

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA  
ȘCOALA DOCTORALĂ**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**STUDIUL CLINIC, HISTOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHEMIC  
AL MODIFICĂRILOR PARODONTALE ȘI DENTINARE LA  
PACIENȚII CU PARODONTOPATIE SEVERĂ**

## **REZUMAT**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC**

**Prof. univ. dr. Laurențiu MOGOANTĂ**

**STUDENT - DOCTORAND,  
Melania Olimpia Uretyan**

**Craiova – 2015**

# CUPRINS

## **INTRODUCERE**

### **CAPITOLUL I - DEZVOLTAREA DINTELUI**

- Organul smalțului
- Ansa cervicală
- Stadiul de clopot
- Apoziția
- Formarea rădăcinii
- Cementogeneza
- Formarea desmodonțiului
- Formarea oaselor alveolare
- Dezvoltarea postnatală a structurilor dentoparodontale

### **CAPITOLUL II - ORGANUL DENTAR**

- Odonțiul
- Parodontiul

### **CAPITOLUL III - PARODONTOPATII**

- Sisteme de clasificare ale parodontopatiilor
- Etiologia bolii parodontale
- Patogenia bolii parodontale
- Factori modificatori de risc

### **CAPITOLUL IV - LEZIUNILE MIXTE ENDOPARODONTALE**

- Leziunile endo-parodontale
- Clasificarea leziunilor endo-parodontale
- Relația dintre afecțiunile pulpare și afectarea parodontală
- Afecțiunile endodontice în relație cu parodonțiul
- Afectarea periapicală
- Căile non-fiziologice (accidentale)
- Relația dintre pulpa vitală și țesuturile parodontale
- Afectarea PARODONTALĂ

### **CAPITOLUL V - STUDIU CLINIC**

- Introducere
- Scop
- Material și metoda
- Evaluarea pacientului / EXAMINARE
- Evaluarea indicelui de sângerare
- Indicele de sângerare sulcular
- Indicele de placă
- Măsurarea adâncimii de sondare
- Forța de sondare
- Măsurarea /evaluarea furcațiilor
- Măsurarea recesiei.
- Fotografia intraorală
- Evaluarea radiologică
- CBCT
- Rezultate
- Discuții

### **CAPITOLUL VI - STUDIU HISTOLOGIC AL MODIFICĂRILOR PERIODONTALE**

Introducere

Material și metode

Tehnica colorării cu hematoxină-eozină (HE)

Tehnica colorării tricromice cu verde de lumină - metoda Goldner-Szeckeli

Rezultate

Discuții

## **CAPITOLUL VII - STUDIU IMUNOHISTOCHEMIC AL REACȚIEI INFLAMATORII ÎN PERIODONTITELE MARGINALE CRONICE**

Introducere

Material și metode

Metoda biotină – streptavidină marcată (LSAB)

Controlul reacțiilor de imunohistochimie

Rezultate

Discuții

## **CAPITOLUL VIII - STUDIU MICROSCOPIC AL MODIFICĂRILOR DENTINARE LA PACIENȚII CU PERIODONTITELE MARGINALE CRONICE**

Introducere

Rezultate

Discuții

## **CONCLUZII GENERALE**

## **CONCLUZII**

## **BIBLIOGRAFIE**

**Cuvinte cheie:** parodontopatie cronică, modificări clinice, evaluare, markeri imunohistochimie, modificări dentinare.

# CAPITOLUL I

## DEZVOLTAREA DINTELUI

Dentiția reprezintă unitățile dentare prezente în alveolele maxilare, în cavitatea bucală. Există două dentiții, primară și secundară, cea primară se dezvoltă în perioada prenatală și este constituită din 20 de dinți temporari care vor fi înlocuiți după exfolierea acestora de către dinții permanenți (dentiție secundară). Smalțul se dezvoltă din ectoderm, pulpa dentară din mezoderm (mezenchim) iar dentina și cementul se formează prin mineralizarea directă a țesutului conjunctiv.

Dezvoltarea dintelui este un proces complex care se desfășoară în mai multe etape succesive, implică o interacțiune celulară epitelio-mezenchimală între epiteliul oral și mezechimul subjacent. Interferențele care apar în dezvoltarea dinților pot avea loc în oricare etapă a odontogenezei, acestea vor avea o consecință directă prin afectarea proceselor fiziologice și vor influența tratamentele necesare pentru fiecare pacient.

Prezentarea în dinamică a procesului de dezvoltare include următoarele etape de referință: inițierea, proliferarea, histo și morfodiferențierea și apoziția. Denumirea stadiilor are la bază morfologia pe care o capătă structura epitelială a germenului dentar.

Procesul de dezvoltare a dintelui include, după *formarea coroanei*, *formarea rădăcinei* și, în paralel, *structurarea țesuturilor de suport* care realizează ancorarea dintelui la nivel mandibular.

Secvențialitatea în procesul de dezvoltare a dintelui este următoarea:

- inițierea – stadiul de mugure;
- proliferarea – stadiul de capișon;
- histo și morfodiferențierea – stadiul de clopot;
- apoziția – finalizarea stadiului de clopot, formarea coroanei

Interacțiunea epitelialo-ectomesenchimală complexă determină structurarea ectomesenchimului. Studiile au arătat că ectomesenchimul și organul dentar conțin toate informațiile necesare pentru a crea dintele și întreg aparatul său de fixare.

Existența interacțiunilor epitelio-mezenchimale determină inițierea proceselor de dezvoltare a dintelui. Experimental s-a stabilit că mezenchimul/ectomezenchimul din stadiul de capișon, clopot și clopot avansat stabilește tipul de dinte și poate induce dezvoltarea dintelui în epiteliul nondentar, determinând secreție de smalț.

Dentina și smalțul se depun în manieră apozițională, existând o depunere ritmică de matrice extracelulară, de natură organică, care se maturizează apoi prin mineralizare. Procesul este caracterizat prin perioade de activitate și de repaus, alternând la intervale de timp precise; prin depunerea dentinei și smalțului, se formează coroana dentară. Forma dintelui este dependentă de momentul opririi acestei diviziuni mitotice, moment care corespunde transformării celulelor în ameloblaste și a exercitării funcției de depunere a smalțului, de către acestea.

Formarea rădăcinii debutează după definitivarea formării coroanei, la nivelul viitoarei joncțiuni amelocementare și se continuă și după momentul erupției.

Depunerea de dentină este dependentă de formarea odontoblastelor iar acestea, care apar în urma procesului de inducție realizat de celulele epitelului intern al organului smalțului. În acest context, celulele epitelului intern al organului smalțului sunt absolut necesare pentru a induce formarea rădăcinii.

În paralel cu formarea și depunerea de cement, celulele epiteliale restante din teaca epitelială radiculară Hertwig, grupate în mici insule, continuă să se distanțeze de suprafața externă a rădăcinii și se stabilesc în zona viitorului ligament parodontal, sub forma *resturilor epiteliale Malassez*.

Înteruperea dezvoltării în timpul formării tecii rădăcinii afectează continuitatea mantalei și produc o mică lacună. În această situație, dentinogeneza nu intervine la nivelul defectului și se formează un canal mic accesoriu între sacul dentar și pulpa dentară.

Ansa cervicală comportă transformarea în teacă epitelială radiculară Hertwig, iar aceasta induce transformarea celulelor papilei dentare în odontoblaste, care participă la formarea dentinei radulare. Implicarea celulelor din teaca Hertwig la formarea cementului este controversată. Aceste celulele epiteliale restante, grupate în mici insule, continuă să se distanțeze de suprafața externă a rădăcinii și se stabilesc în zona viitorului ligament parodontal, sub forma resturilor epiteliale Malassez. Resturile epiteliale Malassez sunt mai frecvente la tineri, dar persistă toată viața și au putut fi evidențiate și la 70 de ani. În urma inflamației, aceste resturi epiteliale pot genera formațiuni chistice sau proliferarea în locurile unde se produc fenomene osteitice, în zonele de bi- și trifurcație radiculară, ca și în lungul rădăcinii. Astfel, se creează condiții pentru o patologie inflamatorie, resorbtivă și chiar degenerativă la aceste niveluri.

Caracteristicile principale ale perioadei intrauterine sunt *diferențierea și specializarea* țesuturilor. Nașterea este marcată de importante modificări structurale și funcționale caracterizate prin *creștere și dezvoltare* până la stadiul de maturitate și organism adult.

În primele două săptămâni după naștere - *perioada neonatală* - se produce o scădere în greutate, apar schimbări importante ale inimii și vaselor care se adaptează condițiilor postnatale de circulație a sângelui și sunt inițiate funcțiile aparatului digestiv care preia activitatea de digestie și asimilare a hranei de către noul născut. La om, formarea dintelui începe deja din a 6-a săptămână de viață embrionară. Se continuă până la vârsta adultă timpurie, atunci când rădăcinile molarilor trei permanenți ajung la finalizare. Derularea acestor stadii de dezvoltare pot fi observate simultan în decursul odontogenezei care se desfășoară din stadiul embrionar până în adolescență.

## CAPITOLUL II

### ORGANUL DENTAR

Odontonul (organul dentar) este un complex de țesuturi structurate diferit, dar armonizate morfologic și funcțional pentru a primi, armoniza și transmite presiunile masticatorii. El este constituit din 2 componente: odonțiul (componenta masticatorie) și parodonțiul (componenta de susținere). Dintele prezintă la interior cavitatea pulpară care conține *pulpa dintelui*. Acesta comunică în porțiunea sa inferioară prin foramenul apical cu spațiul parodontal. Prin acest spațiu pătrund și ies din pulpa dentară vasele sanvine și nervii.

Smalțul dentar reprezintă stratul extern al coroanei dentare. Dentina reprezintă țesutul dentar dur care înconjoară pulpa dentară; ea este acoperită la exterior de smalț la nivelul coroanei și de cement la nivelul rădăcinii. Cementul este stratul acoperitor al dentinei la nivelul rădăcinii dintelui, de la coletul anatomic până la apex. El reprezintă zona de fixare dentară a fibrelor parodontale. Dintele este solidarizat la peretele osos alveolar printr-o structură conjunctivă numită periodonțiu..

Smalțul este singurul țesut calcifiat de origine epitelială, rezultat prin mineralizarea matricei organice sintetizată și secretată de către ameloblasti; este alcătuit în proporție de 96% dintr-o componentă anorganică sub formă de hidroxiapatită și o componentă organică reprezentată de colagen, lipide, glucide, acid citric și acid lactic, 1,3% și 2,7% apă.

Dentina este țesutul dur care se dezvoltă pornind de la papila mezenchimatoasă și de la pulpă și care se mineralizează progresiv; este cel mai voluminos țesut dur al dintelui; conținutul în substanțe minerale este mai redus, 67%, cristalele de hidroxiapatită fiind preponderente, de 200 de ori mai mici; substanțele organice (20%) reprezentate de colagen, lipide, mucopolizaharide, glicoproteine, peptide, proteine și apă (13%). Proteinele necolagenice au un rol important în reglarea mineralizării dentinare sau în inducerea diferențierii celulelor stem pulpare în odontoblaste. Canaliculele dentinare conțin expansiunile citoplasmice ale odontoblastelor și au o direcție paralelă cu axul lung al dintelui în dentina coronară superioară corespunzătoare feței ocluzale, pe fețele laterale devin oblice, iar de la nivelul coletului înspre apex sunt dispuse perpendicular pe axul dintelui. Dentina coronară conține mai multe canalicule pe unitatea de suprafață decât cea radiculară. În procesele de uzură se depune rapid o dentină terțiară ce are o structură neregulată, cu canalicule rare și accentuat ondulate, cu incluzii de celule (odontoblastice, fibroblaste, celule sanguine).

Pulpa dentară este un țesut conjunctiv lax, ce derivă din papila mezenchimală ; camera pulpară se prelungeste în interiorul rădăcinilor prin canale radiculare și se deschid la exteriorul apexului printr-un îngust orificiu apical. Canalele radiculare prezintă frecvent neregularități de calibru și traiect sau pot emite canale laterale. Histologic, pulpa este constituită dintr-un țesut care păstrează caracteristicile morfologice ale mezenchimului embrionar, la dinții tineri se constată o densitate celulară mare, iar la dinții adulți mai puține celule și componentă fibrilară accentuată. Fibrele sunt din colagen, reticulină, fibre Korff în zona Weill și fibre oxitalanice. Fibrele de colagen sunt cele mai abundente și sunt de tip I distribuția colagenului fiind

determinată de starea de sănătate pulpară. Celulele pulpare derivă din celulele papilei mezenchimatoase și se împart în 4 grupe: celule de bază: fibroblastele și fibrocitele; celule înalt specializate: odontoblastele; celule de releu: celule rotunde ale lui Weil; celulele implicate în procesele de apărare: macrofage, mastocite, plasmocite, limfocite, leucocite.

Parodonțiul este componenta organului dentar constituită din ansamblul țesuturilor de menținere și susținere ale dintelui anatomic, țesuturi situate într-o completă interdependență anatomică și fiziologică. Toate componentele parodontiului sunt interdependente din punct de vedere biologic, iar o agresiune cu consecințe disfuncționale asupra uneia dintre componente are consecințe și asupra celorlalte.

Parodonțiul are două componente mari: parodonțiul marginal și parodonțiul apical.

Parodonțiul marginal este structurat în: parodonțiul superficial format din: mucoasa gingivală și ligamente supraalveolare și din parodonțiul profund, format din: cement, desmodontiu, os alveolar.

Epiteliul joncțional se formează în jurul porțiunii cervicale a dintelui care urmează joncțiunea cementară. Epiteliul joncțional se extinde în direcția apicală de la nivelul porțiunii celei mai declive a șanțului gingival și formează un manșon în jurul dintelui.

Joncțiunea dentogingivală este o adaptare a mucoasei orale care cuprinde epiteliul și componentele țesutului conjunctiv; este considerat a fi un epiteliu scuamos stratificat incomplet dezvoltat, autonom cu un turn-over foarte mare. Este zona singulară din organismul uman unde un țesut moale, vulnerabil din punct de vedere al rezistenței mecanice, se atașează în mod organic de o structură densă, hipermineralizată. În timp, această structură evoluează diferit, producând componente epiteliale atașate, în tipar de progresie continuă și structurează un epiteliu cheratinizat. Natura specială a epitelului joncțional reflectă faptul că țesutul conjunctiv de susținere este funcțional diferit de cel adiacent epitelului sulcular, o diferență cu implicații importante pentru progresia bolii parodontale și regenerarea joncțiunii dentogingivale după chirurgia parodontală.

Cementul este un țesut conjunctiv dur, cu origine mezenchimală, provenind din zona internă a foliculului dentar. El acoperă rădăcinile dinților și permite atașarea și fixarea fibrelor principale ale ligamentului parodontal, este avascular și lipsit de inervație.

Raportul dintre smalț și cement delimitează joncțiunea amelocementară. Cementul este mineralizat în proporție de 45-47%. Există un cement de reparație care aderă foarte bine la suprafața rădăcinii dacă există o fază rezorbtivă care precede noua depunere a matricei.

Ligamentul parodontal este reprezentat de țesutul conjunctiv fibros dens care ocupă spațiul parodontal între rădăcina dintelui și alveolă. El este un țesut unic, multifuncțional specializat, extrem de vascularizat, cu conținut celular diversificat care înconjoară rădăcina dintelui și îl conectează la peretele interior al osului alveolar; se continuă cu țesutul conjunctiv al gingiei și comunică cu spații medulare prin canalele vasculare, în os.

Osul alveolar este reprezentat de partea oaselor maxilare și mandibulare ce conține alveolele dentare. Procesul alveolar realizează suportul morfologic al dintelui, constituirea procesului alveolar se realizează concomitent cu erupția dentară, iar pierderea dintelui, determină o rezorbire a acestuia. Osul alveolar alături de cementul radicular și desmodontiu formează aparatul de ancorare a rădăcinii dentare și absoarbe forțele masticatorii aplicate la nivelul coroanei.

## CAPITOLUL III

### PARODONTOPATII

Etiologie și patogenie. Afecțiunile parodontale, au determinare bacteriană, prezintă caracter cronic și afectează preponderent populația adultă. Reprezintă o cauză majoră de pierdere a dinților. Există o susceptibilitate generală la afecțiunea parodontală, există însă și pacienți care manifestă o rezistență la dezvoltarea acestei afecțiuni. Intensitatea atacului microbial depinde de virulența microorganismelor, cantitatea și compoziția plăcii, abilitatea de a invada țesuturile și de producții lor metabolici. Capacitatea gazdei de a răspunde la atacul bacterian va determina severitatea gingivitei, inițierea parodontitei și rapiditatea cu care vor fi distruse țesuturile parodontale. Prezența microorganismelor în sine nu este capabilă să producă distrugerea țesutului dentoalveolar, și de aceea rolul imunității locale în progresia bolii precum și mecanismul de adaptare la masa de placă bacteriană, fără a determina progresia parodontopatiilor, reprezintă segmentul de studiu cel mai...

Aproximativ 700 de specii bacteriene diferite pot fi detectate în biofilmul subgingival iar infecția este cauzată, în multe cazuri de asociații bacteriene, cu o predominanță a bacililor gram negativi anaerobi care colonizează pungile parodontale.

Bacteriile patogene cu rol în declanșarea bolii parodontale au două caracteristici: invazivitatea și toxigenza (producerea de exo- și endotoxine). Celulele bacteriene intervin în mecanismul patogenității parodontale prin exotoxine, enzime, metaboliți; exotoxina și leucotoxina, intervin toxic la nivelul PMN, distruge leucocitele din șanțul gingival, determinând colonizarea și invazia țesutului parodontal. Mediatorii inflamatori determină distrugerea țesutului conjunctiv gingival, a ligamentului parodontal și a osului alveolar. Modificarea suprafeței rădăcinei se produce prin pierderea stratului cementoplast exterior și rezultă leziuni de resorbție de mică adâncime ale cementului. Endotoxinele produse de bacterii au un efect iritant asupra țesutului moale, împiedicând activarea mecanismelor reparatorii.

Imunitatea specifică și nespecifică, se completează reciproc. Inflamația care rămâne limitată la nivel gingival este rezultatul unei simbioze echilibrate dintre biofilm și țesuturile gazdei, iar dezvoltarea parodontopatiei este rezultatul dezechilibrării simbiozei, fiind modificate de mediu și factorii genetici.

Fluxul salivar și fluidul crevicular din sulcusul gingival îndepărtează continuu producții bacterieni, iar turnover-ul crescut al epiteliului gingival elimină celulele superficiale încărcate bacterian. Neutrofilele participă în tipar determinant la menținerea sănătății parodontale, iar severitatea bolii este crescută în toate formele de neutropenie, agranulocitoză și în alterarea funcției de aderare leucocitară.

Citokinele pro-inflamatorii sunt cele produse în timpul unui răspuns inflamator și favorizează progresia acestuia; interleukina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, și factorul de necroză tumorală (TNF-a), IL-12, IL-18, interferon (IFN) și granulocite macrofage.

Citokinele antiinflamatorii suprimă procesul inflamator, prin capacitatea lor de a suprima expresia genelor pentru citokine pro-inflamatorii și blochează efectele mediatorilor inflamatori citokine antiinflamatoare IL-4, IL-10, IL-13, IL-16 și TGF. Activarea mecanismelor biochimice de secreție a citokinelor vizează mecanisme de semnalizare ca urmare a interferării



dintre tiparul molecular microbial asociat (lipopolizaharide, fimbrii) și tiparul de recunoaștere a receptorilor (Toll like receptors, NODlike receptors) care există în celule din țesuturile parodontale și în infiltratele leucocitare. Studiile existente precizează importanța unui număr mare citokine în inițierea și reglarea răspunsurilor imune în parodontită, precum și în distrugerea țesutului (în principal prin activarea matrix metallo proteinazelor MMP).

Saliva conține numeroși factori antibacterieni de tipul: lizozim, lactoferina, sistemul peroxidaza, dar nu au un rol semnificativ în protecția față de bolile parodontale. Inițial lichidul gingival acționează prin spălarea bacteriilor neaderente de placă și reduce difuzia metaboliților bacterieni spre țesuturi prin diluția lor. Complementul din lichidul gingival este activat de bacteriile opsonizate, de produsele lor metabolice și de endotoxinele bacteriene eliberate. Complementul activat poate determina liza sau inhibiția unui număr de bacterii și intervine în fagocitarea bacteriană de către neutrofile și macrofage. Poate participa și la distincțiile celulare prin componentele sale C3a și C5a, determinând eliberarea histaminei din mastocite precum și a altor factori chemotactici și a mai multor citokine din țesutul parodontal.

Dezvoltarea și progresia bolii parodontale sunt determinate de factori endogeni și exogeni.

Evaluarea, înțelegerea și managementul adecvat al acestor factori facilitează prevenția bolii sau controlul acesteia. O selecție a factorilor de risc din parodontita cronică și agresivă: vârsta pacientului, sângerarea la sondare, diabetul zaharat, afectarea furcației, istoricul de chirurgie parodontală, profunzimea la sondare, nivelul osos evaluat radiologic, restaurații realizate sub marginea gingivală, tartrul subgingival, polimorfisme uni-nucleotidice, istoric de fumător, leziuni osoase verticale. Fumatul are risc crescut pentru leziuni parodontale și a fost confirmat în numeroase studii. Factorii genetici modulează modul în care indivizii interacționează cu agenții de mediu diferiți, inclusiv biofilmele și influențează sensibilitatea la parodontită. Interacțiunea dintre factorii genetici și cei de mediu (nu genele singure), este cea care determină rezultatul. Datorită acestei caracteristici intrinseci, factorii ce țin de stilul de viață permit dezvoltarea afecțiunii. Parodontita este adesea menționată ca a șasea complicație a diabetului. Mai multe studii sugerează că menținerea controlului bolii parodontale poate juca un rol-cheie în controlul diabetului. Există o relație directă între gradul de obezitate și riscul de a dezvolta diabet zaharat de tip 2 atât pentru copii cât și pentru adulși. Obezitatea este o afecțiune multisistem și contribuie în mod semnificativ la dezvoltarea hipertensiunii, diabetului zaharat, arteriosclerozei și a bolilor cardiovasculare și cerebrovasculare. În afara acestor factori de risc, obezitatea a fost sugerată ca factor de risc pentru parodontită. Dieta are un rol modifier în inițierea și progresia bolii parodontale; cu toate acestea, din cauza numeroșilor factori predispozanți și variabile pentru boala parodontală, este dificil să se determine efectele individuale ale fiecărei nutriente pe parodonțiu.

## CAPITOLUL IV

### LEZIUNILE MIXTE ENDOPARODONTALE

Interdependența dintre afectarea parodontală și cea endodontică dezvoltă încă multe confuzii, întrebări și controverse. Diferențierea între problemele parodontale și cele endodontice poate fi dificilă.

Asociația Americană de Endodonție (AAE) utilizează în dicționarul de termeni medicali din 1998 termenul de "leziuni endo-parodontale" (AAE Glossary of Endodontic Terms /electronic edition) .

Asociația Americană de Parodontologie definește leziunile endo-parodontale ca fiind „arii de infecție localizate și circumscrise cu origine în țesuturile parodontale și/sau pulpare”.

Problemele pulpare și parodontale sunt responsabile pentru mai mult de 50% din pierderile de unități dentare. O leziune endo-periodontala poate avea o patogeneză variată, care variază de la simplu la complex .

Deși relația dintre topografia pulpei dentare și a parodontiului este bine documentată, căile de răspândire a bacteriilor între țesuturile pulpare și parodontale au fost discutate și sunt controversate .

Pulpa și parodontiul sunt strâns interrelaționate, având o relație embrionară, anatomică și funcțională. Parodontiul este interconectat cu pulpa dentară atât la nivelul foramenului apical cât și la nivelul canalelor laterale accesorii, aceste căi permițând schimbul de agenți nocivi între cele două compartimente tisulare. Inflamația pulpară determină ca agenții toxici să fie eliminați prin canalul principal, foramenul apical, canalele laterale și canalele accesorii. În timp, orice leziune endodontică poate evolua de-a lungul ligamentului parodontal cu posibilitatea de a forma fistule, aceasta fiind parodontita retrogradă. Inflamația pulpară sau necroza pulpară care se extinde în țesuturile periapicale provoacă un răspuns inflamator local, însoțit de modificări ale metabolismului osos și, uneori, de resorbție radiculară .

Afectarea parodontală are un caracter progresiv. Aceasta începe în sulcus și migrează spre apex, este caracterizată de depozite de placă și tartru care produc și întrețin inflamația; această inflamație distruge progresiv aparatul de susținere și se produce o infiltrare a canalelor laterale, a canalelor accesorii sau canalele dentinare expuse. Menținerea fluxului vascular prin foramenul apical permite activarea mecanismelor defensive (calcificări sau modificări degenerative, minore care pot fi observate histologic). Dacă leziunea parodontală compromite aportul vascular la nivelul foramenului apical, se instalează necroza pulpară și deteriorarea parodontală se accentuează. Prognosticul pentru un astfel de dinte depinde în esență de natura leziunii parodontale . Deși afecțiunea parodontală a fost dovedit a avea un efect cumulativ negativ asupra țesutului pulpar, dezintegrarea totală a țesutului pulpar se instalează doar dacă placa bacteriană implică foramenul apical principal și compromite aportul vascular .

Există opinii că nici tratamentul endodontic nici cel parodontal unitar nu pot conduce la un prognostic bun și vindecare, fiind necesara o terapie bidirecționala [239, 240]. Este general acceptat faptul că afectarea pulpară ar putea iniția sau perpetua afectarea parodontală; teoria inversă este controversată. Simring și Goldberg [172 ] au postulat că terapia endodontică este indicată în tratamentul bolii parodontale terminale care nu răspunde la terapia parodontală.

## CAPITOLUL V

### STUDIUL CLINIC

Scopul acestui studiu a fost acela de a aborda controversa din jurul relației dintre boala parodontală și modificările țesuturilor parodontale și dentinare și de a evalua tipul modificărilor în parodontopatia severă, prin măsurarea statusului clinic și paraclinic al pacienților selectați, afectați de parodontită cronică severă. Parodontita "cronică" se referă la progresia bolii în timp, fără tratament și nu sugerează că boala este "netratabilă." Severitatea se bazează pe evaluarea gradului de pierdere de atașament clinic (CAL-clinical attachment level) și/ sau a pierderii de masă osoasă. Pacienții selectați pentru studiu au fost dintre cei care au solicitat tratament parodontal în cabinetul privat, în perioada octombrie 2011 –martie 2015, având simptomatologie specifică afecțiunilor parodontale: modificări de formă, culoare sau textură ale țesutului gingival, edem, sângerare provocată ușor sau spontană, dureri și sensibilitate gingivale, prurit gingival, mobilitate dentară, punji de diferite adâncimi, hipercreșteri de diferite grade, recesii, modificări ale fizionomiei.

Evaluarea clinică inițială a fost realizată pentru 92 de pacienți, dintre aceștia, doar 37 au corespuns criteriilor de selecție pentru studiu și au continuat prin semnarea formularului de consimțământ informat. Studiul clinic a fost dublat de studiul histologic și imunohistochimic ale parodontiului marginal și ale dentinei pentru dinții extrași.

Pentru obținerea unor rezultate structurate, pacienții au fost repartizați în grupuri, organizate pe criteriul de sex (feminin/masculin), mediu de proveniență (rural/urban) iar un alt grup a fost cel pentru pacienții fumători. Pacienții au fost evaluați clinic și radiologic și au fost diagnosticați cu parodontită cronică severă.

Datele obținute din evaluarea antecedentelor pacienților au fost atent monitorizate pentru realizarea studiilor statistice. Au fost stabilite următoarele rezultate: valori obținute după evaluarea motivului principal/ determinant care îl trimite pe pacient la tratamentul parodontal (tabel 1), valori /grafic obținute după evaluarea comportamentului specific de tratament și a opțiunii de tratament pentru pacienții cu afecțiuni parodontale (tabel 2), valori /grafic obținute după o evaluare a intervalului de timp necesar pentru programarea la tratament de la apariția simptomatologiei (tabel 3), valori /grafic obținute după o evaluare a preocupărilor pentru igiena dentară pentru grupurile de pacienți masculin/ feminin (tabel 4).

Evaluarea clinică și paraclinică a pacientului își propune identificarea tuturor aspectelor anatomice care au suferit modificări, în scopul stabilirii diagnosticului, al planului de tratament și a stabilirii prognosticului parodontal: *evaluarea indicelui de sângerare, măsurarea adâncimii de sondare, evaluarea recesiei, evaluarea furcațiilor, evaluarea mobilității, modificarea structurii/ culorii gingivale, modificarea axului de implantare a dintelui, rezorbție osoasă tipar vertical/ orizontal/mixt, numărul de dinți absenți.*

După examinare și evaluare s-a realizat configurația afectării parodontale (tabel/grafic) ce permite realizarea analizei statistice a pacienților incluși în studiu.

	Pacienți sex fem. (20)	Pacienți sex masc (17)	Urban (29)	Rural (8)	Fumători (11)
Indice de placă	1.76	2.44	1.99	2.35	2.33
Sângerare la sondare	2.8	3.1	2.9	3.06	3.02
Nivelul recesiei	4.2	4.11	4.16	4.12	4.14
Expunerea furcației (grad 4)/pacient	2	1.41	1.93	1.14	1.1
Nivelul de atașament clinic	3.75	3.76	3.60	3.78	3.80
Pierdere de os alveolar ≥50%	4.2	4.5	4.3	4.6	4.7
Mobilitate grad 3&4	3.08	3.97	3.5	4.16	4.19
Absența dinților frontali (număr)	3.2	4,3	3.4	4.5	4.72

Rezultatele acestui studiu clinic au arătat clar că există modificări severe ale parametrilor parodontali și distrucții importante ale țesuturilor parodontale (tabel 5). Conform chestionarului realizat, aceste modificări par a fi consecința unui interval de așteptare mare din momentul apariției simptomatologiei până în momentul instituirii terapiei de specialitate. Evaluarea ținută pe intervalul de timp scurs de la apariția simptomatologiei parodontale până la momentul începerii terapiei a configurat o unitate de timp de 2-5 ani pentru pacienții din zona de studiu, și o deficiență de adresare pentru tratamentele specifice pentru pacienții din mediul rural. Procentul cel mai mare pentru motivul de prezentare la tratament a fost cel al mobilității dentare, un simptom care poate fi capabil să atraga atenția pacientului că apar/ au apărut modificări degenerative. Datele obținute permit o decriptare a unui comportament noncompliant pentru terapia parodontală și /sau stomatologică, motivația legată de teamă și de lipsa de importanță a simptomatologiei prezente fiind omniprezentă în răspunsurile pacienților din chestionar. Necesitatea realizării extracțiilor dentare și apariția problemelor de fizionomie rămân motive concrete pentru care pacienții solicită tratament stomatologic sau parodontal, dar nu cele mai importante, acestea fiind dublate de apariția durerii ca factor determinant (81.8%), conform acestui studiu. Comportamentul de opțiune terapeutică este orientat înspre terapia prin extracție, iar utilizarea unuia dintre mijloacele de igienă secundară are un scor mic. Indicele de placă realizat la pacienții incluși în studiu a avut valori ridicate, deasemenea indicele de sângerare și pierderea de atașament clinic. Pierderea osoasă pentru pacienții acestui studiu a avut valori procentuale crescute pentru pacienții din grupul rural și pentru cei fumători, 57.8% înregistrând pierderi severe de os alveolar. Rezultatele acestui studiu au arătat valori crescute pentru extracția acestor dinți (cu o medie de 4.5 - 4.72 dinți frontali absenți).

## CAPITOLUL VI

### STUDIUL HISTOLOGIC AL MODIFICĂRILOR PERIODONTALE

#### Material, metoda

Evaluarea clinică inițială a fost realizată pentru 92 de pacienți, dintre aceștia, doar 37 au corespuns criteriilor de selecție pentru studiu și au continuat prin semnarea formularului de consimțământ informat. După efectuarea extracțiilor dentare, au fost prelevate fragmente mici de parodonțiu marginal, care au fost supuse imediat operației de fixare în soluție de formol neutru 10% pentru efectuarea unor studii de microscopie optică și imunohistochimie iar volumul soluției fixatoare a fost 15-20 de ori mai mare decât volumul piesei de fixat. Formalina 10% este un fixator blând, de aceea fragmentele de parodonțiu au putut fi păstrate un timp mai îndelungat fără alterarea structurilor celulare sau infracelulare. Procesul de fixare al fragmentelor de parodonțiu a durat 24 de ore la temperatura laboratorului, în timp ce dinții au fost lăsați în fixator 7 zile. După fixare, fragmentele de parodonțiu au fost incluse în parafină histologică, (tehnica histologică clasică pentru includerea la parafină), tehnică ce ne-a permis efectuarea unor secțiuni seriate de 3-5 $\mu$  grosime. Tehnica a comportat următorii timpi:

- a) deshidratarea;
- b) clarificarea;
- c) parafinarea;
- d) includerea propriu-zisă;
- e) secționarea blocului;
- f) lipirea secțiunilor pe lame și uscarea lor;
- g) colorarea secțiunilor;
- h) uscarea și depozitarea materialului histologic.

Secționarea fragmentelor de odonțiu și parodonțiu s-a realizat la microtomul rotativ Microm HM350, dotat cu baie de transfer pe apă pentru secțiuni, obținându-se secțiuni cu grosimea de 4 microni. Secțiunile obținute se lipesc pe lame histologice de sticlă, curățite și degresate. Fiecare lama cu cupa histologică pe ea a fost numerotată după blocul de parafină care corespundea fragmentului de parodonțiu recoltat. Preparatele histologice au fost colorate cu hematoxilină-eozină, cea mai utilizată metodă de evidențiere a țesuturilor și cu tricromicul pe bază de verde de lumină după metoda Goldner-Szeckeli. O parte din preparatele histologice astfel obținute au fost împachetate în coli albe, inscripționate și depozitate într-un loc mai răcoros, ferit de variații de temperatură, pentru a realiza la nevoie alte tehnici de colorare.

#### Rezultate

Tehnica de colorare cu H.E oferă următoarele rezultate:

- |                |                 |
|----------------|-----------------|
| • Citoplasmele | roz             |
| • Nucleii      | albastru        |
| • Nucleolii    | albastru-violet |

- Fibrele de colagen roz palid
- Fibrele elastice și de reticulină nu se colorează.

În colorația tricromică cu verde de lumină GS se constată următoarele rezultate:

- Citoplasmele roz-violaceu,
- Nucleii roșu închis sau maron,
- Nucleolii negru,
- Eritrocitele roșu-portocaliu,
- Fibrele de colagen verde,
- Fibrele musculare roșu-brun.

Studiul microscopic al parodonțiului a evidențiat leziuni foarte variate Cel mai adesea parodonțiul a fost sediul unui infiltrat inflamator cronic, format din limfocite, plasmocite, macrofage și rare granulocyte. Intensitatea proceselor inflamatorii a fost foarte variabilă de la un pacient la altul și chiar pentru același pacient, reacția inflamatorie a fost fie difuză fie sub formă de granuloame.

În mod frecvent, în parodonțiu marginal au fost identificate zone de microhemoragii mai mult sau mai puțin extinse. Noi considerăm că aceste microhemoragiile sunt determinate de leziunile microvaselor din circulația sanguină direct de către agenții patogeni sau indirect prin modificările pH-ului local sau prin secreția unor factori toxici sau a unor enzime (colagenaze, hidrolaze) de către agenții patogeni sau de celulele sistemului imunitar. Intensitatea microhemoragiilor locale și congestia vasculară s-au corelat cu intensitatea procesului inflamator peridental, ceea ce denotă faptul că mecanismele inflamatorii și modificările microcirculatorii locale sunt interdependente. La unii pacienți, alterarea structurii vasculare a determinat extravazarea lichidului plasmatic, cu constituirea de edem în parodonțiul superficial, iar extravazarea plasmei și hematiilor din patul vascular contribuie la realizarea tumefacției parodonțiului de înveliș, la modificare culorii acestuia și la apariția durerii locale.

Au fost observate zone de necroză parodontală de diametre diferite fie în apropierea odonțiului fie la distanță de acesta. Un aspect microscopic particular a fost acela al unei reacții reduse a celulelor de tip fibroblastic, sugerând că procesele regenerative sunt foarte reduse

În studiul nostru am remarcat faptul că vasele de angiogeneza erau în număr redus în conjunctivul parodontal și cu peretele discontinuu sau imatur, deoarece s-au observat numeroase sufuziuni hemoragice și chiar microhemoragii în parodonțiu. Noi credem că acest proces inflamator parodontal are anumite particularități care fac ca proliferarea fibroblastelor și a angioblastelor să fie deficitară. Un aspect microscopic particular observat pe preparatele noastre a fost acela al unei reacții reduse a celulelor de tip fibroblastic.

Este surprinzător faptul că pe preparatele histologice realizate de noi, numărul redus de fibroblaste nu s-a corelat cu intensitatea procesului inflamator cronic.

## CAPITOLUL VII

### STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC AL REACȚIEI INFLAMATORII ÎN PERIODONTITELE MARGINALE CRONICE

Imunohistochimia reprezintă întotdeauna o completare a diagnosticului histopatologic foarte utilă în următoarele cazuri: în stabilirea unui diagnostic pozitiv și diferențial al unor leziuni; în stabilirea etiologiei sau histogenezei; evaluarea unor markeri celulari și tisulari; în terapia unor afecțiuni. Pentru studiul imunohistochimic noi am utilizat același material biologic, adică fragmente de parodontiu recoltate de la cei 37 de pacienți la care s-a efectuat și studiul histologic, numărul de dinți extrași fiind de 63.

Și pentru tehnicile de imunohistochimie cel mai utilizat fixator este formalină 10%. Dacă în majoritatea tehnicilor histologice se preferă secțiuni cu grosimea de 4-5  $\mu\text{m}$ , pentru o observare de bună calitate a rezultatelor chiar și cu un obiectiv cu grosisment mare, în imunohistochimia clasică se preferă secțiuni cât mai subțiri. Spre deosebire de tehnica histologică clasică, unde am utilizat albumina Mayer pentru creșterea adhezivității cupei histologice la lama port-obiect pentru tehnicile de imunohistochimie am folosit lame acoperite cu adezivi speciali pentru a împiedica desprinderea țesutului în cursul procesării (tehnologiile Super Frost și Poly-L-lysine). Adeziunea țesutului pe lamă este completă după o uscare de o noapte într-un incubator la 45°C. Tehnicile de imunohistochimie utilizează pentru deparafinare și hidratare aceleași procedee, respectiv 3-4 băi cu hidrocarburi aromatice și alcool etilic în concentrații descrescânde. Un timp particular al tehnicilor de imunohistochimie îl reprezintă așa zisa „demascare antigenică”, noi am utilizat tehnica de „demascare a antigenului cu ajutorul microundelor” cu ajutorul tampoanelor citrat (pH 6) și EDTA (pH 8).

Metoda streptavidină-biotină are la bază conjugarea directă a streptavidinei cu moleculele enzimatice. Enzima de detecție utilizată de noi a fost peroxidaza. Cromogenul utilizat în cazul peroxidazei este diaminobenzidina. Rezultatele colorării sunt valide dacă se exclude orice interferență care determină o colorație nespecifică (controlul negativ nu se colorează) și dacă sensibilitatea tehnicii este garantată (țesutul control pozitiv este pozitiv, el conținând antigenul în studiu în concentrație redusă).

Prin studiul imunohistochimic realizat de noi am încercat să evaluăm care sunt celulele sistemului imunitar care participă la formarea infiltratului inflamator din periodontita marginală cronică. În studiul nostru am utilizat următorii markeri de imunohistochimie:

Anticorp	Epitop / marker	Diluție	Recuperare antigenică	Sursă
CD45	<b>Leucocite</b>	<b>1/100</b>	<b>Fierbere în citrat</b>	<b>Dako</b>
CD3	<b>Limfocite T</b>	<b>1/100</b>	<b>Fierbere în citrat</b>	<b>Dako</b>
CD4	<b>Limfocite T</b>	<b>1/100</b>	<b>Fierbere în citrat</b>	<b>Dako</b>
CD8	<b>Limfocite T</b>	<b>1/100</b>	<b>Fierbere în citrat</b>	<b>Dako</b>
CD20cy	<b>Limfocite B</b>	<b>1/100</b>	<b>Fierbere în citrat</b>	<b>Dako</b>
CD79-alfa	<b>Plasmocite</b>	<b>1/100</b>	<b>Fierbere în citrat</b>	<b>Dako</b>
CD68	<b>Macrofage</b>	<b>1/200</b>	<b>Fierbere în citrat</b>	<b>Dako</b>

Markerul CD45 a fost utilizat pentru a evidenția amploarea prezenței limfocitelor T în periodonțiu inflammat din periodontita marginală cronică; în studiul nostru limfocitele T au fost prezente în număr foarte mare în parodonțiu. În studiul nostru, am identificat puține granulocite neutrofile în procesul inflamator din periodontitele cronice.

Prin utilizarea markerului CD3 am evidențiat prezența limfocitelor T citotoxice și helper, în periodontitele marginale cronice am remarcat prezența unui număr mare de limfocite CD3 pozitive, cel mai adesea, limfocitele CD3 au apărut diseminate difuz și neomogen, mai ales perivascular în periodonțiu.

Limfocitele CD4 pozitive. În studiul nostru nu s-au evidențiat decât extrem de rar limfocite CD4 pozitive.

Comparativ cu limfocitele CD4, limfocitele CD8 pozitive au fost mult mai abundente în periodonțiu din parodontitele cronice

Evaluarea limfocitelor B în periodontitele cronice s-a făcut prin utilizarea anticorpului anti-CD20. În studiul nostru limfocitele B au fost prezente la toate persoanele cu periodontită cronică, dar ele au fost distribuite neuniform în țesutul conjunctiv parodontal.

Investigarea reacției celulelor sistemului macrofagic s-a făcut prin utilizarea anticorpului anti-CD68. În studiul nostru, celule de tip macrofagic au fost răspândite neomogen în țesutul conjunctiv al parodonțiului inflammat.



## CAPITOLUL VIII

### STUDIUL MICROSCOPIC AL MODIFICĂRILOR DENTINARE LA PACIENȚII CU PERIODONTITELE MARGINALE CRONICE

După obținerea consimțământului informat al fiecărui pacient s-au efectuat extracțiile dentare. Dinții extrași (63) au fost supuși imediat operației de fixare în soluție de formol neutru 10% pentru efectuarea studiilor de microscopie optică. Procesul de fixare al dinților a fost de 7 zile. După fixare, dinții au fost supuși unei operații de decalcifiere în soluție de acid tricloracetic 10% timp de 30 de zile. Pentru o decalcifiere rapidă și omogenă s-a schimbat zilnic soluția de decalcifiere, iar vasul cu dinții și soluția decalcifiantă au fost puse pe un agitator magnetic. Am considerat că decalcifierea a fost optimă atunci când piesele au devenit suficient de moi și flexibile. După realizarea decalcifierii dinții au fost secționati longitudinal, spălați în apă timp de 24 de ore și incluși apoi în parafină.

Secționarea s-a realizat la microtomul rotativ Microm HM350, obținându-se secțiuni cu grosimea de 5 micrometri care au fost colorate cu hematoxilină-eozină și cu tricromicul Goldner-Szeckeli. Din studiul nostru am observat că modificările dentinare sunt destul de complexe și variate. Noi considerăm că în apariția și dezvoltarea eroziunilor dentare intervin mai mulți factori, cum ar fi proprietățile structurale ale dintelui, modificările proprietăților fiziologice ale lichidului salivar, consumul de substanțe cu pH scăzut.

Noi credem că eroziunile apărute la nivelul dentinei radiculare sunt rezultatul agresivității florei bacteriene, care are capacitatea de a forma un mediu acid care dizolvă componenta minerală a dentinei, urmată de distrugerea componentei organice.

## CONCLUZII GENERALE

Pacienții se prezintă la cabinet pentru inițierea terapiei, tardiv, într-o fază avansată de distrucție tisulară. Opțiunea de tratament a pacienților, cea mai comună pentru terapia dinților afectați de parodontopatie este extracția. Programările pentru inițierea tratamentului se realizează în intervalul 2-5 ani de la debutul simptomatologiei; au fost observate, corelații semnificative între amânarea tratamentelor de specialitate și valoarea negativă a parametrilor parodontali. Procesul inflamator cronic parodontal a fost însoțit frecvent de microhemoragii locale și necroze celulare și tisulare, atestând astfel agresivitatea unor specii bacteriene care au pătruns subgingival formând adevărate pungi periodontale. Studiul imunohistochimic a confirmat faptul că în parodontitele marginale cronice infiltratul inflamator este format preponderent din limfocite T CD45 pozitive. Dintre limfocite T, cele mai numeroase au fost limfocitele CD3, limfocitele CD8, în timp ce limfocitele CD4 au fost slab reprezentate. Au evidențiate cantități mare și de limfocite B (CD20 pozitive), plasmocite (CD79-alfa pozitive) și macrofage (CD68 pozitive), ceea ce demonstrează că reacția de apărare în parodontitele marginale cronice este complexă, la ea participând atât imunitatea celulară cât și cea umorală.

## BIBLIOGRAFIE

1. Nanci A, Ten Cate's Oral Histology, 8th Edition, Elsevier, 2013
2. Garant PR. Oral Cells and Tissues. 1st ed. Quintessence. Chicago,2003
3. Rose, Louis F. Periodontics: Medicine, Surgery and Implants. Mosby. St. Louis2004
4. Gargiulo AW, Wentz FM, Orban B.(1961).Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans. J Periodontol; 32:261-267.
5. Nelson SJ Wheeler's Dental Anatomy, Physiology and Occlusion,9-th edition Saunders; 2009
6. Scheid, R.C, Weiss Gabriela. Woelfel's Dental Anatomy: It's Relevance to Dentistry. 8<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2011
7. Carranza FA, Bernard GW(2003) Carranza's Clinical Periodontology, ed 9, WB Saunders Philadelphia. (pp 36–57) Newman MG. Carranza's clinical periodontology. 11<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2011.
8. Schroeder, H.E. & Listgarten, M.A. (1997). The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontology 2000 13, 91–120.
9. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontol 2000 1997; 13: 91–120.
10. Karring T, Lang NP, Loe H. The role of gingival connective tissue in determining epithelial differentiation. J Periodontal Res 1975; 10: 1–11.
11. Hakkinen L, Oksala O, Salo T, Rahemtulla F, Larjava H. Immunohistochemical localization of proteoglycans in human periodontium. J Histochem Cytochem 1993; 41: 1689–1699.
12. Michael G. Newman, DDS, Henry Takei, DDS, Perry R. Klokkevold Carranza's Clinical Periodontology:Elsevier,1996
13. D'Aiuto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J & Tonetti MS (2006) Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: Results from a randomized controlled clinical trial. Am Heart J 151(5): 977–984.
14. Monteiro AM, Jardim MA, Alves S, Giampaoli V, Aubin EC, Figueiredo Neto AM & Gidlund M (2009) Cardiovascular disease parameters in periodontitis. J Periodontol 80(3): 378–388.
15. Buhlin K, Mäntylä P, Paju S, Peltola JS, Nieminen MS, Sinisalo J & Pussinen PJ (2011) Periodontitis is associated with angiographically verified coronary artery disease. J Clin Periodontol 38(11): 1007–1014.
16. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999- 2008. JAMA. 2010;303(3):235-241
17. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. J Periodontol. 2005;76(suppl 11):2075-2084.
18. S Martu, C.Mocanu, Parodontologie Clinica, Apollonia,2000
19. Simring M., Goldberg M. (1964): The pulpal pocket approach: retrograde periodontitis, J Periodontol 35:22.
20. M. Torabinejad and M. Trope, "Endodontic and periodontal interrelationships," in Principles and Practice of Endodontics, R. E. Walton and M. Torabinejad, Eds., 1996
21. Al-Fouzan K. S A New Classification of Endodontic-Periodontal Lesions International Journal of Dentistry Vol. 2014 (2014),
22. Vertucci FJ. Root canal anatomy of the mandibular in central incisors. J anterior teeth. J Am Dent Assoc1974;89:369-71
23. Gutmann JL. (1978): Prevalence, location, and patency of accessory canals in the furcation region of permanent molars. Journal of Periodontol. 49(1):21-26.
24. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology.Periodontology 2000. 2005;38(1):135-187.
25. Morris AJ, Steele J, White DA. The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. Br Dent J 2001 191: 186-192
26. Lang WP, Ronis DL, Farghaly MM. Preventive behaviors as correlates of periodontal health status. J Public Health Dent 1995 55: 10-17.
27. Bergström J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. J Clin Periodontol. 2000;27:61–68. [PubMed]
28. Monteiro da Silva, A.M.; Newman, H.N.; Oakley, D.A. & O'Leary, R. (1998) Psychological factors, dental plaque levels and smoking in periodontitis patients. J Clin Periodontol, Vol. 25, pp. 517-523.

29. Imatani T, Kato T, Okuda K. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*. 2001;16(2):65–72.
30. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Archives of Oral Biology*. 2014;59(2):167–175.
31. Gibson FC 3rd, Savelli J, Van Dyke TE, Genco CA. Gingipain-specific IgG in the sera of patients with periodontal disease is necessary for opsonophagocytosis of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2005 Oct; 76(10):1629-36.
32. Stephenson TJ. Inflammation. In: Underwood JCE (ed). *General and systemic pathology*. Churchill Livingstone. London, 1992: 177-200.