



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA,**  
**ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y**  
**MEDICINA FÍSICA**

Valoración de Marcadores Inflamatorios y Estrés  
Oxidativo en un Grupo de Pacientes con  
Enfermedad Periimplantaria

**D. Javier Lucas Azorín**

2015

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Mariano Sánchez Siles por comenzar este proyecto cuando no teníamos tiempo ni fuerzas para cumplir este sueño.

Al Dr. Luis Carbonell Meseguer por su ayuda y consejos desinteresados hacia un extraño.

Al Dr. Fabio Camacho Alonso por coger las riendas de este proyecto cuando andaba perdido, darle forma y empujarme para poder llegar a la meta. Gracias Fabio.

A Pilar y Narcisa, mis auxiliares que viven mis retos profesionales como si fueran propios. Gracias

A mis pacientes, que con respeto y paciencia han acudido a mi consulta por amistad, respeto o gratitud hacia nuestra clínica.

*Javier Lucas Azorín 2015*

*A Rocio, Gonzalo e Ignacio por darle sentido a la vida*

*A mi tía Maria Luisa, por estar siempre a mi lado*

*A mi padre, por su ejemplo de lucha*

*A mi madre, porque compartir este reto conmigo*

Javier Lucas Azorín 2015

## **TESIS DOCTORAL**

**VALORACIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS Y ESTRÉS  
OXIDATIVO EN UN GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD  
PERIIMPLANTARIA**

# **INDICE**

## INDICE

1.- ABREVIATURAS.....	8
2.- INTRODUCCIÓN.....	11
2.1.- Enfermedad periimplantaria.....	12
2.1.1.- Definición.....	13
2.1.2.- Etiopatogenia.....	13
2.1.3.- Diagnóstico.....	25
2.1.4.- Características clínicas.....	30
2.1.5.- Epidemiología.....	31
2.1.6.- Criterios de éxito de los implantes dentales.....	32
2.1.7.- Factores de riesgo para la aparición de periimplantitis.....	33
2.2.- Estrés oxidativo.....	37
2.2.1.- Definición.....	37
2.2.2.- Oxidación-reducción o sistema redox.....	39
2.2.3.- Radicales libres.....	40
2.2.4.- Mecanismos de defensa antioxidante.....	45
2.2.5.- Diagnóstico de enfermedades causadas por estrés oxidativo.....	49
2.2.6.- Métodos para medir el daño oxidativo.....	50
2.2.7.- La saliva como mecanismo antioxidante.....	52
2.3.- Periimplantitis y estrés oxidativo.....	53
3.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	58
3.1.- Justificación.....	59
3.2.- Objetivos.....	60
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	62
4.1.- Material.....	63

4.2.- Métodos.....	71
5.-RESULTADOS.....	75
6.- DISCUSIÓN.....	84
7.- CONCLUSIONES.....	92
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	94
9.- ANEXOS.....	108

**TESIS DOCTORAL**  
**VALORACIÓN DE MARCADORES**  
**INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN**  
**GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD**  
**PERIIMPLANTARIA**

**ABREVIATURAS**

## 1.- ABREVIATURAS

ac: ácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

Cº: centígrados

Co: cobalto

CT: tomografía computerizada

Ct: catalasa

CTE: cadena de transporte de electrones

Cu: cobre

ELAM-2: molécula de adhesión leucocitaria al endotelio

EROs: especies reactivas del oxígeno

Fe: hierro

GPx: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión

GST: glutatión sulfhidril transferasa

GR: glutatión reductasa

h: horas

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular

Ig A: inmunoglobulina A

IgM: inmunoglobulina M

Il 1: interleuquina 1



IMC: índice de masa corporal

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: deshidrogenofosfato de potasio

LDH: lactato deshidrogenasa

LPx: lipoperoxidación

MDA: malondialdehído

Min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

mm: milímetro

MMP: metaloproteínas de la matriz

MPO: mieloperoxidasa

Mn: Manganeseo

N: newton

Nº: número

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ng/ml: nanogramos por mililitros

Ni: níquel

NIC: nivel de inserción

NY: New York

OMS: organización mundial de la salud

PMN: polimorfonucleado

PS: profundidad de sondaje

RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear ligando B

Redox: reacción de reducción-oxidación

RL: radicales libres

RLO: radicales libres de oxígeno

ROS: reactivos de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RVG: radiovisiografía

Rx: rayos x

SD: derivación estandard

SOD: superóxido dismutasa

SUP: superficie

TBA: tiobarbitúrico

TiO<sub>2</sub>: dióxido de titanio

TNF: factor de necrosis tumoral

USA: Estados Unidos de América

μm: micra

μm/l: micras por litro

**TESIS DOCTORAL**  
**VALORACIÓN DE MARCADORES**  
**INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN**  
**GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD**  
**PERIIMPLANTARIA**

**INTRODUCCIÓN**

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1.- Enfermedad peri-implantaria**

#### **2.1.1.-Definición**

La osteointegración es la conexión directa tanto estructural como funcional entre el hueso vivo y la superficie rugosa de un implante dental para soportar la carga oclusal (Branemark, 1977).

La enfermedad periimplantaria es un término colectivo que designa las reacciones inflamatorias que se producen en los tejidos que rodean un implante oclusalmente funcional. Tras la correcta osteointegración de un implante, la enfermedad periimplantaria es el resultado de un mal balance entre la carga bacteriana y la respuesta del huésped (Zitmann y cols., 1992). Así pues, la enfermedad peri-implantaria es una enfermedad de carácter infeccioso (Lindhe y Meyle, 2008).

La enfermedad periimplantaria se divide en dos entidades bien diferenciadas y secuenciadas en tiempo de aparición: la mucositis y la periimplantitis.

La mucositis periimplantaria se define como una forma reversible de afección inflamatoria de los tejidos blandos que rodean a un implante oclusalmente funcional (Lang y cols., 2000). La mucositis perimplantaria es considerada como el estadio inicial de la periimplantitis. Las características más comunes de la mucositis periimplantaria son: presencia de placa blanda y calcificada, edema, enrojecimiento e hiperplasia de la mucosa, sangrado y compromiso del sellado mucoso al sondeo, en ocasiones exudado o

supuración (microabsceso gingival) y ausencia radiológica de pérdida ósea (Lang y cols., 2000).

La periimplantitis fue definida por Astrand y cols. en el año 2000 (Astrand y cols., 2000) como una infección que incluye secreción purulenta y pérdida ósea. Zetterqvist y cols. en el año 2010 (Zetterqvist y cols., 2010) ampliaron esta definición para poder establecer qué pérdida ósea radiográfica es necesaria para traspasar la frontera entre mucositis y periimplantitis. Así, Zetterqvist y cols definieron la periimplantitis como una mucositis con encuentro de sangre y/o supuración al sondaje, 5 o más milímetros de pérdida ósea en sondaje, siendo esta progresiva en tiempo y más de 5 milímetros de pérdida ósea confirmado a rx. Para puntualizar esta definición, Koldslund y cols. (Koldslund y cols., 2010) añadieron la necesidad de realizar estas medidas siempre en la misma inclinación a la hora de la realización de las placas radiográficas porque si no obtendremos valores distintos en la medición.

### **2.1.2.-Etiopatogenia**

En la etiopatogenia de la enfermedad periimplantaria se han descrito los siguientes factores etiológicos:

- Factores desencadenantes.
- Factores asociados: A. Diseño del implante dental, B. Diseño de la prótesis dental.
- Características de la mucosa periimplantaria.

#### Factores Desencadenantes

La periimplantitis se define como una enfermedad de origen bacteriano que combina una inflamación de la mucosa y una pérdida de hueso de soporte (Albrektsson e Isidor, 1994).

Hasta hace algunos años se pensaba que cualquier pérdida de hueso se debía a una sobrecarga funcional o complicaciones técnicas a la hora de realizar la cirugía implantológica, sin embargo, en la actualidad se sabe que las bacterias son capaces de colonizar la superficie de los implantes tanto en pacientes edéntulos o como parcialmente edéntulos y son la causa principal de la aparición y progresión de la periimplantitis. *Tannerellagingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotellanigrescens*, *Fusobacteriumnucleatum*, *Campylobacterspp*, *Parvimonas micra* y *Aggregatibacteractynomycetenscomitans* han sido detectadas en los surcos periimplantarios de pacientes edéntulos y parcialmente edéntulos (Charalampakisy y cols., 2011). De entre todas estas bacterias se ha demostrado un predominio de microflora Gram-negativa anaeróbica en la colonización de la superficie de implantes fracasados(Renvert y cols., 2007).

Charalampakisy y cols. (Charalampakisy y cols., 2011) encontraron un porcentaje muy alarmante (54%) de pacientes con enfermedad periodontal activa y periimplantitis. Una gran cantidad de estudios han demostrado, en pacientes parcialmente edéntulos, el movimiento de patógenos periodontales desde el surco de los dientes al implante, quedando este como reservorio (Mombelli y cols., 1998; De Boever y De Boever, 2006).

### Factores asociados

Relacionado con la colonización bacteriana, en la literatura científica encontramos tres factores que van a acompañar a los procesos de periimplantitis con frecuencia: la fenestración ósea durante la cirugía, una banda estrecha de encía queratinizada y un mal diseño protésico son considerados factores que pueden ayudar a estos patógenos a colonizar nuestro implante.

Estudios de Roos-Jansaker y cols. (Roos-Jansaker y cols., 2006) hablan de fenestraciones como un camino más sencillo para la introducción de

bacterias al igual que una fina banda de encía queratinizada. La falta de encía queratinizada no es necesariamente un factor desencadenante del proceso periimplantario pero sí introduce condiciones más adversas para un buen mantenimiento de la salud del implante dental a lo largo del tiempo. Estudios de Kim y cols. (Kim y cols., 2009) hablan de la relación entre una ancha banda de encía queratinizada con una menor pérdida de hueso alveolar alrededor de los implantes y un mejor mantenimiento de la salud gingival alrededor de ellos.

Un diseño protésico erróneo también parece favorecer la colonización bacteriana del área perimplantaria por una deficiente accesibilidad a la hora de la higiene y su consiguiente acumulación de placa bacteriana. Estudios de Serino y Strom (Serino y Strom, 2009) hablan de puntos de acumulación de placa en los diseños protéticos como un factor de riesgo muy importante por la imposibilidad de mantener una superficie libre de placa cercana a la unión prótesis-implante.

#### *A. Diseño del implante dental*

En los últimos años se le está dando mucha importancia al diseño del implante tanto en su superficie y recubrimiento como en el área de unión implante-prótesis (tipo de conexión y platform switch) como mecanismos de lucha ante una agresión patógena.

Lang y cols. (Lang y cols., 2011) se preguntaron si las características de la superficie implantaria influirían en el desarrollo de la enfermedad periimplantaria y tomando como referencia la clasificación de Albrektsson y Wennerberg (Albrektsson y Wennerberg, 2004) sobre rugosidad de superficie llegaron a la conclusión que una superficie rugosa es más susceptible a la colonización bacteriana que una mínimamente rugosa o lisa (Tabla 1).

**Tabla 1:** Clasificación de la superficie del implante en función de la rugosidad (Albrektsson y Wennerberg, 2004).

LISA	MÍNIMAMENTE RUGOSA	MODERADAMENTE RUGOSA	RUGOSA
<0.5µm	0.5-1 µm	1.1-2.0 µm	>2 µm

Esta conclusión, admitida en casi todos los estudios, también es muy discutida en cuanto al poco peso científico que presentan sus artículos en tiempo y número de muestras, y así hay otros autores como Heiz-Mayfield (Heiz-Mayfield, 2008) que hablan de los pocos estudios referentes a este punto de vista para poder dar una respuesta a esta pregunta, o Groessner-Scheriber y cols. (Groessner-Scheriber y cols., 2009) que hablan de una falta de evidencia científica que demuestre un cambio en la composición del biofilm dependiendo de la rugosidad de la superficie.

Superficies con una rugosidad mayor a 2µm se han asociado con un mayor riesgo de periimplantitis (Becker W y cols., 2000). Hoy en día, la mayoría de los implantes orales comercialmente disponibles presentan una superficie moderadamente rugosa (1-2µm).

Albrektsson y Wennerberg (Albrektsson y Wenneberg, 2004) también clasificaron las superficies de los implantes según sus propiedades mecánicas, topográficas y físico-químicas. Esta clasificación es mucho más completa que la referida exclusivamente a los tipos de superficie externa del implante o última capa, clasificación utilizada mayoritariamente por las casa comerciales para intentar diferenciar sus productos de la competencia.

Albrektsson y Wennerberg (Albrektsson y Wenneberg, 2004) clasificaron las propiedades en:

- Propiedades mecánicas: hacen referencia al potencial de estrés, fatiga o envejecimiento de la superficie. Es una propiedad no suficientemente estudiada.



Dentro de esta propiedad podemos incluir la clasificación de la Sociedad Americana de Tests de Materiales donde clasifican el titanio en cuatro grados de pureza definidos según la concentración de titanio y otros elementos presentes en su composición. El grado 1 es el más puro debido a su bajo contenido en oxígeno y hierro, presentando una mayor histocompatibilidad y resistencia a la corrosión pero también una mayor fragilidad. Las aleaciones de titanio se clasifican en grados que oscilan entre 5 y 29 y algunos fabricantes emplean la aleación de titanio de grado 5, denominada Ti-6AR-4V, para los implantes dentales (Jokstad y cols., 2003)

- Propiedades topográficas: se refieren al grado de rugosidad de la superficie, así como la orientación de sus irregularidades. Propiedad muy estudiada en los últimos años y también muy utilizada por las casas comerciales, al igual que las propiedades químicas, para diferenciarse.

Kadkhodazadeh (Kadkhodazadeh y cols., 2014) habla de un estrés óseo aumentado en implantes con cambios agresivos en la forma a lo largo de la longitud del implante en dirección apical y de un mejor comportamiento del complejo hueso-implante en implantes con formas uniformes o con cambio suaves.

El diámetro de los implantes también ha sido considerado un factor de éxito/fracaso de los implantes dentales durante muchos años. Actualmente no hay estudios que demuestren el beneficio o no del uso de implantes anchos o estrechos. Un ejemplo de esta controversia sería el grupo de Ivanoff y cols (Ivanoff y cols., 1997) que en 1997 concluyeron que el uso de implantes anchos aumentaba las tasas de éxito por aumentar la superficie de soporte en hueso cortical. Sin embargo; dos años más tarde, publicaron otro estudio donde no observaron relación estadísticamente significativa entre la pérdida ósea periimplantaria y el diámetro de los implantes (Ivanoff CJ y cols., 1999).

La misma controversia y el mismo resultado que con el diámetro de los implantes nos encontramos con la longitud de los mismos y su relación con la pérdida ósea. Existen estudios a favor de implantes largos ( $\geq 11.5\text{mm}$ ), demostrando una pérdida significativamente mayor en implantes cortos ( $\leq 10\text{mm}$ ) (Chung D y cols., 2007) y otros estudios que no han observado ninguna diferencia de pérdida ósea crestral entre implantes cortos y largos (Rokni y cols., 2005).

Otro punto crítico en el diseño del implante es la morfología de la porción cervical. La presencia de 0.5 mm de superficie lisa a nivel cervical, cuello del implante, antes de la aparición de la rosca o la aparición de éstas desde la plataforma del implante parece que cambia la respuesta ósea ante la colocación de un implante. Hay evidencia de una menor pérdida ósea en implantes con minirrosado hasta la plataforma del implante (Shin y cols., 2006). Un estudio reciente concluye que no existe una diferencia significativa entre implantes con macrorrosca y microrrosca a nivel cervical en términos de pérdida ósea marginal (Kang YL y cols., 2012).

- Propiedades físico-químicas: dependiendo de las superficies del implante y su composición química. Esta va a provocar distintas reacciones en el hueso con cambio de agua e iones que condicionan la unión de las proteínas y por tanto la reacción celular que permite una buena unión implante-hueso (Tabla 2).

**Tabla 2:** Clasificación química de los tipos superficie de los implantes dentales.

SUP. LISA	Electropulida	Torneada	
SUP. RUGOSA	TPS (añadiendo materiales)		

SUP. RUGOSA	SANDBLASTING (eliminando materiales)	GRABADO ÁCIDO Y CHORREADO (eliminando materiales)	GRABADO ÁCIDO (eliminando materiales)
-------------	--	---	--

### *B. Diseño de la prótesis dental*

Ya en 1996 Persson y cols. (Persson y cols., 1996) demostraron que, aunque muchos patógenos causantes de la periimplantitis se encuentran en las bolsas periimplantarias, muchas bacterias residen en los componentes protésicos. Un mal diseño de la prótesis, donde el paciente o profesional no puedan acceder a su limpieza o higiene en los componentes de unión implante-pilar va a condenar nuestros implantes en un futuro.

Estas bacterias pueden colonizar en microgaps de 10  $\mu\text{m}$  entre implante y su interfase protética. Las consecuencias de esta contaminación incluyen inflamación del tejido blando y posible pérdida ósea (Hertmann y cols., 2001). El diseño de la interfase pilar-implante va a determinar el tamaño del microgap (Tesmer y cols., 2009).

En 2005 Gardner (Gardner, 2005) introdujo el concepto de cambio de plataforma refiriéndose al uso de un aditamento protésico de diámetro menor que la plataforma del implante con el fin de alejar la unión implante-pilar del hueso crestral. En un experimento reciente en minipigs (Farronato y cols., 2012) encontraron una diferencia en la dimensión de la anchura biológica entre implantes colocados a nivel crestral con cambio de plataforma y los implantes con un pilar de dimensiones coincidentes con las del implante. El primer grupo presentaba una anchura biológica menor ( $1,97 \pm 1,20$  mm) y el segundo una

anchura media de  $3,20 \pm 0,33$  mm. Estos resultados sugieren que la utilización de pilares con cambio de plataforma conlleva efectos beneficiosos.

Existen varias hipótesis que explican el efecto beneficioso del cambio de plataforma en el mantenimiento del hueso crestal:

- Microbiológica: desplazando la interfase implante-pilar hacia medial, el infiltrado inflamatorio se aleja del hueso y, por lo tanto, también el efecto destructor que el microgap ocasiona en el hueso periimplantario.
- Biológica: se crea un área horizontal a nivel coronal del implante que permite el apoyo de los tejidos blandos y un mayor espacio para la adaptación del tejido conectivo, previniendo de este modo, la retracción del tejido epitelial (Farronato y cols., 2012).
- Biomecánica: se desplaza la zona de concentración de la carga lejos de la unión hueso-implante en el cuello periimplantario, lo que se traduce en una menor reabsorción ósea postcarga (Maeda y cols., 2007)

Un ajuste defectuoso entre los diferentes aditamentos usados habitualmente y el implante, en la interfase de conexión, puede suponer un depósito bacteriano en el surco periimplantario, y ser el causante de una mucositis periimplantaria que si no se resuelve puede llegar a una periimplantitis (Arano y cols., 2001). Estos autores, también demostraron que los aditamentos mecanizados tienen un mejor ajuste que los colados a través de un calcinable.

La elección del material de la prótesis también parece que puede condicionar el mayor o menor acúmulo de bacterias. Según el estudio de Welander y cols. (Welander y cols., 2008) la calidad y salud del tejido periimplantario es mayor en pilares de zirconio-titanio que en aleaciones de oro o platino.

### Características de la mucosa periimplantaria

La estructura de la mucosa periimplantaria hace que cualquier agresión bacteriana conlleve unos daños mucho más agresivos que los que ocasiona en la unión dentogingival.

El tejido conectivo periimplantario presenta un 85% de colágeno frente al 60% del dentogingival y un 1-3% de fibroblastos frente 5-15% del tejido dentogingival. Esto significa que se comporta más como un tejido cicatricial donde la poca presencia de fibroblastos hace que tenga menor capacidad de resolución de los procesos inflamatorios.

Otra característica de la mucosa periimplantaria es la ausencia de cemento dentinario en la superficie del implante. El cemento dentinario proyecta haces de fibras gruesas dentogingivales y dentoalveolares en dirección lateral, coronal y apical mientras que las fibras colágenas de la mucosa periimplantaria se proyectan de forma paralela a la superficie del implante, lo que disminuye la fortaleza de este tejido (Berglundh y cols., 1991)

También es un factor a tener en cuenta, que ante un ataque prolongado el proceso alveolar dentario siempre mantiene 1 mm de separación ante las bacterias mediante un collarete de tejido conectivo, mientras que en la mucosa periimplantaria las bacterias llegan hasta estar en contacto con el hueso, lo que provoca una velocidad de destrucción ósea mucho mayor (Lindhe y cols., 1992).

Todas estas características se han demostrado al comparar el sondaje en la unión dentogingival e implantogingival. En estado de salud, la profundidad de sondaje suele ser de 0.7 mm en diente frente a 2 mm en implante, y sobre todo, la distancia del sondaje al hueso suele ser de 1.2 mm en complejo dentogingival y 0.2 mm en periimplantario. Estas medidas corroboran la fragilidad del sistema mucoperiimplantario.

Para terminar esta comparación añadimos que el aporte vascular del diente se produce por los vasos sanguíneos supraperiósticos y del plexo vascular del ligamento periodontal, mientras que el complejo implante-hueso-mucosa periimplantaria sólo recibe el aporte de los vasos sanguíneos supraperiósticos. Así el compartimento del tejido conectivo supraalveolar apical al epitelio de unión en la mucosa periimplantaria, prácticamente carece de aporte vascular.

Un reciente estudio de Berglundh y cols. (Berglundh y cols., 2011), nos hace todavía más incapié en la mayor agresividad de los procesos periimplantarios frente a los periodontales debido a las características estructurales anteriormente expuestas. Concluyen que un mes después de quitar una ligadura colocada en la bolsa del tejido periodontal se forma una capa protectora conectiva (entre el infiltrado ocasionado por la ligadura y el hueso), mientras que en el espacio periimplantario, este infiltrado seguía en contacto con el hueso. Esto demuestra la mayor agresividad e irreversibilidad de los procesos periimplantarios frente a los periodontales.

Finalmente, debemos señalar que ante una actividad inflamatoria mediada por bacterias (en este caso la periimplantitis), el organismo dispone de tres elementos defensivos ante posibles ataques:

- Barreras externas (piel y mucosas).
- Respuesta inespecífica contra microorganismos.
- Respuesta inmunitaria antígeno-específica.

#### Barreras externas (piel y mucosas)

Si comparamos el diente y el implante vemos que en el diente existen unos mecanismos de protección específicos como son el epitelio de unión, el tejido conectivo y los elementos celulares del sistema inmunitario. El epitelio y

la interfase entre el tejido conectivo supralveolar y la superficie de titanio de un implante son diferentes a la interfase homóloga del complejo gingivo-dentario. La unión del epitelio con la superficie del implante es de tipo hemidesmosomal, al igual que la del tejido conectivo, pero la disposición de sus fibras es predominantemente longitudinal respecto a la superficie del implante y no perpendicular como ocurre en el diente natural. En la zona más coronal tiene una disposición circunferencial, además de una escasa vascularización y una mayor proporción de fibras de colágeno respecto a los fibroblastos en comparación con el diente (proporción de 4 en el diente por 109 en el implante) (Berglundh y cols., 1991). Esta unión es relativamente débil de manera que si se destruye, la contaminación bacteriana se extiende al hueso de manera directa, provocando su rápida destrucción (Lindhe y cols., 1992).

#### Respuesta inespecífica contra microorganismos

Ante la presencia de placa bacteriana se produce una irritabilidad en los tejidos del huésped, lo que estimula a las células epiteliales para que produzcan citoquinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación. Se produce una tumefacción de los tejidos y la llegada de leucocitos, principalmente neutrófilos, que migran desde los vasos hacia tejido conectivo y posteriormente hacia la hendidura crevicular. Este reclutamiento es debido a las acciones quimiopositivas del sistema del huésped (interleucina-8, componentes C5a del complemento, leucotrina B4) así como productos derivados de microorganismos (lipopolisacáridos, formilfenilalalina, etc.).

Los Leucocitos migran por un gradiente quimiotáctico hacia la hendidura recibiendo ayuda de moléculas de adhesión, principalmente las situadas en el epitelio de unión (ICAM-1 , ELAM-1).

La acumulación de neutrófilos PMN y su actividad en la hendidura tiene como resultado la liberación de enzimas que son dañinas tanto para los microorganismos como para el huésped (Larsson y cols., 2011).

Si aumenta esta infiltración leucocitaria por la perpetuación del ataque microbiano se va a producir una modificación en la composición estructural y celular de los tejidos, así vamos a encontrar una dilatación de las arteriolas, capilares y vénulas; la presión hidrostática dentro de la microcirculación crece y se forman brechas intercelulares entre las células endoteliales. Este infiltrado puede llegar hasta el 15% del volumen del tejido conectivo produciéndose una degeneración de los fibroblastos dentro de la lesión y una destrucción del colágeno en el área infiltrada. Otra modificación que va a sufrir nuestro tejido ante la perpetuación del contacto con microorganismos es el reforzamiento de la barrera primaria del epitelio de unión aumentando las células basales del epitelio de unión y sulcular (Sheethal y cols., 2014).

El aumento de este infiltrado hace necesario un mayor espacio, así las capas epiteliales son destruidas y el epitelio se reubica más apicalmente produciéndose una reabsorción ósea y la formación de la bolsa.

Mientras que en los procesos periodontales el infiltrado de neutrófilos se ubica únicamente en la bolsa en los procesos periimplantarios este infiltrado también avanza hasta los compartimentos perivasculares en las porciones apicales de la bolsa, lo que nos demuestra la mayor agresividad en este último proceso (Berglundh y cols., 2011).

Los macrófagos van a tener un papel muy importante en la hendidura ya que se van a encargar de fagocitar los neutrófilos muertos o sobreactivados que pueden degranularse y liberar enzimas que causen más daños y excitación de los tejidos, con la consiguiente acción de las citoquinas para llamar a más leucocitos y tengamos una inflamación mayor con la consiguiente pérdida de inserción.

Otro de los procesos que ocurren en la defensa inespecífica es la aparición de moléculas expulsadas al medio tanto parte del huésped como del agente microbiano que van a influir en el proceso inflamatorio. Así podemos encontrar proteasas y proteinasas, colagenasas, fosfatasas ácidas,



fosfolipasas, fosfatasa alcalinas en la hendidura que participan en la destrucción de tejidos, e inhibidores de proteasas que sirven como moduladores de la inflamación inactivando la función de las proteasas. También encontramos metaloproteinasas de la matriz (MMP), colagenasa neutrófila y colagenasa fibroblástica que tienen la capacidad de dividir la triple hélice de colágeno I, II y III iniciando la degradación de la matriz extracelular.

### Respuesta inmunitaria antígeno-específica

Está basada en la respuesta inmunitaria humoral y celular específica.

Los anticuerpos son dirigidos contra determinados microorganismos bucales. Estos anticuerpos tienen la función de opsonización de bacterias y la de unirse fuertemente a las fimbrias con lo cual previenen una futura colonización.

Cuando un antígeno de la placa penetra en el tejido conectivo atravesando el epitelio de unión las células de Langerhans lo procesan y alteran de forma para que sean reconocibles por el sistema inmunitario. El péptido antigénico se une a complejo de histocompatibilidad y es reconocido por un Linfocito T helper (CD4+) liberando citoquinas que actúan llamando a otras células linfoides como son los macrófagos, Linfocitos B, y Linfocitos T.

Esta respuesta es mucho más selectiva ante el antígeno pero al mismo tiempo es más dañina para el organismo, produciendo mayor inflamación y reabsorción ósea que la inespecífica (Meyle y cols., 2015).

### **2.1.3.-Diagnóstico**

Un diagnóstico correcto y temprano de la periimplantitis es fundamental para poder tener alguna posibilidad de detenerla y tratarla eficazmente. De hecho, según en un estudio realizado por Charalankis y cols. (Charalankis y

cols., 2011), un 17,3% de las periimplantitis se diagnostican 2-3 años más tarde de su comienzo.

Un diagnóstico correcto se basa en:

- Exploración visual, palpación.
- Sondaje periimplantario.
- Análisis del líquido crevicular periimplantario y de la saliva.
- Test diagnóstico microbiano.
- Evaluación radiográfica.
- Movilidad del implante dental.
- Exploración oclusal.
- Diseño de la prótesis dental.

#### Exploración visual, palpación

Cambios en el color, la textura de la mucosa o la presencia de supuración, pueden indicar algún tipo de patología (Lang y cols., 1994).

#### Sondaje periimplantario

Lang y cols. (Lang y cols., 1994) y Schou y cols. (Schou y cols., 2002) demostraron la necesidad del sondaje con una ligera fuerza (0,2-0,3 N) para el diagnóstico de la enfermedad periimplantaria o del estado de salud periimplantario.

Hasta hace unos años el sondaje alrededor de los implantes se consideraba potencialmente dañino para el sellado marginal de la mucosa alrededor de estos por lo que no era rutinario el sondaje en las revisiones de

los pacientes. Etter y cols. (Etter y cols., 2002) hablaron de la necesidad del sondaje rutinario como medio de diagnóstico y de la completa restauración del sellado marginal tras este al cabo de 5 días.

#### Análisis del líquido crevicular periimplantario y de la saliva

Actualmente se están llevando a cabo algunos estudios para relacionar marcadores bioquímicos de inflamación con parámetros clínicos de enfermedad periimplantaria. Liskmann y cols. (Liskmann y cols., 2004) concluyeron que había un aumento considerable de mieloperoxidasa (MPO) en pacientes con periimplantitis. Plagnat y cols. (Plagnat y cols., 2002) observaron un aumento de la actividad fosfatasa y elastasa en los surcos de los implantes que presentaban inflamación. Strbac y cols. (Strbac y cols., 2006) también detectaron un aumento de cathepsin K (proteasa expresada por osteoclastos) en pacientes con pérdida ósea alrededor de los implantes.

El problema de estos estudios son su coste para poder introducirlos en las revisiones rutinarias de nuestras clínicas.

#### Test diagnóstico microbiano

La utilización de tests para diagnosticar la presencia de bacterias específicas como *Aggregatibacter* y *actinomycescomitans*, *Prevotellaintermedia*, *Porphyromonas gingivallis* y *Treponema denticola* nos sirven tanto para diagnosticar la enfermedad periimplantaria de origen bacteriano, como para el tratamiento farmacológico específico contra estas.

Al contrario que los marcadores químicos, estos tests microbianos sí están al alcance de nuestra clínica rutinaria por precio y sencillez en su metodología de trabajo.

### Evaluación radiográfica

- a) Radiografías periapicales con paralelizador: Son las que más se han empleado para establecer los niveles óseos marginales y determinar la pérdida ósea interproximal. Así, medición tras medición, se pueden monitorizar los cambios longitudinalmente. Como desventaja cabe añadir que no es posible evaluar radiográficamente las paredes vestibular ni bucal.
- b) Ortopantomografía: Permite ver el implante completo y su relación con estructuras vecinas, pero plantea como desventaja su conocida distorsión.
- c) Tomografía computarizada (CT), conebeam CT y micro CT: Ofrecen la posibilidad de observar las estructuras en tres dimensiones, fiel en proporciones y sin distorsión.

Las radiografías sólo muestran la situación ósea mesial y distal. Sabiendo que los defectos tienen forma circular o de embudo, añadiremos que son mayores en boca de lo que muestran las radiografías.

Tenemos dos tipos de defectos radiográficos:

1.- Horizontal;

Lo asociamos a un desarrollo lento y relacionado con una retracción de partes blandas. El ángulo que forma con la superficie del implante es mayor de 60° teniendo este tipo de defectos un pronóstico favorable.

2.- Vertical;

Lo asociamos a un desarrollo rápido y va asociado a bolsas con proliferación epitelial en su interior, infecciones purulentas y sondaje mayor de 5 mm. El ángulo que se forma con la superficie del implante es menor de 60 grados y su pronóstico es desfavorable (Tabla 3).

**Tabla 3:** Clasificación de Jovanovic de los defectos óseos (Jovanovic, 2002):

<b>Grado 1</b>	Pérdida horizontal mínima con signos iniciales de reabsorción vertical periimplantaria
<b>Grado 2</b>	Pérdida horizontal moderada con reabsorción vertical periimplantaria localizada
<b>Grado 3</b>	Pérdida horizontal moderada intensa con reabsorción vertical circunferencial avanzada
<b>Grado 4</b>	Pérdida horizontal intensa con reabsorción circunferencial avanzada y pérdida vestibular o lingual

#### Movilidad del implante dental

Indica una pérdida total de la osteointegración y el implante debe ser retirado. Este parámetro no es útil para un diagnóstico temprano de la periimplantitis, todo lo contrario, demostraría un fallo en nuestro sistema de revisiones y un diagnóstico muy tardío.

#### Exploración oclusal

El efecto de la sobrecarga oclusal en la pérdida de hueso alrededor de los implantes no está probada ni lo suficientemente estudiada, pero sí se ha encontrado una mayor y más rápida pérdida ósea en pacientes con patología periimplantaria en presencia de inflamación y contactos supra-oclusales (Naert I y cols., 2012), no así cuando encontramos una sobrecarga oclusal sin ambiente periimplantario inflamado donde no encontramos pérdida ósea.

### Diseño de la prótesis dental

Un diseño incorrecto de la prótesis puede limitar el acceso de los instrumentos de higiene, tanto por parte del paciente como del profesional. Esto puede provocar un mayor acúmulo de placa de forma localizada, que estará asociada a un mayor riesgo de sufrir algún tipo de lesión periimplantaria.

En el año 2010, Su y cols. (Su y cols., 2010) establecieron dos conceptos que se deberían tener en cuenta para preservar los tejidos blandos periimplantarios: el contorno crítico y el contorno subcrítico. Estos autores observaron que la respuesta de los tejidos periimplantarios al contorno del pilar-corona podía variar dependiendo de la localización del cambio en el contorno. El término contorno crítico se define como el área del pilar y la corona localizado inmediatamente apical al margen gingival. Constituye los 360° de la circunferencia de la restauración y con un espesor aproximado de 1mm, sin embargo, las dimensiones exactas todavía no han sido bien delimitadas. El contorno crítico juega un papel fundamental en la estética gingival.

El contorno subcrítico está localizado desde el contorno crítico hasta la plataforma del implante. El contorno subcrítico puede ser diseñado como una superficie convexa, plana o cóncava. Las modificaciones en este contorno va a provocar respuestas diferentes en los tejidos periimplantarios. Así un contorno convexo exagerado va a producir un edema gingival, posible formación de fístula y/o recesión.

#### **2.1.4.-Características clínicas**

Las características clínicas de la enfermedad periimplantaria son:

- Formación de bolsa: si partimos de la base de que el surco periimplantario presenta una profundidad de sondaje de 3-3,5 mm en

condiciones normales, la formación de una bolsa mayor de 4 mm puede ser un signo clínico de periimplantitis.

- Sangrado al sondar: el sangrado al sondaje es un parámetro clínico de enfermedad periimplantaria.
- Movilidad: la movilidad es un signo clínico de la enfermedad periimplantaria en fase terminal y la remoción del implante es el siguiente paso a ejecutar.
- Supuración: indica infiltrado de neutrófilos y es considerado un signo de periimplantitis en fase aguda.
- Presencia de placa bacteriana: nos indica falta de higiene oral y un acúmulo de bacterias y posible invasión de estas al espacio periimplantario.
- Dolor a la palpación.
- Hiperplasia mucosa en zonas donde no hay suficiente encía queratinizada.
- Edema o enrojecimiento de los tejidos marginales.

### **2.1.5.-Epidemiología**

Estudios recientes de Roos-Jankanser y cols. (Roos-Jankanser y cols., 2006) han demostrado la existencia de periimplantitis en un 16%, mientras que Fransson y cols. (Fransson y cols., 2005) subieron este porcentaje hasta el 28%, tras 5-10 años de su colocación.

Estos datos son muy diferentes de los que manejábamos del 5-10% de Mombelli y Lang en 1998 (Mombelli y Lang, 1998) o Bragger y cols. en 2001 (Bragger y cols., 2001). Esta diferencia se debe a lo que se llama un infradiagnóstico en el pasado, provocado por el pensamiento de que una vez

osteointegrado el implante acababan nuestras complicaciones y por tanto, nuestros estudios, y cualquier observación accidental de pérdida de hueso a rayos x (Rx) se atribuía a una sobrecarga oclusal.

Sin embargo, estudios de Astrand y cols. (Astrand y cols., 2008) y Kim y cols. (Kim y cols., 2008) han demostrado una tasa de éxito del 90-95% de los implantes en un período de seguimiento de 20 años. Este porcentaje de supervivencia hace que los implantes sean uno de los tratamientos más recomendados y demandados en nuestra clínica diaria.

### **2.1.6.-Criterios de éxito de los implantes dentales**

Albrektsoon e Isidor (Albrektsoon e Isidor, 1994) en el primer workshop europeo de periodoncia condicionaron el éxito de los implantes a largo plazo siempre que estos cumplieron los siguientes requisitos:

- El implante aislado o independiente debe ser inmóvil cuando se prueba clínicamente.
- La radiografía no debe mostrar ninguna zona radiolúcida alrededor del implante.
- La pérdida de hueso debe ser inferior a 0,2 mm después del primer año de la puesta en función del implante.
- Cada implante debe estar libre de síntomas persistentes o irreversibles como dolor, infecciones, neuropatías, parestesias o lesión del conducto mandibular.

Zarb y Schmitt (Zarb y Schmitt, 1996) añadieron a estos criterios de éxito el siguiente punto:



“Los implantes deben cumplir con un objetivo y una finalidad clara de satisfacer tanto estética como funcionalmente al paciente, y que por ello se debe considerar muy seriamente el desarrollo de la prótesis que posteriormente soportan dichos implantes”.

### **2.1.7.-Factores de riesgo para la aparición de periimplantitis**

Los factores de riesgo relacionados con la preimplantitis son:

- Relación con la enfermedad periodontal.
- Consumo de hábitos tóxicos (tabaco y alcohol)
- Ausencia de encía queratinizada
- Factores genéticos.
- Presencia de enfermedades sistémicas (Diabetes Mellitus).

#### Relación con la enfermedad periodontal

Recientes estudios han demostrado relación entre la enfermedad periimplantaria y la enfermedad periodontal activa.

Ya en 1999, Watson y cols. (Watson y cols., 1999) concluyeron sus estudios en el que pacientes con enfermedad periodontal activa con implantes perdieron estos a lo largo de 4 años mientras que los pacientes sin enfermedad periodontal no perdieron ningún implante durante este tiempo. Rosenberg y cols. (Rosenberg y cols., 2004) concluyeron en un estudio de 13 años de duración, que los pacientes con enfermedad periodontal activa presentan un 25,6% de fracasos mientras que los que no presentaban enfermedad periodontal sólo un 5,4%. Mengel y cols. (Mengel y cols., 2007) observaron un 100% de éxito en pacientes sin enfermedad periodontal en un estudio de 10 años mientras baja al 83,3% en pacientes con enfermedad periodontal activa.

Los estudios de Furst y cols. (Furst y cols., 2007) también demostraron que a la media hora de la colocación del implante las bacterias que colonizaban la cavidad oral y/o la superficie de los dientes adyacentes ya se encontraban en el surco periimplantario. Por este motivo es tan importante que no exista enfermedad periodontal activa al realizar la cirugía implantológica. En este estudio concluyeron que los pacientes con surcos periodontales de más de 5 mm de profundidad, tenían más riesgo de aparición de periimplantitis.

Para el buen mantenimiento de los implantes en pacientes periodontales, Matarasso y cols. (Matarasso y cols., 2010), hablaron de la necesidad de implantar en nuestras consultas un sistema de mantenimiento para pacientes con implantes colocados, al igual que tienen los periodoncistas con sus pacientes.

#### Consumo de hábitos tóxicos (tabaco y alcohol)

Numerosos estudios han demostrado la trascendencia del consumo de tabaco en la aparición de enfermedad periodontal. Ya en 1994, Weyant (Weyant, 1994) en un estudio retrospectivo de 4 años de seguimiento sobre 598 pacientes hablaba de un aumento de complicaciones en tejido blando alrededor de los implantes en pacientes fumadores frente a no fumadores (11,9 % vs. 6,8%).

El monóxido de carbono y otros químicos producidos durante la combustión reducen el flujo capilar y pueden disminuir la velocidad de la sangre periférica en un 40%. La nicotina incrementa los niveles de adhesión plaquetaria, elevando el riesgo de micro-oclusión vascular e isquemia en los tejidos. Además fumar está asociado con la liberación de catecolaminas que producen vasoconstricción y disminuyen la perfusión del tejido.

Estudios más recientes de Roos-Jansaker y cols. (Roos-Jansaker., 2006) y Fransson y cols. (Fransson y cols., 2008) hablaron del tabaco como un

factor de riesgo para la aparición de mucositis, pérdida de hueso marginal y enfermedad periimplantaria.

Otro estudio de Klokkevold y Han (Klokkevold y Han, 2007) observaron un 78% de periimplantitis en los implantes colocados en fumadores, mientras que en no fumadores desciende al 64%, a 10-15 años de seguimiento.

El alcohol como factor de riesgo en la aparición de periimplantitis es mucho más complicado de estudiar y medir en la población. En este sentido, Galindo-Moreno y cols. (Galindo-Moreno y cols., 2005) investigaron la influencia del tabaco y el alcohol sobre la pérdida de hueso marginal en 85 pacientes tratados con 514 implantes. Estos pacientes fueron seguidos durante 3 años y se observó un aumento de pérdida de hueso marginal alrededor de los implantes en aquellos pacientes que fumaban y bebían más de 10 gr de alcohol al día.

#### Ausencia de encía queratinizada

La anchura de mucosa queratinizada se define como la distancia entre la unión mucogingival y la mucosa periimplantaria marginal libre. Ante el auge de la terapia implantaria surgió la duda de si la cantidad de mucosa queratinizada es importante para mantener la salud periimplantaria en el tiempo. Así como en dientes naturales su beneficio es conocido, en implantes dentales no se sabe con seguridad debido a las diferencias anatómicas y estructurales entre dientes e implantes. Como ya hemos comentado, en los implantes las fibras de colágeno supracrestales se orientan paralelamente y no perpendicularmente como en dientes naturales creando una unión mecánica más débil en los implantes.

Según estudios de Roos-Jansaker y cols. (Roos-Jansaker, 2006) no hay asociación entre ausencia de encía queratinizada y periimplantitis.

Bouri y cols (Bouri A Jr y cols., 2008) sí encontraron que el aumento de anchura de mucosa queratinizada alrededor de los implantes está asociado con una menor pérdida ósea periimplantaria.

Todavía existen pocos estudios y no está claro su protagonismo en la periimplantitis.

En 2013, Ling y cols (Ling y cols., 2013), demostraron la asociación entre la anchura de la mucosa queratinizada y la inflamación de los tejidos periimplantarios y el acúmulo de placa. Observaron que la anchura de tejido queratinizado  $< 2$  mm presentaba un acúmulo de placa y signos inflamatorios significativamente mayores que los implantes con una anchura de mucosa queratinizada  $\geq 2$  mm.

### Factores genéticos

Las variaciones genéticas han sido consideradas como un factor de riesgo para la periimplantitis. Polimorfismos de IL-1RN ha sido considerado como un factor de riesgo del fracaso de los implantes (Laine y cols., 2006).

Las citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina 1 (IL1) han demostrado tener un amplio espectro de respuesta que incluye la degradación de matriz extracelular. La sobreproducción de esta, ha sido implicada como un factor importante en la patogénesis y manifestación clínica de la enfermedad inflamatoria. Los polimorfismos específicos de la IL1, han sido sugeridos como determinantes genéticos de periodontitis severas (Andreiotelli y cols., 2008). Publicaciones científicas recientes han indicado que existe un aumento significativo en los niveles de IL-1, en el fluido crevicular de pacientes con lesiones de peri-implantitis avanzadas, cuando son comparadas con implantes sanos . A pesar de esto, Tonetti y cols. (Tonetti y cols., 2005) no encontraron asociación entre el genotipo de la IL-1 y la pérdida de hueso marginal (como marcador sucedáneo de peri-implantitis).

### Presencia de enfermedades sistémicas (Diabetes Mellitus)

La diabetes es una enfermedad sistémica con una gran prevalencia de enfermedad periodontal y cuya asociación con una mayor probabilidad de padecer periimplantitis todavía necesita más estudios para su afirmación (Laine y cols., 2006). Un nivel alto de glucosa puede disminuir la capacidad de reparación tisular y los mecanismos de defensa del huésped, así como la función de los neutrófilos, por lo que un buen control por parte del paciente es fundamental para un correcto mantenimiento de nuestros implantes.

Los pacientes con diabetes Tipo I tienen una secreción elevada de mediadores inflamatorios como prostaglandina E2 (PGE2) e IL1b en el fluido crevicular, comparado con sujetos sanos. Sin embargo, los pacientes diabéticos controlados presentan niveles similares a los de un paciente sano (Mombelli y Cionca, 2006).

## **2.2.- Estrés oxidativo**

### **2.2.1.-Definición**

El estrés oxidativo, término introducido por Helmut Sies (Sies, 1985), es un estado del organismo en el cual se encuentra alterado el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desequilibrio se produce por un exceso de especies reactivas del oxígeno principalmente, radicales libres y otras especies reactivas moleculares, y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes provocando un daño de forma directa o indirecta en el tejido, siendo la importancia del daño dependiente de la duración y de la naturaleza del sistema estresado.

El estrés oxidativo, o más bien el exceso de radicales libres, en relación con las defensas antioxidantes está en mayor o menor grado involucrado en la patogénesis de múltiples enfermedades y en el envejecimiento celular. La “Hipótesis de los Radicales Libres (RL) del Envejecimiento” (Harman, 1956) añade que un incremento de los RL produce un aumento del estrés oxidativo que favorecería la senescencia prematura en las células. Esta, se produciría por modificaciones oxidativas en las biomoléculas, alterando sus funciones biológicas y contribuyendo al envejecimiento prematuro y a la aparición de numerosas patologías.

Hoy en día se admite que el proceso de envejecimiento se produce bajo dos mecanismos básicos, el primero de orden genético y el segundo debido a procesos de oxidación por RL (Bast, 1991).

Para defenderse contra este ataque al correcto funcionamiento celular, los organismos han desarrollado sistemas amortiguadores antioxidantes capaces de reducir los radicales libres, las especies reactivas y los oxidantes exógenos y endógenos presentes en una cantidad excesiva y aprovechar, al mismo tiempo, los beneficios de éstas en el metabolismo oxidativo (Halliwell y cols., 1999). Estos sistemas están formados por enzimas antioxidantes, cosustratos antioxidantes y antioxidantes exógenos y endógenos que generan barreras para reducir los oxidantes y disminuir su potencia oxidativa.

Todo esto, no quiere decir que el oxígeno sea una molécula dañina para el organismo, todo lo contrario, está presente en numerosas reacciones químicas celulares necesarias para el correcto funcionamiento del mismo. De hecho, es la molécula oxidante final del metabolismo aerobio y oxidativo y está presente en todas las reacciones para obtener energía, en la proliferación celular, diferenciación, fagocitosis, metabolismo y reacciones inflamatorias.

Las especies reactivas del oxígeno, los radicales libres y otros oxidantes van a producir daños irremediables a nivel de ácido desoxirribunucleico (ADN),

carbohidratos, proteínas y lípidos con consecuencias estructurales a corto, medio o largo plazo.

Una vez controlada la agresión oxidativa se reduce la eficiencia del sistema amortiguador antioxidante para evitar gastos energéticos y sobre todo no provocar una condición reductora muy elevada en la célula que sería igual de dañina para esta. Esta producción de reactivos de oxígeno (ROS) no significa un daño al huésped si su producción es controlada por el sistema Redox y estas moléculas, estando controladas, van a tener unos efectos positivos en nuestra defensa como la movilización en el sistema de transporte iónico, el reclutamiento adicional de plaquetas en el lugar de la herida y la unión al sistema adaptativo inmune vía reclutamiento leucocitario.

### **2.2.2.-Oxidación-reducción o sistema redox**

La oxidación es la pérdida de electrones de una especie química y la reducción es la ganancia de electrones. Como los electrones ni se crean ni se destruyen, en las reacciones químicas, la oxidación y la reducción son inseparables.

Un agente oxidante es una molécula inestable en su última capa de electrones que tiene avidez por electrones de otras moléculas y reaccionan con macromoléculas (lípidos, proteínas, ác. Nucleicos y carbohidratos) que tienen electrones susceptibles de compartir. Dentro de estas especies oxidantes encontramos las especies reactivas del oxígeno y los radicales libres que no sólo tienen una alta reactividad sino que además pueden generar reacciones oxidativas en cadena.

RL y especies reactivas existen en todas las células y tejidos en baja, pero medible concentraciones. Su concentración está determinada por el balance entre los rates de producción y eliminación por varios componentes antioxidantes y enzimas.

Todos los organismos, incluidos las bacterias, presentan un sistema de señalización Redox ante agentes oxidativos, que induce repuestas ante el daño oxidativo y devuelve el original estado Redox homeostático después de un tiempo de exposición ante especies reactivas del oxígeno y radicales libres.

### **2.2.3.-Radicales libres**

La mayor parte de compuestos están formados por átomos unidos de forma covalente, compartiendo un par de electrones en un orbital molecular donde cada uno de ellos gira opuesto a su par. En las reacciones químicas estos enlaces se rompen de forma heterolíticas, haciendo que una molécula conserve los dos y la otra tenga deficiencia de dos. Estas moléculas seguirán siendo estables. En algunas reacciones químicas estos enlaces se rompen de forma homolítica donde cada uno de ellos conserva un solo electrón, quedando inestables en su última capa y con avidez para buscar otras moléculas a las que robar electrones. Así se forman los radicales libres.

Un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente. Sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, a sustraer un electrón de las moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su estabilidad. Estas moléculas se caracterizan por su alta reactividad y su baja especificidad.

Los sustratos moleculares más frecuentes incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Beckman y Ames, 1998).

En la naturaleza encontramos tres tipos de radicales libres:

- Especies reactivas del oxígeno; la mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas salvo el 2-5% que escapa a la reducción quedándose en forma monovalente y de ello



resulta la formación de radicales libres de oxígeno, que no son más que átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa. Son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al organismo mediante reacciones bioquímicas oxidación-reducción. Entre ellas encontramos al anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo e hidroperóxido.

Una pequeña descripción de la formación de las *especies reactivas del oxígeno* sería la siguiente: la reducción univalente de  $O_2$  produce el radical superóxido ( $O_2^-$ ) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio. La reacción univalente subsecuente genera el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que no es un radical libre del oxígeno pero tiene una alta capacidad oxidante por vía de la reacción Fenton, y forma el radical hidroxilo (OH) que es varias miles de veces más reactivo que el  $O_2^-$  y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres.

- Metales de transición; llegan a ser estables por sí mismos sin necesidad de reaccionar con otro elemento. La mayoría tienen electrones desapareados y pueden existir como radical libre. Fe, Mn, Co, Ni, Cu son los más importantes.
- Especies reactivas del nitrógeno (óxido nítrico o dióxido nítrico), ión hipoclorito y el radical triclorometilo son otros radicales libres presentes en la naturaleza.

El daño que puede producir una concentración exagerada de radicales libres puede ser a cuatro niveles:

#### 1.- ADN

2.- Proteínas

3.- Lípidos

4.- Carbohidratos

- ADN;

Sus alteraciones por la interacción de RL son causantes de mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas en las cromátidas y pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a la pérdida total de determinados cromosomas (Roche y cols., 1996). Los principales agentes involucrados en el daño directo son los radicales  $\text{OH}^\circ$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (de Mello Filho y cols., 1985).

El ADN mitocondrial es más influenciado a la mutación por modificaciones oxidativas de sus bases que son responsables del mal funcionamiento de los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE), principal fuente de Especies reactivas de oxígeno (ERO) mitocondrial, incrementando su producción y produciendo así un círculo vicioso (Fukui y cols., 2009).

-Proteínas;

Pueden producir la fragmentación de proteínas alterando su función, estructura, transporte y receptores.

Los radicales libres y sobre todo el radical  $\text{OH}^\circ$  son muy afines a los aminoácidos presentes en las proteínas produciendo un daño oxidativo a nivel de los aminoácidos produciendo entrecruzamientos de cadena peptídicas, fragmentación de la proteína por ruptura de enlaces peptídicos y por último, formación de grupos carbonilos que impiden el normal desarrollo de sus funciones y una alta susceptibilidad a la degradación (Stadtman, 1992).

El ataque de los RL a proteínas puede ser difuso, dando lugar a modificaciones generalizadas, o selectivo, atacando sitios específicos. A nivel

general atacan en diferentes regiones de la estructura proteica dando lugar a alteraciones estructurales, agregaciones intra o intercatenarias, fragmentación y/o desnaturalización. Un ejemplo muy frecuente puede ser el ataque a las proteínas de MDA liberado tras la lipoperoxidación (Valenzuela, 1991). Los ataques selectivos causan un daño oxidativo en el cual juegan un papel importante los metales de transición, siendo los enzimas que contienen dichos metales los que aparentemente presentan mayor riesgo de sufrirlas (Stadtman, 1992).

Las proteínas modificadas oxidativamente son eliminadas mediante proteólisis. Sin embargo, algunas proteínas oxidadas pueden presentar una mayor resistencia a ser eliminadas lo que contribuye a un acúmulo de proteínas oxidadas y a los efectos dañinos derivados de su mayor concentración. Se piensa que las proteínas parcialmente o poco oxidadas presentan una menor resistencia a la proteólisis que las que están muy oxidadas (Davies, 1987). El envejecimiento conlleva una mayor acumulación de proteínas dañadas debido a una disminución de la capacidad de degradación de las mismas y un aumento en la velocidad de oxidación de las mismas (Stadtman, 1992).

-Lípidos;

Son los más sensibles a ellos. Atacan sobre todo a los lípidos membranales provocando la permeabilidad, fluidez e integridad de las membranas. Este proceso se conoce como lipoperoxidación (Lpx) o enranciamiento oxidativo. Este proceso se considera un factor muy importante para el envejecimiento de células aerobicas (Sevenian y cols., 1985; Frankel, 1984).

La lipoperoxidación es un proceso vital para las membranas biológicas ya que actúa como regenerador sus enlaces pero su activación no controlada está relacionada con numerosas enfermedades como diabetes, fibrosis pulmonar, etc, por lo que hay que tener muy presente su papel en la aparición de las enfermedades y su evolución (Jenkins, 1988).

Conocemos tres fases en la lipoperoxidación: iniciación, propagación y terminación. La iniciación se produce cuando cualquier especie reactiva ataca o abstrae un átomo de H del doble enlace de un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) de los PUFAs generando un radical lipídico (Halliwell y cols., 1993). En la propagación, el radical lipídico tiende a estabilizarse por reordenación molecular formando un dieno conjugado que puede sufrir varias reacciones posteriores. En condiciones aeróbicas favorables reaccionan con el O<sub>2</sub> formando radicales peroxilo (ROO°). El peroxilo puede sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula vecina, la cual puede ser otro PUFA formándose así un hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical libre.

Los radicales ROO° pueden reaccionar con residuos aminoácidos de proteínas, dañando la función de enzimas y receptores de membrana u oxidar el colesterol de las membranas celulares. El grado de propagación de la cadena depende de varios factores, entre ellos la concentración de O<sub>2</sub>, la composición de los ácidos grasos, la relación de lípido-proteína y la presencia de antioxidantes. Los hidroperóxidos (ROOH) son los productos primarios de la LPx y en condiciones fisiológicas son relativamente estables pero sus grupos –OOH se encuentran localizados en medio de la cadena hidrocarbonada de PUFAs provocando una distorsión del espacio hidrofóbico y una pérdida de la función biológica de las membranas celulares (Richter, 1987). La LPx sigue propagándose llegando a la fase de terminación, donde dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables y al romperse generan adhesivos como el MDA, indicador de la LPx (Valenzuela, 1991).

Los productos finales de la lipoperoxidación son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, donde encontramos los n-Alcanales, 2-Alquenales, incluyendo dentro de estos últimos el malondeialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenales. El MDA, formado durante las últimas etapas de la ruptura de endoperóxidos durante la reestructuración intramolecular de los ácidos grasos, puede ser metabolizado a nivel celular ,

por ejemplo por la aldehído deshidrogenasa hepática, y está involucrado en el daño a la célula ya que reacciona y modifica residuos aminados de proteínas, especialmente a la lisina, ataca los grupos sulfhidrilo (-SH) y produce entrecruzamientos intra e intermoleculares con las proteínas (Valenzuela, 1991).

En la lipoperoxidación se producen los 4-hidroxi alquenos y en particular el 4-HNE (4-hidroxi nonenal), producto de la oxidación del ácido araquidónico, que es muy reactivo y reacciona rápidamente con los componentes celulares causando mutaciones en DNA y produciendo daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Esterbauer y cols., 1991).

-Carbohidratos;

Los RL pueden provocar una disminución del contenido de adenosín trifosfato (ATP) intracelular alterando la vía glucolítica, inactivando la vía GADPH y la disminución de  $\text{NAD}^+$ , y mitocondrial.

Los monosacáridos, en condiciones fisiológicas, se autooxidan y forman cetoaldehídos e intermediarios oxidantes como el radical  $\text{O}_2^\circ$  que es captado por glucosa e impide su acción sobre otras moléculas. Son productos muy reactivos y capaces de alterar la estructura espacial de las proteínas (Wolff y cols., 1987).

#### **2.2.4.-Mecanismos de defensa antioxidante**

Según Halliwell y cols. podemos definir como antioxidante a “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell y cols., 1999). Los antioxidantes al interactuar con un RL le ceden un electrón oxidándose a su vez y transformándose luego en un RL débil no tóxico

impidiendo que otras moléculas se oxiden uniéndose ellos al  $O_2$ . Su acción la ejercen en la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular, es decir, tanto en medios hidrofóbicos como hidrofílicos. Alterando su propia integridad molecular evitan alteraciones de moléculas funcionalmente vitales.

Los mecanismos de defensa antioxidante son:

A). Macromoléculas; inactivan especies reactivas y así evitan su acción. Entre ellas encontramos proteínas que acumulan o transportan metales de transición como transferrina, ceruloplasmina, o como oxígeno con la mioglobina o hemoglobina.

B). Enzimas antioxidantes; son definidas como sustancias que son capaces, a bajas concentraciones, de unirse a sustratos oxidables e inhibir o eliminar la oxidación de dichos sustratos. Presentan gran afinidad para catalizar a altas velocidades de reacción. Entre ellas encontramos la *superóxido dismutasa (SOD)* que produce la dismutación del  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , la *glutación peroxidasa (GPx)* que produce la reducción peróxido hidrógeno o lipoperóxidos y la *glutación sulfhidril transferasa (GST)* que reduce  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y catalasas, como tocoferol (vitamina E), ascorbato (vitamina C).

La catalasa (CT) se trata de una enzima intracelular ferriporfirínica localizada principalmente en peroxisomas (80%) y citosol (20%). (Nieto N, 1993). Está compuesta por 4 subunidades cada una de ellas con un grupo hemo enlazado en su centro activo. Su función es doble, ya que tanto cataliza la descomposición de peróxido en agua y oxígeno (actividad catalítica) como la oxidación de donadores de hidrógeno, como pueden ser metanol, etanol, fenoles, etc.

La superóxido dismutasa (SOD) pertenece a la familia de metaloenzimas conocida por acelerar la dismutación espontánea del radical  $O_2^\bullet$  hacia  $H_2O_2$  y  $O_2$  aumentando la velocidad 109 veces (Casado y cols., 1996). La SOD

también puede actuar como una peroxidasa capaz de utilizar el  $H_2O_2$  como reductor para formar el radical  $O_2^\circ$  (Sinet y cols., 1981). Las SODs se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos aeróbicos jugando un papel crucial en el control de los niveles de  $O_2^\circ$  siendo la primera defensa contra estos radicales (Fridovich, 1975).

La glutatión peroxidasa (GPx) formada por cuatro subunidades idénticas y donde cada una de ellas contiene un residuo de selenio-cisteína que es esencial para su actividad enzimática. Comparte sustrato con la catalasa catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos ( $ROOH$  y  $H_2O_2$ ) usando glutatión reducido (GSH) y dando lugar a la formación de glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y un producto de reducción. El GSSG, a su vez, es reducido a GSH por la glutatión reductasa (GR) en presencia de  $NADPH+H^+$  formando un ciclo redox, impidiendo que se agoten las reservas de GSH.

C). Cosustratos antioxidantes; empleados por enzimas para poder reducir parcialmente a los radicales libres y especies reactivas.

- C.1. Glutatión; tripéptido con gran facilidad de ceder electrones debido a su grupo sulfhídrico (-SH) y su potencial redox. Una vez oxidado se puede regenerar gracias a la enzima glutatión reductasa (GR) que lo reduce en la oxidación de NADPH.
- C.2. NADPH; tiene un potencial redox muy negativo y es un importante donador de electrones e hidrógenos con lo que puede pasar a su forma  $NADPH^+$  fácilmente y también es utilizado como cosustrato asociado a otras enzimas.

D). Antioxidantes endógenos; son moléculas nucleofílicas con gran afinidad y que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas. Ofrecen electrones a especies reactivas para que estas no dañen a macromoléculas. Un ejemplo sería el glutatión, NADPH, albúmina, ácido úrico, coenzima Q, bilirrubina y melatonina.

E). Antioxidantes exógenos; provienen de la dieta. Son esenciales ya que pueden prevenir la lipoperoxidación o participar en reacciones enzimáticas antioxidantes debido a que muchos actúan como cofactores de enzimas (Krinsky, 1992).

El GSH puede ser obtenido de la dieta y se encuentra prácticamente en todas las células, presentando un papel importante como antioxidante intracelular ya que reacciona directamente con los RL sin necesidad de intervención enzimática (Markovic, y cols., 2010).

Las vitamina C y E interaccionan directamente con los RL y con los radicales lipídicos haciendo de estos compuestos unos excelentes antioxidantes hidrosolubles. El  $\alpha$ -tocoferol es un componente muy importante antioxidante presente en la vitamina E. Presenta un potente antioxidante lipofílico y supresor del daño oxidativo en membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos. El ácido ascórbico es el miembro más importante dentro de la vitamina C. Es una querolactona, hidrosoluble, estructuralmente similar a la glucosa. Tiene la capacidad de poder sufrir rápidamente dos procesos oxidativos monovalentes consecutivamente con la formación del radical semidihidroascorbato como intermediario, radical relativamente no reactivo. Estas características hacen de este compuesto un excelente antioxidante hidrosoluble (Buettner y cols., 1995).

El ascorbato, es capaz de interaccionar directamente con  $O_2$ , OH, oxígeno singlete, radicales centrados en el nitrógeno y en el sulfuro y radicales lipídicos (Stadman, 1991). Otro de los efectos de la vitamina C es la de intervenir en el reciclaje de la vitamina E, reduciendo el radical  $\alpha$ -tocoperóxido y transformándolo de nuevo en  $\alpha$ -tocoferol (Weffers y cols., 1988)

La vitamina A y los carotenoides reaccionan con el radical peroxilo, radicales  $OH^\bullet$  y  $O_2^{\bullet-}$  y otras especies reactivas (Handelman, 2001). Los elementos trazas (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) están presentes en las enzimas



antioxidantes SOD, CAT, GPx y para que sean capaces de neutralizar el estrés oxidativo estas enzimas necesitarán la disponibilidad de todos estos elementos.

Estudios epidemiológicos indican que la ingesta de frutas y verduras confiere protección contra el desarrollo de las enfermedades crónicas y cancerígenas asociadas a estrés oxidativo. Éstas no sólo nos dan agentes antioxidantes sino también nos proporcionan polifenoles, antioxidantes presentes en los vegetales, que presentan propiedades atrapantes de radicales libres y quelantes para metales.

Todos estos mecanismos se encuentran enlazados en un sistema amortiguador celular donde se juntan y colaboran entre sí para hacer frente a cualquier agresión oxidativa en la célula y el organismo. Este sistema se basa, finalmente, en la oxidación de GSH y NADPH, este último esencial para reducir nuevamente al glutatión oxidado por lo que los sistemas que reducen al NADP<sup>+</sup>, regeneran al NADPH, resultan de vital importancia para mantener el flujo de electrones e hidrógenos en todo el sistema amortiguador y de esta forma estar preparado para el siguiente insulto oxidativo.

### **2.2.5.-Diagnóstico de enfermedades causadas por estrés oxidativo**

Para que una enfermedad se englobe dentro de las causadas por procesos oxidativos tiene que cumplir los siguientes requisitos:

- Daños compatibles con la oxidación.
- Identificación del agente antioxidante en el sitio de la lesión.
- Reducción del daño con otro agente.
- Que la enfermedad responda al tratamiento antioxidante.

Cada vez hay más enfermedades que tienen a la oxidación como etiología, patogenia o complicación de las mismas. Esto nos obliga a buscar nuevas vías de tratamiento recomendando agentes antioxidantes como medicina paliativa o preventiva.

### **2.2.6.-Métodos para medir el daño oxidativo**

Existen dos modos de cuantificar el daño oxidativo:

- Directo.
- Indirecto.

#### Directo

Midiendo la concentración de agentes oxidantes. Es muy difícil por su vida corta y lo costoso de los equipos.

La espectrometría de la resonancia de rotación (espín) de electrones es la única técnica analítica que mide directamente las EROs, pero su aplicación en el ser humano no es factible todavía.

Recientemente se ha desarrollado un equipo fotométrico con reactivos incluidos para medir los niveles de RLO en sangre. Esta prueba está basada en el hecho de que los metales de transición, una vez liberados de su forma quelante en plasma o intracelularmente, tienen la capacidad de catalizar reacciones tipo REDOX cuyos productos son atrapados por derivados fenólicos que resultan en la formación de una solución coloreada que puede ser medida mediante espectrofotometría (Tarpey y cols., 2004).

#### Indirecto

*A.Determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas.*

Se han desarrollado métodos para medir algunas de las EROs pero indirectamente, mediante los productos terminales de su acción oxidante sobre proteínas, ADN y lípidos (Tarpey y cols., 2004)

Aunque tenemos marcadores de ataque oxidante sobre proteínas y ADN, la peroxidación lipídica es el factor más medido cuando se trata de probar la función de los radicales libres en algún tipo de daño celular. Existen varias formas de medirlas:

- Medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico; basado en la reacción del tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), producto este del desdoblamiento de los hidroperóxidos formándose un color susceptible de ser medido directamente.
- Medición de otros aldehídos procedentes también de la lipoperoxidación: el 4 hidroxinonenal susceptible de ser medido por HPLC con detección ultravioleta.
- Medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado como etano y pentano. Son derivados de los hidroperóxidos de los ácidos grasos insaturados de las series omega-3 y omega-6. No es invasivo pero muy molesto al paciente de tomar.
- Medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación; mide la lipofuscina que es un producto de la destrucción oxidativa de los lípidos.

#### *B. Medición de la concentración de antioxidantes*

Se pueden utilizar como marcadores de la enfermedad o para el seguimiento terapéutico.

Hay una amplia gama de marcadores utilizados pero los más comercializados son los que miden antioxidantes tipo enzimáticos superóxido dismutasa y catalasa.

También se pueden medir antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas C, A y E y la ubiquinona, o enzimas reparadoras del daño al ADN como las redoxiendonucleasas (Jackson, 1999).

### *C. Medición del estado antioxidante total*

Refleja el balance dinámico entre el sistema antioxidante y prooxidante.

Es utilizado como instrumento para estimar el riesgo de daño oxidativo. Son múltiples los métodos empleados en tal medición y van desde la simple espectrofotometría, HPLC a la moderna quimioluminiscencia (Jackson, 1999).

### **2.2.7.-La saliva como mecanismo antioxidante**

La saliva es la primera barrera biológica para agentes externos que entran en nuestro cuerpo como son comida, bebida y sustancias inhaladas volátiles. Los mecanismos de protección de la saliva han ido evolucionando para combatir la penetración de bacterias, virus, hongos y agentes químicos y mecánicos.

Se piensa que el principal sistema de defensa inmunológico se basa en la secreción de IgA, aunque en la saliva también encontramos la IgA secretora, Ig M, y de enzimas antioxidantes, basadas en las enzimas lisosómicas como son lactoferrinas, mucinas, proteínas ricas prolinas e histatinas (Marcozzi, 1996; Rao y cols., 1997).

Recientemente se han incorporado a este sistema de protección antioxidante de la saliva moléculas y enzimas donde las más importantes son

el ácido úrico, el ácido ascórbico y las peroxidasas, ambas solubles en agua (Terao y cols., 1993).

Un ejemplo de cómo funciona una peroxidasa dentro del sistema de protección antioxidante es el siguiente: la lactoperoxidasa toma el ión tiocianato y el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos producidos por las bacterias orales aeróbicas, que causan estrés oxidativo, para oxidarlo y convertirlo en ión hipotiocianato y en agua, conduciendo a una actividad antimicrobiana ya que el ión hipotiocianato inhibe algunas enzimas de la glucólisis bacteriana y protege a las células y proteínas del huésped de la acción tóxica del peróxido de hidrógeno.

Según Moore y cols. (Moore y cols., 1994) el 70% de la capacidad antioxidante de la saliva depende del ácido úrico seguido en importancia por el ácido ascórbico. En ese 30% también vamos a englobar a dos enzimas de la familia de las peroxidasas con un gran peso antioxidante, la peroxidasa salivar y la myeloperoxidasa.

Estudios recientes de Liskmann y cols. (Liskmann y cols., 2007) demuestra la disminución importante de ácido úrico y ascorbato, los principales sistemas antioxidantes salivares, en pacientes con periimplantitis.

### **2.3.- Periimplantitis y estrés oxidativo**

Cada vez se le da más importancia, tanto en la patogenia como en la posible prevención o tratamiento, a la unión de los conceptos estrés oxidativo y periimplantitis. De hecho, estudios como los de Linden y cols. (Linden y cols., 2009) o Liskmann y cols. (Liskmann y cols., 2007), mostraron la relación entre la concentración de antioxidantes en saliva y suero y la aparición de enfermedad periodontal o periimplantaria.

La idea de que el aumento de estrés oxidativo es culpable de la pérdida de hueso está siendo cada vez más estudiada y es una idea bastante atractiva

para muchos investigadores. Un estudio reciente de Almeida y cols. (Almeida y cols., 2009) demostró que la formación de hueso en un ratón joven era disminuida por la inhibición de glutatión antioxidante que aumenta la oxidación lipídica y reduce la estimulación pro-osteogénica. Otro estudio como el de Lean y cols. (Lean y cols., 2003) mostró la parada de la pérdida de hueso que estaba sufriendo un ratón por la deficiencia de estrógeno administrando un antioxidante como es N-acetylcysteina. Otro estudio de Toker y cols. (Toker y cols., 2009) mostró que el mismo antioxidante, N-acetylcysteina, podía reducir la pérdida ósea en una rata con periodontitis.

Inmediatamente después de la implantación, nuestro implante es expuesto a fluidos biológicos y células; células inflamatorias, particularmente macrófagos y neutrófilos, se ponen en contacto con la superficie del implante y la activación de los macrófagos lideran la producción de ROS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en altas cantidades las cuales son importantes para el proceso de cicatrización de las heridas (Tsaryk y cols., 2007). Durante la fase de curación de la herida producida por la colocación del implante, la activación de los macrófagos y neutrófilos produce grandes cantidades de peróxidos, que terminarían en un aumento de MDA como producto final de peroxidación lipídica.

Los implantes en su mayoría están compuestos por titanio por ser un material altamente biocompatible y su superficie está recubierta con una lámina de óxido de titanio para reducir su potencial de corrosión. La fricción en su colocación o las influencias químicas del medio pueden liderar la ruptura o debilitamiento de esta capa de TiO<sub>2</sub> conduciendo a un proceso de corrosión y formación de partículas de desgaste en estas regiones (Tsaryk y cols., 2007). Debido a esta corrosión total o parcial se van a formar iones metálicos en su fase anódica y reducción de oxígeno con formación de radicales libres y peróxido de hidrógeno en su fase catódica.

La formación de ROS en la superficie del implante puede influenciar en la viabilidad y actividad celular circundante debido a que las células adheridas a la superficie del implante están sujetas a un estrés oxidativo durante el

proceso de herida en su colocación, así como las células que crecen cerca del titanio de nuestro implante que también presentan signos permanentes de estrés oxidativo y exhiben menos tolerancia contra un aumento de éste (Tsaryk y cols., 2007). Este estrés celular, según Tsaryk et al, se debe a una insuficiente difusión del oxígeno debido a una alteración profunda de la función mitocondrial celular. Esta anomalía funcional induce la producción de ROS intracelular y el agotamiento de moléculas antioxidantes como GSH.

La conclusión es que desde el primer momento de la implantación del implante se va a producir una área incluida por el titanio y las células adheridas a él altamente inestable debido a la formación de células con niveles altos de ROS en su base y a la liberación gradual de radicales libres en la interacción TiO<sub>2</sub> y peróxido de hidrógeno (Lee y col., 2005) si nuestro medio se va degradando por ataques bacterianos con el tiempo. Kilic y cols. (Kilic y cols., 2013) demuestra una disminución de la MDA a partir del quinto día de la colocación de nuestro implante con un punto crítico de máxima concentración en el tercero. Esto demuestra que el incremento de MDA en futuros períodos será debido a un aumento de estrés oxidativo que ha disminuido las defensas antioxidantes y aumentando la peroxidación lipídica y su daño celular consecuente.

Ozmen y cols. (Ozmen y cols., 2006) muestran que un mes después de la colocación de implantes en conejos existe un aumento de valores en peroxidación lipídica en los tejidos circundantes al implante y una disminución de la actividad antioxidante enzimática tanto en la catalasa, SOD como glutatión peroxidasa. Estas observaciones indican un permanente estrés oxidativo en la superficie de los implantes que llevan a un cansancio de las enzimas antioxidantes en los tejidos de alrededor.

Tsaryk y cols. (Tsaryk y cols., 2007) demostraron una concentración menor de actividad enzimática antioxidante, catalasas y SOD, y de GSH en células endoteliales en contacto con superficies de Titanio, in vitro, lo que

también demuestra un permanente estado de estrés oxidativo en estas células.

Ante un ataque bacteriano prolongado en tiempo, se va a producir una respuesta inmunológica desproporcionada que se conoce como estado inflamatorio sistémico. Los neutrófilos y macrófagos que migran al lugar de la inflamación van a producir una cantidad de radicales libres superiores a la capacidad antioxidante celular, que como ya hemos descrito anteriormente está disminuida desde el contacto con el implante, y van a dañar significativamente el tejido periimplantario (Fialkow y cols., 2007).

Este aumento de estrés oxidativo producirá altos niveles de peroxidación lipídica, peróxido de hidrógeno y daño oxidativo en ADN (Yamamoto y cols., 2010).

El aumento de la peroxidación lipídica, y por tanto un aumento de MDA (malondialdehído) y ácido nítrico, es considerado el principal factor de la inducción y progresión de la periimplantitis. Un aumento de MDA en los tejidos muestra un aumento de estrés oxidativo. Este aumento de ROS va a activar el receptor de RANKL (nuclear factor-kappa B ligando), que es una proteína de ligadura a membrana que pertenece a la familia de factor de necrosis tumoral (TNF), importantísima en la diferenciación y proliferación de osteoclastos (Mehmet Saglam y cols., 2014).

También ha sido visto en estudio in vitro en los fibroblastos que en concentraciones de peróxido de hidrógeno entre 0,12-0,4 mM se produce un detenimiento de su crecimiento, una concentración entre 0,5-1,0 mM origina muerte celular por apoptosis y entre 5,0-10 mM necrosis celular. Un aumento de peróxido de hidrógeno conlleva la liberación de LDH (lactate dehydrogenase) en ensayos de citotoxicidad. La liberación de LDH indica una ruptura de la membrana celular característica de la muerte celular por necrosis (Lee y cols., 2005). Esta disminución en la concentración o directamente la desaparición de los fibroblastos debido al aumento de estrés oxidativo,



añadido a la débil configuración estructural del complejo implante-encía por la única presencia de fibras paralelas de soporte va a producir una velocidad y una agresividad de la enfermedad periimplantaria, en casi todos los casos clínicos, imposible de detener.

La importancia del aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS), un desequilibrio en el sistema redox y una disminución de las enzimas y moléculas antioxidantes, lo cual sucede en bloque y se conoce como estrés oxidativo, tiene cada vez tiene un papel más importante en la perpetuación de la periimplantitis (Liskmann y cols., 2006), pero los mecanismos moleculares que unen el estrés oxidativo y la pérdida de hueso son complejos y todavía no totalmente entendidos.

**TESIS DOCTORAL**

**VALORACIÓN DE MARCADORES  
INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN  
GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD  
PERIIMPLANTARIA**

**JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

#### 3.1. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periimplantaria es considerada como una enfermedad inflamatoria que puede conducir a la pérdida del tejido de soporte periimplantario y como consecuencia a la pérdida del implante dental. Etiológicamente es una enfermedad multifactorial que si no es tratada precozmente, puede desencadenar el fracaso de la rehabilitación implantológica.

Numerosos estudios científicos han sugerido que una gran variedad de especies moleculares aparecen en los tejidos inflamados y por lo tanto la producción de especies reactivas (ROS) de oxígeno jugaría un papel importante en la etiología y severidad de la enfermedad periodontal. Por similitud fisiopatológica, en los últimos cinco años han sido publicados algunos estudios en los que se valoran los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo como factores que pudieran indicar el desarrollo de la enfermedad periimplantaria.

En este sentido, de igual modo que la detección de ROS, un nivel elevado de iones de hierro y cobre (los cuales catalizan la producción de la mayoría de especies libres reactivas) y la identificación de una falta de equilibrio entre la oxidación y antioxidación se han relacionado con la presencia de enfermedad periodontal, la detección de estas variables en ausencia de enfermedad periodontal podría ser un indicativo de periimplantitis que nos permitiría realizar un diagnóstico precoz de la misma.

Del mismo modo, debido a que la mieloperoxidasa (MPO) es la proteína más abundante en los neutrófilos y son los polimorfonucleares neutrófilos la primera barrera de defensa no específica, su cuantificación puede ser de ayuda para el diagnóstico precoz de la actividad inflamatoria. Además, al ser la única peroxidasa que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno y cloruro

a ácido hipocloroso, es un potente agente oxidante que se ve siempre envuelto en los mecanismos de defensa contra agentes infecciosos.

Por último la saliva es el primer medio biológico de defensa al medio externo, y es un fluido corporal con bajos niveles de MDA y MPO en condiciones de equilibrio oxidación-reducción e inflamación. La facilidad para la obtención de este fluido corporal la convierte en un fluido objeto de estudio para la detección de numerosos marcadores indicativos de salud-enfermedad a nivel local o sistémico. Si bien existen algunos estudios que analizan la concentración de MDA o MPO a nivel del fluido crevicular para la detección de enfermedad periodontal y/o periimplantaria, son necesarios estudios de series de casos con grandes muestras en los que se utilice la saliva para la detección de marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad periimplantaria, lo cual permitiría realizar un diagnóstico precoz de la periimplantitis.

### 3.2. OBJETIVOS

El **objetivo general** fue la valoración de marcadores inflamatorios y estrés oxidativo en un grupo de pacientes con enfermedad periimplantaria.

El objetivo general fue dividido en una serie de objetivos específicos que permiten responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio:

#### **Objetivos específicos:**

1. Estudiar las características periodontales y periimplantarias en pacientes con periimplantitis y compararlas con las de pacientes sin periimplantitis y las de un grupo control sin implantes dentales.
2. Valorar los niveles de MDA en saliva en pacientes con periimplantitis y compararlos con los de pacientes sin periimplantitis y los de un grupo control sin implantes dentales.

3. Analizar los niveles de MPO en saliva en pacientes con periimplantitis y compararlos con los de pacientes sin periimplantitis y los de un grupo control sin implantes dentales.

**TESIS DOCTORAL**  
**VALORACIÓN DE MARCADORES**  
**INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN**  
**GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD**  
**PERIIMPLANTARIA**

**MATERIAL Y MÉTODO**

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

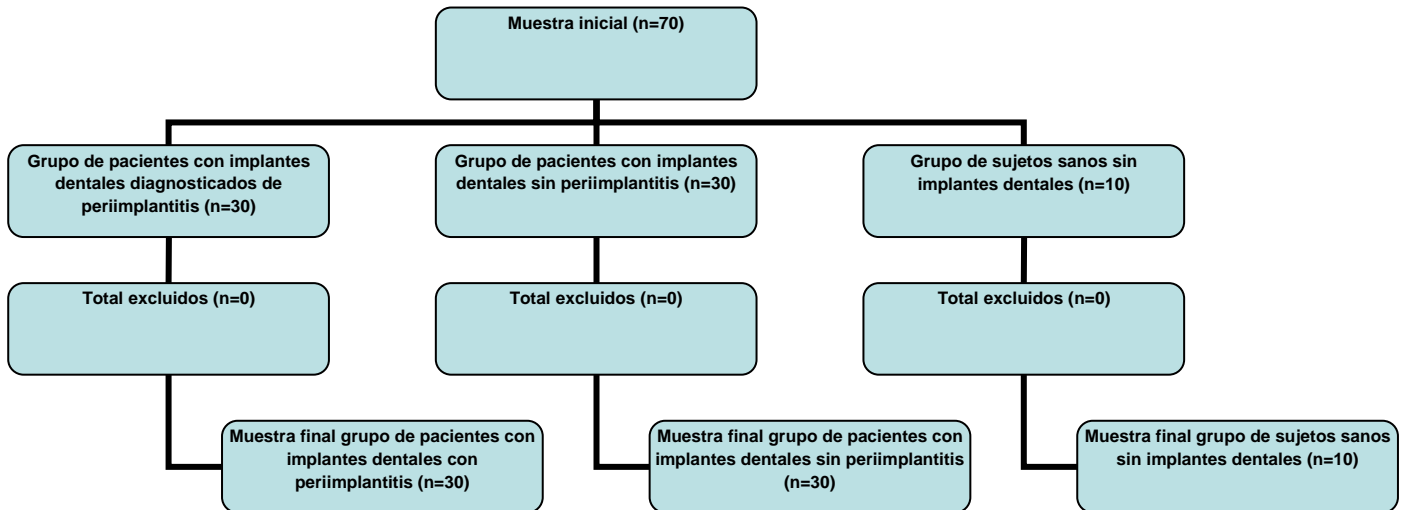
### 4.1 MATERIAL

#### **Muestra clínica**

La muestra de este estudio observacional transversal con muestra de conveniencia, estaba formada por un total de 70 unidades muestrales; 30 eran pacientes con implantes dentales diagnosticados de periimplantitis, 30 eran portadores de implantes dentales sin periimplantitis que acudieron de forma consecutiva al Máster de Cirugía e Implantología Bucal de la Universidad de Murcia (España) para una revisión de sus rehabilitaciones implantológicas y 10 fueron sujetos sanos sin implantes dentales que acudieron de forma consecutiva a la Clínica Odontológica Universitaria de la Universidad de Murcia (España) para realizarse un tratamiento dental. El estudio fue realizado durante el período de tiempo comprendido entre Enero de 2013 y Noviembre de 2014.

El estudio fue llevado a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki (Anexo 1). Todos los participantes eran voluntarios no remunerados. El estudio fue autorizado por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia (Anexo 2).

Ninguno de los pacientes invitados a participar, rehusó a ser incluido en el estudio. Por lo que la muestra final estaba formada por 70 pacientes (Diagrama 1).

**Diagrama 1:** Descripción de la muestra de estudio.

Los criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes:

Criterios de inclusión para el grupo de pacientes con implantes dentales diagnosticados de periimplantitis

- Ser portadores de implantes dentales rehabilitados protéticamente.
- Presentar al menos un implante dental con periimplantitis diagnosticada clínica y radiográficamente siguiendo los criterios del 6º workshop europeo en periodoncia (Lindhe y cols., 2008): profundidad de sondaje  $\geq 5$  mm, sangrado al sondaje como factor indicador de la pérdida de tejido de soporte (comprobado radiográficamente) y de inflamación, inflamación de la mucosa periimplantaria y posible presencia de supuración y movilidad del implante.
- No ser diagnosticado de enfermedad periodontal según los criterios del 5º workshop europeo en periodoncia (Tonetti y cols.,



2005): profundidad de sondaje >3 mm, pérdida ósea radiográfica, posible sangrado a la exploración y posible movilidad dental.

- Tener más de 18 años.
- Haber firmado el consentimiento informado.

#### Criterios de inclusión para el grupo de pacientes con implantes dentales sin periimplantitis

- Ser portadores de implantes dentales rehabilitados protéticamente.
- No presentar ningún implante con signos clínicos y/o radiográficos indicativos de periimplantitis según los criterios del 6º workshop en periodoncia (Lindhe y cols., 2008).
- No ser diagnosticado de enfermedad periodontal según los criterios del 5º workshop europeo en periodoncia (Tonetti y cols., 2005)
- Tener más de 18 años.
- Haber firmado el consentimiento informado.

#### Criterios de inclusión para el grupo de sujetos sanos sin implantes dentales

- No ser portador de implantes dentales.
- No ser diagnosticado de enfermedad periodontal según los criterios del 5º workshop europeo en periodoncia (Tonetti y cols., 2005).
- Tener más de 18 años.
- Haber firmado el consentimiento informado.

#### Criterios de exclusión para los tres grupos

- Estar diagnosticado de cualquier enfermedad inflamatoria crónica sistémica.
- Presencia de incapacidades físicas o funcionales que impidieran el registro de las variables de estudio.
- No haber firmado el consentimiento informado.
- Ingesta de suplementos dietéticos antioxidantes.

Todas las exploraciones fueron realizadas por único explorador previamente entrenado que cumplimentó el protocolo de estudio (Anexo 3).

### **Registro de variables socio-demográficas, hábitos tóxicos e historia médica**

Realizamos una historia clínica completa en la que registramos:

1. Características sociodemográficas: edad y sexo.
2. Hábitos tóxicos: consumo de tabaco y/o alcohol.
3. Presencia de enfermedades sistémicas concomitantes.
4. Consumo de medicamentos.

### **Índice de masa corporal (IMC)**

Fue calculado el IMC de cada paciente, mediante la fórmula matemática  $IMC=Kg/m^2$ .

### **VARIABLES RELACIONADAS CON LOS IMPLANTES DENTALES (GRUPOS 1 Y 2)**

Fueron registrados el número total de implantes dentales detallando las siguientes características:

- Marca comercial.
- Localización.
- Longitud y diámetro.
- Tiempo de seguimiento.

### **VARIABLES RELACIONADAS CON LAS PRÓTESIS SOBRE IMPLANTES DENTALES (GRUPOS 1 Y 2)**

Anotamos el tipo de prótesis utilizada para la rehabilitación protética de los implantes dentales:

- Prótesis fija ceramo-metálica cementada o atornillada.
- Prótesis híbridas atornilladas.
- Sobredentaduras.

### **VARIABLES DENTALES**

Se realizó un odontograma completo en cada paciente.

### **Variables clínicas periodontales y periimplantarias**

Las exploraciones periodontales y periimplantarias fueron realizadas usando un espejo bucal plano del número 5 (Hy-Friedy<sup>®</sup>, Madrid, España) y una sonda periodontal tipo OMS (PCP11 5B) (Hy-Friedy<sup>®</sup>, Madrid, España). Realizando un periodontograma completo a todos los pacientes incluidos en el estudio, las variables registradas fueron:

#### Número de dientes:

Cuantificación del número total de dientes presentes en boca.

#### Índice de sangrado:

El sangrado del surco gingival y periimplantario es el primer signo de inflamación gingival y precede tanto al enrojecimiento como a la inflamación de la encía, para su determinación (Ainamo y Bay, 1975) se comprueba si unos segundos después del sondaje, el diente sangra en cualquiera de las superficies exploradas; si es positivo, lo anotamos un diente sangrante. El índice se calcula:  $N^{\circ}$  de dientes/implantes dentales que sangran  $\times 100 / N^{\circ}$  de dientes/implantes dentales presentes en boca. El índice de sangrado debe ser 0 para que sea compatible con la salud gingival.

#### Índice gingival:

En el índice gingival de Löe y Silness se examinan los dientes 1.6, 2.1, 2.4, 3.6, 4.1 y 4.4; explorando las 4 superficies lisas de cada diente, esto suma un valor máximo posible de 24 mediciones. Para su obtención se emplea la sonda periodontal y las puntuaciones obtenidas siguen la valoración de Genco (Genco y cols., 1998):

- 0 → Ausencia de inflamación.
- 1 → Inflamación leve, leve cambio en el color y hay edema gingival. No sangra al sondaje.

- 2 → Inflamación moderada, enrojecimiento, edema e hipertrofia gingival. Sangra al sondaje (a los 10 segundos).
- 3 → Inflamación severa, marcado enrojecimiento e hipertrofia. Puede haber ulceraciones. Tiende al sangrado espontáneo.

La media del total de las mediciones efectuadas, constituye el índice gingival para toda la boca del paciente.

#### Nivel de Inserción Clínica (NIC)

Esta medida hace referencia a las fibras de tejido conectivo gingivales que se insertan al cemento radicular a través de fibras de Sharpey. Al igual que la medida de profundidad sondable, es una medida lineal más que un área de soporte periodontal, tal cual y como ocurre naturalmente. A diferencia de las fibras del ligamento, la inserción de la encía se da de forma constante a 1.07 mm (aproximadamente) coronal a la cresta ósea. Sin embargo, en algunos casos nos encontramos dientes que tienen una inserción de tejido conectivo supracrestal mucho más largo y por lo tanto una reducción en el nivel óseo sin que esto indique que sean más susceptibles a mayor pérdida de inserción.

Cálculo del NIC (Brägger y cols., 1990):

Para calcular el NIC, se realiza como indica a continuación:

- Si el margen esta coronal a la línea amelocementaria, se le resta la profundidad sondable.
- Si el margen coincide con la línea amelocementaria, el NIC es igual a la profundidad sondable.
- Si el margen esta apical a la línea amelocementaria, se suma la profundidad sondable y el margen.

#### Profundidad sondable (PS)

En todos los pacientes, realizamos la medición de la profundidad sondable para el diagnóstico de bolsas periodontales y periimplantarias, definidas como una profundización patológica del surco periodontal, ocasionada por la pérdida ósea y de inserción periodontal (Toto y Gargiulo,

1970). Anotando en cada caso el número de bolsas periodontales con profundidades sondables  $\geq 4$  mm y  $\geq 6$  mm.

### **Estudio de las características clínicas y radiológicas de los implantes dentales con periimplantitis**

Fueron registradas las siguientes variables clínicas:

- Dolor a la percusión: presencia o ausencia.
- Movilidad del implante dental: presencia o ausencia.
- Sangrado al sondaje: presencia o ausencia.
- Supuración: presencia o ausencia.
- Hiperplasia o granuloma: presencia o ausencia.

Finalmente, para el estudio cuantitativo de la pérdida ósea periimplantaria radiológica se realizaron radiografías intraorales mediante un sistema de radiología digital (RVG Model 5100, Kodak, Rochester, NY, USA) y la pérdida ósea crestral mesial, distal y total (mesial + distal/2) fue medida usando un software de análisis de imagen (ImageJ, National Institutes of Health, USA).

### **Valoración de marcadores inflamatorios y estrés oxidativo en saliva**

#### Muestras de saliva

Todas las muestras de saliva fueron recogidas entre la franja horaria de 09:00 h a 11:00 h. Se instruyó a los pacientes para que no tomaran alimentos ni bebieran durante 90 minutos antes de la obtención de las muestras.

Los pacientes se sentaron en posición de reposo mirando hacia abajo y dejaron que la saliva fuera recogida en un tubo de ensayo en el que se colocó un embudo para evitar la pérdida de saliva, hasta obtener un total de 5 mL.

Una vez obtenida la muestra, esta fue guardada en condiciones de ausencia de luz a 4° C, hasta su congelación. Este almacenaje nunca fue superior a 30 minutos.

Antes de ser congeladas, las muestras fueron centrifugadas a 2.500 g durante 10 minutos, alicuotadas y congeladas en nitrógeno líquido a -80° C durante un tiempo nunca superior a 30 días.

#### Cuantificación de Malondialdehido (MDA)

La determinación de la concentración de MDA en saliva se ha realizado utilizando el método de Wong y cols (Wong y cols., 1994).

La preparación previa de las muestras ha consistido en que una vez hemos disuelto 160 microlitos de las muestras y patrones en un tampón de tiobarbitúrico (TBA) con un pH de 6,8, lo calentamos en tubos cerrados a una temperatura de 95° durante 60 minutos. De esta forma, se producen la hidrólisis del lipoperóxido y la liberación de MDA. Después volvemos a añadir un tampón Fosfato de un pH de 6,8. Centrifugamos a 1300 g con el fin de eliminar el precipitado y añadimos a 200 microlitros de sobrenadante de las muestras y patrones, otros 200 ml de tampón pH 3,5. Mezclamos bien y medimos la muestra por HPLC.

Para ello utilizamos una bomba con un flujo de 1,2ml/min, un detector uv-vis a 532nm y una columna C-18 con 15 cm de longitud. Para estabilizar la columna y arrastrar la muestra por la columna utilizamos una fase móvil compuesta por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ph 6,8 y acetronitrilo. Después limpiamos la columna con acetronitrilo y agua a un porcentaje de 70/30 % respectivamente. Una vez se ha inyectado 100 microlitros de la muestra en la columna, nuestro pico de MDA aparece a los 3,4 minutos aproximadamente. Calculando el área de este pico y realizando una recta de regresión con las concentraciones de MDA conocidas, utilizando con patrón Malondialdehido Bis de la casa Merk nº de catálogo 8.20756.0005, obtenemos el valor de la concentración de MDA en muestras en saliva.

#### Cuantificación de Mieloperoxidasa (MPO)

La determinación de la concentración de Mieloperoxidasa (MPO) en saliva se realizó utilizando el kit comercial de la casa Immundiagnostik AG, Bensheim,

Alemania) con el título de MPO Elisa Kit cuyo número de referencia es el K 6631.

El Kit contiene una placa de un total de 96 pocillos, con anticuerpos específicos de MPO fijados en exceso en la superficie de cada pocillo. En primer lugar añadimos la muestra de suero e incubamos la placa con ligero movimiento durante una hora. Después lavamos y añadimos la enzima peroxidasa unida a un anticuerpo anti MPO e incubamos durante otra hora. De esta forma, las moléculas de MPO que se han quedado atrapadas por los anticuerpos fijados a los pocillos de la placa, serán reconocidos por este 2º anticuerpo que fijará a su vez una enzima peroxidasa al complejo. Esta será la que realice la reacción colorimétrica.

Después de esperar una hora desde que se añadió el 2º anticuerpo, lavamos de nuevo y añadimos el sustrato de la reacción que es tetrametilbenzidina (TMB). Esperamos de 10 a 20 minutos y añadimos la solución stop deteniendo la reacción. De esta forma la cantidad de color amarillo resultante será proporcional a la concentración de MPO que contenían las muestras de saliva. Después medimos las muestras y los patrones de concentraciones conocidas a (450nm) y calculamos la concentración de MPO en saliva.

## 4.2. MÉTODOS

### Diseño del estudio

El diseño de este estudio fue un estudio clínico de carácter transversal observacional para valorar la presencia de marcadores inflamatorios y estrés oxidativo en un grupo de pacientes con enfermedad periimplantaria. El planteamiento metodológico utilizado en este estudio fue la exploración clínica dental, periodontal, periimplantaria y la medición de los marcadores inflamatorios y estrés oxidativo en muestras de saliva, mediante la cual se

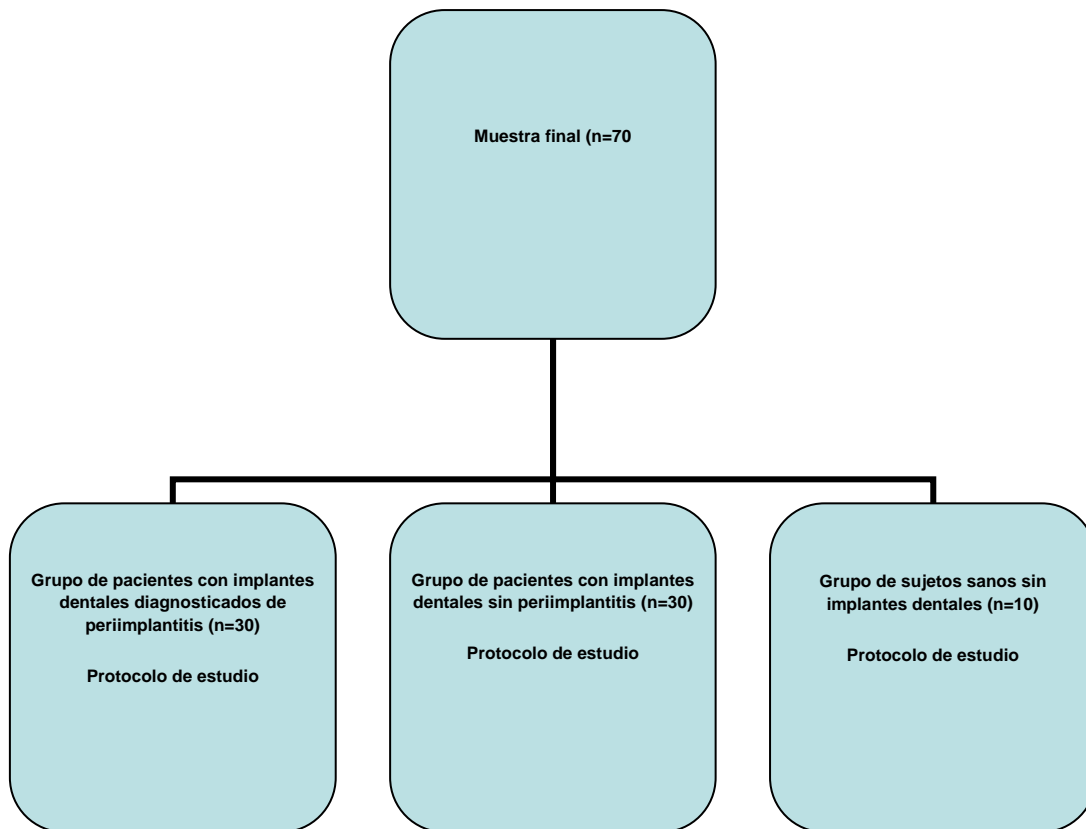
obtuvieron los datos de cada paciente tras la aceptación verbal y escrita para participar en el estudio.

A todos los pacientes se les informó que la participación en el estudio era voluntaria y que la decisión de no participar en él no afectaría a su atención odontológica dentro de la Clínica Odontológica Universitaria, y que en cualquier momento del estudio los pacientes podían revocar su consentimiento informado (Anexo 3).

La muestra final estaba compuesta por 70 pacientes; 30 con implantes dentales diagnosticados de periimplantitis, 30 eran portadores de implantes dentales sin periimplantitis que acudieron de forma consecutiva al Máster de Cirugía e Implantología Bucal de la Universidad de Murcia (España) para una revisión de sus rehabilitaciones implantológicas y 10 fueron sujetos sanos sin implantes dentales que acudieron de forma consecutiva a la Clínica Odontológica Universitaria de la Universidad de Murcia (España) para realizarse un tratamiento dental.

Todas las exploraciones bucodentales, así como el registro del resto de variables recogidas en el protocolo de estudio (Anexo 3) fueron realizadas por un mismo explorador previamente entrenado. Inicialmente se informaba al paciente del motivo del estudio, de la confidencialidad y de la protección de los datos obtenidos. Finalmente, se realizaba la presentación de la temática y finalidad del estudio y una vez que el paciente aceptaba su participación, se realizaban las exploraciones clínicas y el registro del resto de variables (Diagrama 2).



**Diagrama 2:** Diseño del estudio.

### Tratamiento estadístico

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® (versión 12.0) (SPSS® Inc., Chicago, IL, EEUU) para Windows, con el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

#### Estadística descriptiva:

En primer lugar, para el análisis descriptivo de la distribución general de la muestra, así como para el análisis de cada una de las variables (tanto en conjunto como para cada uno de los subgrupos); se han hallado valores tales como: media, desviación típica y los valores máximos y mínimos (rango).

#### Estadística inferencial:

En segundo lugar, para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar (cuando esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia), cuando la probabilidad

mínima de rechazo (el llamado “p-valor”) no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05. Para ello, se han realizado los siguientes contrastes:

1º. Estudio de las asociaciones entre las variables cuantitativas continuas:

- Test «t de Student»: Los datos cuantitativos fueron analizados con el test «t de Student» para comparar dos medias (de muestras independientes), cuando eran dos las muestras que se comparaban. Determinando en cada caso, si las varianzas eran homogéneas.
- Test «ANOVA»: para comparar medias de muestras independientes cuando eran más de dos las muestras comparadas.

2º. Estudio de las asociaciones entre las variables cualitativas:

- El estudio de las asociaciones entre las variables cualitativas, se llevó a cabo mediante la elaboración de tablas de contingencia; utilizando la prueba de  $\chi^2$  de Pearson para establecer los contrastes de hipótesis (ya que este tipo de  $\chi^2$  es la recomendada para tablas de contingencia con cualquier número de filas y columnas).

**TESIS DOCTORAL**

**VALORACIÓN DE MARCADORES  
INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN  
GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD  
PERIIMPLANTARIA**

**RESULTADOS**

## 5.- RESULTADOS

Nuestra muestra estaba formada por 70 individuos, 28 hombres (40%) y 42 mujeres (60%), con una edad media de  $61,87 \pm 6,67$  años. El grupo de pacientes con implantes diagnosticados de enfermedad periimplantaria estaba formado por 30 sujetos (42,85%), el grupo de pacientes sin periimplantitis lo componían 30 individuos (42,85%) y finalmente la muestra incluía un total de 10 sujetos sanos (14,30%) sin implantes dentales (Tabla 1).

**Table 1:** Características de la población de estudio.

Característica muestra paciente	
<b>Pacientes:</b> n	70
<b>Edad:</b> media $\pm$ SD*	61,87 $\pm$ 6,67
<b>Sexo:</b> n (%)	
Hombre	28 (40)
Mujer	42 (60)
<b>Índice masa muscular (Kg/m<sup>2</sup>):</b> media $\pm$ SD	27,21 $\pm$ 4,23
<b>Fumador:</b> n (%)	
No fumador	64 (91,42)
<10	4 (5,74)
11-20	1 (1,42)
>20	1 (1,42)
<b>Consumición alcohol:</b> n (%)	
Nunca	68 (97,16)
Diariamente	0 (0)
Bebedor fin de semana	2 (2,84)
<b>Enfermedades:</b> n (%)	
Hipertensión arterial	3 (4,28)
Hipertrofia prostática	2 (2,84)
Hipercolesteremia	3 (4,28)
Úlcera gástrica	2 (2,84)
Hiperucemia	1 (1,42)
Osteoporosis	1 (1,42)
<b>Grupos de estudio:</b> n (%)	
Pacientes con peri-implantitis	30 (42,85)
Pacientes sin peri-implantitis	30 (42,85)
Control sin implantes	10 (14,30)

<b>Número total de prótesis sobre implantes:</b> n (%)	63 (100)
Prótesis híbridas completas sobre implantes	16 (25,39)
Prótesis fijas sobre implantes	45 (71,42)
Sobredentaduras sobre implantes	2 (3,19)
<b>*SD = desviación estándar</b>	

Los 60 pacientes con implantes dentales eran portadores de un total de 223 implantes con una media de  $3,70 \pm 2,41$  (1-12) implantes por paciente. De los 223 implantes dentales, 97 (43,49%) se encontraban en el grupo de pacientes con enfermedad periimplantaria y 126 (56,51%) en el grupo de sujetos sin periimplantitis. La localización y características de dichos implantes aparece descrita en la Tabla 2.

**Table 2:** Distribución de los implantes.

Características	Total n (%)	Implantes con peri-implantitis n (%)	Implantes sin peri-implantitis n (%)
<b>Número de implantes dentales</b>	223 (100)	97 (100)	126 (100)
<b>Modelo implante dental</b>			
Lifecore® (Lifecore Biomedical, Minnesota, USA)	193 (86,54)	73 (75,25)	120 (95,23)
Biomet 3i® (Biomet 3i Dental Imerica S.L., Barcelona, Spain)	5 (2,26)	3 (3,11)	2 (1,60)
Nobel Biocare™ (Nobel Biocare, Zurich, Switzerland)	13 (5,82)	9 (9,27)	4 (3,17)
Biotech® (Biotech International, Marseille, France)	12 (5,38)	12 (12,37)	0 (0)
<b>Maxilar/Mandíbula</b>			
Maxilar	120 (53,81)	57 (58,76)	63 (50,00)
Mandíbula	103 (46,19)	40 (41,24)	63 (50,00)
<b>Anterior/Posterior</b>			
Anterior	70 (31,39)	35 (36,09)	35 (27,78)
Posterior	153 (68,61)	62 (63,91)	91 (72,22)
<b>Longitud</b>			
8 mm	12 (5,38)	6 (6,20)	6 (4,76)
10 mm	70 (31,39)	25 (25,77)	45 (35,71)
11,5 mm	122 (54,71)	48 (49,48)	74 (58,73)
13 mm	19 (8,52)	18 (18,55)	1 (0,80)
<b>Diámetro</b>			
3,30 mm <sup>2</sup>	68 (30,49)	34 (35,05)	34 (26,98)
3,75 mm <sup>2</sup>	66 (29,59)	35 (36,08)	31 (24,61)
4,00 mm <sup>2</sup>	52 (23,31)	19 (19,60)	33 (26,19)
4,50 mm <sup>2</sup>	37 (16,61)	9 (9,27)	28 (22,22)

De los 97 implantes dentales con enfermedad periimplantaria, 4 (4,12%) presentaban dolor a la percusión, 3(3,09%) tenían movilidad, los 97 (100%) mostraban sangrado al sondaje, 2 (2,06%) supuraban, en 25 (25,77%) encontramos la presencia de tejido gingival hiperplásico o granulomas. Finalmente, la pérdida ósea total en estos implantes fue de  $3,78 \pm 1,17$  mm (Tabla 3).

**Table 3:** Características de los implantes dentales con peri-implantitis.

Características	
Número de implantes dentales con peri-implantitis: n(%)	97 (100)
Seguimiento implantes con peri-implantitis (meses): media $\pm$ SD*	26,40 $\pm$ 7,97
<b>sitio:</b> n (%)	
1.1	4 (4,12)
1.2	2 (2,06)
1.3	6 (6,20)
1.4	7 (7,21)
1.5	7 (7,21)
1.6	7 (7,21)
2.1	4 (4,12)
2.2	2 (2,06)
2.3	5 (5,15)
2.4	7 (7,21)
2.6	6 (6,20)
3.3	6 (6,20)
3.4	7 (7,21)
3.5	3 (3,11)
3.6	4 (4,12)
3.7	3 (3,11)
4.3	6 (6,20)
4.4	7 (7,21)
4.5	1 (1,03)
4.6	2 (2,06)
4.7	1 (1,03)
<b>Dolor a la percusión:</b> n (%)	
Sí	4 (4,12)
No	93 (95,88)
<b>Movilidad:</b> n (%)	
Sí	3 (3,09)
No	94 (96,91)

<b>Sangrado:</b> n (%)		
Sí		97 (100)
No		0 (0)
<b>Supuración:</b> n (%)		
Sí		2 (2,06)
No		95 (97,94)
<b>Hiperplasia o granuloma:</b> n (%)		
Sí		25 (25,77)
No		72 (74,23)
<b>Pérdida ósea radiográfica (mm):</b> media $\pm$ SD		
Mesial		3,72 $\pm$ 1,27
Distal		3,85 $\pm$ 1,17
Total (mesial + distal / 2)		3,78 $\pm$ 1,17
* SD = desviación estándar		

Al comparar la homogeneidad de las muestras del grupo de pacientes con implantes dentales con enfermedad periimplantaria (n=30), el grupo de sujetos con implantes sin periimplantitis (n=30) y los individuos controles sanos sin implantes dentales (n=10), observamos que eran homogéneos respecto a la edad, el sexo, el consumo de hábitos tóxicos (tabaco y alcohol) y el IMC (Tabla 4).

**Table 4:** Homogeneidad de los grupos de estudio en terminos de características demográficas, hábitos tóxicos e índice de masa corporal (ANOVA y *Pearson's*  $\chi^2$  tests).

Características	Pacientes con peri-implantitis (n=30)	Pacientes sin peri-implantitis (n=30)	Control sin implantes (n=10)	p-valor
<b>Edad:</b> media $\pm$ SD*	63,27 $\pm$ 5,65	61,73 $\pm$ 7,01	58,10 $\pm$ 7,62	0,104
<b>Sexo:</b> n (%)				0,574
Hombre	13 (43,33)	10 (33,33)	5 (50)	
Mujer	17 (56,67)	20 (66,67)	5 (50)	
<b>Fumador:</b> n (%)				0,579
Sí	3 (10)	3 (10)	0 (0)	
No	27 (90)	27 (90)	10 (100)	
<b>Consumo Alcohol:</b> n (%)				0,253
Sí	2 (6,67)	0 (0)	0 (0)	
No	28 (93,33)	30 (100)	30 (100)	
<b>Índice masa corporal:</b> media $\pm$ SD	27,47 $\pm$ 4,05	27,52 $\pm$ 4,81	25,47 $\pm$ 2,34	0,378
* SD = desviación estándar				

Cuando comparamos las características periodontales entre los tres grupos de estudio y perimplantarias entre los grupos de pacientes portadores de implantes dentales, observamos que el tiempo de seguimiento en ambos grupos con implantes (pacientes con enfermedad periimplantaria y sujetos sin periimplantitis) fue homogéneo ( $p=0,463$ ). El menor número de dientes naturales (al comparar los tres grupos de estudio) fue observado en el grupo de pacientes con implantes con enfermedad periimplantaria ( $13,13 \pm 8,12$ ), con diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ). El índice de sangrado en dientes naturales, fue mayor en los pacientes con periimplantitis ( $35,98 \pm 30,98$ ) que en los otros dos grupos, con diferencias significativas ( $p=0,001$ ), y al comparar este índice sobre los implantes entre los dos grupos de pacientes con implantes dentales, también fue mayor en el grupo con periimplantitis ( $94,22 \pm 19,61$  Vs  $58,99 \pm 36,51$ ), observando diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ).

Al comparar el índice gingival en dientes naturales entre los tres grupos de estudio, observamos que era mayor en los pacientes portadores de implantes con periimplantitis ( $0,68 \pm 0,66$ ), con diferencias significativas ( $p=0,001$ ). Del mismo modo, al comparar este índice sobre implantes entre los dos grupos de pacientes con implantes dentales, también fue mayor en el grupo con periimplantitis ( $1,60 \pm 0,56$  Vs  $0,33 \pm 0,47$ ), observando diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ).

Respecto al nivel clínico de encía insertada, al comparar su medición en dientes naturales entre los tres grupos de estudio, observamos que fue mayor en los pacientes portadores de implantes sin periimplantitis ( $1,66 \pm 0,33$ ), sin diferencias significativas ( $p=0,187$ ). Al comparar este índice sobre implantes entre los dos grupos de pacientes con implantes dentales, fue mayor en el grupo con periimplantitis ( $2,49 \pm 0,91$  Vs  $1,39 \pm 0,52$ ), observando diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ).



Con relación a la profundidad de sondaje, al comparar su cuantificación en dientes naturales entre los tres grupos de estudio, observamos que fue mayor en los pacientes con implantes diagnosticados de periimplantitis ( $1,79 \pm 0,45$ ), sin diferencias significativas ( $p=0,136$ ). Al comparar esta medición sobre implantes entre los dos grupos de pacientes con implantes dentales, fue mayor en el grupo con periimplantitis ( $4,44 \pm 0,96$  Vs  $2,92 \pm 0,86$ ), observando diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ).

Cuando comparamos el número de bolsas  $\geq 4$  mm en dientes naturales entre los tres grupos de estudio, observamos un mayor número de este tipo de bolsas en los pacientes con implantes diagnosticados de periimplantitis ( $0,41 \pm 1,08$ ), sin diferencias significativas ( $p=0,457$ ). Al comparar esta medición sobre implantes entre los dos grupos de pacientes con implantes dentales, fue mayor en el grupo con periimplantitis ( $5,03 \pm 4,21$  Vs  $1,27 \pm 2,57$ ), observando diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ).

Al comparar el número de bolsas  $\geq 6$  mm en dientes naturales entre los tres grupos de estudio, sólo observamos este tipo de bolsas en los pacientes con implantes diagnosticados de periimplantitis ( $0,11 \pm 0,41$ ) sin diferencias significativas ( $p=0,285$ ). Cuando comparamos esta medición sobre implantes entre los dos grupos de pacientes con implantes dentales, fue mayor en el grupo con periimplantitis ( $2,13 \pm 2,98$ , Vs  $0,10 \pm 0,41$ ), observando diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ).

Finalmente, al comparar la pérdida ósea mesial, distal y total (mesial + distal/2) entre los dos grupos de pacientes con implantes dentales, tanto la mesial ( $3,18 \pm 1,35$ ), distal ( $3,27 \pm 1,27$ ), como la total ( $3,22 \pm 1,27$ ) fueron mayores en el grupo con periimplantitis, observando diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,001$  en las tres variables) (Tabla 5).

**Table 5:** Características periodontales /periimplantaria de grupo de estudio (ANOVA y *Student t tests*).

Características periodontales	Pacientes con peri-implantitis (n=30)	Pacientes sin peri-implantitis (n=30)	Control sin implantes (n=10)	p-valor
<b>Número de dientes:</b> media $\pm$ SD*	13,13 $\pm$ 8,12	22,47 $\pm$ 5,87	26,70 $\pm$ 1,94	<0,001
<b>Número de implantes colocados:</b> media $\pm$ SD	4,70 $\pm$ 2,29	2,70 $\pm$ 2,11	-----	0,001
<b>Seguimiento de implantes (meses):</b> media $\pm$ SD	82,40 $\pm$ 19,61	86,00 $\pm$ 18,12	-----	0,463
<b>Índice sangrado:</b> media $\pm$ SD				
Dientes naturales	35,98 $\pm$ 30,98	24,22 $\pm$ 24,18	0,00 $\pm$ 0,00	0,001
Implantes dentales	94,22 $\pm$ 19,61	58,99 $\pm$ 36,51	-----	<0,001
<b>Índice gingival:</b> media $\pm$ SD				
Diente natural	0,68 $\pm$ 0,66	0,13 $\pm$ 0,35	0,40 $\pm$ 0,51	0,001
Implantes dentales	1,60 $\pm$ 0,56	0,33 $\pm$ 0,47	-----	<0,001
<b>CAL** (mm):</b> media $\pm$ SD				
Diente natural	1,45 $\pm$ 0,64	1,66 $\pm$ 0,33	1,12 $\pm$ 0,38	<0,187
Implantes dentales	2,49 $\pm$ 0,91	1,39 $\pm$ 0,52	-----	<0,001
<b>PD*** (mm):</b> media $\pm$ SD				
Diente natural	1,79 $\pm$ 0,45	1,65 $\pm$ 0,43	1,49 $\pm$ 0,29	0,136
Implantes dentales	4,44 $\pm$ 0,96	2,92 $\pm$ 0,86	-----	<0,001
<b>Profundidad de surco <math>\geq</math> 4 mm:</b> media $\pm$ SD				
Diente natural	0,41 $\pm$ 1,08	0,28 $\pm$ 0,84	0,00 $\pm$ 0,00	0,457
Implantes dentales	5,03 $\pm$ 4,21	1,27 $\pm$ 2,57	-----	<0,001
<b>Profundidad de surco <math>\geq</math> 6 mm:</b> media $\pm$ SD				
Diente natural	0,11 $\pm$ 0,41	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,285
Implantes dentales	2,13 $\pm$ 2,98	0,10 $\pm$ 0,41	-----	<0,001
<b>Pérdida ósea radiográfica (mm):</b> media $\pm$ SD				
Mesial	3,18 $\pm$ 1,35	1,45 $\pm$ 0,51	-----	<0,001
Distal	3,27 $\pm$ 1,27	1,44 $\pm$ 0,53	-----	<0,001
Total (mesial + distal / 2)	3,22 $\pm$ 1,27	1,44 $\pm$ 0,51	-----	<0,001

\* SD = desviación estándar; \*\* CAL = nivel inserción clínica; \*\*\* PD = profundidad sondaje

Por último, al comparar los niveles de MDA en saliva en  $\mu$ M/l entre los tres grupos de estudio, observamos mayor concentración de MDA en el grupo de pacientes portadores de implantes con periimplantitis ( $0,52 \pm 0,37$ ), sin diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,442$ ). Del mismo modo, los niveles de MPO en saliva en ng/ml, también fueron mayores en el grupo de pacientes portadores de implantes con periimplantitis ( $12,32 \pm 2,17$ ), sin diferencias estadísticamente significativas.

**Table 6:** Comparación de concentración de saliva de malondialdehido (MDA) y mieloperoxidasa (MPO) entre grupos de estudio (ANOVA test).

Estrés oxidativo	Pacientes con peri-implantitis (n=30) media $\pm$ SD*	Pacientes sin peri-implantitis (n=30) media $\pm$ SD	Control sin implantes (n=10) media $\pm$ SD	p-valor
MDA salivar ( $\mu$ M/l)	0,52 $\pm$ 0,37	0,40 $\pm$ 0,16	0,41 $\pm$ 0,79	0,442
MPO salivar (ng/ml)	12,32 $\pm$ 2,17	11,54 $\pm$ 2,80	11,86 $\pm$ 2,67	0,584
* SD = desviación estándar				

**TESIS DOCTORAL**  
**VALORACIÓN DE MARCADORES**  
**INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN**  
**GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD**  
**PERIIMPLANTARIA**

**DISCUSIÓN**

## 6.- DISCUSIÓN

El objetivo del siguiente trabajo es conocer si los pacientes portadores de implantes con periimplantitis tienen mayor concentración en saliva total de MDA y MPO, considerados dos importantes marcadores de estrés oxidativo, y compararlo con muestras salivales de pacientes que no padecen periimplantitis.

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo para conocer la concentración en saliva total de MDA como subproducto de lipoperoxidación lipídica y concentración de Mieloperoxidasa, como biomarcador de estrés oxidativo e inflamación en un grupo de 30 pacientes con periimplantitis, comparándolo con 30 pacientes portadores de implantes sanos y a su vez con 10 pacientes sin implantes y boca sin patología. Los pacientes con periimplantitis presentaron similares concentraciones de MDA y MPO en saliva total que los pacientes sin periimplantitis.

La periimplantitis se define como una enfermedad de origen bacteriano que combina una inflamación de la mucosa y una pérdida de hueso de soporte de los implantes dentales (Albrektsson e Isidor, 1994).

Es un término colectivo que designa las reacciones inflamatorias que se producen en los tejidos que rodean un implante. Tras la correcta osteointegración de un implante, la enfermedad periimplantaria es el resultado de un mal balance entre la carga bacteriana y la respuesta del huésped (Zitmann y Berglundh, 2008). Así pues, la enfermedad peri-implantaria es una enfermedad inflamatoria de carácter infeccioso, La mucositis describe una lesión inflamatoria que reside en la mucosa, mientras que periimplantitis también afecta a la hueso de soporte (Lindhe y Meyle, 2008).

Estudio de Roos-Jankanser y cols. (Roos-Jankanser y cols., 2006) mostraron una prevalencia de periimplantitis en un 16%, mientras que Fransson y cols. (Fransson y cols., 2005) subieron este porcentaje hasta el

28%, tras 5-10 años de su colocación.

Las moléculas oxidantes, además de lípidos interaccionan con otras muchas biomoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas, a menudo dañando irreversiblemente el delicado mecanismo implicado en la funcionalidad celular (Leuratti y cols., 1999).

Los polimorfonucleares neutrofilos constituyen la primera línea de defensa inespecífica. La mieloperoxidasa es la proteína más abundante en los neutrófilos y es la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrogeno y cloruro a ácido hipocloroso. Este es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos; sin embargo, puede ser capaz de actuar sobre las células del huesped en caso de activación incontrolable o excesiva e inactivar factores humorales (Bradley y cols., 1982). Dado el amplio espectro de reactividad, el ácido hipocloroso es un mediador de en numerosos procesos inflamatorios. Por lo tanto la MPO está involucrado en la homeostasis celular y juega un papel importante en la iniciación y agravamiento de procesos inflamatorios agudos y crónicos (van der Veen BS y cols., 2009).

El incremento de la actividad de la MPO en los distintos procesos patológicos, está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo, como en el caso de las enfermedades infecciosas (generales o locales), las enfermedades inflamatorias, como artritis reumatoidea, síndrome de sögren, Lupus eritematoso y otras condiciones inflamatorias, se considera un biomarcador de estrés oxidativo e inflamación (Tsimikas, 2006; Wang y cols., En prensa).

Numerosos estudios sugieren que los radicales libres derivados del oxígeno y sus productos desempeñan un papel importante en la etiología y severidad de la la periodontitis y/o la periimplantitis. Parece puede existir una relación lineal entre estrés oxidativo, enfermedad periodontal y enfermedad sistémica. Según una revisión realizada por Waddington y cols. (Waddington y cols., 2000). Los acontecimientos patológicos que conducen a la destrucción

del periodonto durante las enfermedades periodontales inflamatorias representan las interacciones complejas que implican un desequilibrio en los mecanismos de degradación enzimáticos y no enzimáticos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), derivan de diversas fuentes metabólicas. En la patogénesis de la enfermedad periodontal ROS se generan predominantemente por leucocitos polimorfonucleares (PMN) durante una respuesta inflamatoria y son considerados como altamente destructivas. En estudios in vitro han demostrado que las ROS son capaces de degradar un número de componentes de la matriz extracelular incluyendo proteoglicanos, lo que resulta en la modificación de grupos funcionales de aminoácidos, lo que lleva a la fragmentación de la proteína del núcleo, mientras que las cadenas de glicosaminoglicanos constituyentes sufren despolimerización. La identificación y caracterización de algunos de algunos metabolitos presentes en tejido conectivo y en el fluido crevicular gingival resultante de la degradación de los tejidos periodontales, el hueso alveolar en particular, proporciona evidencia adicional para un papel de ROS en la destrucción del tejido asociada a enfermedades periodontales.

Liskmann y cols. (Liskmann y cols., 2004) llevó a cabo un estudio para relacionar la concentración de MPO en surco crevicular con los clásicos índices clínicos periodontales o periimplantarios. El estudio se llevó a cabo sobre 24 pacientes (9 hombres y 15 mujeres) con 64 implantes. Se compararon las concentraciones de MPO en surcos de implantes con inflamación y sin inflamación. Se obtuvieron mayores niveles de MPO en surco crevicular de implantes con inflamación que sin inflamación. Hubo correlación de los valores de MDA con las variables periodontales medidas (profundidad de sondaje, índice gingival).

Güncü y cols. (Güncü y cols., 2008) estudiaron el impacto de la inflamación y la carga inmediata sobre la concentración de MPO en surco periimplantario. Encontraron mayores niveles de MPO en áreas inflamadas de implantes y dientes. No hubo relación con la carga inmediata o tardía. Concluyeron que altos niveles de MPO en surco periimplantario se pueden

considerar como marcadores tempranos de enfermedad periimplantaria. Exponiendo este marcador como nueva herramienta de detección precoz de la periimplantitis.

La mayoría de estudios de estrés oxidativo están realizados en enfermedad periodontal. La etiología y los mecanismos patogénicos de la periodontitis son los mismos que la periimplantitis (Lindhe y Meyle, 2008). Son muy escasos en la literatura científica los estudios de estrés oxidativo en pacientes con periimplantitis (Linksmann y cols., 2004; Linksmann y cols., 2006; Linksmann y cols., 2007; Günkü y cols., 2008; Tözüm y cols., 2007).

La implicación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la patología periodontal ha sido estudiada en las últimas décadas (Henry y cols., 1984; Shapira y cols., 1991) varios estudios han demostrado que la periodontitis se asocia a polimorfonucleares activados funcionalmente exhibiendo el aumento de la producción de ROS. El estudio de Sculley y Langley-Evans (Sculley y Langley-Evans, 2002) indicaron que los sujetos con peor estado de salud periodontal tendían a tener un mayor daño oxidativo. Soory (Soory, 2009) afirmaron que un aumento en ROS puede inducir un estado de hiperinflamación en las forma agresivas del periodontitis que conduce a un desequilibrio del estado redox, que resulta en un daño celular (Sorry, 2009). Esto es totalmente coherente con la hipótesis que hay una mayor daño mediado por ROS a los tejidos en estados avanzados de la enfermedad periodontal (Sculley y Langley-Evans, 2002). Es probable que los procesos oxidativos juegan un papel causal en la etiología de la periodontitis, pero es más probable que contribuyan en la progresión de la enfermedad. Además, según algunos estudios como el de Hendek y cols. (Hendeck y cols., 2014), los niveles de marcadores de estrés oxidativo como la 8-hydroxydeoxyguanosine en periodontitis, se redujeron en saliva y fluido crevicular después de tratar la enfermedad periodontal tanto en fumadores como en no fumadores. En la mayoría de estudios realizados sobre los niveles de marcadores de estrés oxidativos en enfermedad periodontal, las mediciones de estos biomarcadores se hacen de muestras tomadas directamente del surco crevicular de los dientes



afectados. El estudio de los componentes biológicos del sulco periimplantario se está empezando a considerar parte fundamental e imprescindible para un correcto diagnóstico de la presencia de enfermedad periimplantaria como método de evaluar su estadio y velocidad de progresión. Así, según Liskmann y cols. (Liskmann y cols., 2006) la detección de productos de oxidación, la elevación de iones hierro y cobre, los cuales catalizan la producción de las especies más reactivas de radicales libres, y la identificación de un imbalance en la actividad oxidante/antioxidante dentro de las bolsas periodontales, sugieren un importante rol de ROS en la destrucción de tejido periodontal.

Linksmann y cols. (Liskmann y cols., 2007), buscó niveles de sustancias antioxidantes en pacientes con periimplantitis. 30 pacientes jóvenes (14 hombres, 16 mujeres) con sobredentaduras implantosoportadas. Se midieron variables bioquímicas y clínicas; nivel de urato, ascorbato, MPO en saliva total, estado antioxidante total, profundidad de sondaje, índice gingival e índice de sangrado. Los niveles antioxidantes totales, ascorbato y urato en saliva total están disminuidos en pacientes con periimplantitis. Esto le sugirió que existe un exceso de estrés oxidativo, lo cual puede contribuir a ser un factor importante de destrucción del tejido periimplantario. Por lo que la formación de estos productos está implicada en los mecanismos patogénicos de la periimplantitis. En el tratamiento de este cuadro inflamatorio crónico debería estar incluido a parte de la terapia mecánica y química local, la suplementación con antioxidantes.

Un estudio reciente de Borges reportó un aumento en la actividad mieloperoxidasa en fluido crevicular de pacientes con periodontitis crónica en comparación con controles (Borjes y cols., 2007). Además hablamos de una enfermedad que suele afectar a todos los dientes, lo que podría aumentar considerablemente los niveles de los marcadores estrés oxidativo supuestamente sería más elevados en saliva total (D'Aiuto y cols., 2010).

En la periimplantitis puede existir desde un implante afectado en una boca sin periodontitis, hasta una boca sin dientes con una rehabilitación de más

de 10 implantes estando todos afectados por periimplantitis, los pacientes de nuestro estudio tenían una media de 4,70 implantes con periimplantitis en boca. Esta condición no provocó aumento en los niveles de MPO Y MDA en saliva total. Nuestro objetivo fue conocer si la periimplantitis puede aumentar los niveles de estrés oxidativo en saliva total. La mayoría de trabajos publicados realizan las mediciones directamente del surco de los implantes afectados. De ahí las altas concentraciones obtenidas por estos autores. Por lo que podemos, considerar que la presencia de periimplantitis en pacientes con una media de 4 implantes como una enfermedad autolimitada y local sin repercusión sistémica en lo que refiere a estrés oxidativo e inflamación y sus consecuencias sistémicas teniendo su origen en la inflamación periimplantaria (D'Aiuto y cols., 2010). Ya que los resultados de MDA y MPO son en saliva total, No es un resultado puntual de cada implante/diente. En estudios donde se ha medido concentración de biomarcadores de estrés oxidativo en saliva total como el de Linkman y cols. (Linkman y cols., 2004), obtiene mayores niveles de MPO en pacientes con periimplantitis o Güliz y cols. (Güliz y cols., 2008) no sólo nos encontramos con una medición en el sulco sino que además intentó hacerlo mediante un protocolo de aislamiento del sulco y el resto de la boca. Antes de la medición en el sulco eliminaban la placa supragingival y secaban con un algodón estéril y aire la zona para intentar que se comportara como una entidad independiente al resto de la boca. Sus resultados demostraron una diferencia significativa en los valores de MPO entre pacientes con enfermedad periimplantaria y pacientes con implantes sin enfermedad.

Akalin y cols. (Akalin y cols., 2007) realizaron un estudio sobre 36 pacientes con enfermedad periodontal y lo compararon con 28 otros controles sanos. Evaluaron variables clínicas periodontales y tomaron muestras de fluido crevicular, saliva total y suero. MDA fue medido por cromatografía líquida, la oxidación total se midió por método de colorimetría automática. El MDA en fluido crevicular, y la oxidación total en fluido crevicular, saliva total y suero fueron superiores para el grupo de enfermedad periodontal ( $p < 0.05$ ). MDA en suero y saliva total fue normal ( $p > 0.05$ ). Lo que concluye, los productos de la

peroxidación lipídica están aumentados en la enfermedad periodontal. Estos productos pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Tsai y cols., 2005; Panjamurthy y cols., 2005).

El resto de trabajos publicados miden MPO en surco periimplantario dando cifras elevadas con respecto a implantes sanos (Linkman y cols., 2004; Günkü y cols., 2008; Tözüm y cols., 2007). No existen precedentes en la literatura de estudios que midan MDA en pacientes con periimplantitis. A pesar de ser la molécula más importante y frecuentemente estudiada como marcador de oxidación lipídica. El MDA es el subproducto de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Del Rio y cols., 2005). En cambio si ha sido producto de estudio en pacientes con enfermedad periodontal, encontrando concentraciones altas en fluido crevicular de dientes periodontales (Alkalin y cols., 2007; Wei y cols., 2010).

Nuestros resultados pueden sugerir que los niveles de estrés oxidativo en saliva total al ser bajos, la periimplantitis podría no estar involucrada en procesos patológicos sistémicos recientemente relacionados con la periodontitis, como consecuencia entre otras del aumento del riesgo de algunas enfermedades crónicas como la enfermedad cardiovascular y la diabetes (Pihlstrom y cols., 2005). Ya que según algunos estudios parece existe una relación lineal entre la periodontitis, inflamación sistémica y estrés oxidativo sistémico (D'Aiuto y cols., 2010). Con los niveles de MDA y MPO obtenidos en nuestro estudio en saliva total no podríamos confirmar esta teoría asociativa entre la periimplantitis, estrés oxidativo y algunas enfermedades sistémicas.

Debemos afirmar que los pacientes portadores de 4-5 implantes con periimplantitis dentales en una boca sin enfermedad periodontal, no presentan altas concentraciones de MDA y MPO en saliva, lo que supondría que la periimplantitis no genera daño oxidativo cuantificable en saliva total. Estudios longitudinales en pacientes con mas número de implantes afectados con periodontitis serían interesantes para confirmar si la periimplantitis produce aumento de biomarcadores de estrés oxidativo en saliva total.

**TESIS DOCTORAL**  
**VALORACIÓN DE MARCADORES**  
**INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN**  
**GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD**  
**PERIIMPLANTARIA**

**CONCLUSIONES**

## 7.- CONCLUSIONES

1. Respecto a las características periodontales, los pacientes portadores de de implantes con periimplantitis mostraron un menor número de dientes y mayor índice de sangrado, índice gingival, nivel clínico de encía insertada y profundidad de sondaje que los pacientes con implantes sin enfermedad periimplantaria y los sujetos sanos sin implantes dentales, con diferencias estadísticamente significativas en todas las variables excepto para la profundidad de sondaje. En relación a las características periimplantaria, los pacientes portadores de implantes con periimplantitis mostraron un mayor índice de sangrado, índice gingival, nivel clínico de encía insertada, profundidad de sondaje y pérdida ósea radiográfica que los pacientes con implantes sin enfermedad periimplantaria, con diferencias estadísticamente significativas.
2. Los niveles de MDA en saliva en pacientes portadores de implantes dentales con enfermedad peridontal, fueron más elevados que los obtenidos en sujetos con implantes dentales sin periimplantitis e individuos sanos sin implantes, aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas.
3. La concentración salival de MPO en pacientes portadores de implantes dentales con enfermedad peridontal, fue más elevada que la obtenida en sujetos con implantes dentales sin periimplantitis e individuos sanos sin implantes, aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas.

**TESIS DOCTORAL**

**VALORACIÓN DE MARCADORES  
INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN  
GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD  
PERIIMPLANTARIA**

**BIBLIOGRAFÍA**

---

## 8.- BIBLIOGRAFÍA

1. Ainamo J, Bay Y. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent* 1975; 25:229-33.
2. Albrektsson T, Isidor F. Consensus report: implant therapy in Berlin. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. Quintessence 1994; 25:365-69.
3. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implantsurfaces: Part 1- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses tothem. *Int J Prosthodont* 2004; 17:536-43.
4. Alkalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periondotitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34:558-65.
5. Almeida M, Ambrogini E, Han L, Manolagas SC, Jilka RL. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic.Wnt signaling in the skeleton. *J Biol Chemistry* 2009; 284: 27438-48.
6. Andreiotelli M, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Relationship between interleukin-1 genotype and peri-implantitis: a literature review. *Quintessence Int* 2008; 39: 289-98.
7. Arano J, Giner L. La interfase de conexión implantaría en el espacio crevicular. *Ajustes protésicos de los materiales. Parte 1. Periodoncia* 2001; 11: 291-302.
8. Astrand P, Ahlquist P, Gunne J, Nilson H. Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008; 10:207-17.
9. Astrand P, Anzen B, Karlsson U, Sahlhom S ,Svårdström P, Hellem S. Non submerged implants in the treatment of the edentulus upper jaw. A prospective clinical and radiographic study of ITI Implants results after 1 year. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; 2:166-74.
10. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*, 1991; 91:25-135.

11. Becker W, Becker BE, Ricci A, Bahat O, Rosenberg E, Rose LF, Handelsman M, Israelson H. A prospective multicenter clinical trial comparing one- and two-stage titanium screw fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; 2:159-65.
12. Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854:118-27.
13. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomson P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res* 1991; 2:81-90.
14. Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions?. *J. Clin Periodontol* 2011; 38:188-202.
15. Borges I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Fröde TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2007 ;2007:45794.
16. Bouri A Jr, Bissada N, Al-Zahrani MS, Faddoul F, Nouneh I. Width of keratinized gingival and the health status of the supporting tissues around dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 23:323-36.
17. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of Cutaneous Inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206-09.
18. Brägger U, Aeschlimann S, Bürgin W, Hämmerle CH, Lang NP. (2001) Biological and technical complications and failures with fixed partial dentures (FPD) on implants and teeth after four to five years of function. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12: 26-34.
19. Brägger U, Nyman S, Lang NP, von Wyttenbach T, Salvi G, Schürch E Jr. The significance of alveolar bone in periodontal disease. A long-term observation in patients with cleft lip, alveolus and palate. *J Clin Periodontol* 1990; 17:379-84.
20. Branemark PL, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experiences from a 10 years period. *Scand J Plast Reconst Surg* 1977; 16:1-132.
21. Buettner GR, Jurkiewicz BA. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. *Handbook of Antioxidants*. New York: Marcel Dekkerç 1995:91-115.



22. Canullo L, Giampiero RS, Lanello G, Jepsen S. Platform Switching and marginal bone level alterations: the results of a randomized-controlled trial. *Clin Oral Implants Res* 2009; 21:115-21.
23. Casado JA, Merino J, Cid J, Subirá ML, Sánchez-Ibarrola A. Oxidizing agents and free radicals in biomedicine. *Rev Med Univ Navarra* 1996; 40:31-40.
24. Charalampakis G, Leonhardt A, Rabe P, Dahlén G. Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study. *Clin Oral Implants Res* 2011; 23:1045-54.
25. Chung DM, Oh TJ, Lee J, Misch CE, Wang HL. Factors affecting late implant bone loss: a retrospective analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22:117-26.
26. Cigdem k, Emine G, Gülec P, Füsün A, Seda M, Sari k, Sule CC. Investigation of the effects of local glutathione and chitosan administration on incisal oral mucosal wound healing in rabbits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 112:449-507.
27. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987; 262:9895-901.
28. De Boever AL, De Boever JA. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:8-17.
29. De Mello Filho AC, Meneghini R. Protection of mammalian cells by ophenanthroline from letal and DNA-damaging effects produced by active oxygen-species. *Biochim Biophys Acta* 1985; 847:82-89.
30. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15:316-28.
31. Durrani F, Singh R. Myeloperoxidasa level around dental implants as an indicator of an inflammatory process. *Indian J Dent* 2015; 6:2-6.
32. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Den Res* 2010; 89:1241-46.

- 
33. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Bio Med* 1991; 11:81-128.
  34. Etter TH, Hankanson I, Lang NP, Trejo PM, Caffesse RG. Healing after standardized clinical probing of the periimplant soft tissue seal: a histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13:571-80.
  35. Farronato D, Santoro G, Canullo L, Botticelli D, Maiorana C, Lang NP. Establishment of the epithelial attachment and connective tissue adaptation to implants installed under the concept of "platform switching": a histologic study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23:90-94.
  36. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007; 42:153-64.
  37. Frankel EN. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog Lipid Res* 1984; 23:197-221.
  38. Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T. Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:440-46.
  39. Fransson C, Wennstrom J, Berglundh T. Clinical characteristics of implants with a history of progressive bone loss. *Clin Oral Implants Res* 2008; 16:579-86.
  40. Fridovich, I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.
  41. Fukui H, Moraes CT. Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Hum Mol Genet* 2009; 18:1028-36.
  42. Fürst MM., Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:501-08.
  43. Galindo-Moreno P, Fauri M, Avila-Ortiz G, Fernández-Barbero JE, Cabrera-León A, Sánchez-Fernández E. Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:579-86.

44. Gardner DM. Platform swichting as a means to achieving implant aesthetics. NY State Dent J 2005; 71:34-37.
45. Genco CA, Van Dyke T, Amar S. Animal models for Porphyromonas gingivalis mediated periodontal disease. Trends Microbiol 1998; 6:444-49.
46. Groessner-Schreiber B, Hanning M, Duck A, Griepentrog M, Wenderoth DF, Ott SJ. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. Clin Oral Implants Res 2009 ;20:817-26.
47. Güliz N, Güncü GN, Tolga F, Tözüm TF, Yamalik N, Tümer C, Karabulut E, Kilinc K. Myeloperoxidasa as a measure of polymorphonuclear leukocyte response in inflammatory status around immediately and delayed loaded dental implants: A randomized controlled clinical trial. Clin Implant Dent Relat Res 2008; 10:30-9.
48. Güncü GN, Tözüm TF, Güncü MB, Yamalik N, Tümer C, Karabulut E, Kilinc K. Myeloperoxidase as a measure of polymorphonuclear leulocyte response in inflammatory status around immediately and delayed loaded dental implants: a randomized controlled clinical trial. Clin Implant Den Relat Res 2008; 10:30-39.
49. Halliwell BG, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Oxford 1999. Third edition.
50. Halliwell BG, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? J Lab Clin Med 1992; 119:598-620.
51. Handelman GJ. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. Nutrion 2001; 17:818-22.
52. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 1956; 11:298-300.
53. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implantdiseases: diagnosis and risk indicators. Clin Oral Implants Res 2008; 35:292-304.
54. Hendek Mk, Erdemir EO, Kisa U, Ozcan G. Effect of Initial periodontal therapy on the oxidative stress markers in gingival crevicular fluid, saliva and serum in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. J Periodontol 2014; 17:1-17.

- 
55. Henry CA, Winfold TE, Laohapund P, Yotnuengnit P. Neutrophil chemiluminescence and opsonic activities of young people with periodontitis in Thailand. *Arch Oral Biol* 1984; 29:623-27.
56. Hertmann JS, Buser D, Schenk RK, Schodiold JD, Cochran DL. Biologic width around one and two piece titanium implants. *Clin Implant Den Res* 2001; 12:559-71.
57. Ivanoff CJ, Gröndahl K, Sennerby L, Bergström C, Lekholm U. Influence of variations in implant diameters: a 3- to 5-year retrospective clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14:173-80.
58. Ivanoff CJ, Sennerby L, Johansson C, Rangert B, Lekholm U. Influence of implant diameters on the integration of screw implants. An experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; 26:141-48.
59. Jackson MJ. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc* 1999; 58:1001-06.
60. Jenkins RR. Free radicals chemistry. Relationship to exercise. *Sport Med* 1988; 5:156-70.
61. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I, Wennerbeg. A quality of dental implants. *Int Dent J* 2003; 53:409-43.
62. Jovanovic S. Diagnosis and treatment of peri-implant disease. A systematic review of the effect of anti-infective therapy in the treatment of periimplantitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 213-25.
63. Kadkhodazadeh M, Lafzi A, Khademi M, Amid R, Movahhedy MR, Torabi H. Comparison of the effects of different implant apical designs on the magnitude and distribution of stress and strain in bone: a finite element analysis study. *J Long Term Eff Med Implants* 2014; 24:109-19.
64. Kang YL, Lee DW, Park KH, Moon IS. Effect of thread size on the implant neck area: preliminary results at 1 year of function. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23:1147-51.
65. Kilic C, Gülec EG, Acartürk F, Kilicaslan SM, Coskun S. Investigation of the effects of local glutathione and chitosan administration on incisional oral mucosal wound healing in rabbits. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 112:499-507.
66. Kim BS, Kim YK, Yun PY, Yi YJ, Lee HJ, Kim SG, Son JS. Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized

- mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 107: 24-28.
67. Kim, D.M., Badovinac, R.L., Lorenz, R.L., Fiorellini, J.P. & Weber, H.P. A 10 year prospective clinical and radiographic study of one-stage dental implants. Clinical Oral Implants Research 2008; 19:254-258.
68. Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes and periodontitis affect outcomes of implant treatment?. Int J Oral Maxillofac Implants 2007; 22:173-202.
69. Koldslund OC, Scheie AA. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. J Periodontol 2010; 81:231-38.
70. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. Proc Soc Exp Biol Med 1992; 200:248-54.
71. Laine ML, Leonhardt A, Roos- Jansaker AM, Peña AS, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Renvert S. IL-1Rn gene polymorphism is associated with peri-implantitis. Clin Oral Implants Res 2006; 17:380-85.
72. Lang NP, Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Histologic probe penetration in health and inflamed peri-implant tissues. Clin Oral Implants Res 1994; 5:191-201.
73. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. Clin oral Implants Res 2000; 11:146-55.
74. Larsson L, Thorbert-Mros S, Rymo L, Berglundh T. Interleukin-10 genotypes of the -1087 single nucleotide polymorphism influence sp1 expression in periodontitis lesions. J Periodontol 2011; 82:1376-82.
75. Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jaqger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers TJ. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. J Clin Invest 2003; 112: 915-23.
76. Lee MC, Yoshino F, Shoji H, Takahashi S, Todoki K, Shimada S, Kuse-Barouch K. Characterization by electron spin resonance spectroscopy of reactive oxygen species generated by titanium dioxide and hydrogen peroxide. J Dent Res 2005; 84:178-82.

- 
77. Leuratti C, Singh R, Deag EJ, Griech E, Hughes R, Bingham SA, et al. A sensitive immunoslot-blot assay for detection of malondialdehyde-deoxyguanosine in human DNA. *IARC Sci Publ* 1999; 150:197-203.
  78. Linden GJ, McClean KM, Woodside JV et al. Antioxidants and periodontitis in 60-70 years-old men. *J. Clin Periodontol* 2009; 36:843-849.
  79. Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* 1992; 3:9-16.
  80. Lindhe J, Meyle J, Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 282-85.
  81. Liskmann S, Vihalemm T, Salum O, Zilmer K, Fischer K, Zilmer M. Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implant health and diseases. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:27-23.
  82. Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer k. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 546-52.
  83. Maeda Y, Miura J, Taki I, Sogo M. Biomechanical analysis on platform switching: is there any biomechanical rationale? *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:581-84.
  84. Marozzi G. A rapid procedure for the purification of human salivary peroxidase. *Biomed Chromatogr* 1996; 10:97-98.
  85. Markovic J, García-Jiménez JL, Gimeno A, Viña J, Pallardó FV. Role of glutathione in cell nucleus. *Free Radic Res* 2010; 44:721-33.
  86. Matarasso S, Rasperini G, Iorio Siliciano V, Salvi GE, Lang NP, Aglietta M. A 10 year retrospective analysis of radiographic bone-level changes of implants supporting single-unit crowns in periodontally compromised vs. periodontally healthy patients. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:898-903.
  87. Mengel R, Behle M, Flores-de-Jacoby L. Osseointegrated implants in subjects treated for generalized aggressive periodontitis: 10-year results of a prospective, long-term cohort study. *J Periodontol* 2007; 12:2229-37.
  88. Meyle J, Chapplel. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2015; 69:7-17.

89. Mombelli A, Buser D, Lang NP. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 3:113-20.
90. Mombelli A, Cionca N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:97-103.
91. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 1998; 17:63-76.
92. Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994; 21:417-25.
93. Naert I, Duyck J, Vandamme K. Occlusal overload and bone/implant loss. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23:95-107.
94. Nieto N. Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. 1993.
95. Ozmen I, Naziroglu M, Okutan R. Comparative study of antioxidant enzymes in tissues surrounding implant in rabbits. *Cell Biochem Funct* 2006; 24:275-81.
96. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10:255-64.
97. Persson LG, Lekholm U, Leonhardt A, Dahlen G, Lindhe J. Bacterial colonization of peri-implantitis at different implant surfaces: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1996; 12:595-603.
98. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366:1809-20.
99. Plagnat D, Giannopoulou C, Carrel A, Bernard JP, Mombelli A, Belser UC. Elastase, Alpha 2-macroglobulin and alkaline phosphatase in crevicular fluid from implants with and without peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13:227-33.
100. Rao RK, Thomas DW, Pepperl S, Porreca F. Salivary epidermal growth factor plays a role in protección of ilcal mucosal integrity. *Dig Dis Sci* 1997; 42:2175-81.
101. Renvert S, Roos-Jansaker AM, Lindhal C, Renvert H, Persson GR. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:509-16.
102. Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* 1987; 44:175-89.

103. Roche E, Romero-Alvira D. Changes in DNA induced by oxidative stress. *Med Clin* 1996; 106:144-53.
104. Rokni S, Todescan R, Watson P, Pharoah M, Adegbenbo AO, Deporter D. An assessment of crown-to-root ratios with short sintered porous-surfaced implants supporting prostheses in partially edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20:69-76.
105. Roos-Jansaker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol* 2006; 33:296-301.
106. Rosenberg ES, Cho SC, Elian N, Jalbout Z N, Froum S, Evian CI. A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally compromised and periodontally healthy patients: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:873-79.
107. Saglam M, Köseoglu S, Hatipoglu M, Esen HH, Köksal E. Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci* 2015; 23:33-41.
108. Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Fiehn NE, Skovgaard L T. Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingiva. A histologic comparison in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) *Clin Oral Implants Res* 2002; 13:113-26.
109. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc* 2002; 61:137-43.
110. Seethal HS, Uma K, Rao K, Priya NS, Umadevi HS, Smitha T. A quantitative analysis of mast cells in inflammatory periapical and gingival lesions. *J Contemp Dent Pract* 2014; 15:300-05.
111. Serino G, Strom C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association within adequate plaque control. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20:169-74.
112. Sevenian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985; 5:365-90.
113. Shin YK, Han CH, Heo SJ, Kim S, Chun HJ. Radiographic evaluation of marginal bone level around implants with different neck designs after 1 year. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21:789-94.
114. Sies H. Biological redox systems and oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:2181-88.
115. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985; 311:617-31.



116. Shapira L, Borinski R, Sela MN, Solskolne A. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1991; 18:44-48.
117. Soory M. Redox status in periodontal and systemic inflammatory conditions including associated neoplasias: antioxidants as adjunctive therapy?. *Infect Disord. Drug Targets* 2009; 9:415-27.
118. Stadman ER. Ascorbic acid and oxidative inactivation of protein. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:1125-28.
119. Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM, Floyd RA. Protein modification in aging. *EXS* 1992; 62:64-72.
120. Strbac GD, Monov G, Cei S, Kandler B, Watzek G, Gruber R. Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2006; 33:302-08.
121. Su H, Gonzalez-Martin O, Weisgold A, Lee E. Considerations of implant abutment and crown contour: critical contour and subcritical contour. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2010; 30:335-43.
122. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: 431-44.
123. Terao J, Nagao A, Yuki H, Itoh, Y. Reduction of fatty acid hydroperoxides by human parotid saliva. *Lipids* 1993; 28:121-22.
124. Tesmer M, Wallet S, Koutouzis T, Lundgren T. Bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an in vitro study. *J Periodontol* 2009; 80:1991-97.
125. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2009; 80:672-78.
126. Tonetti MS, Claffey N, European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5<sup>th</sup> European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontology* 2005; 32:210-13.
127. Toto PD, Gargiulo AW. Epithelial and connective tissue changes in periodontitis. *J Periodontol* 1970; 41:587-90.
128. Tözüm TF, Akman AC, Yamalik N, Tulunoglu I, Turkyilmaz I, Karabulut E, Kilinc K, Cehreli MC. Analysis of the inflammatory process around endosseous dental implants and natural teeth: myeloperoxidase level

- and nitric oxide metabolism, *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22:969-79.
129. Tsai CC, Chen HS, Chen SI, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2005; 40:378-84.
  130. Tsaryk R, Kalbacova M, Hempel U, Scharnweber D, Unger RE, Dieter P, Kirkpatrick CJ, Peters K. Response of human endothelial cells to oxidative stress on Ti6Al4V alloy. *Biomaterials* 2007; 28:806-13.
  131. Tsimikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 98:9-17.
  132. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 1991; 48:301-09.
  133. Van del Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanism of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:2899-937.
  134. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 2000; 6:138-51.
  135. Wang W, Jian Z, Guo J, Ning X. Increase levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis. *Life Sci* 2014 (In press).
  136. Watson C, Tinsley D, Ogden AR, Russell JL, Mulay S, Davison EM. A 3 to 4 year study of single tooth hydroxylapatite coated endosseous dental implants. *Br Dent J* 1999; 187:90-94.
  137. Weffers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 1988; 174:353-57.
  138. Wei DI, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J* 2010; 55:70-8.
  139. Welander M, Abrahamsson I, Berglundh T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19:635-41.
  140. Weyant, RJ. Characteristics associated with the loss and peri-implant tissue health of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 9:95-102.

141. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem J* 1987; 245:243-50.
142. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987; 33:214-20.
143. Yamamoto S, Takashashi N, Mori Y. Chemical physiology of oxidative stress-activated TRPM2 and TRPC5 channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2010; 103:18-27.
144. Zarb GA, Schmitt A. The edentulous predicament. I: A prospective study of the effectiveness of implant-supported fixed prostheses. *J Am Dent Assoc* 1996; 127:59-65.
145. Zetterqvist L, Feldman S, Rotter B, Vincenzi G, Wennström JL, Chierico A, Stach RM, Kenealy JN. A prospective multicenter randomized-controlled five-year study of hybrid and fully etched implants for the incidence of peri-implantitis. *J Periodontol* 2010; 81:493-501.
146. Zitmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2008; 35:286-91.

**TESIS DOCTORAL**  
**VALORACIÓN DE MARCADORES**  
**INFLAMATORIOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN UN**  
**GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD**  
**PERIIMPLANTARIA**

**ANEXOS**

## 9.- ANEXOS

### ANEXO 1

#### **DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MÉDICA MUNDIAL**

#### **Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos**

Adoptada por la

18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964

y enmendada por la

29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975

35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983

41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989

48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996

52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000

Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM,

Washington 2002

Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM,

Tokio 2004

59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008

#### A. INTRODUCCION

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar todos los otros párrafos pertinentes.

2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la AMM insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.

3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.
4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".
5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están subrepresentadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.
6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.
7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.
8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.
9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.
10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que

un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

## B. PRINCIPIOS PARA TODA INVESTIGACION MEDICA

11. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.

12. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

13. Al realizar una investigación médica, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.

14. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiadas.

15. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida.

El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité.

16. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

17. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.

18. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.

19. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.

20. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible



hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.

21. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en la investigación.

22. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.

23. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.

24. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.

25. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la

recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

26. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.

27. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.

28. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.

29. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan

sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

30. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público..En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

#### C. PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACION MEDICA SE COMBINA CON LA ATENCION MEDICA

31. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.

32. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente, excepto en las siguientes circunstancias:

- El uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay una intervención probada existente.
- Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un placebo es necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

33. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

34. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

35. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.

## ANEXO 2

UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Vicerrectorado de  
Investigación

CEI Comisión de  
Ética de  
Investigación

CMN  
CAMPUS MARE NOSTRUM

### INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

#### CERTIFICA:

Que D. Fabio Camacho Alonso ha presentado el proyecto de investigación titulado "*Salivary Concentration of Oxidative Stress Biomarkers in a Group of Patients with Peri-implantitis: A transversal Study*", a la Comisión de Ética de Investigación.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día 22 de julio de 2015<sup>1</sup>, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión, en Murcia a 23 de julio de 2015.

Vº Bº  
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN  
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN  
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA



Fdo.: Antonio Juan García Fernández



ID: 1154/2015

<sup>1</sup> A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

ANEXO 3

## **CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS**

# **Estrés oxidativo en un grupo de pacientes con enfermedad periimplantaria.**

NÚMERO DE HISTORIA:

TLF:

**Criterios de inclusión:** Paciente mayor de 18 años que presente enfermedad periimplantaria crónica

**Criterios de exclusión:** Pacientes con patología crónica sistémica, enfermedades de la mucosa oral, periodontitis crónica del adulto, diabetes mellitus

**Nombre: Apellidos:**

**Edad: Sexo:** M F

**Hábitos tóxicos**

**Tabaco:** Número de cigarrillos:

**Alcohol:** esporádico a diario fines de semana

**Otros:**

**IMC:** Talla: Peso:

**Mucositis:** Si No

**Número de implantes colocados:** 1-4 >5

**Longitud y diámetro:**

**Marca comercial:**

**Tipo de prótesis:** Fija: pcelana circonio

Removible: Sobredentadura de resina.

**Posición de los implantes:** Maxilar Mandíbula

**Tiempo de los implantes en boca:**

**Tiempo de evolución de la enfermedad periimplantaria:**

**Dolor:** Si No

**Presencia de dientes:** si no

**Sondaje:** presencia de bolsas mayores de 4mm

presencia de bolsas mayores de 6mm

**Índice de placa:**

**Índice de sangrado:**

**Pérdida ósea rx en mm:** Mesial: Distal:

**Presencia de supuración:** Si No

**Presencia de hiperplasia o granuloma:** Si No

Sangrado																		vestibular	
Retracción																			vestibular
Sondaje																			vestibular
	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8			
Sondaje																			lingual
Retracción																			lingual
Sangrado																			lingual

Sangrado																			lingual
Retracción																			lingual
Sondaje																			lingual
	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
	8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8			
Sondaje																			vestibular
Retracción																			vestibular
Sangrado																			vestibular

**MDA (CONCENTRACIÓN):**

**MILOPEROXIDASA (CONCENTRACIÓN):**



# CONSENTIMIENTO INFORMADO

D/Dña.....

de.....años de edad y con DNI.....manifiesta que ha sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer el participar en este proyecto sobre el estado de salud oral, ansiedad-depresión y calidad de vida en pacientes en hemodiálisis, así como sobre la confidencialidad de los datos obtenidos en este protocolo.

He sido informado/a de que mis datos personales serán también protegidos de acuerdo con lo que dispone la Ley Orgánica Reguladora de esta materia y no serán usados sin mi consentimiento previo.

Tomando ello en consideración OTORGO MI CONSENTIMIENTO a que lo antes mencionado sea llevado acabo para cubrir los objetivos específicos en el proyecto.

Fdo. D/Dña

.....a.....de.....de.....



# Salivary Concentration of Oxidative Stress Biomarkers in a Group of Patients with Peri-Implantitis: A Transversal Study

Mariano Sánchez-Siles, PhD, DDS;\* Javier Lucas-Azorin, DDS;† Noemi Salazar-Sánchez, PhD, DDS;‡ Luis Carbonell-Meseguer, PhD, MD;‡ Fabio Camacho-Alonso, PhD, DDS§

---

---

## ABSTRACT

*Purpose:* The purpose of this study was to know if peri-implantitis causes an increase in the total salivary concentration of oxidative stress markers.

*Materials and Methods:* Seventy patients, 28 men and 42 women, 60 of them with dental implants, 30 of which had peri-implantitis and 30 were healthy. The remaining 10 were the control group: healthy subjects without implants. The average number of implants per patient was  $4.70 \pm 2.29$  in the peri-implantitis group and  $2.70 \pm 2.11$  in the control group. Periodontal/peri-implant variables were assessed, including bleeding index, gingival index, clinical attachment level, probing depth, presence of pockets larger than 4 and 6 mm, pain to percussion, suppuration, gingival hyperplasia or granuloma, crestal bone loss (both mesially and distally), evaluated through periapical radiography. Saliva samples from the 70 subjects were collected for measurement of malondialdehyde high performance liquid chromatography (HPLC) and myeloperoxidase (enzyme-linked immunosorbent assay analysis) concentrations.

*Results:* Implants affected with peri-implantitis had an average follow-up of  $26.40 \pm 7.97$  months. 4.12% of implants with peri-implantitis had a painful response to percussion. 2.06% showed suppuration; 25.77% had granuloma. The mean crestal bone loss in implants with peri-implantitis was  $3.78 \pm 1.17$  mm. Total salivary malondialdehyde concentration in the peri-implantitis group ( $0.52 \pm 0.37$   $\mu\text{M/l}$ ) was slightly higher than that in the group with healthy implants ( $0.40 \pm 0.16$   $\mu\text{M/l}$ ) and also slightly higher than that in the group of healthy patients without implants ( $0.41 \pm 0.79$   $\mu\text{M/l}$ ), although the difference was not statistically significant,  $p$  value = .442. Myeloperoxidase concentration was slightly higher in the peri-implantitis group ( $12.32 \pm 2.17$  ng/ml) than in the group with healthy implants ( $11.54 \pm 2.80$  ng/ml) and the group of healthy patients without implants ( $11.86 \pm 2.67$  ng/ml), without statistically significant differences,  $p$  value = .584.

*Conclusions:* The salivary concentration of oxidative stress markers in patients with peri-implantitis and without periodontitis is not higher than that found in healthy patients.

**KEY WORDS:** inflammation, peri-implantitis, clinical study

---

---

\*Associate professor of oral medicine, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain; †private dental practice, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain; ‡chairman of physiology, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain; §full professor of oral medicine, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain

Corresponding Author: Dr. Mariano Sánchez-Siles, University Dental Clinic, Oral Medicine Teaching Unit, Hospital Morales Meseguer (2nd floor), Avda. Marqués de los Vélez s/n, C.P., Murcia 30008, Spain; e-mail: marianosasi@um.es

Conflict of interest: no conflict of interest

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

DOI 10.1111/cid.12367

## INTRODUCTION

Peri-implantitis is defined as a bacterial disease that includes both soft tissue inflammation and a progressive loss of supporting bone in dental implants.<sup>1</sup>

It is a collective term encompassing the different inflammatory reactions in the tissues surrounding an implant. After the correct osseointegration of an implant, peri-implant disease is the result of an imbalance between the bacterial load and the host response.<sup>2</sup> Thus, peri-implant disease is an infectious inflammatory process. While mucositis has been described as a

disease in which the presence of inflammation is confined to the soft tissue, peri-implantitis also affects the supporting bone.<sup>3</sup>

Research by Roos-Jankanser<sup>4</sup> shows a prevalence of peri-implantitis by 16%, while Fransson<sup>5</sup> raises this percentage to 28%, within 5–10 years of implant placement.

A *free radical* can be defined as “any species capable of independent existence that contains one or more unpaired electrons.”<sup>6</sup>

Oxidative stress (OS) is defined as the imbalance between oxidants and antioxidants in the body in favour of the former. The production of reactive oxygen species (ROS) (pro-oxidants and oxidants) occurs in a physiologic manner in every living organism, its main endogenous source being the mitochondrial electron transport chain.<sup>7</sup>

The oxidative damage that characterizes OS has been linked to various inflammatory and neurodegenerative diseases, connective tissue diseases, and aging processes, among other causes. Recent studies by different authors indicate that this biochemical phenomenon can be found in the pathophysiologic basis of chronic inflammatory processes, conditioning their evolutionary state.<sup>7,8</sup> The main target of ROS are polyunsaturated fatty acids in tissue lipids, which results in lipid peroxidation. Lipid oxidation leads to a number of secondary products. These by-products are mostly aldehydes that may aggravate oxidative damage.<sup>9</sup> The main lipid peroxidation by-product is called malondialdehyde (MDA).<sup>10,11</sup> The longevity and high reactivity of ROS allow these oxidizing molecules to act inside and outside the cells, interacting not only with lipids, but also with many other biomolecules such as nucleic acids and proteins, which often has irreversible effects on the delicate mechanisms involved in cell functionality.<sup>12</sup>

Polymorphonuclear neutrophils are the first line of nonspecific defense. Myeloperoxidase (MPO) is the most abundant protein in neutrophils and is the only peroxidase that catalyzes the conversion of hydrogen peroxide and chloride to hypochlorous acid. This is a powerful oxidizing agent involved in the defense mechanism against infectious agents; however, under conditions of uncontrollable or excessive activation, it could act on the host cells and inactivate humoral factors.<sup>13</sup> Given its broad reactivity spectrum, hypochlorous acid acts as a mediator of many inflammatory processes. Therefore, MPO is involved in cellular homeostasis, and

plays an important role in the initiation and aggravation of acute and chronic inflammatory processes.<sup>14</sup>

An increase in MPO activity in different pathologic processes is associated with an increased risk of OS, as is the case with local or general infectious diseases, inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, Lupus erythematosus, and other inflammatory conditions. In other words, MPO is considered a biomarker of OS and inflammation.<sup>15,16</sup>

Several studies suggest that oxygen-derived free radicals and its products play an important role in the etiology and severity of periodontitis and/or peri-implantitis. There might be a linear relationship between OS, periodontal disease and systemic disease.<sup>10,17–23</sup>

The purpose of this paper was to determine whether patients with peri-implantitis have a higher total salivary concentration of MDA and MPO, which are considered two important OS markers, and compare these data with salivary samples from patients without peri-implantitis.

## MATERIAL AND METHOD

A transversal study of 70 patients was conducted—28 men, 42 women. The 70 subjects, who came consecutively to the University Dental Clinic for a regular check-up, were classified into three groups: 30 patients with implants affected by peri-implantitis;<sup>3</sup> 30 patients with healthy implants (no clinical or radiographic signs of inflammation or bone destruction; a total of 223 implants were evaluated); and 10 healthy subjects (no periodontal disease, no tooth decay, no chronic inflammatory mucosal diseases) without implants.

Inclusion criteria were patients with dental implants and patients with any kind of prosthesis. Exclusion criteria were patients with mucositis (inflammation confined just to the soft tissue);<sup>3</sup> patients with periodontal disease (Fifth European Workshop in Periodontology;<sup>24</sup> patients older than 70 years; and patients taking antioxidant-based dietary supplements. Table 1 shows the main features of the study population (Table 1).

Implant characteristics and positions are shown in Table 2.

Periodontal measurements were taken in all teeth for gingival index, bleeding index, clinical attachment level, probing depth, number of pockets  $\geq 4$  mm, number of pockets  $\geq 6$  mm; and series of periapical radiographs. Implants measurements were taken for

**TABLE 1 Characteristics of the Study Population**

Patient Sample Characteristics	
Patients: n	70
Age: mean $\pm$ SD	61.87 $\pm$ 6.67
Sex: n (%)	
Male	28 (40)
Female	42 (60)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> ): media $\pm$ SD	27.21 $\pm$ 4.23
Smoking status: n (%)	
Non-smoker	64 (91.42)
<10	4 (5.74)
11–20	1 (1.42)
>20	1 (1.42)
Alcohol consumption: n (%)	
None	68 (97.16)
Daily	0 (0)
Weekend drinker	2 (2.84)
Diseases: n (%)	
Arterial hypertension	3 (4.28)
Prostatic hyperplasia	2 (2.84)
Hypercholesterolemia	3 (4.28)
Gastric ulcer	2 (2.84)
Hyperuricemia	1 (1.42)
Osteoporosis	1 (1.42)
Study groups: n (%)	
Patients with peri-implantitis	30 (42.85)
Patients without peri-implantitis	30 (42.85)
Control without implants	10 (14.30)
Total number of implant prosthesis: n (%)	63 (100)
Implant supported hybrid prosthesis	16 (25.39)
Fixed prosthesis supported by implants	45 (71.42)
Implant supported overdenture	2 (3.19)

bleeding index, gingival index, clinical attachment level, probing depth, number of pockets  $\geq 4$  mm, number of pockets  $\geq 6$  mm, radiographic crestal bone loss; mobility, pain to percussion, suppuration, and presence of gingival hyperplasia or granuloma.

Saliva samples were collected first thing in the morning. No food, drink or saliva stimulators were allowed for 90 minutes before the sample was taken.

Patients were instructed to sit in a relaxed position, looking down and dropping the saliva into a test tube with a funnel. A total amount of 5 ml of saliva sample was drawn from each patient by a trained dentist and collected into tubes. Saliva samples were immediately protected from light, and kept at 4°C for less than 30 minutes before processing. Samples underwent centrifuga-

tion at 2,500 g for 10 minutes, and aliquot saliva samples were snapped frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for less than 30 days. Trace element free tubes were used in order to optimize sample stability and minimize self-generated processes of lipid peroxidation.

Saliva samples were analyzed in a single batch after one thaw cycle for MDA, and MPO biomarker of oxidative damage and inflammation.<sup>15,25,26</sup> The decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids MDA was determined by HPLC after reaction with thiobarbituric acid (TBA) to form MDA-TBA adduct according to Wong and colleagues<sup>27</sup> The adduct was eluted from the column with methanol-phosphate buffer and quantified spectrophotometrically at 532 nm.

Salivary MPO concentration was measured by enzyme-linked immunosorbent assay analysis (ELISA kit, Immundiagnostik, Bensheim, Germany). According to the manufacturer's instructions (detection level: 1.6 ng/ml; coefficient of intra-assay variation: 4.5%; coefficient of inter-assay variation: 13.5%). All patients were fully informed of the objective of the study and gave their consent to take part. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Murcia (Spain) and was carried out between September 2013 and October 2014 at the University Dental Clinic (University of Murcia, Murcia, Spain).

### Statistic Analysis

Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 12.0 statistics software (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA). A descriptive study was performed of each variable. The Kolmogorov–Smirnov test and Levene normality variance homogeneity test were applied, and the data showed a normal distribution, and were analyzed using parametric tests. The associations between the different qualitative variables were studied using Pearson's chi-squared test. The associations between different quantitative variables were studied using one-way analysis of variance (ANOVA) for more than two samples and the Student's *t*-test for two related samples. Statistic significance was accepted for  $p \leq .05$ .

### RESULTS

Two hundred twenty-three implants were evaluated in 60 patients. Table 1 shows characteristics of the study population. Of the 223 implants, 97 had peri-implantitis

**TABLE 2 Implant Distribution**

Characteristics	Total, n (%)	Implants with Peri-Implantitis, n (%)	Implants Without Peri-Implantitis, n (%)
Number of dental implants	223 (100)	97 (100)	126 (100)
Dental implant type			
Lifecore® (Lifecore Biomedical, MN, USA)	193 (86.54)	73 (75.25)	120 (95.23)
Biomet 3i® (Biomet 3i Dental Imerica S.L., Barcelona, Spain)	5 (2.26)	3 (3.11)	2 (1.60)
Nobel Biocare™ (Nobel Biocare, Zurich, Switzerland)	13 (5.82)	9 (9.27)	4 (3.17)
Biotech® (Biotech International, Marseille, France)	12 (5.38)	12 (12.37)	0 (0)
Maxilla/mandible			
Maxilla	120 (53.81)	57 (58.76)	63 (50.00)
Mandible	103 (46.19)	40 (41.24)	63 (50.00)
Anterior/posterior			
Anterior	70 (31.39)	35 (36.09)	35 (27.78)
Posterior	153 (68.61)	62 (63.91)	91 (72.22)
Length (mm)			
8.0	12 (5.38)	6 (6.20)	6 (4.76)
10.0	70 (31.39)	25 (25.77)	45 (35.71)
11.5	122 (54.71)	48 (49.48)	74 (58.73)
13.0	19 (8.52)	18 (18.55)	1 (0.80)
Diameter (mm <sup>2</sup> )			
3.30	68 (30.49)	34 (35.05)	34 (26.98)
3.75	66 (29.59)	35 (36.08)	31 (24.61)
4.00	52 (23.31)	19 (19.60)	33 (26.19)
4.50	37 (16.61)	9 (9.27)	28 (22.22)

and 126 were healthy. The average number of implants per patient in the study group was  $4.70 \pm 2.29$ , and  $2.70 \pm 2.11$  in the control group.

Table 2 shows their position in the maxilla or mandible, their anterior or posterior location, their diameters and lengths.

The average follow-up implants affected with peri-implantitis was  $26.40 \pm 7.97$  months. The teeth most frequently replaced by implants were the premolars and the maxillary right first molar. Of the implants, 4.12% showed pain to percussion, 3.09% showed mobility, all of them showed bleeding, and 2.06% exhibited suppuration; 25.77% had hyperplasia or granuloma. The mean crestal bone loss of implants with peri-implantitis, evidenced by periapical radiography, was  $3.78 \pm 1.17$  mm (Table 3).

The groups were homogeneous in terms of age, sex, smoking and drinking habits, and body mass index (Table 4). Table 5 shows the differences between the two groups with regard to periodontal and the peri-implant indices. The patients from both groups had no periodontal disease. Periodontal scores were similar in peri-

implantitis patients and the healthy group, showing no statistically significant differences. With the exception of the gingival bleeding index, which was higher in patients with peri-implantitis. Gingival index also higher in teeth of patients with peri-implantitis ( $p$  value = .001). This is explained by the gingivitis caused by marginal plaque present on some teeth, which does not constitute an exclusion criterion, as there is no bone loss. (Table 5).

Salivary MDA and MPO concentration was slightly higher in the peri-implantitis group than in the healthy groups of patients both with and without implants, but the differences were not statistically significant (Table 6).

## DISCUSSION

A transversal study was conducted to determine the total salivary concentration of MDA, as a by-product of lipoperoxidation, and of MPO, as a biomarker of OS and inflammation, in a group of 30 patients with peri-implantitis. The results were then compared with those obtained from 30 patients with healthy implants and 10 healthy patients without implants. Total MDA and MPO

**TABLE 3 Characteristics of Dental Implants with Peri-Implantitis**

Characteristics	
Number of dental implants with periimplantitis: n(%)	97 (100)
Implants with peri-implantitis follow-up (months): mean $\pm$ SD	26.40 $\pm$ 7.97
Site: n (%)	
1.1	4 (4.12)
1.2	2 (2.06)
1.3	6 (6.20)
1.4	7 (7.21)
1.5	7 (7.21)
1.6	7 (7.21)
2.1	4 (4.12)
2.2	2 (2.06)
2.3	5 (5.15)
2.4	7 (7.21)
2.6	6 (6.20)
3.3	6 (6.20)
3.4	7 (7.21)
3.5	3 (3.11)
3.6	4 (4.12)
3.7	3 (3.11)
4.3	6 (6.20)
4.4	7 (7.21)
4.5	1 (1.03)
4.6	2 (2.06)
4.7	1 (1.03)
Percussion-induced pain: n (%)	
Yes	4 (4.12)
No	93 (95.88)
Mobility: n (%)	
Yes	3 (3.09)
No	94 (96.91)
Bleeding: n (%)	
Yes	97 (100)
No	0 (0)
Suppuration: n (%)	
Yes	2 (2.06)
No	95 (97.94)
Hyperplasia or granuloma: n (%)	
Yes	25 (25.77)
No	72 (74.23)
Radiographic bone loss (mm): mean $\pm$ SD	
Mesial	3.72 $\pm$ 1.27
Distal	3.85 $\pm$ 1.17
Total (mesial + distal/2)	3.78 $\pm$ 1.17

concentrations were similar in the saliva collected from both the peri-implantitis group and the healthy patients.

The majority of studies on OS are focused on periodontal disease. The etiology and pathogenic mechanisms are the same in periodontitis and peri-implantitis processes.<sup>3</sup> Studies on OS in patients with peri-implantitis are very scarce in the scientific literature<sup>21,22,28</sup>.

The involvement of ROS in periodontal pathology has been studied in the last decades.<sup>29,30</sup> Several studies have shown that periodontitis is associated with functionally activated polymorphonuclear cells exhibiting increased ROS production. Sculley and Langley-Evans<sup>31</sup> observed a tendency to greater oxidative damage in patients with poorer periodontal health. Soory and colleagues stated that an increase in ROS can induce a hyper-inflammatory response in aggressive forms of periodontitis, which leads to redox imbalance, and in turn results in cell damage.<sup>32</sup> This is completely consistent with the hypothesis that there is greater ROS-mediated damage to tissues in advanced stages of periodontal disease<sup>31</sup> It is likely that oxidative processes play a causal role in the etiology of periodontitis, but it is more likely that they contribute to the progression of the disease. Moreover, according to some studies such as Hendek and colleagues,<sup>33</sup> the levels of OS markers like 8-hydroxydeoxyguanosine in periodontitis, were reduced in saliva and crevicular fluid after treating periodontal disease both in smokers and non-smokers. In the majority of studies aimed at evaluating the levels of OS markers in periodontal disease, the measurements of these biomarkers are carried out with samples taken directly from the gingival sulcus of the affected teeth. A recent study by Borges reported an increase in MPO activity in the crevicular fluid of patients with chronic periodontitis, as compared with control groups.<sup>34</sup> Additionally, this disease tends to affect all teeth, which could significantly increase the total concentration of OS markers in the patient's saliva.<sup>23</sup>

Peri-implantitis may affect a single implant in individuals without periodontitis, or every implant in a toothless patient with more than 10 implants. The subjects in our study had an average of 4.70 implants per patient affected by peri-implantitis. This condition did not cause an increase in total salivary MPO and MDA levels. Our goal was to determine whether peri-implantitis could increase total salivary levels of OS markers. The majority of published works take

**TABLE 4 Homogeneity of the Study Groups in Terms of the Demographic Characteristics, Toxic Habits and Body Mass Index (Analysis of Variance and Pearson's  $\chi^2$  Tests)**

Characteristics	Patients with Peri-Implantitis (n = 30)	Patients Without Peri-Implantitis (n = 30)	Control Without Implants (n = 10)	p Value
Age: mean $\pm$ SD	63.27 $\pm$ 5.65	61.73 $\pm$ 7.01	58.10 $\pm$ 7.62	.104
Sex: n (%)	0.574			
Male	13 (43.33)	10 (33.33)	5 (50)	
Female	17 (56.67)	20 (66.67)	5 (50)	
Smoking behavior: n (%)				.579
Yes	3 (10)	3 (10)	0 (0)	
No	27 (90)	27 (90)	10 (100)	
Alcohol consumption: n (%)				.253
Yes	2 (6.67)	0 (0)	0 (0)	
No	28 (93.33)	30 (100)	30 (100)	
Body mass index: mean $\pm$ SD	27.47 $\pm$ 4.05	27.52 $\pm$ 4.81	25.47 $\pm$ 2.34	.378

**TABLE 5 Periimplant/Periodontal Characteristics of the Study Groups (Analysis of Variance and Student's t-Tests)**

Periodontal Characteristics	Patients with Peri-Implantitis (n = 30)	Patients Without Peri-Implantitis (n = 30)	Control Without Implants (n = 10)	p Value
Number of teeth: mean $\pm$ SD	13.13 $\pm$ 8.12	22.47 $\pm$ 5.87	26.70 $\pm$ 1.94	<.001
Number of placed implants: mean $\pm$ SD	4.70 $\pm$ 2.29	2.70 $\pm$ 2.11		.001
Implants follow-up (months): mean $\pm$ SD	82.40 $\pm$ 19.61	86.00 $\pm$ 18.12		.463
Bleeding index: mean $\pm$ SD				
Natural teeth	35.98 $\pm$ 30.98	24.22 $\pm$ 24.18	0.00 $\pm$ 0.00	.001
Dental implants	94.22 $\pm$ 19.61	58.99 $\pm$ 36.51		<.001
Gingival index: mean $\pm$ SD				
Natural teeth	0.68 $\pm$ 0.66	0.13 $\pm$ 0.35	0.40 $\pm$ 0.51	.001
Dental implants	1.60 $\pm$ 0.56	0.33 $\pm$ 0.47		<.001
CAL (mm): mean $\pm$ SD				
Natural teeth	1.45 $\pm$ 0.64	1.66 $\pm$ 0.33	1.12 $\pm$ 0.38	<.187
Dental implants	2.49 $\pm$ 0.91	1.39 $\pm$ 0.52		<.001
PD (mm): mean $\pm$ SD				
Natural teeth	1.79 $\pm$ 0.45	1.65 $\pm$ 0.43	1.49 $\pm$ 0.29	.136
Dental implants	4.44 $\pm$ 0.96	2.92 $\pm$ 0.86		<.001
Number of pockets $\geq$ 4 mm: mean $\pm$ SD				
Natural teeth	0.41 $\pm$ 1.08	0.28 $\pm$ 0.84	0.00 $\pm$ 0.00	.457
Dental implants	5.03 $\pm$ 4.21	1.27 $\pm$ 2.57		<.001
Number of pockets $\geq$ 6 mm: mean $\pm$ SD				
Natural teeth	0.11 $\pm$ 0.41	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	.285
Dental implants	2.13 $\pm$ 2.98	0.10 $\pm$ 0.41		<.001
Radiographic bone loss (mm): mean $\pm$ SD				
Mesial	3.18 $\pm$ 1.35	1.45 $\pm$ 0.51		<.001
Distal	3.27 $\pm$ 1.27	1.44 $\pm$ 0.53		<.001
Total (mesial + distal/2)	3.22 $\pm$ 1.27	1.44 $\pm$ 0.51		<.001

CAL = clinical attachment level; PD = probing depth.



**TABLE 6 Comparison of Saliva Concentration of MDA and MPO between the Study Groups (Analysis of Variance Test)**

Oxydative Stress	Mean $\pm$ SD			<i>p</i> Value
	Patients with Peri-Implantitis (n = 30)	Patients Without Peri-Implantitis (n = 30)	Control Without Implants (n = 10)	
MDA salivary ( $\mu$ M/l)	0.52 $\pm$ 0.37	0.40 $\pm$ 0.16	0.41 $\pm$ 0.79	.442
MPO salivary (ng/ml)	12.32 $\pm$ 2.17	11.54 $\pm$ 2.80	11.86 $\pm$ 2.67	.584

MDA = malondialdehyde; MPO = myeloperoxidase.

measurements directly from the gingival sulcus of the affected implants. Hence, the high concentrations obtained by the authors of these studies. Therefore, the occurrence of peri-implantitis in patients with a mean of four implants can be seen as a localized, self-limited disease that has no systemic consequences in terms of OS and inflammatory response.<sup>23</sup> Because the results refer to total salivary MDA and MPO concentrations, these cannot be applied to a specific implant/tooth alone. In studies that measured the total salivary concentration of OS biomarkers, such as Linkman and colleagues, higher MPO levels were found in patients with peri-implantitis. The rest of published works measure MPO concentration in the peri-implant sulcus, which results in higher levels than those found in healthy implants.<sup>21,22,28</sup> No previous study has measured MDA concentration in patients with peri-implantitis, despite the fact that this is the most important and most frequently studied molecule as a lipid oxidation marker. MDA is the by-product of the peroxidation of polyunsaturated fatty acids.<sup>35</sup> It has, on the other hand, been studied in patients with periodontal disease, where high concentrations of MDA were found in the crevicular fluid of periodontal teeth.<sup>18,36</sup>

Our results may suggest that the low levels of OS in saliva mean that peri-implantitis might not be involved in systemic pathologic processes recently associated with periodontitis, as a consequence, *inter alia*, of the increased risk posed by certain chronic diseases such as cardiovascular disease and diabetes.<sup>37</sup> According to some studies, there seems to be a linear relationship between periodontitis, systemic inflammation and systemic OS.<sup>23</sup> The total salivary levels of MDA and MPO found in our study are not sufficient to confirm a correlation between peri-implantitis, OS and certain systemic diseases.

In conclusion, we must say that patients with four to five implants affected by dental peri-implantitis and

without periodontal disease, do not exhibit high salivary MDA and MPO concentrations, which would mean that peri-implantitis does not cause quantifiable oxidative damage in total saliva. It would be interesting to conduct longitudinal studies in patients with a larger number of implants affected by periodontitis to determine whether peri-implantitis causes an increase in total levels of OS biomarkers in saliva.

## REFERENCES

- Albrektsson T, Isidor F. Consensus report: implant therapy. In: Lang NP, Karring T, eds. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology. Vol. cds. Berlin: Quintessence, 1994:365–369.
- Zitmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2008; 35:286–291.
- Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: consensus report of the sixth European workshop on periodontology. *J Clin Periodontol* 2008; 35:282–285.
- Roos-Jansaker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol* 2006; 33:296–301.
- Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T. Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:440–446.
- Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989; 82:747–752.
- Túnez I, Feijóo M, Huerta G, et al. The effect of infliximab on oxidative stress in chronic inflammatory joint disease. *Curr Med Res Opin* 2007; 23:1259–1267.
- Kalpakcioglu B, Senel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27:141–145.
- Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1685–1696.
- Tsai CC, Chen HS, Chen SL, et al. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2005; 40:378–384.

11. Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys* 2003; 420:217–221.
12. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424:83–95.
13. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206–209.
14. Van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:2899–2937.
15. Tsimikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 98:9–17.
16. Wang W, Jian Z, Guo J, Ning X. Increase levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis. *Life Sci* 2014; 117:19–23.
17. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 2000; 6:138–151.
18. Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34:558–565.
19. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10:255–264.
20. Linkman S, Vihalemm T, Salud O, Zilmer K, Fischer K, Zilemer M. Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implant health and disease. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:27–33.
21. Güncü GN, Tözüm TF, Güncü MB, et al. Myeloperoxidase as a measure of polymorphonuclear leukocyte response in inflammatory status around immediately and delayed loaded dental implants: a randomized controlled clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008; 10:30–39.
22. Tözüm TF, Akman AC, Yamalik N, et al. Analysis of the inflammatory process around endosseous dental implants and natural teeth: myeloperoxidase level and nitric oxide metabolism. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22:969–979.
23. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89:1241–1246.
24. Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a peri-odontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 2005; 32(Suppl 6):210–213.
25. Block G, Dietrich M, Norkus EP, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002; 156:274–285.
26. Trevisan M, Browne R, Ram M, et al. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol* 2001; 154:348–356.
27. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN Jr, Sunderman FW Jr. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987; 33:214–220.
28. Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15:546–552.
29. Henry CA, Winfold TE, Laohapund P, Yotnuengnit P. Neutrophil chemiluminescence and opsonic activities of young people with periodontitis in Thailand. *Arch Oral Biol* 1984; 29:623–627.
30. Shapira L, Borinski R, Sela MN, Soskolne A. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leucocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1991; 18:44–48.
31. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc* 2002; 61:137–143.
32. Soory M. Redox status in periodontal and systemic inflammatory conditions including associated neoplasias: antioxidants as adjunctive therapy? *Infect Disord Drug Targets* 2009; 9:415–427.
33. Hendek MK, Erdemir EO, Kisa U, Ozcan G. Effect of initial periodontal therapy on the oxidative stress markers in gingival crevicular fluid, saliva and serum in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2014; 17:1–17.
34. Borges I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Frode TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm* 2007; 45794.
35. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15:316–328.
36. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J* 2010; 55:70–78.
37. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366:1809–1820.