

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Programa Macro de Investigación

SEMINARIO DE GRADUACIÓN

**Planteamiento de un protocolo para el análisis microbiológico en fluido crevicular y
saliva**

Directora de Seminario:

Dra. Gisella Rojas González

Profesora asociada:

Dra. Sandra Silva de la Fuente

Sustentantes del Seminario de Graduación:

María José Chinchilla Hidalgo

Silvia Díaz Castro

Carolina Fong Xiao

Carolina González Villalobos

María Fernanda Hernández Brenes

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio Brenes, Costa Rica
San José, Costa Rica
Año 2017



Hoja de aprobación
MEMORIA
SEMINARIO DE GRADUACIÓN

Nombre del Proyecto: Planteamiento de un protocolo para el análisis microbiológico en fluido crevicular y saliva.

Sustentantes:

Fecha: 8 de diciembre del 2017.

- María José Chinchilla Hidalgo B21945
Silvia Díaz Castro B12226
Carolina Fong Xiao B02421
Carolina González Villalobos A92802
María Fernanda Hernández Brenes B13180

Handwritten signatures in blue ink corresponding to the list of students.

Miembros del Tribunal

Nombre:

Firma:

Handwritten names of tribunal members: Asma Rojas A, Guisela Murillo K., David Tapia, Tatiana Vega, Carlos E. Filloy

Handwritten signatures of tribunal members corresponding to the names listed.

Hoja de autorización

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Vicerrectoría de Investigación
Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información (SIBDI)

Autorización para la digitalización, inclusión y publicación de trabajos finales de graduación (TFG) en el acervo digital del Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información de la Universidad de Costa Rica (SIBDI-UCR).

Los abajo firmantes, en su condición de autores del Trabajo Final de Graduación: ***Planteamiento de un protocolo para el análisis microbiológico en fluido crevicular y saliva.***

AUTORIZAMOS de forma gratuita al SIBDI-UCR, a digitalizar e incluir dicho TFG en el acervo digital del SIBDI-UCR y a publicarlo por medio de la página web u otro medio electrónico, para ser accesado según lo que el SIBDI defina para su consulta o divulgación. Dicho texto se publicará en formato PDF, o en el formato que en su momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre y gratuito, permitiendo su consulta e impresión, pero no su modificación. Los autores del TFG, garantizan al SIBDI-UCR que la tesis es el trabajo original que sirvió para la obtención de su Título, que no infringe ni violenta ningún derecho de terceros.

Lic., Licda. _____ # cédula _____
Domicilio: _____
Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____
Domicilio: _____
Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____
Domicilio: _____
Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____
Domicilio: _____
Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____
Domicilio: _____
Firma _____, Fecha: _____

Lic., Licda. _____ # cédula _____
Domicilio: _____
Firma _____, Fecha: _____

Para uso interno. Número de tesis: _____

Dedicatorias

Este proyecto lo dedico a Dios, por ser el que me ha permitido llegar hasta aquí, dándome fortaleza y capacidad para desempeñarme, quien me ha acompañado día con día y me ha sostenido en cada situación.

A mis padres, por apoyarme desde el momento en que tomé la decisión de estudiar esta carrera, hasta hoy.

A mis hermanos y a mi abuelita, quienes han estado a mi lado cada día y han estado ahí cada vez que he necesitado de ellos.

A todos los instructores y docentes de la Facultad de Odontología quienes, de una u otra manera, han invertido su tiempo y dedicación en la enseñanza que he obtenido a lo largo de esta carrera.

Por último, a mis amistades, conocidos y todos aquellos que me han ayudado a desarrollar este trabajo de investigación, y que han sido un pilar en mi vida y en este camino.

¡Muchísimas gracias! Que Dios los bendiga siempre.

María José Chinchilla Hidalgo

A la vida al permitirme esta experiencia de enseñanza superior, la cual es un privilegio al que pocos tienen acceso.

A mi familia, quienes han sido mi apoyo constante, indispensable e incondicional en mi proceso de enseñanza superior.

A mis compañeros y amigos de carrera, quienes han sido mi segunda familia y un gran apoyo en todo este proceso.

A Abraham, por toda la paciencia y por ser el mejor amigo que un estudiante de odontología pueda tener.

Silvia Díaz Castro

Dedico este proyecto a mis padres, por todo el apoyo que me han dado todos estos años, gracias a ellos por todo lo que han hecho y hacen por mí estando lejos de casa, por apoyarme siempre en todo momento.

A Dios, por todas las bendiciones que he tenido en mi vida, por la fortaleza y esperanza que me ha dado en los momentos difíciles.

A mis hermanos, familia, amigos y compañeros por su ayuda, comprensión, paciencia en todo momento y por todo lo que hemos compartido a lo largo de estos años.

A mis profesores, por todo lo que nos han enseñado y todos los conocimientos compartidos para ser mejor persona y profesional cada día.

Carolina Fong Xiao

Este proyecto lo dedico a mis padres, por el apoyo incondicional que me han brindado siempre para lograr culminar con éxito este proyecto de vida, por impulsarme siempre a cumplir mis metas, por darme bases de responsabilidad, ética y humanismo que espero se vean reflejadas en mi práctica profesional.

A Dios, por darme fortaleza, entendimiento y sabiduría en su debido momento; a mis hermanos por siempre estar presentes, a pesar de la distancia, mi abuelita por escuchar, y ser una guía en el camino; a mi novio, por su paciencia, comprensión y ayuda para superar los obstáculos.

A mis compañeros y amigos, que han sido mi segunda familia; a mis profesores y profesoras por compartir su conocimiento e impulsarme a ser mejor persona y profesional.

Carolina González Villalobos

A Dios, por bendecirme con salud y fuerzas durante mi carrera, por ser mi guía, iluminar mi camino y permitirme cumplir mis sueños.

A mi madre, por el apoyo incondicional durante todo mi proceso de educación, no hay palabras que reflejen mi infinito agradecimiento hacia ella, por ser la mejor madre, por ser mi guía e inspiración en mi crecimiento personal y profesional. Gracias por ser mi ejemplo de vida.

A mi hermana y hermanos, por el apoyo y ayuda que siempre me han brindado, por estar ahí cuando los necesito, y por ser en mi vida ejemplo de esfuerzo y superación.

A la Facultad de Odontología, a todos los maestros que fueron parte de mi formación, por todos los conocimientos que me transmitieron a lo largo de mi carrera, gracias a todos por el respaldo, la confianza y el apoyo durante mi capacitación profesional.

A mis compañeros y amigos, por llegar a mi vida y ahora formar parte de ella, por su amistad, apoyo y enseñanzas.

María Fernanda Hernández Brenes

Agradecimientos

Agradecemos a la Facultad de Odontológica de la Universidad de Costa Rica que por medio de sus docentes y personal administrativo fue formando tanto profesional como humanitariamente a lo largo de este camino, por brindarnos las herramientas y ser guía en nuestro crecimiento profesional.

A la Dra. Gisella Rojas González, por su dedicación a la enseñanza, por ser nuestra orientadora, acompañarnos y respaldarnos durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Sandra Silva de la Fuente, por su ayuda en el análisis de las muestras, por su atenta y desinteresada colaboración en el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Gina Murillo Knudsen, por su tiempo y colaboración en los seminarios de sustento teórico para nuestro proyecto.

A los pacientes, estudiantes e instructores de la Preclínica de Periodoncia que participaron directa o indirectamente, dándonos parte de su tiempo en la recolección de los datos para la elaboración de este proyecto.

Revisión por el filólogo

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE FILÓLOGO

San José, 13 de noviembre del 2017.

Señores

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Estimados señores:

Por este medio, yo, Bolívar Bolaños Calvo, mayor, casado, filólogo, incorporado (a) al Colegio de Licenciados y Profesores en Letras, Filosofía, Ciencias y Arte, con el número de carné 2 949, vecino (a) de Turrúcares de Alajuela, portador de la cédula de identidad 0202790320, hago constar:

1. Que he revisado la **MEMORIA DEL SEMINARIO DE GRADUACIÓN** para optar por el grado académico de **LICENCIATURA EN ODONTOLOGÍA**, denominado **PLANTEAMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN FLUIDO CREVICULAR Y SALIVA**, de las estudiantes **MARÍA JOSÉ CHINCHILLA HIDALGO, SILVIA DÍAZ CASTRO, CAROLINA FONG XIAO, CAROLINA GONZÁLEZ VILLALOBOS Y MARÍA FERNANDA HERNÁNDEZ BRENES**.
2. Que se le han hecho las correcciones pertinentes en acentuación, ortografía, puntuación, concordancia gramatical y otras del campo filológico.

En espera de que mi participación satisfaga los requerimientos de la Universidad.

Se suscribe, atentamente,

Dr. Bolívar Bolaños Calvo

No. 2 949

2-279-320

solymasa@facsacsa.co.cr

Índice General

Hoja de aprobación	ii
Hoja de autorización.....	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos.....	viii
Revisión por el filólogo	ix
Lista de figuras	xiv
Abreviaturas	xv
Resumen	xviii
Capítulo I: Introducción.	19
1.1 Justificación	22
1.2 Planteamiento del problema	23
1.3 Antecedentes	24
1.4 Objetivos	26
1.4.1 Objetivo general.....	26
1.4.2 Objetivos específicos	26
Capítulo II: Marco teórico	27
2.1 Generalidades de la enfermedad periodontal	28
2.1.1 Periodoncio normal	28
2.1.2 Anatomía de la encía	28
2.1.3 Líquido crevicular.....	29
2.1.4 Elementos celulares del ligamento periodontal.....	29
2.1.5 Pronóstico periodontal	30
2.1.6 Fases del tratamiento.	31
2.2 Inmunología general	32
2.2.1 Inmunidad Innata	33
2.2.1.1 Fagocitosis	35
2.2.1.2 Reconocimiento de microorganismos.....	35
2.2.1.3 Receptores relacionados con membrana	36
2.2.1.4 Tipos celulares de inmunidad innata	38
2.2.2 Inmunidad adquirida	38

2.2.3 Inmunidad celular.....	39
2.2.4 Inmunidad humoral	41
2.2.5 Células inmunitarias.....	44
2.2.5.1 Células mieloides	45
2.2.5.2 Células linfoides	47
2.2. 6 Antígenos y reconocimiento antigénico.	49
2.2.6.1 Antígeno	49
2.2.6.2 Inmunógeno:.....	49
2.2.6.3 Epítopo:	49
2.2.6.4 Tipos de antígeno según su origen (15).	50
2.2.6.5 Tipos de antígenos según su composición química (15).....	52
2.2.6.6 Características de los antígenos:	54
2.2.6.7 Sistema Biológico y la Inmunogenicidad.	56
2.2.6.8 Anticuerpos: Estructura y función.	57
2.2.6.9 Respuesta ante antígenos.....	58
2.3 Saliva total	60
2.3.1 Definición de saliva total.	61
2.3.2 Componentes de la saliva.....	62
2.3.2.1 Componentes inorgánicos	62
2.3.2.2 Componentes orgánicos.....	62
2.3.3 Características preanalíticas de la saliva	63
2.3.3.1 Ventajas.....	63
2.3.3.2 Limitaciones.....	63
2.3.4 Principales marcadores para enfermedades periodontales que se encuentran en saliva.....	65
2.3.4.1 Actividad enzimática en la saliva	65
2.3.4.2 Óxido nítrico radical (NO)	67
2.3.5 Otros marcadores en enfermedades periodontales	67
2.4 Análisis del contenido inflamatorio en el fluido crevicular	68
2.4.1 Función inmunitaria.....	69
2.4.2 Significación clínica del contenido del líquido gingival	69
2.4.3 Recolección de muestras a partir del fluido crevicular.	71

2.4.3.1 Tiras de papel.....	71
2.4.3.2 Micropipetas.....	72
2.4.3.3 Microjeringas.....	73
2.4.3.4 Tiras de plástico.....	73
2.5 Células inmunológicas en sangre: los neutrófilos y su función.....	73
2.5.1 Sangre.....	73
2.5.2 Eritrocitos:.....	74
2.5.3 Leucocitos:.....	74
2.5.3.1 Neutrófilos:.....	75
2.5.3.2 Eosinófilos:.....	78
2.5.3.3 Basófilos.....	79
2.5.3.4 Linfocitos:.....	79
2.5.3.5 Monocitos:.....	79
2.6 Biopsia de tejido gingival.....	80
2.6.1 Diagnóstico de Infecciones bacterianas y fúngicas.....	81
2.6.2 Diagnóstico molecular.....	82
2.6.2.1 Sonda de hibridización 16S Rrna.....	84
2.6.2.2 Sistemas de amplificación objetiva.....	84
2.6.3 Protocolo.....	86
2.7 Interacción de los anticuerpos y antígenos en la enfermedad peridontal....	87
Capítulo III: Metodología.....	91
3.1 Población y muestras.....	92
3.2 Criterios de inclusión.....	92
3.3 Criterios de exclusión.....	92
3.4 Instrumentos de recolección de datos.....	93
3.5 Protocolo para muestras de saliva.....	93
3.5.1 Toma de muestras.....	93
3.5.2 Análisis de las muestras en laboratorio.....	94
3.6 Protocolo para muestras de fluido crevicular.....	96
3.6.1 Toma de las muestras.....	96
3.6.2 Análisis de las muestras en laboratorio.....	97
Capítulo IV.....	99

4.1 Conclusiones.....	100
4.2 Limitaciones	101
Capítulo V.....	102
5.1 Cronograma de actividades	103
5.2 Bitácora.....	112
5.3 Referencias bibliográficas	115
5.4 Anexos	120

Lista de Figuras

- Figura 1. Tubos de ensayo con muestras de saliva. (Fotografía tomada en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM), ubicado en la ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR)).
Fotografía de elaboración propia. 94
- Figura 2. Colocación de los tubos de ensayo en la centrifuga y luego su decantación. Fotografía de elaboración propia. 94
- Figura 3. Tubos de ensayo con el botón y al que se le agregan buffer Lisis y Proteinasa K. Fotografía de elaboración propia. 95
- Figura 4. Posterior a la agregación de NaCl y cloroformo- alcohol isoamílico, se agita en el vortex y se observan dos capas en el tubo de ensayo. Fotografía de elaboración propia. 95
- Figura 5. ADN precipitado posterior a la colocación de etanol. Fotografía de elaboración propia. 96
- Figura 6. Corte de los Paper Points y su colocación en tubo eppendorf. Fotografía de elaboración propia. 97
- Figura 7. Colocación de Chelex al tupo eppendorf con los Paper Points. Fotografía de elaboración propia. 98
- Figura 8. Incubación en baño maría de los tubo eppendorf con las muestras de líquido crevicular y Chelex. Fotografía de elaboración propia. 98

Abreviaturas

A.A.....	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Ac.....	Anticuerpo
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ARN.....	Ácido ribonucleico
ARNr.....	Ácido ribonucleico ribosomal
Ag.....	Antígeno
AST.....	Aspartato aminotransferasa
C°.....	Centígrados
Ca ²⁺	Ion calcio
CDR.....	Región determinante de la complementariedad
CD4.....	Cúmulo de diferenciación 4
CD8.....	Cúmulo de diferenciación 8
CD47.....	Cumulo de diferenciación 47
CIBCM.....	Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular
Cl ⁻	Ion Cloro
CLR.....	Receptores de lectina tipo C
CTL.....	Linfocitos T Citotóxicos
Da.....	Daltons
DAMP.....	Componentes endógenos liberados por células muertas
ECP.....	Proteína catiónica del eosinófilo
EDN.....	Neurotoxina derivada del eosinófilo
ELISA.....	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EPO.....	Peroxidasa del eosinofilo
Fab.....	Fragmento de unión a antígenos
Fc.....	Fracción constante
FR.....	Factor reumatoide
HCO ₃ ⁻	Ion bicarbonato

HLA-I.....Antígenos leucocitarios humanos I
HLA-II.....Antígenos leucocitarios humanos II
Ig.....Inmunoglobulina
IL.....Interleucina
IL-1.....Interleucina -1
JAM-A.....Molécula A de adhesión de unión
K⁺.....Ion Potasio
Linfocitos T.....Células del Timo
MHC.....Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Mg.....Magnesio
Na⁺.....Ion Sodio
NaCl.....Cloruro de Sodio
NADPH.....Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NH₃.....Amoniacó
NK.....Natural Killer
TCR.....Receptor de células T
T_c.....Células T Citotóxicas
T_H.....Células T Colaboradoras
TNF-α.....Factor de necrosis tumoral alfa
PAMP.....Patrones moleculares asociados a agente patógeno
PCR.....Reacción en cadena de la Polimerasa
P. Gingivalis.....Porphyromonas Gingivales
PMN.....Polimorfonucleares
PRR.....Receptores de reconocimiento de patrones
TLR.....Receptores tipo Toll
UAC.....Unión amelocemento
UCR.....Universidad de Costa Rica

VH.....Dominio variable pesado
VL.....Región variable ligera

Resumen

En el presente trabajo de investigación se hizo una revisión bibliográfica de las generalidades de la enfermedad periodontal. Así mismo, se realizó una revisión de los conceptos básicos de inmunología periodontal. Este conocimiento es importante para comprender y explicar el mecanismo inmunoinflamatorio presente en la periodontitis; así como reconocer el agente microbiológico causal de alteraciones en el organismo que inicien la respuesta inmunoinflamatoria en el huésped y así mejorar el diseño del tratamiento que se realiza al paciente periodontal.

Adicionalmente, se realizó un planteamiento para la extracción de muestras de fluido crevicular y saliva, para determinar cuál de los dos tipos de muestras representa mayor veracidad diagnóstica y mayor sencillez metodológica.

Desea realizarse un estudio epidemiológico nacional, pero previo a esto, debe tenerse certeza de si los dos tipos de fluidos son equivalentes en la representación de la flora bacteriana o si alguno de los fluidos es mejor que el otro esto, porque la recolección de la muestra de saliva es más sencilla, porque no necesita la calibración del operador; que sí es preferible en la recolección del líquido crevicular.

Con estos resultados podrá realizarse un estudio de campo con mayor asertividad y obtener mejores resultados. La técnica de análisis molecular PCR es preferible en comparación con análisis de cultivos bacterianos, ya que es más precisa la extracción y amplificación de ADN mediante la técnica de PCR; por esto, es la técnica es la escogida para el análisis de las muestras, tanto de saliva como de líquido crevicular.

Capítulo I: Introducción

Según Carranza la periodontitis se define como "...la enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte del diente causada por microorganismos o grupos de microorganismos específicos que producen destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar con formación de bolsas, recesión o ambas" (1). Una de las características principales de la periodontitis es la presencia de bolsas periodontales. La bolsa periodontal es el surco gingival profundizado de una manera patológica (1). Cuanto más profunda sea la bolsa, mayor será la dificultad de limpieza para el paciente.

El factor etiológico de esta enfermedad es el biofilme dental, conocido anteriormente como placa bacteriana. En ausencia del biofilme dental la periodontitis no se manifiesta en el huésped (1). Esta enfermedad se ha relacionado con otras afecciones sistémicas, entre las cuales se puede mencionar: enfermedad coronaria y enfermedad renal crónica (2).

Diferentes estudios han relacionado la enfermedad periodontal y los problemas cardiovasculares debido a que la infección bacteriana crónica existente en la periodontitis puede inducir la agregación plaquetaria como consecuencia de la influencia bacteriana, daño al tejido cardiovascular por las toxinas bacterianas y la predisposición a formación de placas de ateroma (3). Además, se ha relacionado con parto prematuro y bajo peso al nacer en niños, cuyas madres presentan enfermedad periodontal. (2).

La enfermedad periodontal es la afección bucal más común en adultos, se estima que un 35% de adultos mayores de 30 años presentan esta condición en los Estados Unidos (2). No es común en niños y adolescentes entre 12-17 años de edad, estimándose una afectación de menos del 1% para estas poblaciones (3). Los factores de riesgo de la enfermedad son: mala higiene oral, fumado, compromiso inmunológico, diabetes mellitus, respiración bucal, entre otros (3). Actualmente, estudios similares en población nacional no existen.

Los estudios sobre enfermedad periodontal abarcan no solo su extensión (nivel de avance de la enfermedad), sino también se estudian los agentes causales de la misma. Los microorganismos responsables del desarrollo de la periodontitis son múltiples, y se debe de identificar el papel que cada uno juega en el desarrollo de la enfermedad. Además, es importante identificar los sitios en los cuales habitan estos microorganismos, para saber los lugares específicos que atacan. Para lo anterior, se recolectan muestras de diferentes fluidos corporales, en este caso particular: líquido crevicular y saliva total. El análisis que identifica la presencia o ausencia de los microorganismos periodontopatógenos se realiza por medio de pruebas de ADN confirmatorias, por ejemplo, análisis de PCR o sonda ribosomal.

En el presente estudio, se realiza una revisión bibliográfica acerca de la enfermedad periodontal, sistema inmunológico y agentes microbiológicos de dicha enfermedad. Esta revisión será utilizada como anteproyecto para hacer el estudio piloto sobre saliva-fluido crevicular, que, a su vez, definirá cuál muestra es más representativa para hacer un estudio epidemiológico a nivel nacional, que, a su

vez, de sustento a un estudio de la relación de dichos microorganismos y la condición periodontal/inmunológica expresada en la respuesta a neutrófilos y otras células inmunológicas.

1.1 Justificación

En la enfermedad periodontal está presente microorganismos periodontopatógenos asociados al progreso y severidad de la afección de la periodontitis que son capaces de desafiar los mecanismos de defensa del huésped, causando daño y alterando el equilibrio entre el huésped y la microflora oral, por lo que al estudiar estos microorganismos puede observarse la relación que existe entre la enfermedad periodontal con la elevada presencia de microorganismos en los sitios enfermos, la presencia de mejoría clínica tras la eliminación o disminución de las bacterias del área subgingival y la presencia de reacción inmunitaria celular o humoral del huésped. (4)

Existen estudios para examinar muestras de saliva o de fluido crevicular gingival; algunos de estos estudios de recolección de muestras del fluido crevicular gingival son costosos o complejos de llevarlos a cabo por el elevado costo en términos de calibración para las personas que vayan a ejecutar las muestras. También, existe el alto riesgo de contaminar las muestras de las puntas de papel que se requieren para la recolección del fluido crevicular gingival, ya sea con biofilme supragingival o sangre. Para la obtención y almacenamiento de saliva es mucho más sencillo y de bajo costo, es una muestra que se obtiene de forma

no invasiva, por lo que se encuentra libre de estrés para el paciente, además de que puede obtenerse muestras repetidas. (4)

En Costa Rica, no existe un estudio epidemiológico reciente que cuantifique la presencia bacteriana en la enfermedad periodontal de la población. Una desventaja para la obtención de muestras es que quiere examinarse pacientes con enfermedad periodontal, pero descartando enfermedades metabólicas, sin antecedentes a largo plazo de medicamentos que podrían afectar el estado periodontal y fumadores, esto porque altera las muestras.

Por lo tanto, es propósito de este estudio preliminar conocer la presencia de agentes microbiológicos en la enfermedad periodontal, así como los mejores sitios para la recolección de muestras y su respectivo análisis de marcadores inmunoinflamatorios mediante técnicas de biología celular y molecular.

1.2 Planteamiento del problema

Este proyecto de investigación se enfocó en el estudio de los mediadores inmunológicos asociados a la enfermedad periodontal, por medio de un análisis microbiológico en fluido crevicular y saliva, esto como modelo piloto para el establecimiento de protocolos de investigación de futuros estudios epidemiológicos.

Para un efectivo entendimiento del problema se inició con la revisión bibliográfica de los conceptos de inmunología relacionados con la enfermedad

periodontal, y las técnicas de laboratorio utilizadas para el estudio de los agentes etiológicos y respuestas inmunológicas del organismo a la enfermedad.

La enfermedad periodontal, a pesar de haberse estudiado por muchos años, aún hay aspectos que no se comprenden a cabalidad. Hay pocas investigaciones que puedan aportar información relevante para aclarar las interrogantes, por lo que el presente trabajo pretende iniciar la línea de investigación para resolver la interrogante: ¿Por qué se da tanta variabilidad en el desarrollo de la enfermedad periodontal entre individuos con los mismos agentes periodontopatógenos?

1.3 Antecedentes

En la enfermedad periodontal, la interacción que tenga el microorganismo con el huésped va a determinar la magnitud y el curso de la enfermedad. Además, de la destrucción de tejido, otra acción que ejercen los microorganismos es la estimulación y modulación de la respuesta inmunitaria. La respuesta del huésped se ve influida por la interacción entre el microorganismo y las características inherentes del huésped, incluso, los factores genéticos del individuo. La respuesta del huésped se conforma de las respuestas antimicrobianas de las células inflamatorias agudas como los neutrófilos y de las actividades de adaptación de monocitos/macrófagos y linfocitos. (1)

Se conoce que en respuesta a la infección bacteriana que se da en la enfermedad periodontal, los factores innatos tienen una función importante en la señalización del endotelio, lo que inicia la inflamación. Los neutrófilos protegen a

los tejidos locales controlando la microflora periodontal que se encuentra presente en el surco gingival. Por último, aquellas células inflamatorias crónicas (macrófagos y linfocitos) protegen al huésped desde el tejido conectivo subyacente e impiden que la infección focal se torne sistémica. (1)

Avances en estudios de biología molecular han sido de ayuda para el estudio de la enfermedad periodontal, por ejemplo, la teoría sobre la especificidad del biofilme dental en la enfermedad periodontal debería ser revisada; pues se ha encontrado que la mayoría de los patógenos periodontales conocidos muestran diferencias fenotípicas en cuanto a su capacidad de causar la enfermedad. También, gracias a estudios realizados de bases moleculares se conoce hoy en día que, el patógeno *P. Gingivalis* tiene la capacidad de regular de forma negativa la expresión de IL-8 y ICAM-1. (1)

Como se ha encontrado por medio de los años en los estudios de la inmunología, al inocular un microorganismo un individuo con un microorganismo específico se produce inmunidad protectora. En estudios donde se utilizaron membranas de *P. Gingivalis* como inmunógenos se demostró un efecto protector en un roedor. Estudios en primates no humanos, demostraron que al inmunizarlos con células enteras de esta bacteria se disminuyó la destrucción periodontal. Sin embargo, debido a la naturaleza polimicrobiana de la enfermedad periodontal se deben realizar más investigaciones para considerar la vacunación como tratamiento en los seres humanos. (1)

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica de las generalidades de la enfermedad periodontal, los agentes microbiológicos que se encuentran en la periodontitis y sitios para toma de muestras que permitan un análisis de los marcadores inmunoinflamatorios por medio de las técnicas de biología celular y molecular.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1) Explicar los diferentes conceptos relacionados con la enfermedad periodontal, sus agentes causales y respuesta inflamatoria por medio de una revisión bibliográfica.
- 2) Definir los conceptos de inmunología básica relacionados con la enfermedad periodontal.
- 3) Enunciar los diferentes mediadores celulares en la respuesta inmunológica presentes en el paciente periodontal
- 4) Confeccionar un protocolo de laboratorio para el manejo de las diferentes muestras de fluido crevicular y saliva.

Capítulo II: Marco Teórico

2.1 Generalidades de la enfermedad periodontal

2.1.1 Periodoncio normal

El periodoncio se forma con los tejidos de soporte y protección del diente (encía, ligamento periodontal, cemento, hueso alveolar). Se divide en dos partes: la encía, cuya función principal es proteger los tejidos subyacentes, y el aparato de inserción, compuesto de ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Se considera que el cemento es parte del periodoncio dado que junto con el hueso, sirve de soporte a las fibras del ligamento periodontal (1).

2.1.2 Anatomía de la encía

En el nivel microscópico hay un núcleo central de tejido conectivo (constituido por fibras de colágeno) cubierto por epitelio estratificado. Ese epitelio se clasifica en:

- i. **Epitelio bucal o externo:** en el punto de vista macro es el que cubre la cresta y la superficie exterior de la encía libre o marginal y la superficie de la encía insertada. Se encuentra queratinizado. (1)
- ii. **Epitelio del surco:** recubre el surco gingival, es un epitelio no queratinizado. Posee capacidad para queratinizarse si se revierte y expone a cavidad bucal o se elimina por completo la microflora bacteriana del surco. Esto sugiere que la irritación local del surco impide su queratinización. (1)
- iii. **Epitelio de unión:** Formado por la fusión del epitelio bucal y el epitelio reducido del esmalte, este último no es esencial para su formación, por ello, se restaura después de la instrumentación o la reparación quirúrgica. La lámina

basal interna consta de una lámina densa (adyacente al esmalte) y una lámina lúcida a la cual se fijan los hemidesmosomas. El epitelio de unión se fija al cemento afibrilar presente en la corona (a menos de 1 mm de UAC) y de modo semejante al cemento radicular. Fibras gingivales fortalecen la inserción del epitelio de unión con el diente. (1)

2.1.3 Líquido crevicular

Es un filtrado desde el tejido conectivo por medio del epitelio del surco. (1)

Funciones:

- Elimina material que se encuentra en esa zona como un proceso de placa, un biofilme en estadios iniciales.
- Favorece la adherencia epitelio-diente porque contiene proteínas plasmáticas.
- Propiedades microbianas.
- Actividad inmune. (1)

2.1.4 Elementos celulares del ligamento periodontal

- Células de tejido conectivo.
- Restos epiteliales de Malassez.
- Células de defensa: Neutrófilos, Linfocitos, Macrófagos, Mastocitos, Eosinófilos. (1)

2.1.5 Pronóstico periodontal

Se refiere a la predicción del curso, duración y desenlace probables de una enfermedad. Está el pronóstico general e individual. (1)

El pronóstico general se refiere a la dentición como un todo y toma en cuenta factores como: Edad del paciente, gravedad de enfermedad, control de placa del paciente, cumplimiento del paciente, hábitos (tabaquismo, alcohol), enfermedad sistémica, factores locales, factores protésicos. (1)

El pronóstico por cada pieza dental se determina después de establecer el pronóstico general, ya que el mismo lo afecta. (1)

- i. *Pronóstico bueno:* buen soporte periodontal clínico y radiográfico, buena cooperación por parte del paciente, ausencia de movilidad dental, ausencia de furcas, mínima pérdida en los niveles de inserción, control de los factores etiológicos. (5)
- ii. *Pronóstico regular:* movilidad grado I, furca grado I o II mantenible, pérdida ósea de leve a moderada, bolsas no mayores a 5 mm, piezas que cuando se termine la fase higiénica permanezcan en cavidad oral. (5)
- iii. *Pronóstico malo:* bolsas mayores a 5 mm, movilidad grado II o III, furcas grado II o III, pérdida ósea de moderada a severa, piezas que, a pesar que se les realice la fase higiénica no puedan quedarse en la boca a menos que sean tratadas quirúrgicamente. (5)

2.1.6 Fases del tratamiento.

El tratamiento periodontal consiste en:

- i. la evaluación sistemática de la salud del paciente
- ii. una fase terapéutica en relación con la causa/ en algunos casos
- iii. una fase correctiva/ que comprende tratamientos de cirugía periodontal
- iv. una fase de terapia periodontal de mantenimiento (6)

La fase sistémica del tratamiento periodontal es todo aquello que el paciente requiera que no es desde un punto de vista periodontal. Por ejemplo, el tipo de tratamiento que se da a un paciente hipertenso o diabético.

La fase higiénica es donde se contempla toda la parte de citas (índice de placa, instrucciones de higiene oral, raspado grueso, corrección de restauraciones, exodoncias). Al terminar la fase higiénica se entra en la fase de reevaluación de los tejidos, hacer otra vez sondeos, índices de sangrado, índices de placa y dependiendo de los resultados se pasa a la fase quirúrgica o fase de mantenimiento. (1)

La gingivitis y periodontitis son enfermedades infecciosas crónicas. La interacción del microorganismo con el huésped determina el curso y la magnitud de la enfermedad resultante. A veces, los microorganismos ejercen directamente su efecto patógeno, causando la destrucción del tejido o indirectamente, estimulando y modulando la respuesta inmunitaria del huésped. En general, la respuesta del huésped funciona de forma protectora al impedir que la infección local evolucione hacia una infección sistémica; sin embargo, puede existir

alteración y destrucción local de los tejidos del huésped, que se evidencian como enfermedad periodontal. (1)

2.2 Inmunología general

El término inmunidad proviene del latín *immunis* que significa “exento”, y significa un estado de protección contra una enfermedad infecciosa. (8). Actualmente, se conoce que la inmunidad celular es mediada por las células T y que los anticuerpos que son producidos por las células B, las cuales confieren inmunidad humoral. (7)

El concepto de inmunidad se expandió más allá de las enfermedades infecciosas, al demostrar que sustancias no patogénicas también podían ser antígenos. Un antígeno es cualquier sustancia que desencadena una respuesta específica por linfocitos B o T. Inclusive, al inyectar casi cualquier sustancia química orgánica extraña a un animal podía inducir la producción de anticuerpos. Entonces, se crearon dos teorías para explicar la especificidad de esta unión de anticuerpos a los antígenos: la selectiva y la instruccional. (7)

La teoría selectiva propuso que las células en la sangre expresaban diversos receptores, que llamo receptores de cadena lateral, que podían unirse a agentes infecciosos y desactivarlos. Entonces, cada célula sintetiza muchas copias de sólo un receptor unido a membrana (una especificidad).

La teoría instruccional proponía que un antígeno particular serviría como una plantilla alrededor de la cual se plegaría el anticuerpo, como un molde para

impresión. De este modo, la molécula de anticuerpo adoptaría una configuración complementaria a la de la plantilla antígeno. (7)

Existen dos sistemas interconectados que colaboran para proteger el organismo. (7)

2.2.1 Inmunidad Innata

La inmunidad innata constituye una serie de defensas contra infección que están listas para entrar en acción de inmediato cuando un huésped es atacado por un agente patógeno, ya sea un virus, una bacteria, un hongo o un parásito. Esto diferencia la inmunidad innata de la adaptativa, la cual tarda días en surgir después de la exposición al agente patógeno. El sistema inmunitario innato incluye barreras anatómicas, tanto físicas como químicas, además de respuestas celulares. (8)

Las respuestas inmunitarias innatas celulares a la invasión son rápidas, y son desencadenadas por receptores de superficie celulares o intracelulares que reconocen componentes moleculares conservados de agentes patógenos. La respuesta innata e inflamatoria local son beneficiosas para eliminar agentes patógenos y células dañadas o muertas, y para mantener la salud. (7)

Pese a los múltiples estratos del sistema inmunitario innato, algunos agentes patógenos pueden evadir las defensas innatas y es donde el sistema inmunitario adaptativo entra en acción. Este sistema se encuentra en guardia y contrarresta la infección con una respuesta hecha a la medida, específica al agente patógeno

atacante. Este ataque ocurre en forma de linfocitos B y T, que generan anticuerpos, y células T efectoras que reconocen de manera específica y neutralizan los invasores o los eliminan. (7)

La primera línea de defensa del cuerpo son las barreras físicas, constituidas por las capas epiteliales de la piel y las superficies mucosas y de tejido glandular conectadas a las aberturas del cuerpo. Estas barreras epiteliales evitan la infección al bloquear la entrada de agentes patógenos al organismo, sirven como un aislamiento entre el interior del cuerpo y los agentes patógenos del mundo exterior.

Las barreras epiteliales comprenden la piel y superficies tisulares: capas epiteliales mucosas que revisten los tractos respiratorio, gastrointestinal y urogenital, y los conductos de glándulas secretoras como las glándulas salivales, lagrimales y mamarias. (10)

La piel, la barrera física más externa, consta de dos capas separadas: una capa externa delgada, la epidermis: compuesta por células epiteliales estrechamente aglomeradas en su capa interna, y en su capa externa consta de células en su mayoría muerta que contienen queratina, y la dermis: compuesta de tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y leucocitos mieloides dispersos, como células dendríticas, macrófagos y mastocitos. (7)

Las barreras químicas en estas superficies comprenden sustancias solubles especializadas que poseen actividad antimicrobiana, así como pH ácido. La ruptura de las barreras físicas provocadas por lesiones genera la producción de una amplia variedad de agentes antimicrobianos por parte de la piel y otros epitelios. Entre las proteínas antimicrobianas producidas por la piel y otros epitelios en seres humanos son enzimas y proteínas de unión que actúan matando las células bacterianas o inhibiendo su crecimiento. (7)

2.2.1.1 Fagocitosis

Las células fagocíticas constituyen la siguiente línea de defensa contra agentes patógenos que han penetrado en las barreras de células epiteliales. Por medio de diversos receptores de superficie celular, reconocen microorganismos, como bacterias, extienden su membrana plasmática para tragarlos, y los internalizan en fagosomas. Los lisosomas posteriormente se fusionan con los fagosomas, y suministran agentes que matan los microorganismos y los degradan. Los principales tipos de células que llevan a cabo fagocitosis son los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas en los tejidos, y los monocitos en la sangre. (7)

2.2.1.2 Reconocimiento de microorganismos

Para el reconocimiento de los microorganismos, los fagocitos expresan diversos receptores sobre su superficie, algunos de los cuales reconocen de manera directa componentes moleculares conservados y específicos sobre la superficie de microorganismos. Estos motivos conservados se llaman patrones moleculares asociados a agente patógeno (PAMP, del inglés pathogen-associated

molecular patterns), y están ubicados sobre la superficie de una bacteria, célula micótica, parásito o partícula de virus. Los receptores que reconocen se llaman receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés pattern recognition receptors). (7)

La opsonización constituye un mecanismo de activación de la fagocitosis de manera indirecta, mediante el reconocimiento por fagocitos de proteínas solubles que se han unido a superficies microbianas, lo que aumenta la fagocitosis y una vez unidas a las superficies de microorganismo, las opsoninas son reconocidas por receptores de membrana de los fagocitos, lo cual activa la fagocitosis. (7)

2.2.1.3 Receptores relacionados con membrana

El sistema inmunitario innato utiliza como sus efectores una variedad de moléculas solubles, así como receptores unidos a la membrana celular. En el lugar de infección o lesión se producen determinados tipos de moléculas solubles y actúan localmente.

Los PRR pueden ser expresados sobre la membrana plasmática y otros se encuentran dentro de las células del ser humano, en endosomas/lisosomas o en el citosol, por lo que la célula puede reconocer PAMP sobre patógenos tanto extracelulares como intracelulares.

A continuación, se describen las cuatro familias principales de PRR en seres humanos, y las vías de señalización que activan:

Receptores tipo Toll

Fueron la primera familia de PPR que se descubrió, y sigue siendo la mejor caracterizada en términos de su estructura. Pueden encontrarse tanto en la membrana plasmática como en las membranas de endosomas y lisosomas, y reconocen muchos tipos de moléculas de agentes patógenos. Su localización celular les permite mostrar respuesta óptima a los ligandos microbianos particulares que reconocen. Los TLR que reconocen PAMP sobre la superficie externa de microorganismos extracelulares se encuentran en la membrana plasmática, donde pueden unirse a estos PAMP e inducir respuestas, y los TLR que reconocen componentes microbianos internos se encuentran en endosomas y lisosomas.(7)

Además de ligandos microbianos, los TLR también reconocen DAMP, componentes endógenos liberados por células muertas o tejidos dañados.

Receptores de lectina tipo C

Los receptores de lectina tipo C son receptores de membrana plasmática expresados sobre células dendríticas, neutrófilos, monocitos, macrófagos, células B y subgrupos de células T. En general, actúan reconociendo los componentes carbohidrato en hongos, micobacterias, virus, parásitos y algunos alérgenos. Los humanos tienen al menos 15 CLR que funcionan como PPR. (7)

Receptores tipo gen-I inducibles por ácido retinoico

Se unen a ARN viral en el citosol de células infectadas, donde desempeñan funciones cruciales como detectores de infección viral. (7)

Receptores tipo Nod

Son una familia grande de proteínas citosólicas activados por diversos PAMP intracelular, DAMP y otras sustancias perjudiciales. (7)

2.2.1.4 Tipos celulares de inmunidad innata

Las células principales en la inmunorrespuesta innata son neutrófilos, macrófagos, monocitos, células asesinas naturales y células dendríticas.

2.2.2 Inmunidad adquirida

La inmunidad adquirida o específica es la segunda defensa del huésped cuando los microorganismos superan o evaden los mecanismos innatos inespecíficos de defensa, inicia cuando los antígenos de los microorganismos invasores entran en contacto con las células del sistema inmunitario (macrófagos y linfocitos). Es capaz de reconocer y eliminar de manera selectiva microorganismos y moléculas extrañas específicas (antígenos ajenos). (7, 9)

La inmunidad adaptativa se fundamenta en los linfocitos B y T y tarda más tiempo en activarse, pero es mucho más específica para el antígeno. La respuesta inmunitaria evoluciona en tiempo real como reacción a una infección y se adapta para reconocer, eliminar y recordar mejor al agente patógeno invasor. (7). Ante un

segundo encuentro con ese agente patógeno la respuesta de defensa es rápida, eficiente y específica. (9)

2.2.3 Inmunidad celular

Microorganismos como virus, algunas bacterias y parásitos que sobreviven dentro de las células, son inaccesibles para los anticuerpos. Entonces, la inmunidad celular es la encargada de eliminar estos patógenos intracelulares al ocasionar lisis de las células infectadas. (7)

Se caracteriza por la participación de los linfocitos T, los cuales poseen en su membrana receptores capaces de reconocer antígenos adosados a la superficie de otras células.

Linfocitos T

Se generan en la médula ósea y migran a la glándula timo para madurar. Las células T en maduración poseen en la membrana una molécula de unión a antígeno única llamada receptor de célula T (TCR). Existen dos subpoblaciones de células T bien definidas: células T colaboradoras (T_H) y células T citotóxicas (T_C), estas se distinguen entre sí por la presencia en su superficie de glucoproteínas de membrana CD4 o CD8, las células T que muestran CD4 funcionan como células T_H y las que exhiben CD8 lo hacen como células T_C .

Los linfocitos T colaboradores reconocen antígenos expuestos en la superficie de células presentadoras de antígenos. Luego, comienzan a proliferar y secretar citocinas (interleucinas), moléculas que estimulan la proliferación de

linfocitos T, la activación de linfocitos B y también la activación de los macrófagos, aumentando su capacidad fagocítica. (7)

Las células T_c forman linfocitos T citotóxicos (CTL), tienen actividad citotóxica o de destrucción celular, tienen una función vital en la vigilancia de las células del cuerpo y la eliminación de cualquiera que exhiba antígeno, como las células infectadas por virus, las células tumorales y las células de injerto de tejido extraño. Los linfocitos T CD8 actúan como células citotóxicas, por estos linfocitos es que la inmunidad celular ataca y destruye directamente células malignas y aquellas infectadas por virus cuyos antígenos colonicen su membrana. (7, 11)

Citocinas producidas por los linfocitos

Son polipéptidos producidos por células del sistema inmune, su acción puede ser autocrina cuando actúan sobre los mismos linfocitos que las segregó, o paracrina cuando su efecto es sobre otra célula. Tienen una función importante en los mecanismos efectores involucrados en la eliminación de antígenos extraños como microorganismos. (11)

Las citocinas más importantes producidas por los linfocitos T en respuesta a un estímulo antigénico se conocen como interleucinas:

- *Interleucina 2 (IL-2)*: estimula la proliferación de los linfocitos T activados por un antígeno e incrementa la respuesta inmune producida por los linfocitos colaboradores, estimula la generación y proliferación de células citotóxicas e incrementa la producción de anticuerpos por medio de los linfocitos colaboradores.

- *Interleucina 3 (IL-3)*: influye en la maduración de las células cebadas.
- *Interleucina 4 (IL-4)*: factor estimulador de los linfocitos B, favorece la producción de inmunoglobulina G-1 e inmunoglobulina E.
- *Interleucina 5 (IL-5)*: estimula el crecimiento y la diferenciación de los eosinófilos.
- *Interleucina 6 (IL-6)*: promueve la transformación de los linfocitos estimulados por antígenos en células plasmáticas productoras de anticuerpos.
- *Interleucina 9 (IL-9)*: aumenta la proliferación de otras células T.
- *Interleucina 10 (IL-10)*: producida por la familia de monocitos-macrófagos y linfocitos colaboradores, inhibe la producción de otras citocinas. (11)

2.2.4 Inmunidad humoral

Como anteriormente a los líquidos corporales se les conocía como “humores corporales”, los eventos inmunitarios en los cuales participaban los anticuerpos se conocían como inmunidad humoral. (8)

Este tipo de inmunidad es efectiva contra patógenos extracelulares y sus productos, porque el anticuerpo puede unirse a estas estructuras y generar destrucción. (7)

Se caracteriza por el encuentro de los linfocitos B con un antígeno, su activación y transformación en célula plasmática productora de anticuerpos específicos contra el antígeno que lo activó. (9)

Linfocitos B

Las células B o linfocitos B maduran dentro de la médula ósea. Al salir de la médula, cada una expresa un receptor de unión a antígeno único en su membrana. El receptor de unión a antígeno o receptor de célula B es una molécula de anticuerpo unida a la membrana; donde se forman una hendidura donde se unen los antígenos. (7)

Cuando una célula B virgen o inocente (célula que no ha encontrado un antígeno anteriormente), se encuentra por primera vez con un antígeno que, esta unión del antígeno con el anticuerpo hace que la célula B se divida con rapidez y se diferencie en células B de memoria. Las células B de memoria tienen una vida más prolongada y células B efectoras (células plasmáticas) solo viven unos cuantos días. Sin embargo, las células B efectoras secretan grandes cantidades de anticuerpos. Estos anticuerpos secretados son las principales moléculas efectoras de la inmunidad humoral. (7)

Anticuerpos

Son conocidos también como inmunoglobulinas, están unidas a un epítopo que existen en dos formas, como constituyentes unidos a membrana de las células B o como moléculas solubles secretadas por células plasmáticas que son derivadas de los linfocitos B y reaccionan específicamente con determinado antígeno.

Los anticuerpos de superficie de la célula B al reconocer un antígeno inician la proliferación y diferenciación en linfocitos B de memoria y células plasmáticas.

Los anticuerpos secretados circulan en la sangre, donde actúan como efectores de la inmunidad humoral al buscar antígenos para su eliminación, también ayudan al control de infecciones por microorganismos extracelulares, neutralizan el antígeno, toxina o microorganismo o indirectamente al incrementar la fagocitosis y/o activar la vía clásica del complemento. (7,9)

Clases de anticuerpos

- *Inmunoglobulina G (IgG)*: Es la más abundante en el suero, alrededor del 80% de total de las inmunoglobulinas séricas. Existen cuatro subclases de IgG humana: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. (7)
- *Inmunoglobulina M (IgM)*: Representan 5 a 10% del total de inmunoglobulinas sérica, se expresa como un anticuerpo unido a membrana en células B. La IgM es la primera clase de inmunoglobulina que se produce en una respuesta primaria a antígeno y es la primera inmunoglobulina que sintetiza el recién nacido. Tienen forma de un pentámero, donde las cinco unidades de monómero se unen entre sí por enlaces disulfuro, posee 10 sitios de unión a antígeno. (7)
- *Inmunoglobulina A (IgA)*: Constituye del 10 a 15% del total de las inmunoglobulinas séricas, predomina en secreciones externas como leche materna, saliva, lágrimas y moco de las vías bronquiales, genitourinarias y digestivas. La IgA secretora tiene una función efectora en las superficies mucosas, impide la fijación de patógenos a las células mucosas e inhibe las

infecciones víricas y la formación de colonias bacterianas. Los complejos de IgA secretora y antígeno quedan atrapados con facilidad en el moco, luego son eliminados por las células epiteliales ciliadas de las vías respiratorias o del peristaltismo intestinal. (7)

- *Inmunoglobulina E (IgE)*: Se encuentra en el plasma en muy bajas concentraciones, los anticuerpos IgE median las reacciones de hipersensibilidad inmediata que causan los síntomas de fiebre de heno, asma, urticaria y choque anafiláctico.
- *Inmunoglobulina D (IgD)*: Constituye el 0,2% de la inmunoglobulina total, junto con la IgM, la IgD es la principal inmunoglobulina unida a membrana que expresan células B maduras. Aun no se identifica una función biológica efectora de la IgD. (7)

2.2.5 Células inmunitarias

Todas sus células inmunitarias se desarrollan a partir de células pluripotenciales de la médula ósea, mediante el proceso de hematopoyesis. Cuando una célula se va a diferenciar puede hacerlo es una de dos vías: convertirse en un progenitor mieloide-eritroide común que da lugar a todos los eritrocitos (la línea eritroide), granulocitos, monocitos y macrófagos (la línea mieloide); o convertirse en un progenitor linfoide que da lugar a linfocitos B, linfocitos T y células NK. Las células asesinas naturales (NK, Natural Killers) algunas veces se les menciona como linfocitos granuloso grandes y se cree que se diferencian de un progenitor linfoide. (8)

2.2.5.1 Células mieloides

Son aquellas primeras células que muestran respuesta a la invasión por un agente patógeno, y comunican la presencia de un fenómeno adverso a las células de la línea linfóide. (7)

Granulocitos

Son leucocitos que se clasifican como neutrófilos, basófilos, mastocitos o eosinófilos con base en diferencias de las características morfológicas de la célula y la tinción de sus gránulos citoplasmáticos. (7)

- i. *Neutrófilos*: Corresponden a la mayoría de los leucocitos (50-70%). Son liberados hacia la sangre periférica y circulan durante 7 a 10 h antes de migrar hacia los tejidos, donde tienen un lapso de vida de solo algunos días.

Los neutrófilos son reclutados hacia el sitio de infección en respuesta a moléculas inflamatorias, por ejemplo quimiocinas. Una vez en los tejidos, los neutrófilos fagocitan bacterias y secretan también proteínas que tienen efectos antimicrobianos y potencial de remodelado de tejido. (7)

- ii. *Basófilos*: Son granulocitos no fagocíticos y corresponden a menos del 1% de leucocitos circulantes. En respuesta a la unión de anticuerpos circulantes liberan el contenido de sus gránulos. (7)

- iii. *Mastocitos*: Estas se liberan a la sangre como células indiferenciadas y maduran hasta que salen de la sangre. Al igual que los basófilos circulantes, estas células tienen grandes números de gránulos citoplasmáticos que contienen histamina y otras sustancias. (7)

- iv. *Eosinófilos*: Al igual que los neutrófilos, son células fagocíticas móviles. Su papel de mayor importancia es la defensa contra parásitos multicelulares. También pueden secretar citocinas que regulan los linfocitos B y T, lo que influye sobre la respuesta inmunitaria adaptativa. (7)

Células presentadoras de antígeno

Estas células se consideran puentes entre el sistema inmunitario innato y el adaptativo, debido a que hacen contacto con el agente patógeno en el sitio de infección y lo comunican a los linfocitos T, es decir lo “presentan”. (7)

- i. *Monocitos*: Constituyen alrededor de 5 a 10% de los leucocitos. Son un grupo heterogéneo de células que migran hacia tejidos y se diferencian hacia una diversa gama de células fagocíticas residentes en tejido, incluso macrófagos y células dendríticas. (7)
- ii. *Macrófagos*: Son monocitos diferenciados que migran a tejidos en respuesta a la infección. Algunos de ellos muestran un papel importante en su reparación y regeneración, mientras que otros participan en la respuesta inmune innata. Entonces, desempeñan un doble papel como fagocitos eficaces que pueden contribuir a la eliminación de agentes patógenos de un tejido y como células presentadoras de antígeno que pueden activar linfocitos T. (7)

En la inmunidad mediada por células, los macrófagos cumplen funciones como:

- **Función citotóxica**: genera un proceso de citotoxicidad mediada por anticuerpos al cual pueden destruir las células tumorales.

- Función secretora: compiten con el hígado por la gran cantidad de mediadores y factores que pueden producir.
 - Los macrófagos en inmunopatología: si no logra eliminarse el microorganismo, lo activa en forma prolongada ocasionando una hiperproducción de citoquinas pro-inflamatorias, lo cual puede producir un proceso inflamatorio crónico. (11)
- iii. *Célula dendrítica*: Surgen a partir de las líneas de células hematopoyéticas tanto mieloides como linfoides. (7). Fuera de los ganglios linfáticos, formas inmaduras de estas células vigilan el organismo para buscar signos de invasión y captan antígenos que se han introducido al organismo. Procesan estos antígenos y después migran hacia ganglios linfáticos, donde presentan el antígeno a las células T. (7)
- iv. *Eritrocitos*: Son células que contienen concentración alta de hemoglobina y circulan por los vasos sanguíneos y los capilares suministrando oxígeno a las células y tejidos circundantes. Aquellos que son dañados pueden liberar señales que inducen la actividad inmunitaria innata. (7)
- v. *Megacariocitos*: Dan lugar a plaquetas. (7)

2.2.5.2 Células linfoides

- i. *Linfocitos*: Son las principales células que participan en la respuesta inmunitaria adaptativa y corresponden entre el 20 y 40% de los leucocitos. Se subdividen en tres tipos principales: Linfocitos T, Linfocitos B y células NK. Desde el punto de vista morfológico resulta difícil distinguir entre los

diferentes tipos de linfocitos, por lo que se depende de las proteínas que expresan en su superficie. (7)

- Linfocitos B: Estos se distinguen por su síntesis y despliegue del receptor de célula B (receptor específico para el antígeno sobre su superficie), una molécula de inmunoglobulina (anticuerpo) unida a la membrana que se une al antígeno. Estas células al diferenciarse lo hacen hacia células efectoras conocidas como células plasmáticas. Estas pierden expresión de inmunoglobulina de superficie y se tornan altamente especializadas para la secreción de anticuerpos. (8)

- Linfocitos T: Al igual que los linfocitos B expresan un receptor de unión a antígeno singular llamado el receptor de célula T. Pero, a diferencia de los linfocitos B que reconocen antígenos solubles o particulados, los receptores de célula T solo reconocen fragmentos de antígeno procesados. (7)

ii. *Células asesinas naturales*: Este tipo de células se relaciona mucho con las células linfoides, sin embargo no expresan receptores específicos para antígeno y se consideran parte del sistema inmunitario innato. Se distinguen por la expresión de un marcador de superficie conocido como NK1.1 y por la presencia de gránulos citotóxicos. Son asesinas eficientes de células y atacan diversas células anormales, incluso algunas células tumorales y algunas células infectadas por virus. (7)

Las células asesinas naturales (NK) son la primera línea de defensa contra los diferentes virus y constituyen una señal de activación clave para otras

células, además detectan y destruyen células infectadas, que son fuentes potenciales de grandes cantidades de otras partículas víricas infecciosas. Las células asesinas naturales son potentes productoras de diversas citocinas por tanto moldean y modifican las defensas presentes y futuras del organismo contra el patógeno. (10)

2.2. 6 Antígenos y reconocimiento antigénico

2.2.6.1 Antígeno

Son las moléculas capaces de desencadenar respuesta inmunitaria celular, humoral o ambas. Es reconocida por los receptores específicos presentes en los linfocitos T y B. Incluye las sustancias extracorporales y algunas moléculas del organismo que son capaces de inducir respuesta inmunitaria. (12)

2.2.6.2 Inmunógeno

Antígeno que es reconocido por los linfocitos T y B y es capaz de inducir una respuesta inmune específica contra él. (15). Término correcto para denominar antígenos. (10)

2.2.6.3 Epítipo

Es la estructura específica la cual es reconocida por las células del sistema inmune adaptativo. (16). Se caracteriza por ser una porción de 8-15 aminoácidos de una macromolécula o monosacáridos con la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria. (15). Pueden estar formados por distintos aminoácidos de

una molécula proteica, cercanos entre sí por configuración tridimensional. Otros tipos se encuentran ocultos, actuando cuando la proteína se desnaturaliza.

2.2.6.4 Tipos de antígeno según su origen (15)

- i. *Antígeno órgano específico.*
- ii. *Antígenos específicos de especie.*
 - Se encuentran en todos los individuos de una misma especie. A su vez, difieren de los antígenos análogos de otra especie.
- iii. *Antígenos ocultos.*
 - Algunos órganos tienen antígenos que están excluidos del contacto con el sistema inmune.
 - Un trauma a estos órganos puede poner en contacto estos antígenos y desencadenar una reacción contra ese tejido.
- iv. *Antígenos tumorales.*
 - Algunos tumores presentan moléculas específicas que son reconocidas por el sistema inmune.
- v. *Antígenos heterófilos.*
 - Presentes en varias especies de animales y que son compartidos por bacterias, hongos y vegetales.
- vi. *Antígenos de reacción cruzada.*
 - En ocasiones los anticuerpos reaccionan con moléculas que no son antígenos, pero tienen estructura similar.
 - Proceso presente en reacciones de autoinmunidad.

vii. *Alérgenos.*

- Moléculas inocuas en mayoría de individuos.
- Inducen respuesta inmune en los individuos predispuestos genéticamente.
- Proteínas y glicoproteínas en su mayoría. Pocas veces, son carbohidratos.
- Se produce Inmunoglobulina E, generando respuestas inflamatorias agudas características de las reacciones alérgicas.

viii. *Antígenos modificados.*

- Moléculas que son modificadas para cambiar ciertas características pero preservando otras.
- Usualmente, son utilizadas para procedimientos de inmunización, ya que enseñan al sistema inmune a iniciar una respuesta adecuada contra el antígeno original.

ix. *Fotoantigenicidad.*

- Moléculas que tienen poca o ninguna capacidad antigénica que al ser expuestas a la luz ultravioleta se convierten en antígenos potentes.
- Ejemplo: ADN.

x. *Antígenos del eritrocito.*

- Membrana del eritrocito presenta varias moléculas antigénicas.
- Permite clasificación en distintos grupos y subgrupos.

- La reacción de estos anticuerpos con estos antígenos ocasionan reacciones inmunes.
- Ejemplo: Transfusión de sangre de un grupo distinto.

xi. *Antígenos de los leucocitos.*

- Presentan antígenos no presentes en los eritrocitos, pero presentes en las demás células nucleadas del organismo.
- HLA-I, HLA-II.

xii. *Superantígenos.*

- Toxinas que activan al sistema inmune de una forma diferente a la presentación normal de un determinado antígeno, estimulando la liberación de linfocitos T.
- Activan el 20% de los linfocitos T en contraste con el 0,0001% usual.
- Ejemplo: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

2.2.6.5 Tipos de antígenos según su composición química (15)

En mayoría son proteínas, sin embargo, los lípidos, carbohidratos o ácidos nucleicos de la proteína actúan como antígenos.

Proteínas

- Modificación de las proteínas por diferentes agentes (infecciones, agentes químicos o físicos) es importante para la inmunogenicidad. Pueden alterar la estructura de la proteína convirtiéndose en sustancias inmunogénicas (enfermedades autoinmunes).

- Proteínas de choque térmico o de estrés: Proteínas que se generan cuando la célula está sometida a un cambio brusco o estrés (hipoxia).
- Complejos proteína-hapteno requiere colaboración de Leucocitos T y B.

Carbohidratos

- Manosa, monosacárido importante en respuesta inmune innata, presente en membrana de bacterias. Es reconocido por receptor presente en fagocitos.
- Respuesta a polisacáridos en la cápsula de los neumococos, lo que produce distintos antígenos en sangre y clasifica los diferentes tipos de neumococos.
- Capacidad antigénica de las glucoproteínas y glucopéptidos está dada por las cadenas de carbohidratos más que por la parte proteica. Principalmente, las hexosas.
- Antígenos de carbohidratos son reconocidos por las células del sistema inmune por medio de lectinas tipo C.

Lípidos

- Generalmente son no inmunogénicas, exceptuando la cardiolipina, la cual induce a formación de antígenos.
- Asociados con proteínas o polisacáridos pueden ser buenos anticuerpos.

Ácidos nucleicos

- Importantes en procesos autoinmunes donde hay producción de antígenos contra el ADN.

Coadyuvantes

Sustancias inyectadas en conjunto con un antígeno débil, los cuales potencian la actividad inmunogénica (15). Se emplean con frecuencia para reforzar la reacción inmunitaria de un antígeno con inmunogenicidad baja o en pequeñas cantidades.

Tiene uno o varios de los siguientes efectos (10):

- Prolongación de la persistencia del antígeno.
- Intensificación de señales co-estimuladoras.
- Aumento de la inflamación local.
- Estimulación de la proliferación inespecífica de linfocitos.
- El sulfato potásico de aluminio es el único coadyuvante aprobado para seres humanos.

2.2.6.6 Características de los antígenos

- *Alteridad*: Reconocimiento de una molécula como ajena. El proceso opuesto es la tolerancia, falta de respuesta a antígenos propios (10). El poder que tiene un antígeno aumenta conforme es más extraña la molécula en el organismo. Por ejemplo, proteínas de una especie introducidas entre ellas no generarán respuesta inmune, por el contrario, si se incorporan en otra especie diferente, se desata una producción considerable de anticuerpos (15). Entre más grande, sea la distancia filogenética entre dos especies mayor diferencia estructural tienen.

Durante el desarrollo de linfocitos, estos se exponen a componentes propios, donde las células que reconocen componentes propios son desactivadas. Las células restantes son liberadas. Por lo tanto, los linfocitos

que no se expusieron a los componentes propios son capaces de reconocer los componentes propios como antígenos.

- *Complejidad de la molécula:* Entre más compleja es la molécula inmunógena, mayor es su capacidad de inducir la respuesta inmune. Por ejemplo, una cadena lineal es más débil que otra cadena de igual peso molecular con ramificaciones.

Las macromoléculas insolubles y grandes son más inmunógenas que las solubles y pequeñas, ya que las primeras se fagocitan con mayor facilidad (9). La estereoquímica es importante, ya que las enzimas presentes en las células presentadoras de antígeno solo pueden degradar proteínas con L-aminoácidos. Los polímeros con D-aminoácidos no pueden ser procesados.

- *Tamaño de la molécula:* Moléculas menores a 5 000 Da son poco inmunógenas, mientras que las de 100 000 Da o más suelen ser potentes. El alto peso molecular aumenta el potencial inmunogénico (15) Sin embargo, ciertas moléculas con tamaño molecular pequeño, 1 000 Da han demostrado ser inmunógenas. (10)
- *Características químicas (Composición y heterogenicidad):* El tamaño y alteridad no son suficientes para que una molécula sea capaz de desarrollar una respuesta inmonogénica (10). Por ejemplo, los homopolímeros tienden a carecer de inmonogenicidad en comparación con los heteropolímeros, sin importar que tamaño tengan (10). En el caso de los lípidos, estos pueden inducir reacciones de las células B, sirviendo como haptenos al unirse con ciertas proteínas (10). Grupos de terminaciones químicas le dan más

capacidad antigénica a una molécula. Por ejemplo ácidos y bases fuertes, benceno y ciertos aminoácidos. (15)

- *Carga Eléctrica*: Moléculas con carga eléctrica tienen un poder inmunogénico mayor que las moléculas neutras.

2.2.6.7 Sistema biológico y la inmunogenicidad

Genotipo del animal receptor

Constitución genética (genotipo) es importante en el tipo de respuesta inmunitaria que se manifiesta y el grado de reacción. Experimentos con inmunógenos demostraron que el control genético de una reacción inmunitaria limita el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los genes que codifican los receptores de células B y T y los que participan en los mecanismos reguladores inmunitarios también determinan la respuesta de un animal a un antígeno. Variabilidad genética afecta la inmunogenicidad de una molécula específica en un animal. (10)

Dosis y vía de administración del inmunógeno

Los inmunógenos presentan una curva de dosis-respuesta particular, determinada al medir la reacción inmunitaria a diferentes dosis y distintas vías de administración. La respuesta a anticuerpos se analiza al medir la concentración de anticuerpos existente en el suero de animales inmunizados.

Si se combinan dosis y vía de administración, se induce a una reacción inmunitaria máxima en un animal particular. Una dosis insuficiente no estimula la

reacción inmunitaria porque no es capaz de activar una cantidad suficiente de linfocitos, o inducir tolerancia. Una dosis muy alta puede inducir tolerancia. Por eso, en ocasiones, es importante repetir el suministro en un lapso de varias semanas. (10)

La vía de administración influye en los órganos y células que intervienen en la respuesta. Por ejemplo, si se administra vía intravenosa, el antígeno se traslada primero al bazo, mientras que si ingresa por vía cutánea, se traslada a los ganglios linfáticos, variando la respuesta inmunitaria (10). Las vías de administración más comunes son:

- Intravenosa
- Intradérmica
- Subcutánea
- Intramuscular
- Intraperitoneal

2.2.6.8 Anticuerpos: Estructura y función

Los anticuerpos son proteínas largas en forma de Y, las cuales son responsables de la identificación de antígenos, unión con estos y subsecuente protección contra invasores patógenos. La inmunoglobulina tiene especificidad por un antígeno con el fin de inactivar las sustancias tóxicas y para opsonizar (marcar) para su remoción por medio de los macrófagos, neutrófilos o eosinófilos. (14)

Las moléculas de anticuerpos tienen una estructura común de cuatro cadenas peptídicas, que incluyen:

- Dos cadenas ligeras idénticas
- Dos cadenas pesadas

Las cadenas ligeras se unen con las cadenas pesadas por medio de un enlace disulfuro y por interacciones intermoleculares como puentes de hidrógeno. Las dos combinaciones de cadena pesada-ligera se unen entre sí por fuerzas intermoleculares. El número y posición de estos enlaces difieren entre las clases y subclases de anticuerpos.

Los primeros 110 aminoácidos de la región aminoterminal de la cadena ligera o pesada varían entre anticuerpos, regiones V. Segundo presentan una región con secuencias constantes, designadas como regiones C. Las cadenas pesadas tienen un dominio variable y 4-5 dominios constantes, mientras que las ligeras presentan un dominio variable y uno constante. La variabilidad depende del tipo de anticuerpo. La inmunoglobulina presenta dos fragmentos que son capaces de unirse con el antígeno (Fab), y presentan un tercer fragmento que carece de actividad de unión a antígeno (Fc).

2.2.6.9 Respuesta ante antígenos

Sitios de unión

Algunas secuencias en asa de los dominios VH y VI contienen aminoácidos variables y constituyen el sitio de unión de la molécula. La unión al antígeno se realiza por las porciones amino terminales del anticuerpo, mientras que las funciones efectoras se dan en la región carboxilo terminal. La variación de la

secuencia de aminoácidos se encuentra en unas cuantas regiones de los dominios.

Los anticuerpos presentan regiones hipervariables (presentan mayor variabilidad) las cuales son el sitio de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo. Estas regiones complementan la estructura del epítipo y son denominadas: regiones determinantes de complementariedad (CDR). La CDR está compuesta por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras. El resto de los dominios que presentan poca variación se conocen como regiones armazón (FR). La especificidad de un anticuerpo es debido a la variación en la longitud y secuencia de la CDR en cada fragmento Fab. La región armazón es un esqueleto que da soporte a las seis asas. Las CDR son prácticamente exclusivas de cada anticuerpo.

Unión del CDR al anticuerpo

Las seis CDR del anticuerpo entran en contacto con el antígeno, pero las CDR de la cadena pesada hacen mayor contacto que las CDR de la cadena ligera. El dominio VH tiene mayor contribución en la unión que el volumen VL. La cadena pesada por sí sola es suficiente para dar especificidad. Sin embargo, en algunas reacciones, la cadena ligera da la mayor contribución.

El área de contacto del antígeno-anticuerpo es globular y grande. En esta área entran en contacto entre 15 a 22 aminoácidos del anticuerpo, similar al antígeno proteico. Antígenos proteicos grandes entran en áreas grandes del sitio de unión

del anticuerpo. Los antígenos más pequeños se ajustan en bolsillos o hendiduras del sitio de unión.

Unión de antígenos y cambios conformacionales

La unión de antígenos produce cambios conformacionales, los cuales mueven las CDR de la cadena pesada y ligera. Varían la longitud y composición de los aminoácidos de las asas de la CDR, permitiendo que adopten forma complementaria más eficaz con la de sus epítomos.

2.3 Saliva total

El análisis salival se ha convertido en un recurso importante para la evaluación de las condiciones salivales con alteraciones fisiológicas y patológicas, y es una herramienta útil para el diagnóstico de enfermedades, principalmente por su origen, composición, funciones e interacciones con otros sistemas de órganos. Además, tiene un método simple de recolección, es fácil de almacenar y más económico en comparación con la recolección de sangre. Con la incorporación de técnicas y equipos de instrumentación química, recientemente ha sido un aumento observable en su uso para investigaciones, aplicables a fines básicos y clínicos en odontología y otras áreas médicas. (17)

La recolección y análisis de la saliva se está desarrollando como una herramienta para la evaluación de biomarcadores fisiológicos, ya que proporciona una alternativa útil, y no invasiva a la recolección de suero y plasma.

2.3.1 Definición de saliva total

La saliva es un líquido diluido incoloro, contiene un 99% de agua con una densidad entre 1002 y 1012 g/L y un pH alrededor de 6,64, sirve como solvente para otros componentes que la forman y un 1% de sólidos disueltos, los cuales pueden ser diferenciados como: componentes orgánicos proteicos, componentes no proteicos y componentes inorgánicos o electrolitos. (17,18)

Saliva total es la suma de secreciones de las glándulas salivales mayores y menores más el líquido gingival (transudado seroso), es un líquido turbio, posee partículas en suspensión (bacterias, leucocitos, células descamadas del epitelio bucal, restos alimenticios).

Puede ser considerada como un filtrado del suero, puesto que se deriva de la sangre. Las concentraciones totales de la mayoría de estos compuestos son mucho más bajos en saliva en comparación con suero o plasma. Sin embargo, pueden proporcionar una referencia fiable para sus respectivas concentraciones sanguíneas.

Es producida por un grupo de glándulas exocrinas: las glándulas salivales, que producen y secretan un volumen de fluido que contiene componentes orgánicos e inorgánicos hacia el exterior del cuerpo. Alrededor del 20% del volumen plasmático total se trasloca todos los días a través de las glándulas salivales, con secreción de saliva en humano estimado en el rango de 750 a 1 500 ml por día. (17)

La saliva es uno de los más complejos, versátiles e importantes fluidos, suministrando una amplia gama de necesidades fisiológicas. En el sistema digestivo, la saliva juega un papel importante en el esófago, el proceso digestivo y la protección de las células gástricas. En la cavidad oral la saliva participa en la masticación, el habla, la deglución, sensibilidad gustativa, lubricación de tejidos, protección de las mucosas contra la invasión, la actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral, regulación del equilibrio iónico en el esmalte, remineralización, y deposición de la película de esmalte adquirida. (19)

2.3.2 Componentes de la saliva

2.3.2.1 Componentes inorgánicos

Se encuentran en forma iónica y no iónica. Se comportan como electrolitos, los más importantes son: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , HCO_3^- , Mg^{2+} , y NH_3 ; estos contribuyen con la osmolaridad de la saliva, la cual es la mitad de la del plasma, por lo tanto, la saliva es hipotónica con respecto al plasma.(19)

2.3.2.2 Componentes orgánicos

La parte orgánica contiene componentes de la secreción corporal (urea, ácido úrico y creatinina), productos de putrefacción (cadaverina, lípidos como el colesterol y los ácidos grasos), y más de 400 tipos de proteínas. Juegan un rol muy importante en la dinámica de la cavidad bucal puesto que se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antifúngicas, participan en la lubricación y mantenimiento de la integridad de la mucosa, contribuyen a aumentar la capacidad *buffer* y promueven la remineralización. (19)

2.3.3 Características preanalíticas de la saliva

La saliva como muestra posee una serie de ventajas y limitaciones con respecto a cualquier otro fluido biológico.

2.3.3.1 Ventajas

- Facilidad de obtención, almacenamiento y transporte de la muestra, bajo costo. En relación al paciente, es una muestra que se obtiene de forma no invasiva, por lo que se encuentra libre de estrés, no existen problemas para poder obtener muestras repetidas y poder monitorizar un analito seriado.
- La mayoría de los analitos son excepcionalmente estables en este tipo de muestra. Para los profesionales posee la ventaja de ser menos infecto-contagiosa que la sangre, cuando exponemos a un individuo sano a muestras de ineffectividad desconocida la mayoría de las veces.
- La saliva es más fácil de manejar para los procedimientos diagnósticos, no coagula y requiere menor manipulación.(4)

2.3.3.2 Limitaciones

- La principal limitación ha sido la tecnológica, debido a la falta de sensibilidad y especificidad de las técnicas, en relación a las concentraciones de los analitos en saliva.(4)

Al comparar la composición de las proteínas encontradas en saliva con el bien establecido proteoma plasmático, encontramos que el 27 % de las proteínas de la saliva total, se encuentran en plasma y cerca del 40 % de las proteínas que se sugieren como marcadores de cáncer, enfermedad cardiovascular, etc. se

encuentran en la saliva total, por lo que el análisis del proteoma salival puede ser de gran valor como biomarcador. Tras la identificación del proteoma, se estudia el transcriptoma salival (ARNm), es el precursor directo de proteínas, muy estables en saliva. Se han encontrado microARNsalival con función conocida en el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, respuesta inmune, etc.(20)

El término biomarcador se refiere a sustancias biológicas que pueden medirse y evaluarse para servir como indicadores de salud biológica, procesos patogénicos, exposición al medio ambiente y farmacología, y respuestas a una intervención terapéutica. Los estudios de las proteínas salivales y el proteoma salival proporcionan una visión de las interacciones celulares que se mantienen en el medio oral. Por lo tanto, los parámetros biológicos (biomarcadores) de la salud y las enfermedades permiten una mejor aplicación y personalización de la prevención. (20)

Las investigaciones sobre la composición de la saliva y la presencia de los marcadores de enfermedad periodontal y otros se hicieron realidad gracias al desarrollo de nanotecnologías de laboratorio que lograron la detección de diversos metabolitos, moléculas de señal, hormonas y otras sustancias por varios órdenes de magnitud. La mayoría de los metabolitos, citocinas, moléculas señal, u hormonas en una cierta cantidad mediante filtración pasiva llegan a saliva y sus niveles en la saliva reflejan sus niveles en el plasma, por lo que la saliva es un líquido de diagnóstico prometedor y muy analizado para los marcadores de la salud. (21)

La saliva es un sistema que incluye no solo sus propios componentes como los componentes de los fluidos sulculares, microorganismos y productos de inflamación en curso en periodonto, de importancia diagnóstica en lo referente a marcadores de destrucción periodontal, sino también metabolitos y moléculas señal que acompañan a los procesos remotos. Las enzimas, proteínas específicas y no específicas, anticuerpos, y otras sustancias figuran entre las posibles biomarcadores de enfermedades periodontales y de tejidos distantes. Por lo que la saliva se convierte en tema de interés entre los expertos en proteómica, e investigación de la composición secuencial de proteínas en individuos. (22)

2.3.4 Principales marcadores para enfermedades periodontales que se encuentran en saliva

2.3.4.1 Actividad enzimática en la saliva

- i. *Aspartato aminotransferasa (AST)*: Uno de los marcadores más estudiados de inflamación es aspartato aminotransferasa. Pertenece a las transaminasas que han sido investigadas durante muchos años en bioquímica clínica. Durante la inflamación, el nivel de AST en tejido aumenta. Se introduce en el plasma sanguíneo y también por difusión por medio de las glándulas salivales hacia la saliva. Durante la inflamación periodontal, también pasa a fluido sulcular y luego en la saliva. Los niveles de AST son significativa y positivamente correlacionados con la intensidad y extensión de la Inflamación. La progresión de la enfermedad periodontal, tal

como profundidad, sangrado gingival y supuración, se relaciona con aumento de los niveles de aspartato aminotransferasa salival. (22)

- ii. *Proteinasas*: Neutrófilos y otras células fagocíticas liberan proteinasas específicas, dipeptidil peptidasas y aminopeptidasas. Sus niveles en la saliva se correlacionan con la intensidad y la extensión de la inflamación en los tejidos periodontales.
- iii. *Lactoferrina*: El nivel de lactoferrina en la saliva durante el período de inflamación periodontal también aumenta. Se sabe que durante la periodontitis la saturación de la lactoferrina con el hierro disminuye, por lo tanto, la lactoferrina se degrada en productos que pueden dañar los tejidos. (22)
- iv. *Metaloproteinasas*: Las metaloproteinasas y su relación con la inflamación periodontal han sido ampliamente estudiadas, ya que las enfermedades del colágeno pueden inducir inflamación. Hoy en día más de veinte metaloproteinasas isoenzimas y sus sistemas inhibidores tisulares son conocidos. Las metaloproteinasas de matriz 8 y 9 son las principales metaloproteinasas en la saliva. En cantidades más pequeñas, la saliva también contiene metaloproteinasas de matriz 1, 2, 3, 7, 12, 13, 14, 25 y 26, y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz 1 y 2. Aumento del sangrado al sondeo, nivel de inserción y profundidad de la bolsa han demostrado en repetidas ocasiones significativas, correlaciones positivas con niveles elevados de matriz metaloproteína, lo que sugiere la metaloproteína matriz 8 como potencial marcador para el monitoreo de la actividad de la enfermedad periodontal. La metaloproteína de matriz 9

interviene en muchas funciones del proceso de la enfermedad periodontal, incluyendo la destrucción de tejidos y respuestas inmunes. (23)

2.3.4.2 Óxido nítrico radical (NO)

El radical óxido nítrico es importante para el correcto funcionamiento de los neutrófilos y macrófagos. En pacientes con periodontitis, la arginasa disminuye el nivel de saliva. Se supone que esto puede ser una consecuencia de una disminución de la actividad fagocítica.

2.3.5 Otros marcadores en enfermedades periodontales

Proteína C Reactiva (PCR)

La proteína C-reactiva es un conocido indicador de actividad inflamatoria o reumática. Durante la periodontitis, los niveles salivales de PCR aumentan y su disminución indica un exitoso tratamiento antiinflamatorio. Los altos niveles de PCR en la saliva durante la periodontitis difusa son riesgo de proceso local para la formación o progresión de enfermedad cardiovascular. Los niveles de PCR aumentan con la severidad de la enfermedad periodontal. (22)

Fibronectina

Durante la periodontitis, un menor nivel de fibronectina en la saliva es evidente. La fibronectina bloquea las adhesinas de muchos microorganismos periodontales, reduciendo su adherencia a los tejidos periodontales. (22)

Neopterina

La neopterina es una citoquina producida por los macrófagos que participa en la formación de óxido nítrico radical que es importante para la fagocitosis. Su nivel en la saliva aumenta durante la inflamación periodontal. (22)

Citocinas

Proteína adicional marcadora de inflamación, cuyos niveles se correlacionan con la intensidad de la inflamación periodontal, es detectable en la saliva. Ejemplos de estos incluyen el factor activador de plaquetas, factor de crecimiento endotelial y factor de crecimiento de hepatocitos.

Interleucina-1 beta salival

Está elevada en las enfermedades y sus niveles están fuertemente correlacionados con la progresión de la enfermedad y se considera un buen biomarcador para discriminar entre sitio periodontal activo e inactivo. La interleucina-1 beta salival también se ha asociado con periodontitis avanzada. (22)

2.4 Análisis del contenido inflamatorio en el fluido crevicular

Composición del líquido crevicular: es una presión ejercida por el plasma trasvasado de las arteriolas sobre el epitelio de inserción, esto obliga a atravesar el epitelio dejando atrás en los tejidos a los factores de la coagulación sanguínea y algún otro elemento plasmático, de lo que resulta un filtrado sérico, rico en proteínas como la albúmina, á-globulinas, heminas, inmunoglobulinas como las IgG y IgM, e IgA (sérica), las proteínas del complemento, interleuquinas o

citoquinas, lactoferina que fija el hierro sérico que requieren algunas bacterias ferropendientes para poderse reproducir, así como células defensivas (macrófagos, monocitos, linfocitos, y otras), las cuales se encuentran en pequeñas cantidades como parte de la llamada vigilancia inmunológica. (23, 24, 25)

2.4.1 Función inmunitaria

Las inmunoglobulinas se forman usualmente en la submucosa gingival y actúan a este nivel, reaccionando con las bacterias que invaden los tejidos (reacción antígeno-anticuerpo), lo que resulta neutralización de toxinas, enzimas y otros productos bacterianos, pero este complejo Ag-Ac, puede también reaccionar con la primera proteína del complemento (C), por lo que se producen sustancias vasoactivas y quimiotácticas, lo que termina lisando o haciendo fagocitables a las bacterias. La IgAs puede atravesar el epitelio, pasar al líquido gingival, donde está la fuente de la invasión, y neutralizar allí los antígenos que se generan en éste. También, pasan al líquido células defensivas para la vigilancia inmunológica, pero si existe invasión de bacterias virulentas a los tejidos, éstas se incrementan mucho en número, pudiendo ser este conteo, un indicador de infección local. Los anticuerpos que en esta zona se forman, ingresan a la memoria antigénica, y se forman constantemente, mientras persista la invasión bacteriana. (23, 24)

2.4.2 Significación clínica del contenido del líquido gingival

Se ha sugerido que en condiciones patológicas, la cantidad de líquido aumenta considerablemente, aunque sigue en discusión si este líquido es un proceso

fisiológico epitelial, continuo o intermitente, o si es un exudado reaccional, secundario a invasiones bacterianas, aunque su cantidad y composición, sobre todo carga bacteriana y celular, están en relación directa con el estado de salud periodontal: escaso en encías sanas, con pocas bacterias y algunas células defensivas (vigilancia inmunológica), y abundante en presencia de inflamación, con múltiples bacterias y gran cantidad de células defensivas y citoquinas. La presencia de cantidades apreciables de IL1 α , es altamente indicativa de inflamación gingivoperiodontal y es considerada como el más importante agente endógeno de destrucción ósea, ya que esta citoquina estimula la conversión de osteoblastos en osteoclastos. (23, 24)

Beck y Offenbacher (26) encontraron una asociación positiva entre la cantidad de esta interleuquina y la profundidad de las bolsas periodontales. Estos mismos autores asocian la cantidad de la IL1 α al desarrollo de aterosclerosis, y en consecuencia, de enfermedad cardiovascular. Parece existir fuertes evidencias entre los patógenos periodontales (*Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia* y otras) y los infartos de miocardio. Dorn (27), probaron la capacidad invasiva de *P. gingivalis* y otros a las células endoteliales de las arterias coronarias. El efecto de la IgAs es incrementar los niveles de la enzima lisosomal polimorfonuclear α -glucuronidasa, aun antes o coincidiendo con la aparición de signos característicos de afección gingival, y esta enzima desaparece cuando se instaura un tratamiento preventivo, por lo que ha sido asociada fuertemente a riesgo de actividad de enfermedad gingival. (23)

La cantidad y variedad de células defensivas, así como de inmunoglobulinas, de citoquinas; la actividad de la elastasa, los niveles de α -glucuronidasa y también de la enzima citoplasmática aspartatoaminotransferasa, en los tejidos o en el líquido gingival, así como la aumentada cantidad de éste, pueden ser indicativos de afección periodontal, aun antes de aparecer signos clínicos evidentes de afección gingival, aunque tal vez no distinguen los tipos de estas afecciones. (23)

2.4.3 Recolección de muestras a partir del fluido crevicular

Para el análisis del fluido crevicular éste debe ser recogido de forma que se produzca un mínimo deterioro del entorno del surco durante el menor tiempo posible; como referencia se ha estimado que la recogida no debe durar más de 30 segundos. (28). Faria (28) describe los siguientes métodos posibles para la recogida del fluido crevicular:

2.4.3.1 Tiras de papel

Las tiras de papel son pequeñas bandas de celulosa que permiten absorber por capilaridad el fluido crevicular cuando son insertadas en el surco gingival, o cuando son colocadas en su entrada. Su principal limitación radica en el hecho de que solo permiten cuantificar el volumen de fluido generado. Una vez recogidas las muestras, existen varias técnicas para cuantificar el volumen de fluido: mediante análisis colorimétrico, mediante valoración del tamaño de la tira con fluido, y mediante fluorescencia. El método más extendido consiste en la

determinación de la penetración de fluido en la tira mediante un dispositivo electrónico (Periotron, ProFlow, Amityville, NY). Las diferencias encontradas son registradas digitalmente para determinar el volumen total de fluido crevicular. La determinación obtenida con esta aparatología puede verse influida por la temperatura ambiental y/o por el grado de humedad; para minimizar esta influencia fue desarrollada una nueva generación de lectores (Periotron 6000, ProFlow, Amityville, NY). Una variante es utilizar conos de papel absorbente y colocarlos en tubos eppendorf con una sustancia buffer para el traslado al laboratorio. (28)

2.4.3.2 Micropipetas

Las micropipetas son dispositivos que permiten recoger pequeños volúmenes de líquido, en este caso fluido gingival, para su cuantificación o análisis cualitativo. Para esto, la pipeta debe ser colocada a la entrada del surco para la recogida del fluido por acción capilar, y medir así el volumen del fluido que entra en el tubo. En relación al análisis del fluido, este método presenta el inconveniente de la alteración en la composición del fluido al entrar en contacto con la superficie del tubo de la pipeta; determinadas sustancias podrían quedar adheridas a su superficie, y posteriormente, no podrían ser detectadas. (28)

2.4.3.3 Microjeringas

Este es un método de valoración de la cantidad de fluido. Para ello, se introduce un volumen conocido de una sustancia tampón mediante una pequeña jeringa en el surco gingival, y posteriormente es arrastrado junto con el fluido previamente existente en el surco. La sustracción de ambos volúmenes nos proporciona el valor correspondiente al fluido crevicular. (28)

2.4.3.4 Tiras de plástico

Estas tiras de plástico sirven para la recogida y examinación de leucocitos intracreviculares. Permiten cuantificar el número de PMN en surco y relacionar su cantidad con la respuesta inflamatoria. (28)

2.5 Células inmunológicas en sangre: los neutrófilos y su función

2.5.1 Sangre

Es una variedad del tejido conectivo, siendo este una subclase especializada del mismo. Se caracteriza por tener un pH de 7,4 y color entre rojo brillante u oscuro, dependiente de la cantidad de oxígeno presente en la hemoglobina. Esta tiene dos componentes: líquido el cual corresponde al plasma y sólido, que constituyen los elementos formes de la sangre (células sanguíneas y plaquetas). (29)

Entre sus funciones se encuentran

- Transporte de oxígeno, nutrientes y productos del metabolismo.
- Transporte de hormonas y gases a diferentes órganos del cuerpo.

- Transporte de dióxido de carbono y sustancias de desecho a órganos excretores.
- Homeostasis (equilibrio ácido-base, equilibrio osmótico y electrolítico).
- Regulación de temperatura corporal.
- Hemostasia. (29,30)

2.5.2 Eritrocitos

Conocidos como hematíes. Tienen forma de discos bicóncavos, sin núcleo, lo cual le permite una mejor cantidad de área de superficie. La forma que presenta es indispensable para el intercambio gaseoso. Contiene hemoglobina y otras enzimas glucolíticas. (29)

2.5.3 Leucocitos

Están presentes en sangre, en una concentración menor a la de los eritrocitos. Se estima que un adulto tiene entre 6000 a 10000 leucocitos por mililitro cúbico de sangre. En sangre tienen forma redondeada. Se dividen en dos grupos:

- i. Granulocitos: presentan gránulos en el citoplasma. Se dividen en tres tipos, de acuerdo con el color que toman al usar la tinción de Romanovsky(29):
 - Neutrófilos
 - Eosinófilos
 - Basófilos
- ii. Agranulocitos: No presentan gránulos. Se dividen en dos tipos:
 - Leucocitos
 - Monocitos (29)

2.5.3.1 Neutrófilos

Son los leucocitos mayormente presentes en sangre, se estiman entre un 60-70% de los leucocitos totales. Presentan un núcleo con varios lóbulos (multilobular), característica que le confiere el nombre de polimorfonucleares (PMN). Tienen una vida media en sangre de 6-7 horas, sin embargo, las señales inflamatorias aumentan la longevidad de los neutrófilos en los tejidos, por ejemplo, se calcula que en tejido conectivo pueden permanecer hasta 4 días. La longevidad de los neutrófilos en los tejidos contribuye a efectos nocivos, generando lesiones. (29,30)

Cada lóbulo del neutrófilo se conecta entre sí por filamentos de cromatina (cayado o banda), las cuales están ausentes en las células inmaduras. Al envejecer la célula, aumenta la cantidad de lóbulos en el núcleo. La presencia de los lóbulos se denomina hipersegmentación. El citoplasma de estas células presenta gránulos, divididos en tres tipos: (29)

- i. *Gránulos primarios/azurófilos grandes*: lisosomas, las cuales son vesículas grandes y densas que permiten la muerte y degradación de los microorganismos invasores. Contienen diferentes enzimas, entre las que encuentran: mieloperoxidasa, lisosima y defensinas: proteínas ricas en cisteína. (31, 32)
- ii. *Gránulos secundarios/pequeños específicos*: Tienen un tamaño menor a los primarios y son menos densos. Presenta lisozima y lactorrerina en mayor cantidad que los gránulos primarios, y otras enzimas como elastasa y mieloperoxidasa las cuales ayudan a llevar a cabo las funciones antimicrobianas de la célula. (29, 32)

iii. *Gránulos terciarios*: Contienen fosfatasa ácida y lisozima (32)

Los neutrófilos son la primera línea de respuesta celular a la lesión y los sitios de infección, actúa como una barrera de defensa contra las infecciones bacterianas agudas y son mediadores potentes de inflamación aguda. Su función principal es la respuesta rápida ante la invasión de agentes externos al organismo (virus, bacterias, hongos, parásitos, entre otros), por medio de la fagocitosis. Además facilitan el reclutamiento de monocitos hacia los tejidos inflamados, los cuales tienen capacidad de fagocitar neutrófilos, permitiendo la resolución de la respuesta inflamatoria. Presentan receptores Fc para la inmunoglobulina G. (29, 30,32)

Funcionamiento fisiológico

Para que exista una respuesta por parte de los leucocitos, es indispensable que exista inflamación con o sin infección. La inflamación produce vasodilatación por acción de la histamina, la serotonina, factor tisular, trombina, entre otros. Lo anterior genera reducción del flujo circulatorio que trae como consecuencia el acercamiento de los neutrófilos al endotelio capilar. (32)

El flujo de sangre reducido en conjunto con IL-1, TNF- α y los lipopolisacáridos bacterianos facilita el aumento de selectinas adhiriéndose al endotelio capilar. Las integrinas $\alpha_4 \beta_2$ aumentan la fuerza tensil y afinidad de los neutrófilos permitiendo una adhesión fuerte al endotelio capilar. El neutrófilo se aplana y la quimioquina interleucina-8 atrae otros neutrófilos repitiendo el ciclo de fijación.

Posteriormente hay acoplamiento a proteínas G y permiten la migración del nucleófilo entre las uniones intercelulares o en forma transcelular. Se adhiere a moléculas de unión intercelular: JAM-A, B y C, luego al receptor CD47 o VE cadherina. Las SIRPA α con previa fosforilación, facilita la diapédesis del neutrófilo.

Cuando el neutrófilo alcanza el otro extremo las moléculas intercelulares se vuelven a juntar. El neutrófilo libera elastasa del gránulo primario y colagenasa del gránulo secundario para romper la matriz extracelular y la fibronectina, para fagocitar las partículas en suspensión. Los procesos anteriores requieren de energía, los cuales se consiguen de la glucólisis anaeróbica o la acción de la NADPH.

En la matriz extracelular, el neutrófilo apoptótico o fagocitado por el macrófago inicia un proceso de reparación. Este proceso se da por la llegada de basófilos, los cuales alargan la vida del neutrófilo, liberando sustancias para la reparación, por ejemplo, factores de crecimiento.

Los neutrófilos salen de la circulación sistémica dependiendo de las necesidades del organismo (ejemplo estrés, miedo), son abundantes en la mañana, aumentan durante el embarazo y después de los tiempos de comida. La mitad se encuentran adosados al endotelio, la otra mitad circulan en el torrente sanguíneo. El mayor volumen de estas células se encuentran principalmente en los capilares de los órganos que requieren de una mayor defensa, ejemplo: bronquios y el tubo digestivo. (33)

2.5.3.2 Eosinófilos

Representan entre el 2-4% de la cantidad total de leucocitos presentes en sangre. Presentan dos lobulaciones en su núcleo, a diferencia de los neutrófilos que presentan una cantidad mayor de lobulaciones. El citoplasma presenta gránulos, los cuales se tiñen de color rojo en los cortes de histológicos. Los gránulos presentan cuatro proteínas principales: arginina, proteína catiónica de eosinófilo (ECP, capaz de neutralizar la heparina), peroxidasa del eosinófilo (EPO, facilita la destrucción por los macrófagos) y neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN, causa disfunción del sistema nervioso de los parásitos). Los gránulos específicos contienen además histaminasa, arilsulfatasa, colagenasa, catepsina. (29)

Al igual que los neutrófilos, presentan gránulos azurófilos, que contienen lisosomas como hidrolasas ácidas y enzimas hidrolíticas que actúan en la destrucción de parásitos. (29)

Estas células se caracterizan por:

- Ser la primera línea de defensa contra parásitos.
- Intervienen en reacciones alérgicas.
- Fagocitosis del complejo antígeno-anticuerpo.
- Participan en el asma bronquial.
- Moderan efectos de los agentes vasoactivos inflamatorios. (29, 30)

2.5.3.3 Basófilos

Son los leucocitos menos abundantes, representan menos del 0,5% del total. Tienen un tamaño menor al neutrófilo. Su nombre se debe a que presentan gránulos específicos muy abundantes, los cuales se tiñen de color azul oscuro o púrpura debido a la presencia de heparina y otros factores que median la respuesta inflamatoria. Presentan gránulos azurófilos inespecíficos, los cuales contienen enzimas similares a las de los neutrófilos. (29, 31)

Presentan receptores de inmunoglobulina E, y tienen la capacidad de liberación de histamina activarse con el antígeno. Además presentan otras enzimas como la Fosfolipasa A, la cual cataliza leucotrienos, promoviendo la respuesta inflamatoria. Estas células están presentes en las reacciones de hipersensibilidad aguda, infecciones virales, procesos inflamatorios crónicos, hipersensibilidad inmediata (asma bronquial) y tardía (alergias). (29, 31)

2.5.3.4 Linfocitos

Agranulocitos más comunes, de tamaño más grande que los eritrocitos. Se dividen en tres tipos (B, T y NK). El 80% corresponden a linfocitos T, el 15% a linfocitos B y el resto corresponden a células NK. Desempeñan funciones fundamentales en la reacción inmunitaria. (29)

2.5.3.5 Monocitos

Leucocitos de mayor tamaño, son fagocitos circulantes por el torrente sanguíneo. A pesar de su clasificación, presentan gránulos pequeños que contienen enzimas lisosómicas. Son precursores de distintos tipos de células;

estos se movilizan a los tejidos diferenciándose en fagocitos (histiocitos, osteoclastos, macrófagos, macrófagos del ganglio linfático, médula ósea, etc.). Estas células son las principales efectoras de la respuesta inmunitaria a la infección y la lesión, sobre todo por medio de los mecanismos de fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios y eliminación de células apoptóticas. Las células derivadas de monocitos son células presentadoras de antígenos, las cuales tienen roles importantes en la defensa inmunitaria. (29, 30, 31)

2.6 Biopsia de tejido gingival

El término biopsia se origina del griego *bios* que significa vida y *opsis* que significa visión, es decir visión de vida. Una biopsia es la remoción de una pequeña muestra de tejido para ser examinada. Después de que el tejido es removido, es enviada a un laboratorio donde será examinada al microscopio. (34)

La evaluación histológica de infiltrados inflamatorios gingivales y anatomía epitelial en biopsias gingivales son importantes en la investigación periodontal y además tiene un impacto en el diagnóstico.

Las biopsias de tejido gingival por lo general provienen de diferentes fuentes como: áreas adyacentes al diente que se sometió a una extracción, regiones de papilas interdetales que fueron sometidas a una gingivectomía. Todas ellas son muy invasivas dejando cicatrices o defectos, por lo que lo es casi imposible de utilizar a gran escala para el diagnóstico. (35)

Numerosos métodos pueden ser utilizados para recoger muestras de tejido de la mucosa oral para un examen histopatológico. Realizar biopsias con bisturí es el estándar y generalmente produce el espécimen más satisfactorio. Otras técnicas que se pueden utilizar incluyen: el uso de una aguja, biopsia de punch, láser o con electrocauterizador. (34) El uso estandarizado de 2mm de diámetro para biopsias de tejido periodontal parece adecuado para análisis de inmunohistoquímica (35)

Se cree que biopsias mínimamente invasivas pueden ser una alternativa para el estudio de la expresión de citoquinas en sitios con enfermedad periodontal. (35) El diagnóstico microbiológico es una razón fundamental para el plan de tratamiento y obtener el consentimiento informado en pacientes con periodontitis, esto al visualizar sus propios patógenos bacterianos. (36)

Existen varios métodos de detección de patógenos periodontales como cultivos anaeróbicos usando un medio selectivo, técnicas moleculares biológicas e inmunoensayos. Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa o PCR basadas en secuencias de ADN objetivo, son las más utilizadas. Sin embargo, éstas no son cualitativas y graban solamente la presencia de la bacteria en la muestra. (36)

2.6.1 Diagnóstico de Infecciones bacterianas y fúngicas

Los exámenes de laboratorio por lo general incluyen la preparación de cultivos con condiciones adecuadas para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. Un espécimen recogido adecuadamente es el paso más importante en el diagnóstico de infecciones, ya que el resultado depende de la

selección, el tiempo y el método de recolección del espécimen. Debido a que el aislamiento del agente es tan importante, el espécimen debe ser obtenido del sitio más propenso a dar el agente en esa etapa particular de la enfermedad. (37)

Reglas generales que aplican a todos los especímenes:

- La cantidad del material debe ser adecuada según el análisis que se vaya a realizar.
- La muestra debe ser representativa del proceso infeccioso.
- La contaminación del espécimen debe evitarse utilizando equipo estéril y una técnica aséptica.
- El espécimen debe ser llevado al laboratorio y ser examinado prontamente.
- Los especímenes deben ser obtenidos antes de que fármacos antimicrobianos sean administrados. (37)

2.6.2 Diagnóstico molecular

Sondas de hibridación de ácido nucleico

El principio de los ensayos moleculares de la sonda de hibridación es la hibridación de una sonda de ácido nucleico característica con una secuencia de ácido nucleico específica en una muestra de ensayo seguido por la detección del híbrido apareado. La sonda de ácido nucleico está marcada con enzimas, sustratos antigénicos, moléculas quimioluminiscentes o radioisótopos para facilitar la detección del producto de hibridación. (37)

La detección del ácido nucleico en la muestra puede ser muy específica, mediante la selección cuidadosa de la sonda o haciendo un oligonucleótido específico y realizando la hibridación con gran rigurosidad. (37)

En la actualidad estos ensayos se utilizan principalmente para la confirmación rápida de un patógeno una vez que se detecta el crecimiento. La hibridización in situ involucra el uso de sondas de ADN etiquetadas o sondas de ARN etiquetadas para detectar ácidos nucleicos complementarios en tejidos sumergidos en parafina y formalina, tejidos congelados o preparaciones citológicas ensambladas en un portaobjetos. (37)

Por otro lado, esta técnica ha incrementado el conocimiento de la biología de muchas enfermedades infecciosas. (37)

Una técnica original que es un tipo de modificación de una hibridación in situ hace uso de sondas de ácido nucleico con péptidos. Las sondas de ácido nucleico con péptidos son piezas sintetizadas de ADN, en las cuales la estructura del ADN compuesta por fosfato de azúcar (cargada normalmente) es reemplazada por unidades repetitivas de poliamida (carga neutral). Las bases nucleótidas individuales pueden acoplarse a la ahora estructura neutral que permite una más específica y rápida hibridación a los ácidos nucleicos complementarios. Debido a que las sondas son sintéticas, no están sujetas a degradación por las nucleasas y otras enzimas. Estas sondas pueden ser utilizadas para la detección de *Staphylococcus aureus*, enterococo y algunas candida spp, y algunos bacilos gram – de cultivos de sangre positivos. La sonda de hibridación es detectada por la

fluorescencia, y se llama hibridación péptida in situ con fluorescencia ácido nucleica. (37)

2.6.2.1 Sonda de hibridación 16S Rrna

El ARNr 16S de cada especie de bacterias tiene porciones estables de la secuencia y hay muchas copias presentes en cada organismo. Entonces se añaden sondas marcadas específicas para el ARNr 16S de una especie y se mide la cantidad de marcador en el híbrido de doble hebra. (37) Esta técnica se utiliza para la rápida identificación de muchos organismos.

2.6.2.2 Sistemas de amplificación objetiva

El ADN o ARN objetivos son amplificados varias veces en este tipo de ensayos. La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es utilizada para amplificar cantidades extremadamente pequeñas de un ADN específico que está presente en un espécimen, haciendo posible la detección de lo que inicialmente era una cantidad mínima del ADN. La PCR utiliza una polimerasa de ADN termoestable para producir una amplificación doble del ADN objetivo con cada ciclo de temperatura. (37)

El ADN extraído de la muestra junto con los primers de oligonucleótidos específicos de secuencia, nucleótidos, la ADN polimerasa termoestable y el buffer; son calentados a 90°-95° C para desnaturalizar las dos cadenas del ADN. La temperatura se reduce a 45°-60° C dependiendo de los primers. Cada primer se extiende por la ADN polimerasa termoestable mediante la adición de nucleótidos

complementarios al ADN objetivo que produce la doble amplificación. Este ciclo se repite de 30 a 40 veces para producir amplificación del segmento de ADN objetivo en más de 10^{10} veces. El segmento que es amplificado puede ser visto en un gel electroforético o detectado por un análisis de Southern Blot usando sondas de ADN marcadas específicas para el segmento. (37)

El PCR también puede interpretar ARN, el cual se denomina PCR transcriptasa reversa donde la enzima transcriptasa reversa es utilizada para transcribir el ARN en ADN complementario para una amplificación en PCR subsecuente. (37)

Los métodos biológicos moleculares que utilizan secuencias de ARN del ARN ribosómico 16S, ahora se usan comúnmente para la identificación y clasificación de bacterias. Las secuencias de ARN ribosomal se utilizan ampliamente para clasificar la taxonomía filogenética biológica, incluida la de microorganismos. Tales secuencias habilitan la identificación de microorganismos porque el ARN ribosomal 16S contiene otras secuencias variables más que cambian de acuerdo a especies o familias. (36)

La hibridación in situ fluorescente (FISH) que utiliza ARNr 16S es una de las herramientas más poderosas en cuanto a visualización de microorganismos y habilita la detección y enumeración de poblaciones bajo condiciones espontáneas sin ser cultivadas. En la mayoría de los estudios que utilizan FISH, se han utilizado aproximadamente 20-mer oligonucleótidos como sondas de ARNr 16S porque sondas de oligonucleótidos cortos pueden impregnar células enteras fijas. El

tamaño de una sonda debe aumentarse para obtener una especificidad necesaria.

(36)

La mayor ventaja de utilizar FISH es que las bacterias que crecen son detectables, especialmente aquellas especies periodontales que son anaeróbicas que no pueden ser cultivadas o resultan difíciles de cultivar. Por ejemplo la *P. gingivalis* es un anaerobio estricto que tiene requerimientos nutricionales de vitamina K y hemina, además es difícil detectar estas especies utilizando técnicas dependientes de cultivo. Estudios demuestran que FISH con una sonda de único uso puede fácilmente detectar la presencia de *P. gingivalis* y *A.A.* (36)

La utilización de métodos como FISH en muestras de tejidos es limitada debido a la autofluorescencia de varios de los componentes tisulares, entre ellos los glóbulos rojos. Estos componentes obstaculizan la aplicación de esta tecnología cuando los tejidos inflamados sangran.

Por lo tanto, para la identificación de bacterias en tejidos gingivales inflamados se ha desarrollado un método denominado Hibridación in situ utilizando una sonda de ADN marcada con digoxigenina. (38)

2.6.3 Protocolo

- i. Preparación de la sonda.
- ii. Desparafinización y rehidratación del corte del tejido.
- iii. Tratamiento previo de cortes de tejido.
- iv. Hibridación con la sonda.

v. Detección con anticuerpo anti-digoxigenina.

Una de las limitaciones de este protocolo es la incapacidad de aplicar múltiples sondas al mismo tiempo. Además, excluir las señales de contaminantes en la superficie de la sección es limitado. (38)

2.7 Interacción de los anticuerpos y antígenos en la enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal se caracteriza por la inflamación e infección localizada o generalizada de las estructuras de soporte del diente (como el hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento y encía), producida principalmente por bacterias anaerobias Gram negativas que se encuentran en la placa subgingival como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* forman un consorcio en el biofilm subgingival y son consideradas como las principales bacterias periodontopatógenas, se tiene también otros microorganismos predominantes en el proceso de la enfermedad como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus migros*, *Eikenella corrodens*. (39, 40)

Actinobacillus actinomycetemcomitans y *Porphyromonas gingivalis* son las principales bacterias periodontopatógenas presentes, se da una producción elevada de anticuerpos en la saliva, fluido crevicular gingival o en el suero de pacientes con periodontitis producidos para contrarrestar la acción de las bacterias. (41)

La *P. gingivalis* es una bacteria patógena ampliamente asociada al inicio, progresión y severidad de la enfermedad periodontal, encontrado en altos niveles en el espacio subgingival de personas con periodontitis, tiene alta prevalencia tanto en la periodontitis crónica como la agresiva y está asociada con la destrucción del soporte periodontal y con el inicio y severidad de ciertas enfermedades y condiciones sistémicas como trastornos cardiovasculares y parto prematuro con bajo peso del neonato. (42, 43)

Estas bacterias específicas responsables del inicio y progresión de la enfermedad periodontal son consecuencias de un desequilibrio entre los factores protectores del huésped y los mecanismos destructivos iniciados por el proceso infeccioso. Agentes etiológicos que originan la enfermedad producen una supresión del sistema inmunológico de defensa y permiten que los patógenos bacterianos se multipliquen y con ello se liberan citocinas, interleucinas proinflamatorias, y se da la iniciación de eventos inmunopatológicos o citotóxicos que generan la destrucción del tejido periodontal. (39, 40)

La respuesta que ocurre ante la enfermedad periodontal se componen de eventos como la activación de la respuesta inflamatoria aguda y los sistemas inmunológicos humorales y celulares que se encuentran en los tejidos locales como en la circulación periférica. Son características de la lesión periodontal la infiltración de linfocitos polimorfonucleares (PMN), de linfocitos T, de linfocitos B y de macrófagos. (40, 44)

El desarrollo de pruebas microbiológicas para la identificación de estas bacterias y los niveles de anticuerpos (IgG, IgA) constituye una vía de información adicional que ayuda al clínico a establecer un diagnóstico más preciso de la situación periodontal del paciente y valorar la necesidad de establecer un tratamiento antibiótico coadyuvante al tratamiento periodontal. (39, 43)

Estos anticuerpos se distribuyen en los líquidos biológicos por todo el cuerpo, por lo tanto las formas secretadas en el plasma corresponden solo a una fracción del total, en plasma la IgG se encuentra en mayor concentración y es la más importante en la respuesta a infecciones, seguido por la IgA importante en la inmunidad de las mucosas y por último la IgM que se encuentra en menor concentración plasmática pero son las primeras en elevarse en infecciones agudas. (45)

Los niveles de IgG se pueden cuantificar en fluidos como la saliva por medio de diversas pruebas micro analíticas, material procedente del fluido crevicular puede llegar a la saliva, esto hace de la saliva un excelente fluido para realizar pruebas por su fácil obtención y que es una técnica no invasiva. (46)

Las bacterias periodontopatógenas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* desencadenan respuestas inflamatorias inmunológicas locales como sistémicas y generan secreción de muchas citoquinas inflamatorias, citocinas que causan inflamación local que conduce a la destrucción periodontal. Al haber una respuesta inmunológica sistémica a la enfermedad periodontal se puede medir como un aumento de los

niveles plasmáticos de anticuerpos frente a estas bacterias y también altos niveles de IgG frente a *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis. (47)

Existen varias técnicas para la medición de inmunoglobulinas, como la nefelometría donde se mide la luz dispersada y por medio de un cálculo de álgebra analítica se determina la concentración de dicha sustancia. La citometría de flujo es una técnica que por medio del tamaño celular y complejidad interna de la célula es posible diferenciar los tipos celulares. La técnica de inmunofluorescencia indirecta es una técnica de laboratorio que identifica la presencia de diversas sustancias gracias a los anticuerpos que se han vuelto fluorescentes. El radioinmunoensayo es una técnica inmunológica donde se detecta los anticuerpos de alta afinidad por radioactividad. (48)

Otra técnica inmunológica para la detección de antígenos y anticuerpos es el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) donde se utilizan anticuerpos o antígenos marcados con una enzima que al reaccionar con el sustrato específico producen una reacción de color que puede ser detectado y cuantificado. (45, 49)

Capítulo III: Metodología

3.1 Población y muestras

La población de este estudio piloto fueron los pacientes que asistieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, específicamente a la Preclínica de Periodoncia durante el segundo semestre del 2017. De esta población se seleccionó por conveniencia una muestra de 18 pacientes que aceptaron participar en el estudio, de estos 9 como grupo experimental y 9 como grupo control. Se eligió esta muestra poblacional porque todos los sujetos recibieron atención odontológica en el mismo horario, facilitando así la recolección de las muestras.

En las muestras del grupo experimental se cuentan con 5 mujeres y 4 hombres, para el grupo control se contaron con 6 mujeres y 3 hombres. Los pacientes del grupo experimental de la muestra de investigación fueron previamente diagnosticados con enfermedad periodontal, como periodontitis crónica localizada y periodontitis crónica generalizada. Y los participantes del grupo control fueron diagnosticados previamente sin enfermedad periodontal.

3.2 Criterios de inclusión

Pacientes aceptados en la clínica de periodoncia, que voluntariamente aceptaron participar en el estudio, con presencia de enfermedad periodontal y requerimiento del tratamiento de fase higiénica.

3.3 Criterios de exclusión

Pacientes con enfermedad periodontal que presentan enfermedades autoinmunes o degenerativas y que hubieran iniciado la fase higiénica periodontal antes de la obtención de la muestra.

3.4 Instrumentos de recolección de datos.

A los sujetos aceptados en la Preclínica de Periodoncia se les valoró su condición periodontal para considerar la necesidad de tratamiento periodontal (fase higiénica). Se procedió a completar el expediente clínico de cada uno de los pacientes que forman la muestra del presente estudio, toma de radiografías periapicales, sondeo de todas las piezas dentales, índice de biofilme dental e índice de sangrado, para determinar el diagnóstico periodontal de cada paciente.

Se realizó un consentimiento informado, previamente aceptado por el Comité de Ética de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, para ser presentado a los pacientes que desearon participar del estudio (anexo 1).

3.5 Protocolo para muestras de saliva

3.5.1 Toma de muestras

La recolección de la muestra de saliva se realizó por medio de un enjuague con el producto comercial Clorexil® (Digluconato de Clorhexidina al 0,12%). Previo a obtener la muestra el paciente debía haberse abstenido de realizarse higiene dental y enjuagarse la boca dos horas antes. Se le suministró el enjuague a los pacientes en un vaso de papel, los pacientes tomaron el enjuague en dos tractos, en cada toma se les pidió que realizaran un enjuague vigoroso de 1 minuto cada uno, y ambas tomas fueron depositadas en un mismo tubo de ensayo por paciente, luego fueron llevados al Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM), ubicado en la ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR) para ser analizadas.

3.5.2 Análisis de las muestras en laboratorio

Para la extracción del ADN de las muestras, primeramente, se agrega buffer TE de manera que los tubos tuvieran un peso similar para que al ser colocados en la centrifuga se lograra un equilibrio adecuado.



Figura 1. Tubos de ensayo con muestras de saliva. (Fotografía tomada en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM), ubicado en la ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR)). Fotografía de elaboración propia.



Figura 2. Colocación de los tubos de ensayo en la centrifuga y luego su decantación. Fotografía de elaboración propia.

Se centrifugan por 20 minutos a 14 000 rpm y se decanta el sobrenadante. Cada muestra se lava nuevamente con buffer y se decanta el sobrenadante.



Figura 3. Tubos de ensayo con el botón y al que se le agregan buffer Lisis y Proteinasa K. Fotografía de elaboración propia.

Una vez obtenido el botón se agregan 100 microlitros de buffer Lisis y 25 microlitros de Proteinasa K (20 mg/ml). Esto se lleva a un baño María a 56° durante toda una noche.

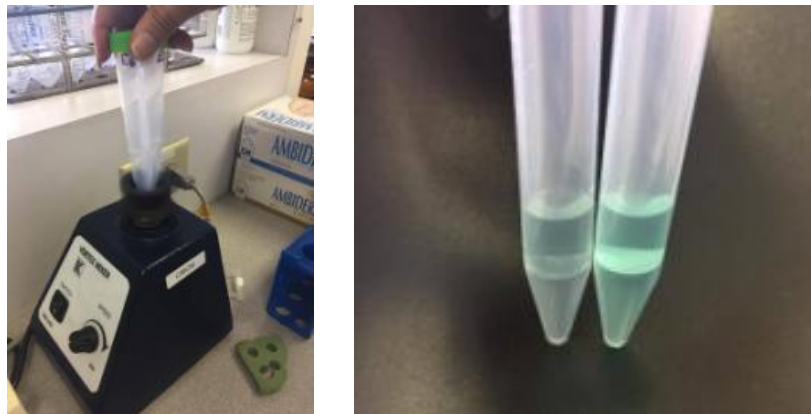


Figura 4. Posterior a la agregación de NaCl y cloroformo- alcohol isoamílico, se agita en el vortex y se observan dos capas en el tubo de ensayo. Fotografía de elaboración propia.

Posteriormente se agregan 220 microlitros de NaCl y 440 microlitros de cloroformo- alcohol isoamílico. Se agita en el vortex, se centrifuga 2 minutos a 14 000 rpm, se extrae la capa superior, se agrega etanol absoluto para que precipite el ADN, se deja secar y se agregan 50 microlitros de buffer TE.



Figura 5. ADN precipitado posterior a la colocación de etanol. Fotografía de elaboración propia.

3.6 Protocolo para muestras de fluido crevicular

3.6.1 Toma de las muestras

La recolección de muestra del fluido crevicular se realizó por medio de puntas de papel Paper Points número 40, previamente esterilizadas. De igual manera que para la recolección de las muestras de saliva, el paciente debió abstenerse de enjuagarse dos horas anteriores de la toma. En cada paciente se utiliza aislamiento relativo con rodillos de algodón y gasa, se limpia los sitios de la recolección de muestra con gasa estéril, asegurándose así de la remoción de biofilme dental.

Sujetando la punta de papel con una pinza se introduce cuidadosamente en el surco gingival en sitios con mayor profundidad al sondaje realizados durante el diagnóstico en el caso de los pacientes de la población experimental, y en

localizaciones mesial y distal por vestibular elegidas aleatoriamente en pacientes control. A cada paciente se le colocan 5 puntas de papel y se mantienen por 30 segundos en el surco, posteriormente son colocados y almacenados en tubos eppendorf estériles, para luego ser llevados y analizados en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM), ubicado en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR).

3.6.2 Análisis de las muestras en laboratorio

Inicialmente se cortaron cuidadosamente las partes activas de las puntas de papel Paper Points de 2 a 3 mm aproximadamente y se trasladan a un nuevo tubo eppendorf estéril, se agregan 75 μ l de Chelex. Luego se incuba en baño maría de agua hirviendo por 20 min y se coloca en vortex por 10 segundos. Posteriormente se deja enfriar y se centrifuga por 3 minutos. La muestra queda lista para ser amplificada en PCR.

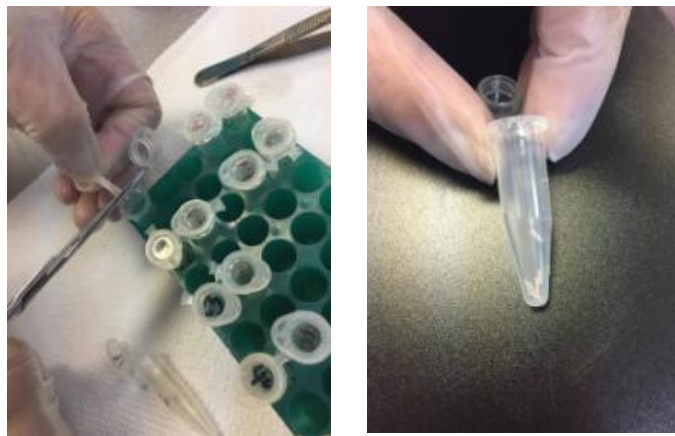


Figura 6. Corte de los Paper Points y su colocación en tubo Eppendorf. Fotografía de elaboración propia.



Figura 7. Colocación de Chelex al tupo Eppendorf con los Paper Points.

Fotografía de elaboración propia.



Figura 8. Incubación en baño maría de los tubo Eppendorf con las muestras de líquido crevicular y Chelex. Fotografía de elaboración propia.

Capítulo IV

4.1 Conclusiones

1. La enfermedad periodontal es una enfermedad crónica e inflamatoria de los tejidos del periodonto causada por microorganismos que producen la destrucción de las estructuras de soporte del diente, cuyo factor etiológico es la presencia del biofilme dental.
2. Los microorganismos ejercen directamente su efecto patógeno causando la destrucción del tejido o indirectamente, estimulando y modulando la respuesta inmunitaria del huésped.
3. La obtención de muestras de saliva es más sencilla en comparación con las muestras de fluido crevicular.
4. Las muestras de fluido crevicular son susceptibles a la contaminación con saliva y/o sangre y es deseable la calibración de los operadores.
5. La técnica de análisis molecular PCR es preferible en comparación con análisis de cultivos bacterianos ya que es más precisa la extracción y amplificación de ADN mediante la técnica de PCR.

4.2 Limitaciones

Las limitaciones del proyecto fueron:

- El seminario, al ser una revisión bibliográfica, necesita de diferentes fuentes para su elaboración. La mayoría de artículos científicos sobre inmunología en la enfermedad periodontal están publicados hace más de 10 años. Los artículos publicados recientemente tienen acceso restringido, lo que limitó la búsqueda de la información más actualizada.
- El contenido del seminario utiliza información muy especializada del ámbito de la inmunología y genética. Estos temas son poco estudiados en la carrera de Odontología. Por lo tanto, se requirió tiempo adicional de estudio en temas de inmunología y química orgánica para su comprensión.
- El tipo de proyecto involucra la investigación en seres humanos, por lo que requiere de la aprobación del Comité de Ética de la Universidad. La aprobación del proyecto por parte del comité fue muy tarde en el año. Como consecuencia, la toma de muestras y su análisis para el estudio piloto no se realizaron con tiempo. Los resultados del estudio y su discusión no se incluyen en el presente seminario.
- Para la toma de muestras de la investigación piloto, se solicitó ayuda a los estudiantes de cuarto año de carrera para tomarlas en sus pacientes de preclínica. El muestreo interfirió con el tiempo de estudio de los estudiantes, por lo cual muchos no quisieron colaborar.

Capítulo V

5.1 Cronograma de actividades

Fecha	Actividad	Recursos	Responsables	Evaluación del director	Evaluación del grupo
25 marzo 2017	Recibimiento del programa.	Programa impreso	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
8 abril 2017	Reunión con la doctora Rojas y seminario.	Computadora Presentación en Power Point	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
28 abril 2017	Reunión con la doctora Rojas y seminario.	Computadora Presentación de Power Point	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		

13 mayo 2017	Reunión con la doctora Rojas y seminario.	Computadora Presentación de Power Point	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
10 junio 2017	Reunión con la doctora Rojas y seminario.	Computadora Presentación de Power Point	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
16 junio 2017	Reunión con la doctora Rojas y seminario.	Computadora Presentación de Power Point	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
19 junio 2017	Recolección de artículos de carácter científico sobre los temas de investigación.	Computadora Base de datos del SIBDI y otras fuentes	María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		

23 junio 2017	Reunión con la doctora Rojas.		Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
28 julio 2017	Reunión con Dra. Murillo y doctora Rojas, seminario.	Computadora Presentación de Power Point	Dra. Rojas Dra. Murillo María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
26 agosto 2017	Reunión con la doctora Rojas y seminarios.	Computadora Presentación de Power Point	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		

2 setiembre 2017	Reunión con la doctora Silva y doctora Rojas, seminario.	Computadora Presentación de Power Point	Dra. Rojas Dra. Silva María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
6 setiembre 2017	Firma de consentimiento de pacientes de la preclínica de periodoncia en la Facultad de Odontología de la UCR, toma de muestras de saliva y fluido crevicular.	Consentimiento informado Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrifuga con enjuague	Dra. Rojas Silvia Díaz Carolina Fong		
12 setiembre 2017	Trabajo en el marco teórico.	Computadora	María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
13 setiembre 2017	Redacción del marco teórico.	Computadora	María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		

19 setiembre 2017	Correcciones del marco teórico.	Computadora	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
20 setiembre 2017	Toma de muestras del grupo experimental. Firma de consentimiento informado en preclínica de periodoncia. .	Consentimiento informado Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrífuga con enjuague	Dra. Rojas María J. Chinchilla Carolina Fong Carolina González		
27 setiembre 2017	Toma de muestras del grupo experimental. Firma de consentimiento informado en preclínica de periodoncia. . .	Consentimiento informado Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrífuga con enjuague	Dra. Rojas Carolina Fong Carolina González		

4 octubre 2017	Toma de muestras grupo experimental. Firma de consentimiento informado en preclínica de periodoncia.	Consentimiento informado Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrifuga con enjuague	Dra. Rojas Carolina Fong		
13 octubre 2017	Toma de muestras grupo control. Firma de consentimiento informado en preclínica de periodoncia.	Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrifuga con enjuague	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina González María F. Hernández		
15 octubre 2017	Correcciones del marco teórico.	Computadora	Dra. Rojas María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		

18 octubre 2017	Trabajo en el marco teórico.	Computadora	María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
19 octubre 2017	Inicio de extracción de ADN de las muestras de saliva y fluido crevicular en el CIBCM.	Equipo del laboratorio de microbiología molecular	Dra. Silva María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
23 octubre 2017	Continuación de extracción de ADN de las muestra de saliva en el CIBCM.	Equipo del laboratorio de microbiología molecular	Dra. Silva Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
26 octubre 2017	Colocación de las muestras de ADN en electroforesis.	Equipo del laboratorio de microbiología molecular	Dra. Silva Carolina Fong Carolina González		

27-31 octubre 2017	Entrega del borrador de la memoria del Seminario de Graduación.		María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
30 octubre-3 noviembre 2017	Revisión de la memoria por parte de lectores y correcciones indicadas.	Borrador de memoria Computadora	Profesores asignados. María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
6-10 noviembre 2017	Revisión de memoria final por parte del filólogo y correcciones indicadas.	Borrador de memoria Computadora	Filólogo. María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
6-10 noviembre 2017	Elaboración de afiche del pasillo.	Computadora Programas de diseño Lona Impresora	María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		

13-24 noviembre 2017	Elaboración de material audiovisual para la presentación oral.	Computadora Power Point	María José Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
27 noviembre-1 diciembre 2017	Presentación oral del Seminario de Graduación a la Dra. Rojas.	Computadora Presentación Power Point	María José Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		
8 diciembre 2017	Presentación oral final del Seminario de Graduación.	Auditorio Equipo audiovisual Micrófono Presentación Power Point	Dra. Rojas. María J. Chinchilla Silvia Díaz Carolina Fong Carolina González María F. Hernández		

5.2 Bitácora

Marzo

25. Recibimiento del programa

Abril

8. Reunión con la doctora Rojas y seminario a cargo de Carolina González.

28. Reunión con la doctora Rojas y seminario a cargo de María José Chinchilla.

Mayo

13. Reunión con la doctora Rojas y seminario a cargo de María Fernanda Hernández.

Junio

10. Reunión con la doctora Rojas y seminario a cargo de Carolina Fong.

16. Reunión con la doctora Rojas y seminario a cargo de Silvia Díaz.

19. Recolección de artículos de carácter científico sobre los temas de investigación a cargo de todos los miembros sustentantes.

23. Reunión con la doctora Rojas.

Julio

28. Reunión con Dra. Murillo y doctora Rojas, seminario a cargo de María Fernanda Hernández.

Agosto

26. Reunión con la doctora Rojas y seminarios a cargo de Carolina Fong y Carolina González.

Septiembre

2. Reunión con la doctora Silva y doctora Rojas, seminarios a cargo de María José Chinchilla y Silvia Díaz.
6. Firma de consentimiento de pacientes de la preclínica de periodoncia en la Facultad de Odontología de la UCR, toma de muestras de saliva y fluido crevicular a cargo de la Dra. Rojas, Carolina Fong y Silvia Díaz.
12. Trabajo en el Marco Teórico a cargo de miembros sustentantes.
13. Trabajo en el Marco Teórico a cargo de miembros sustentantes.
19. Recibimiento de correcciones del Marco Teórico.
20. Firma de consentimiento de pacientes de la preclínica de periodoncia en la Facultad de Odontología de la UCR, toma de muestras de saliva y fluido crevicular a cargo de María José Chinchilla, Carolina González y Carolina Fong.
27. Firma de consentimiento de pacientes de la preclínica de periodoncia en la Facultad de Odontología de la UCR, toma de muestras de saliva y fluido crevicular a cargo de Carolina Fong y Carolina González.

Octubre

4. Firma de consentimiento de pacientes de la preclínica de periodoncia en la Facultad de Odontología de la UCR, toma de muestras de saliva y fluido crevicular a cargo de Carolina Fong.
13. Toma de muestras de saliva y fluido crevicular de los controles en la Facultad de Odontología de la UCR a cargo de Carolina González, María José Chinchilla, Silvia Díaz y María Fernanda Hernández.
15. Recibimiento de correcciones del Marco Teórico.
18. Trabajo en el Marco Teórico a cargo de los miembros sustentantes.

19. Inicio de extracción de ADN de las muestras de saliva y fluido crevicular en el CIBCM a cargo de la Dra. Silva, Carolina González, María José Chinchilla, Silvia Díaz y María Fernanda Hernández, Carolina Fong.

23. Continuación de extracción de ADN de las muestra de saliva en el CIBCM a cargo de la Dra. Silva, Carolina González, Carolina Fong y María Fernanda Hernández.

26. Colocación de las muestras de ADN en electroforesis en el CIBCM a cargo de la Dra. Silva, Carolina González, Carolina Fong.

5.3 Referencias bibliográficas

1. Newman MG, Takei HH, Carranza FA, Klokkevold PR. 2006. Periodontología Clínica de Carranza. Venezuela: Amolca; 2014.
2. Usatine RP, Smith MA, Chumley HS, Mayeaux EJ. The Color Atlas of Family Medicine. New York, McGraw-Hill, 2a. ed; 2013.
3. Gonsalves WC, South-Paul JE, Matheny SC, Lewis EL. Current Diagnosis & Treatment: Family Medicine. New York, McGraw-Hill, 4a. ed; 2015.
4. Sánchez, P. La saliva como fluido diagnóstico. *Ed Cont Lab Clín* 2013; 16: 93-108.
5. Ortiz S, Aguilar M. Pronóstico periodontal: parámetros para una clasificación sencilla. *Odovtos*. 2011; (13):61-64.
6. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005.
7. Owen, J. A.; Punt, J.; Stranford, S. A. *Kuby Inmunología*. Distrito Federal, México: McGraw Hill; 2015.
8. Stewart, J.; Weir, D. M. *Inmunología: Manual moderno*. Madrid, España: Manual Moderno; 1999.
9. Rojas, W.; Anaya, J.M.; Aristizábal, B.; Cano, L.E.; Gómez, L.M.; Lopera, D. *Inmunología de Rojas*. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007.
10. Owen, J. A.; Punt, J.; Stranford, S. A. *Kuby Inmunología*. (6ta ED). Distrito Federal, México: McGraw Hill; 2007.
11. Limachi Mamani N. Inmunidad celular. *Rev. Act. Clin. Med.* 2011; 13: 649-653.
12. Male, D.; Brostoff, J.; Roth, D. B.; Roitt, I. M. *Inmunología*. Elsevier, 8a. ed; 2014.
13. Kishiyama JL. Access Medicine Trastornos del sistema inmunitario [Internet]. New York; 2015 [citado 2017, Jun 14]. Disponible en: <http://accessmedicina.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=1584§ionid=103053922>.
14. Paulsen, D F. Access Medicine, Chapter 14. Lymphoid System. *Histology & Cell Biology: Examination & Board Review* [Internet]. New York; 2010 5e New

- York. [citado, 2017, Junio 14]. Disponible en: <http://accessmedicine.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=563§ionid=42045309>.
15. Rojas, W. Inmunología de Rojas. 15va edición. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2010.
 16. Barrett K. E.; Barman S. M. Ganong's Review of Medical Physiology. Mc Graw Hill, New York, 25va ed; 2010.
 17. Papacosta, E. & Nassis, G. Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 2011; 14: 424-434.
 18. Schipper, R., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral biology* 2007; 53: 1114-1135.
 19. Lima, D. et al. Saliva reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases* 2010; 14: 184-188.
 20. Korte, D. & Kinney, J. Personalized medicine: an update of salivary biomarkers for periodontal diseases. *Periodontology 2000* 2016; 70: 26-37.
 21. Salminen et al. Quantitative PCR analysis of salivary pathogen burden in periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2015; 5 (69).
 22. Podzimek, S. et al. Salivary Markers for Periodontal and General Diseases. *Disease Markers* 2016; 1-8.
 23. Falotico G, Farias F. El surco gingival aspectos clínicos y anatomofisiomicrobiológicos. *Odous Cient.* 2006; 2(2):16-26.
 24. Liébana J. Microbiología Oral. Microbiología Periodontal. Madrid: Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill, 2002.
 25. Negroni M. Microbiología Estomatológica. Argentina: Ed. Panamericana, 1999.
 26. Beck JD, Offenbacher S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: A state of the science review. *Ann Periodontol.* 2001; 6 (1): 9-15.
 27. Dorn BR, Dunn WA, Progulske-Fox A. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun.* 1999; 67(11): 5792-5798.

28. Faria R, Belén A, Bascones A. Nuevos métodos de diagnóstico en Periodoncia. Métodos bioquímicos. *Av Periodon Implantol*. 2001; 13 (1): 29-37.
29. Saavedra, J.; Domínguez A. *Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular, 2 edicio; McGraw-Hill: New York, Estados Unidos, 2014.* [en-línea]<http://accessmedicina.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=1506§ionid=98183011>.
30. Villalva A. S Fortoul, G. *Histología y biología celular, 3 edicion; McGraw-Hill: New York, Estados Unidos.* [en-línea] <http://accessmedicina.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=1995§ionid=150300943>. Accessed julio 27, 2017.
31. Mescher, A. L. Junqueira's Basic Histology, 14 edicion; McGraw-Hill: New York, Estados Unidos. [en línea]<http://accessmedicina.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=1687§ionid=109633181>.
32. Lamas J. Fisiología de los granulocitos. In: Fernández-Tresguerres JA, Ruiz C, Cachofeiro V, Cardinali DP, Escriche E, Gil-Loyzaga PE, Juliá V, Teruel F, Pardo M, Menéndez J. eds. *Fisiología humana, 4e* New York, NY: McGraw-Hill; <http://accessmedicina.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=1858§ionid=134364698>. Accessed julio 27; 2017.
33. Fox, S. Access Medicine: Sistema inmunitario [Internet] New York, 14va edición. [Citado 2017, Julio 28] Disponible en: <http://accessmedicina.mhmedical.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/content.aspx?bookid=2163§ionid=162711327>.
34. Saini R, Saini S, Sharma S. Oral biopsy: a dental gawk. *J Surg tech Case Rep* 2010; 2:93.
35. Lomba KB, de Souza Breves Meiler TC, Sete MC, Pires FR, da Silva Figueredo CM. Use of minimally invasive gingival biopsies in the study of inflammatory expression and their correlation with gingival fluid in patients with chronic periodontitis. *Indian J Dent Res* 2015; 26: 126-30.

36. Tsuruda K, Shimazu A, Sugai M. Detection of a single bacterial cell using a 16S ribosomal RNA-specific oligonucleotide probe designed to investigate periodontal pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 133-140.
37. Carroll CK, Hobden AJ, Miller S, Morse AS, Mietzner AT, Detrick B, Mitchell GT, McKerrow HJ, Sakanari AJ. Principles of Diagnostic Medical Microbiology. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 27e. China: McGraw-Hill Education 2016.
38. Choi YS, Kim YC, Baek KJ, Choi Y. In situ detection of bacteria within Paraffin-embedded Tissues Using a Digoxin-labeled DNA Probe Targeting 16S rRNA. *J. Vis. Exp.* (99).
39. Popova C, Dosseva P, Panov V. Microbiology og Periodontal Diseases. A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2013; 27 (3), 3754-3759.
40. Rojas G & Murillo G. Determinación de Parámetros Inmunológicos Celulares y Humorales Relacionados con la Enfermedad Periodontal. *Internacional Journal Of Dental Sciences* 2008.
41. López M, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromas gingivalis* en relación a las periodontitis agresivas. *Rev. Estomatol Herediana* 2005; 15 (2), 178-183.
42. Sweier D, Shelburne S, Giannobile W, Kinney J, Lopatin D, Shelburne C. Immunoglobulin G (IgG) Class, but Not IgA or IgM, Antibodies to Peptides of the *Porphyromonas gingivalis* Chaperone HtpG Predict Health in Subjects with Periodontitis by a Fluorescence Enzyme-Linked Immunosorbent Assay . *Clinical and Vaccine Immunology.* 2009; 16(12): 1766-1773. doi:10.1128/CVI.00272-09.
43. Díaz Z, Yáñez F, Melgar R, Álvarez R, Rojas L, Vernal A. Virulence and variability on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their association to periodontitis. *Rev. Cli. de Periodoncia, Implantol. Rehabil. Oral,* 2012; 5 (1), 40-45.
44. Bascones A, González M, Mecanismos inmunológicos de las enfermedades periodontales y preimplantarias. *Avances en Periodoncia [Internet].* 2003 Dic [citado 2017 Sep 12]; 15(3): 121-138. Disponible en:

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-658520030003000003&lng=es.

45. Bastías O, Sidgman G, Rodríguez M. laboratorio de Inmunología en la Práctica Clínica. Rev. Méd. Cli. Las Condes. 2015; 26 (6), 764-775.
46. Bravo C, García L, Bonilla F. Niveles de Inmunoglobulina G en saliva como marcador biológico de la enfermedad periodontal. Odontol. Sanmarquina. 2008; 11 (2): 42-46.
47. Thanakun S, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Gokyu M, Kobayashi H, Izumi Y. Inverse Association of Plasma IgG Antibody to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and High C-Reactive Protein Levels in Patients with Metabolic Syndrome and Periodontitis. Yilmaz Ö, ed. *PLoS ONE*. 2016; 11(2):e0148638. doi:10.1371/journal.pone.0148638.
48. Bermúdez J, Romero Q, Aguilar M, Ramos P, Galván V, Ayala L et al. Detección de anticuerpos séricos IgG, IgM e IgA de pacientes con Enfermedad Periodontal. Rev. Iberoamericana de Ciencias. 2016; 3 (4), 60-67.
49. Gutiérrez P. Fundamentos de Ciencias Básicas Aplicadas a la Odontología. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana; 2006.

5.4 Anexos

Anexo 1: Fórmula de consentimiento informado



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
Teléfonos: (506) 2511-4201 Telefax: (506) 2224-9367

Facultad de Odontología

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Para ser sujeto de investigación)

(Comparación del contenido bacteriológico y viral en la saliva y el fluido crevicular de pacientes periodontalmente comprometidos y la condición clínica)

Código (o número) de proyecto: 157

Nombre del Investigador Principal: Dra. Gisella Rojas González

Nombre del participante: _____

- A. **PROPÓSITO DEL PROYECTO:** El programa Macro de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, está realizando un estudio para conocer los microorganismos presentes en la saliva y en el líquido crevicular (líquido de las encías), en pacientes con enfermedad periodontal (enfermedad de las encías) y en pacientes sanos, para saber si el contenido es semejante o no, y ver la correlación que tiene con el cuadro clínico. Este estudio es importante porque determinará si es lo mismo hacer estudios de investigación obteniendo muestras de fluido crevicular y saliva o no. Esto permitirá aclarar cual muestra es más representativa para utilizarla en un futuro cercano en estudios epidemiológicos a nivel nacional. El estudio se espera realizar en dos años.
- B. **¿QUÉ SE HARÁ?:** Si usted participa de la investigación, además de los requerimientos que debe cumplir en la Clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología, aceptará que se obtenga una muestra del líquido que sale por la encía con puntas de papel, y aceptará que se obtengan dos muestras de saliva. Si por la condición clínica que usted presenta, requiere como parte del tratamiento periodontal que se le realice cirugía, se recogerá una muestra de encía de la que se debe desechar en el tratamiento quirúrgico.
- C. **RIESGOS:**
1. La participación en este estudio puede generar un bajo riesgo o molestia para usted por lo siguiente: al obtener las muestras del líquido de las encías se puede producir inflamación y dolor leve. Puede no gustarle el sabor del suero oral con el que se realizará el enjuague.
 2. Si sufriera algún daño como consecuencia de los procedimientos a que será sometido para la realización de este estudio, los investigadores participantes realizarán una referencia al profesional apropiado para que se le brinde el tratamiento necesario para su total recuperación.

Comité Ético Científico _____
Universidad de Costa Rica



- D. **BENEFICIOS:** Como resultado de su participación en este estudio, el beneficio que obtendrá será conocer que tipo de bacterias y eventualmente virus están presentes en su organismo y están produciendo alteraciones a nivel periodontal. Adicionalmente, como resultado de su participación en este estudio, los investigadores aprendan más acerca de los microorganismos que producen enfermedad periodontal y este conocimiento beneficie a otras personas en el futuro.
- E. Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con la Dra. Gisella Rojas González o con alguno de los investigadores sobre este estudio y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a la Dra. Rojas al teléfono 25115439 de lunes a viernes de 8 a 3 p.m. Además, puedo consultar sobre los derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación a la Dirección de Regulación de Salud del Ministerio de Salud, al teléfono 22-57-20-90, de lunes a viernes de 8 a.m. a 4 p.m. Cualquier consulta adicional puede comunicarse a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a los teléfonos 2511-4201 ó 2511-5839, de lunes a viernes de 8 a.m. a 5 p.m.
- F. Recibirá una copia de esta fórmula firmada para mi uso personal.
- G. Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiere.
- H. Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de una manera anónima.
- I. No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.
- J. Las muestras obtenidas para esta investigación podrían transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).



Comité Ético Científico
Universidad de Costa Rica

CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio

Nombre, cédula y firma del sujeto (niños mayores de 12 años y adultos) fecha

Nombre, cédula y firma del testigo fecha

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento fecha

NUEVA VERSIÓN FCI – APROBADO EN SESION DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO (CEC) NO. 149 REALIZADA EL 4 DE JUNIO DE 2008.
CELM-Consentimiento informado saliva fluidocrev 2017 2018 (1).odt

Comité Ético Científico _____
Universidad de Costa Rica

