y 9, son las principales enzimas colágeno-degradantes del fluido crevicular y de la saliva, además, se cree que estas son las principales

responsables de la degradación del colágeno en el tejido inflamado durante la gingivitis y periodontitis. por consiguiente es lógico considerar que estas enzimas son buenos indicadores en la inflamación periodontal.

La liberación de las metaloproteinasas de los neutrófilos ocurre durante el proceso de la fagocitosis o en la desintegración de los neutrófilos; En estudios in-vitro, se ha demostrado que hay una forma latente o precursora de metaloproteinasa-8 y esta, puede activarse por especies como el ácido hipocloroso y por algunas enzimas proteolíticas, como la catepsina-G y la metaloproteinasa-10. Las bacterias de la placa, estimulan la salida de la colagenasa del neutrófilo y activan a las enzimas que se encuentran latentes.(10)

El activador plasminogeno del neutrófilo

Los neutrófilos contienen un activador del plasminogeno de urokinasa (uPA) este activador del plasminogeno es regulador de varios eventos fisiológicos, como es la migración celular en la cicatrización de una herida, la remodelación del tejido, en la fibrinólisis y en la inflamación. Hay fuerte evidencia además, para un papel activo de del uPA en la invasión de células malignas. Los lazos del receptor específico del uPA en la membrana del neutrófilo facilitan la conversión de la enzima, en un uPA activo.

La activación es mediada por el plasminogeno, por el factor XII-a, y la catepsina-B. (10)

Los activadores de Plasminogeno convierten al plasminogeno (qué siempre está presente en los tejidos) en plasmina, que es una proteinasa de la serina, activa con una cierta especificidad.

La plasmina, degrada a la matriz extracelular, a las proteínas la fibronectina, la laminina-1 y a los proteoglicanos, y también activa al sistema de complemento. Además la plasmina puede convertir a las metaloproteinasas de la matriz latentes en activas. El uPA también puede activar a la gelatinasa. Así, en conjunto el factor plasmin-uPA y otras proteinasas de la serina y las metaloproteinasas pueden degradar todas las proteínas conocidas de matriz extracelular, facilitando así la migración del neutrófilo.

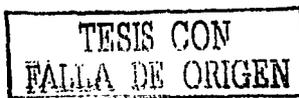
El uPA y la plasmina, tienen sus propios inhibidores específicos, como son el inhibidor-uPA y el inhibidor de la plasmina; El equilibrio de uPA y de la plasmina con sus inhibidores respectivos es importante para la homeostasis del tejido.(11)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La Aminotransferasa Aspartato.

Esta enzima (mitocondrial o citoplasmática) es producida o es derivada por el propio huésped, y ha sido profundamente estudiada. En los resultados de investigaciones, esta enzima a sido identificada en sitios donde está presente la inflamación gingival o donde hubo un antecedente reciente de enfermedad periodontal. Dado que esta enzima es un marcador no específico de las células necróticas que están presentes en el fluido crevicular en tejidos con problemas de gingivitis o periodontitis.

Investigaciones recientes han mostrado en estudios, que la actividad de la aminotransferasa aspartato está asociada con la presencia de microorganismos patógenos periodontalmente hablando como son porphyromonas gingivalis Actinobacilus Actinomycetemcomitans, y Prevotella Intermedia.(10)



Métodos de recolección y medición.

Han sido empleadas muchas técnicas para la medición del fluido, y la mejor técnica dependerá de los objetivos del estudio. Como cada técnica tiene ventajas y desventajas, las técnicas pueden ser divididas en tres principalmente.

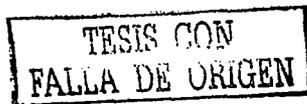
Método de lavado gingival.

En una técnica el fluido crevicular, es irrigado con una solución isotónica, como la solución de sal equilibrada, y una vez irrigado el fluido este representa una dilución del mismo y contiene células solubles como las proteínas del plasma.

En las otras dos técnicas y diferentes entre sí, la más simple consiste en la re-aspiración de 10 l de la solución salina tomada de la papila interdental. Este proceso se tiene que repetir 12 veces, para que se permita mezclar por completo la solución salina y el fluido crevicular, esta técnica puede aplicarse a unidades individuales o múltiples.

Un método más complicado es el que se basa en la construcción de un modelo con acrílicos personalizados que aíslan a los tejidos gingivales del resto de la boca. Los tejidos se irrigan durante 15 min. con la solución salina, usando una bomba peristáltica.

La técnica del lavado es particularmente valiosa porque puede aislar las células del fluido crevicular. Sin embargo, la producción de estos modelos es técnicamente complicada.(12)



Por consiguiente, se ha restringido una sola técnica para su estudio y solo a algunos individuos, así como también sólo se ha aplicado al arco del maxilar, probablemente debido a que no hay hoy en día un aparato ex profeso para la mandíbula. Una desventaja que tiene esta técnica, es que en los sitios individuales no puede analizarse. La mayor desventaja de esta técnica es que el fluido no puede recuperarse durante la aspiración o re-aspiración. Así, una cuantificación exacta del volumen del GCF así como su composición no pueden determinarse por el factor de dilución.

Micropipetas.

Seguido de un proceso de aislamiento y posteriormente un secado del sitio, se insertan tubos capilares o bien llamadas micropipetas, a la entrada del surco gingival, subiendo por este, debido a la acción capilar. Esta técnica parece ser la ideal porque proporciona una muestra pura del fluido, cuyo volumen puede evaluarse con una excelente precisión. Sin embargo, es difícil de recolectar un volumen adecuado de GCF en un corto período, a menos que los sitios son inflamados contengan grandes volúmenes de GCF. El recolectar un volumen razonable de fluido puede exceder de 30 min. e, incluso en surcos saludables pueden ser imposibles de obtener. Debido a esto resulta un problema el hecho de mantener una micropipeta por periodos de 30 min. o más. sin hacer un traumatismo sin intención, y otra es la de recoger de las micropipetas toda la muestra.

Tiras de papel filtro.

Hay variaciones considerables en la aplicación de la tira de papel filtro, como método de recolección.

Las variaciones están con respecto no sólo el método y cronometrando de recolección de la muestra, si no también en los medios de estimar el volumen de muestra recolectados. Las ventajas de esta técnica son su rapidez y su facilidad de uso, que puede aplicarse a los sitios individuales y, posiblemente sea traumático aunque se use de manera correcta.

Los métodos de recolección.

Los métodos de recolección pueden ser divididos, en intracrevicular y extracreviculares. El primero depende de tiras que se insertan en la hendidura gingival, y este último en el que las tiras se colocan en la zona de la región del surco gingival, en un esfuerzo por minimizar el trauma. El método intracrevicular es el método usado más frecuentemente y puede subdividirse dependiendo si la tira simplemente se inserta a la entrada del surco gingival o si la tira se inserta a la base de la bolsa o 'hasta que se sienta la mínima resistencia'.(12)

Métodos para estimar el volumen recolectado

En muchos estudios tempranos el único propósito de la investigación era determinar la cantidad de GCF producida a un sitio dado.

La cantidad de GCF recolectada en una tira se evaluó por la distancia que el fluido había cubierto en la tira, esto se tomó a menudo como una medida lineal simple, pero un valor más exacto se logró evaluando el área humedecida de la tira de papel filtro de la muestra del GCF. La exactitud se logró impregnando a las tiras con el ninhydrin, que produce un color purpúreo en el área dónde aumentó el GCF.

Se mostró un resultado similar con fluoresceína- 2 dados sistémicamente cada 2 hrs. a los pacientes durante la recolección del GCF, y posteriormente se examinaron las tiras bajo luz ultravioleta. Aunque se usó esta técnica para determinar la presencia o ausencia de fluido, en lugar de para cuantificar el volumen coleccionado, se encontró que las marcas de fluoresceína eran 100 veces más sensibles, que las empleadas con ninhydrin para pigmentar a la proteína.

Las técnicas discutidas tienen varias desventajas; primeramente, ellas no se aplican fácilmente. El tiempo puede producir una variación en la medición de la tira, aumentando el volumen del fluido, como resultado de la evaporación. La introducción de un dispositivo de medición electrónico, mejor llamado como Periotron®, ha permitido determinación exacta del volumen de GCF en investigaciones subsecuentes.

Este instrumento mide el grado de afectación del fluido eléctrico sobre las tiras de papel filtro humedecidas, y se compone de dos brazos, que actúan

Como "platos" de un condensador eléctrico, si se introduce una tira seca entre los brazos, la respuesta se traduce por vía de los circuitos eléctricos, registrando 'ceros' en la lectura del aparato mas sin embargo, una tira de papel mojada aumentará la capacidad del volumen de fluido y esto se puede medir como un valor aumentado en la lectura. Esta técnica es rápida y no tiene ningún elemento que afecte a la muestra de GCF.(13)

Se han producido tres modelos de Periotron® (los 600, 6000 y ahora los 8000) y cada uno de ellos ha mostrado ser un medio eficaz para medir el volumen de fluido, recolectados por las tiras de papel filtro. Una de las limitaciones del Periotron®, ha sido su incapacidad para medir volúmenes de GCF mayor que 1.0 l, aunque cuando se ha usado tiras de papel filtro "Whatman" de 3MM, estas son capaces de absorber volúmenes más grandes.

Los volúmenes mayores de 1.0 l, pueden recolectarse de sitios muy inflamados y estas pueden ser las muestras de mayor interés que cualquier otro estudio de volumen, proporción de flujo, o composición del mismo.

De la mayoría de los estudios en la calibración del Periotron®, se pueden hacer las siguientes recomendaciones:

Cada máquina necesita su propia calibración, ya que pueden diferir notablemente sus rangos de las maquinas entre sí.

El suero es un material que puede generar una curva para su calibración. Es esencial una jeringa exacta, así como un formulario de estandarización para la distribución de los volúmenes dobles. esenciales. Es necesario un rango completo de volúmenes de 0.1 a 1.2 l para generar una curva exacta.

Un acercamiento alternativo, que involucre el peso de las tiras de papel antes y después de la recolección, se ha adoptado por algunos investigadores. Éste ha tenido el éxito pero exige de un equilibrio muy sensible al estimar las pequeñas cantidades de fluido recolectadas de un surco gingival sano. Así como el de la proteína que mancha, las técnicas de humectación, las pérdidas por evaporación debido al tiempo, todas estas pueden hacer variar los volúmenes obtenidos finalmente. De hecho, si una tira de papel filtro con GCF o un volumen conocido de suero se pone en equilibrio, sin ser incluido dentro de un recipiente sellado, puede observarse la evaporación.(13)



CAPITULO 4
LAS RELACIONES DEL FLUIDO

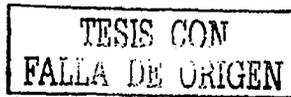
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fluido Crevicular y Placa Dentobacteriana

Aunque, se le ha prestado mucha atención a los componentes que determinan el surco gingival, dentro del espacio dentogingival también puede pensarse que es un portal de entrada para la placa dentobacteriana. Aquí se encuentran los microbios de forma consistente, cuando es analizado el fluido, y debido a la proximidad íntima de esta flora, no debe ser inesperado que las bacterias que se aíslan de estas muestras sean comparables a aquéllas de la placa bacteriana adyacentes. A pesar de tener la constitución similar a la placa "vecina", el número real de bacterias aisladas del fluido, se ha mostrado que no aumenta con la acumulación creciente de placa dentobacteriana, en las superficies dentales.

Cabe mencionar que la fase de inflamación en el fluido es generada por vasos sanguíneos, especialmente por las venas capilares, como una respuesta a los diferentes mediadores relacionados por las células y tejidos lesionados. El exudado inflamatorio contiene agente antibacteriales y sustancias que median a los estados subsecuentes de la respuesta.(14)

El fluido es generalmente mayor en la enfermedad más avanzada, reflejando el incremento del volumen del tejido inflamado y una bolsa gingival de mayor tamaño, a lo largo de la cual se excreta el fluido crevicular. No obstante este fluido, es muy variable, ya que algunas bolsas tienen una cantidad insignificante de este, y por lo tanto puede ser mayor el riesgo a que los productos bacterianos penetren a los tejidos.

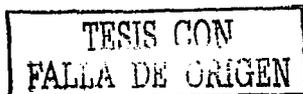


Relación del Fluido con Salud o Enfermedad

La controversia todavía existe acerca de que si el fluido está presente en sitios designados clínicamente como saludables. Esta disputa probablemente se levanta, por lo menos en parte, como resultado de las diferentes técnicas a que el fluido fue sometido. En los experimentos iniciales del surco gingival, se utilizó la prueba intracrevicular (insertando las tiras hasta que la resistencia se sienta) y rindió niveles perceptibles de fluido. En contraste, las tiras de papel de filtro colocadas simplemente a la entrada del surco gingival, el fluido crevicular fue raramente encontrado. Los defensores de la última técnica concluyeron que la fuerza y profundidad aplicada de esta técnica fue la que indujo al trauma, produciendo un flujo del fluido en el surco gingival saludable. Aunque estos argumentos se derivaron de la tira de papel filtro, como método de recolección, hay argumentos similares de este efecto traumático que se aplican a otras técnicas probadas, como son los tubos capilares ó micro pipetas.

La asociación de un aumento de volumen, de fluido junto con un aumento en la severidad de inflamación, se apoya bien por la evidencia de la literatura.

Estas relaciones con la producción del fluido crevicular, y los cambios o signos histológicos, así como la inflamación se han investigado con estudios cruzados y longitudinales. Sin embargo, los investigadores realizaron un mapa que extendió más allá la interpretación de las lecturas de Periotron. Para expresarlas, se realizaron pruebas estando bajo los mecanismos patológicos, que pueden dar lugar y tal vez desarrollar en un pronóstico para el diente.(15)



Así las lecturas dadas por el Periotron (80-200), estaban asociadas al "síntoma invisible de inflamación extendida", en contraste, los sitios clínicamente sanos, "aparentemente" pueden dar volúmenes tan grandes como 0.71 puntos (aproximadamente 120 Unidades del Periotron). Considerando que algunos sitios clínicamente inflamados, pueden dar volúmenes de <1.0 I (aproximadamente 20 Unidades del Periotron)

Esto sugiere que los valores clínicos estén demasiado "crudos" para una valoración exacta de la inflamación, o que el método a probar y determinar el volumen del GCF es impreciso.

En estudios in vitro realizados para determinar la cantidad de fluido, y que hagan pensar en un buen método de recolección y medida, los autores sugieren que las cantidades del GCF, puedan ser cuantificadas en las señales tempranas de inflamación, más que en las características subjetivas como el color y sangrando típicos.

Se ha sugerido por otros investigadores que el aumento del flujo del fluido crevicular, junto con una tendencia aumentada a sangrar, es una de las señales más tempranas de que hay inflamación de la encía. Los investigadores argumentaban que ese aumento de los volúmenes del fluido pueden ser una señal de inflamación "subclínica".(14)

Algunos sitios clasificados como "sanos" clínicamente, posiblemente variarían en su grado de inflamación subclínica.



Esta explicación se apoya por las observaciones histológicas que muestran al tejido conectivo totalmente libre de las células inflamatorias, Si este argumento se extiende a la producción del fluido crevicular, todos los tejidos producirían un fluido, incluso aquellos clasificados como 'saludables' a simple vista.

La discusión precedente, resalta la importancia del volumen del fluido, así como su proporción para el diagnóstico de la inflamación del tejido gingival. La referencia se ha hecho, debido a su potencial para el diagnóstico de los procesos destructivos de la enfermedad periodontal. Este aspecto raramente se ha investigado, probablemente porque los signos de la inflamación, como el color y sangre presentes, muestran no tener ninguna relación con la enfermedad destructiva.

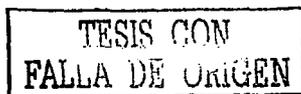
La relación entre el volumen del fluido crevicular y la profundidad de la bolsa, han sido difíciles de interpretar. Esta diferencia puede atribuirse una vez más a las variaciones en el método a probar; donde un estudio usó la técnica intracrevicular profunda y en el otro se colocaron las tiras de papel a la entrada del surco, a una profundidad de 1mm, el área de contacto de la tira con el epitelio de la bolsa, pudiendo haber una variación entre los resultados de las pruebas. Las muestras claramente repetidas del mismo sitio tienen su valor, determinando el progreso de la inflamación. Sin embargo, un volumen más grande recolectado de un sitio, comparado con otro, puede tener un significado pequeño.(15)

La variación es en parte al resultado de los valores presentes en la inflamación, pero también se atribuye al área de la muestra tomada, que puede ser resultado de profundidad de la bolsa periodontal, o a una variación absolutamente anatómica; También no se establece bien el papel de la gravedad en este análisis, aunque puede ser un claro ejemplo en la absorción del fluido por las tiras de papel.

Una amplia explicación del fracaso por descubrir cualquier relación entre los parámetros clínicos y el volumen de fluido así como su cantidad, han sido atribuidos a las diferencias de sensibilidad de los diferentes parámetros a probar. El volumen del fluido y la proporción de flujo, son indicadores de cambios en la permeabilidad vascular presentes en la fase temprana de inflamación. Las medidas clínicas usadas para registrar al proceso inflamatorio, como es el cambio de color, el contorno y la tendencia de los tejidos a sangrar, pueden también ser estos representativos de las señales tempranas de inflamación (15).

Potencial del fluido crevicular como parámetro predictor de riesgo de la enfermedad periodontal.

La composición del fluido crevicular, es el resultado de la conjugación entre la bio-película bacteriana adherida a la superficie dental y las células del tejido periodontal. La recolección del fluido crevicular, es un procedimiento minimamente invasivo y el análisis de sus constituyentes específicos del fluido, provee un indicador bioquímico cuantificativo de la evolución del metabolismo celular local que refleja una persona en estado de salud periodontal.



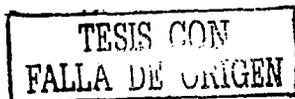
Muchos estudios han observado la asociación ante los niveles totales de la concentración de los diferentes constituyentes del fluido y el estado de salud del periodonto. La respuesta del huésped, es crítica para determinar la patogenia de la enfermedad periodontal.

Los mediadores de la inflamación en el fluido crevicular son usados para evaluar el riesgo para los dientes o más específicamente para una pérdida de inserción y de hueso alveolar y por lo tanto el riesgo un individuo, para desarrollar una enfermedad periodontal.

Resultado de los estudios pilotos longitudinales indican que la medición de los niveles inflamatorios en el fluido crevicular, se incrementan en pacientes con periodontitis, pero no en sitios con pérdida ósea o en sitios estables sin pérdida ósea. Esto sugiere que el riesgo está basado más en el paciente, que en un sitio específico.

Uso de los mediadores inflamatorios en el fluido crevicular, como un indicador de riesgo para la enfermedad periodontal.

Recientes estudios moleculares y epidemiológicos fundamentan un cambio en el paradigma de la patogénia de la enfermedad periodontal. Este fundamento indica que los microorganismos están asociados tanto en enfermedad como en salud, o simplemente en sitios donde no hay una franca progresión de la enfermedad; los niveles de placa no están asociados con individuos enfermos o con la severidad y extensión de la enfermedad.



La presencia de ciertos niveles de patógenos específicos como Phorphyromonas Gingivalis, marca un significado estadístico que poco contribuye en los modales multivirales de la enfermedad.

Estudios de la respuesta del huésped, indican que gemelos parecidos, 48% de la variabilidades la expresión de la enfermedad es resultado de una influencia genética, el stress, el fumar, la diabetes y todos estos son factores de riesgo para la enfermedad periodontal, los cambios microbiológicos y las drogas antiinflamatorias son efectivas en la prevención de la perdida ósea.

Los lipopolisacáridos son estímulos microbiológicos que pueden marcar la respuesta del huésped, en sitios con enfermedad periodontal; son un componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Los lipopolisacáridos en la circulación pueden inducir todos los síntomas del shock séptico, incluyendo a la fiebre, al colapso vascular y la muerte.

Localmente, los lipopolisacáridos, están relacionados con los mediadores inflamatorios (prostaglandina E2, tromboxano B, interleucina-1, 6 y 8 y por el factor de necrosis tumoral, así como por la colagenasa que se incrementa localmente en la destrucción de los elementos estructurales del tejido conjuntivo. Esto es, los mediadores inflamatorios de los monocitos como la prostaglandina E2, la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral, pueden estar presente en el fluido crevicular. El marcador ideal de la actividad de un sitio específico, son los elevados niveles de neutrófilos incluidos la elastasa del neutrófilo, la B-glucoronidasa y la leucotrinasa-B, todos estos pueden reflejar episodios agudos de destrucción localizada del tejido..

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Niveles en el fluido crevicular de los mediadores inflamatorios en salud, gingivitis y en formas severas de periodontitis.

Muchos estudios han reportado que las prostaglandinas-B2 presentes en el fluido crevicular son significativamente más altas en pacientes que sufren de formas severas de enfermedades como la periodontitis juvenil, la periodontitis refractaria, comparada con paciente sanos o del grupo control o pacientes con gingivitis y periodontitis cónica del adulto. En el estudio de 21 paciente sanos (grupo control), 28 pacientes con gingivitis y 21 con periodontitis y 15 casos con periodontitis juvenil.

- Los niveles de prostaglandinas-E2 en el grupo control fue de 20.3 +/- 7.9 mg/ml.
- En los pacientes con gingivitis fue de 49.4 +/- 4.8.
- En pacientes con periodontitis del adulto 42.3 +/- 12.3.
- En los pacientes con periodontitis juvenil fue de 81.6 +/- 20.3.
- En pacientes con periodontitis refractaria fue de 90.0 +/- 15.9.

En todos ellos se observó que la prostaglandina E2 es más elevada en pacientes con gingivitis que en el grupo control, lo cual fue confirmado en el modelo experimental de gingivitis en humanos, lo cual que, determinar los niveles de prostaglandina-E2 es un buen indicador para la actividad inflamatoria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Pacientes con periodontitis del adulto, aunque tuvieron un incremento de la prostaglandina-E2, que comparándolos con el grupo de gingivitis, no esta relacionado el incremento con la severidad de la enfermedad; los niveles de interlucina-1 está elevada significativamente en todas las formas de periodontitis, comparándola con los pacientes sanos o sólo con gingivitis.(15)

Conclusiones

Es obvio que el GCF es únicamente una ventana para el análisis de la condición periodontal, la colección del GCF es un procedimiento relativamente simple y no invasivo. El potencial del GCF para una detección temprana de la periodontitis y su cicatrización, fue identificado desde los 50s, sin embargo ahora en el 3er. año del 2do milenio, no tenemos un indicador periodontal práctico, pero sobre todo preciso, basado sólo en el fluido crevicular.

También podemos decir que el fluido crevicular se encuentra presente en conjunto con la inflamación o cerca de esta, aumentando su presencia en casos de una mayor inflamación. También lo podemos encontrar presente en estado de salud y antes de que se presenten cambios estructurales en los tejidos del periodonto.

El flujo o salida del fluido se relacionó con el grado de enfermedad periodontal, pero también a una efectiva técnica de cepillado, pero a pesar de tantos estudios y métodos de recolección y medición, hoy en día no significa que sean métodos confiables y reales para poder dar un diagnóstico y por lo tanto un tratamiento a la enfermedad periodontal.

Referencias.

- 1.-Andrew J.Délima ,Kenan Eratalay *Origin and function of the cellular components in gingival crevice .fluid .*Periodontology 2000, vol 31 p.p 55-76.
- 2.-Veli-Jukka Vitto. *Gingival crevice fluid.* Periodontology 2000 vol. 31 february 2003 p.p.9
- 3.- Fermín A.Carranza, Michael G. Newman. *Periodontologia Clinica* 8va. Edición,McGraw-Hill,edit. Interamericana p.p 111-113.
- 4.Timo Sorsa, Hanne Luoto. *Gingival Crevice Matriz Proteinase leves.* Journal Periodontology, February 2003 p.p. 66-76.
- 5.- Thomas. E, Van Dique. *Neutróphylos in Crevice Fluid.* Periodontology 2000,vol.31 issue 1 p.p.11-18.
- 6.- Smith A. J. M. Addy, G, Emberly,1999, *Gingival fluid glycosaminoglycanos, and proteolitis enzimes crevicular, leves in pacientes with periodontitis.* J. Clinical Periodontology, vol 22 num.5 p.p. 355-361.
- 7.- Gustafsson A, B; Asman, *Lower Protein concentration in gingival crevique fluid from patients with periodontitis: and indicador of host-especific inflammatory reaction.* Journal Clinic Periodontology. Journal clinic vol.22 p.p. 225-228,1998.
- 8.-J. Gamonal, A, Acevedo, A. Bascones. *Levels de Interlukin and neutrofilos in gingival crevice fluid an cell population in adult periodontitis patient and the effect of periodontal tratment.* Journal Periodontology 2000,vol71 issue 2 p.p.1535-1545.
- 9.-Nurcan Budunelli, Saynur Vardar.*Gingival Crevicular Fluid Matriz Proteinase levels, Followig Adjuntivo Use of Meloxicam and Initial Phase of Periodontal Therapy-* J. Periodontology 2002, vol. 73 p.p.487-49

10.-Gülay Tüter, Bülent Kurtis, *Effects of phase 1 periodontal Treatment on gingival Crevicular Fluids levels of matrix metalloproteinases.*Journal Periodontology 2003, vol 73 p.p.487-493.

11.- Gülnur, Emingil,Serhat,Cinarcik,Haluk. Levels of platelet-activating factor in gingival crevicular fluid and gingival. Journal Periodontology, 2001, vol 72 p.p.1032,1037.

12.- Simth, A.P. Seymour R.A. *Recollection of crevicular fluids in patient with periodontitis chronique.* J.Clinic Periodontology vol.22 issue 1 , january 1998.

13.-Chaple, I,L Al Cross, H. D. Glenwri, 1998 *Calibration and reliability of the periotron 6000th, for individual gingival crevicular fluids fluid simples.*

14.- Garito, M.L,J T. Prihoda, M.L.. Mc Manos, 2000, *Relationship between plaque and crevicular fluid.*J,Dint. Res vol. 74 issue 4 p.p.1048-1056.

15.-Catherine M.E., Michel S. Reddy, John S.Preisser. *Potential of gingival crevice fluid measures as predictos of risk for periodontal diseases* periodontology 2000 vol. 31 pp 167. February 2003.