



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Susceptibilidad del ratón CD1 et/et que desarrolla espontáneamente exocrinopatía, a la infección con *Porphyromonas gingivalis*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

TORRES MORENO MIREYA

Director: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor: Dr. Eduardo Llamosas Hernández

TESIS APOYADA POR PROYECTO PAPIIME PE201307

México D. F. 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mi madre Lucía Moreno, mis hermanos Marco Antonio y Miriam, sin olvidar a David, y a mis tíos Alejandra y Juan:

Porque gracias a su apoyo he podido alcanzar lo deseado, por alentarme a poner todo mi empeño para seguir adelante, enseñarme a sobreponerme de las dificultades, y seguir mi camino a pesar de cansancio, el miedo y la duda. Porque gracias a ellos descubrí la satisfacción de una labor llevada a su término y entender que es mejor vivir los sueños y no conformarme tan solo con soñar la vida.

A mis amigos y compañeros que compartieron conmigo la experiencia de convertirse en un QFB: Nelly, Paulina, Mariana, Laura, Chairel, Julio y Manuel,

Porque en el camino de nuestras ilusiones hubo obstáculos, dificultades, lágrimas, decepciones y hasta fracasos, pero nunca nos dejamos vencer. Porque crecimos en nuestros acuerdos y diferencias, para al final entender lo importante que es el prepararse y perseverar para triunfar.

Agradecimientos

A México y a la UNAM

Por ser parte importante de mi identidad, y por el orgullo de pertenecer a ellos, por mostrarme que es preciso avivar en la mente el anhelo de descubrir nuevos horizontes, y en el espíritu, el afán de superación, que me permita el elevarme constantemente sobre mis propios méritos y posibilidades, y tener la obligación de ser hoy mejor que ayer.

Así mismo agradezco al programa de becas, que me ayudó a solventar los gastos durante todo el curso de mi carrera, y al programa de becas de titulación para exalumnos de alto rendimiento que contribuyó al desarrollo e impresión de esta tesis.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Que el esfuerzo de hoy, se convierta en la realidad del mañana. Porque llevo a la UNAM en el alma pero a Zaragoza en el corazón.

A mi director de tesis Dr. Rubén Marroquín Segura.

En forma especial por su guía y consejo en la elaboración de este trabajo. Por transmitirme parte de sus conocimientos y la paciencia con la cual dirigió esta investigación.

A mi asesor de tesis Dr. Eduardo Llamosas Hernández

Porque sin su ayuda no hubiera sido posible la elaboración de este trabajo. Por mostrarme lo importante de involucrarnos en otras disciplinas para ser cada día mejor.

A mi sinodal Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Por brindarme parte de su tiempo, y mostrarme que la estadística es indispensable y a la vez, puede llegar a ser divertida.

A mis sinodales Q.F.B Francisco Parada García y Dr. Arturo Valle Mendiola

Por sus acertadas observaciones para mejorar y concluir este trabajo.

A los profesores del laboratorio de inmunología M.C. Yolanda Flores Cabrera y M.C. Maurilio Flores Pimentel.

Porque siempre tienen un buen consejo que dar.

A la encargada del bioterio MVZ. Adriana Altamirano Bautista y el personal a su cargo.

Por las facilidades que nos brindaron en cuanto al acceso al bioterio, sus conocimientos y accesibilidad para resolver problemas y dudas.

A mis compañeros del laboratorio de inmunología: Brenda, Blanca, Mariana, Laura, Areli y Jacobo.

Por su amistad, y ayuda en el trabajo de laboratorio.

La química biológica descubre todos los secretos, desarrollos y fenómenos de la vida, prepara las quintaescencias para construir, reconstruir o destruir la arquitectura animal.

Anónimo

Tabla de contenido

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Marco teórico	3
2.1. Síndrome de Sjögren	3
2.1.1. Características clínicas	3
2.1.1.1. Manifestaciones glandulares	4
2.1.1.2. Manifestaciones extraglandulares	4
2.1.2. Patogenia inmunitaria	5
2.2. Mecanismos inmunológicos de lesión celular y tisular involucrados en las enfermedades autoinmunes.	6
2.2.1. Clasificación de los mecanismos inmunopatológicos	6
2.2.2. Mecanismos involucrados en el desarrollo de la hipersensibilidad.	7
2.2.3. Elementos que intervienen en la respuesta inflamatoria	8
2.2.3.1. Proteínas de fase aguda	9
2.2.3.2. Óxido nítrico	9
2.3. Enfermedad periodontal	11
2.3.1. Características del periodonto sano	11
2.3.2. Biota asociada al periodonto	11
2.3.3. Sistema inmune de la cavidad bucal.	12
2.3.4. Placa bacteriana	13
2.3.5. Clasificación de las enfermedades periodontales	14
2.3.6. Patología inmunitaria de la periodontitis	15
2.3.7. Mecanismos de destrucción celular en la periodontitis	17
2.3.8. Signos y síntomas de la periodontitis	19
2.4. <i>Porphyromonas gingivalis</i> como organismo periodontopatogénico.	21
2.4.1. Características generales	21
2.4.2. Factores de virulencia	22
2.5. Técnicas inmunológicas	25
2.5.1. ELISA polimixina	25
2.5.2. Inmunodifusión radial	25
2.6. Modelo experimental.	26

3. Planteamiento del problema	27
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	29
6. Diseño de la investigación	30
7. Diagrama de flujo	31
8. Material	32
8.1. Reactivos	32
8.2. Equipo	33
8.3. Instrumentos	33
8.4. Material biológico	33
8.5. Material	34
9. Métodos	35
9.1. Sacrificio de los animales	35
9.2. Obtención de órganos y suero de ratón	35
9.3. Índice de órganos	35
9.4. Determinación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial	35
9.5. Determinación de nitritos por el método de Griess	36
9.6. Determinación de LPS por el método de ELISA polimixina B	37
9.7. Evaluación de la pérdida del hueso alveolar.	38
9.8. Diseño estadístico	39
10. Resultados	40
11. Discusión de resultados	45
12. Conclusiones	47
13. Glosario	49
14. Referencias	53

Resumen

En este trabajo se estudió la susceptibilidad de los ratones mutantes desnudos de la cepa *et/et*, los *et/+* (heterocigotos) y los progenitores *+/+* a desarrollar un cuadro de periodontitis debido a la infección de *Porphyromonas gingivalis*. La susceptibilidad se determinó mediante el análisis de 5 parámetros: índice de órganos, índice periodontal (IP), determinación de nitritos (por el método de Griess), ceruloplasmina en sangre (por la técnica de inmunodifusión) y la identificación del LPS de *P. gingivalis* en saliva (mediante la técnica de ELISA ligada a polimixina). Los resultados mostraron que en los índices esplénico y hepático, no existen diferencias entre las cepas ($P > 0.05$), el valor del índice renal fue mayor en los ratones *et/et* respecto a los *+/+* ($P < 0.05$) y sin diferencia respecto a los *et/+*. En la cuantificación de ceruloplasmina y nitritos, no se encontraron diferencias entre los grupos de animales ($P > 0.05$). Los ratones *et/et* mostraron una media de IP menor a las de los ratones *et/+* y *+/+* (0.4318 vs 1.2273 y 1.3 respectivamente), $P < 0.05$. Cuando se realizó la determinación del LPS de *P. gingivalis* no se encontró asociación con el daño en el hueso alveolar calculado por el índice periodontal, $P > 0.05$. Al observar las mandíbulas de los ratones *et/et*, *et/+* y *+/+*, se encontró que los *et/+* y los *+/+* presentaron recesión marcada del hueso alveolar con exposición de las raíces dentales y pérdida de piezas, mientras que en los animales *et/et*, la recesión del hueso fue mínima o moderada sin pérdida dental. Por lo tanto, se concluye que los ratones *et/et* son menos susceptibles a la periodontitis causada por *P. gingivalis*.

1. Introducción.

El síndrome de Sjögren (SS), es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por infiltración linfocítica de las glándulas exocrinas que produce los clásicos síntomas de ojos y boca seca. Las glándulas salivales y la saliva son parte del sistema inmune de la mucosa oral, las células plasmáticas que están en las glándulas salivales producen IgA, además las glándulas en sí producen otras moléculas antimicrobianas tales como lisozima, lactoferrina, y peroxidasas, por lo tanto, un paciente con ausencia parcial o completa de saliva tiene un alto riesgo de tener problemas orales serios.

La falta de saliva predispone a los pacientes con SS al rápido desarrollo de lesiones cariosas a pesar de una buena higiene oral, así mismo puede verse afectada la colonización de la placa bacteriana y puede contribuir a generar enfermedad periodontal, aunque algunos estudios sugieren que el SS no incrementa el riesgo de desarrollar periodontitis. La periodontitis involucra procesos que comprometen todas las estructuras del periodonto. Se tratan de procesos destructivos con pérdida de hueso y ligamento periodontal. El proceso de la enfermedad periodontal está dado por etapas, en la etapa de colonización, el sistema inmune mantiene controlada la biota; en la etapa de invasión, la respuesta del eje leucocito-polimorfonuclear-anticuerpo-complemento controla la infección, persistiendo la inflamación; en la etapa destructiva, los antígenos no controlados estimulan la respuesta de macrófagos y linfocitos con sus consiguientes citocinas, para llevar al daño tisular. En la periodontitis, hay un aumento en el total de la carga microbiana en la placa y una fuerte asociación con la presencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola*. De estos microorganismos los tres primeros tienen relevancia por ser los agentes de la enfermedad periodontal más frecuentes en adultos.

P. gingivalis es uno de los microorganismos reconocidos como causantes de infecciones de tipo exógeno al no ser parte de la biota. Se localiza en el surco gingival especialmente cuando no existe una buena salud periodontal. Su patogenicidad está relacionada con varios factores de virulencia. Estos factores incluyen fimbrias, LPS, la presencia de cápsula, enzimas que alteran los mecanismos defensivos del hospedero y enzimas asociadas con la destrucción tisular. Numerosos modelos animales han sido estudiados para comprender la interacción entre *P. gingivalis* y el huésped, los más usados son los roedores. El ratón desnudo et/et fue observado por primera vez en 1985 en una colonia cerrada no consanguínea de ratones albinos CD1 en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones et/et presentan baja fertilidad, mortalidad alta, lesiones en ojos y susceptibilidad a problemas cutáneos como abscesos, dermatitis bacteriana y dermatomycosis y desarrollan una exocrinopatía inflamatoria que asemeja a los pacientes con SS.

Un aspecto importante al usar un modelo animal es que este simule la patogénesis de la infección lo más cercano al proceso en humanos, por lo tanto, en este estudio lo que se pretende es determinar el grado de daño ocasionado por la infección de *P. gingivalis* en el periodonto utilizando ratones desnudos CD1 et/et. Los resultados obtenidos podrán definir si el ratón CD1 et/et puede ser ocupado como modelo animal para la investigación de enfermedades periodontales en pacientes que sufran el SS.

2. Marco teórico

2.1. Síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune de causa desconocida, que se caracteriza por infiltración de linfocitos en glándulas lagrimales y salivales, ello origina xerostomía (sequedad oral) y queratoconjuntivitis seca. En la mitad de los sujetos ésta se presenta como una identidad patológica primaria, en la otra mitad se presenta acompañada de artritis reumatoide o enfermedad conectiva tisular ¹.

La enfermedad afecta fundamentalmente a mujeres de mediana edad (proporción mujer-varón de 9:1), con una edad comprometida entre 35 y 60 años, aunque puede observarse en todas las edades. La prevalencia del SS primario es, aproximadamente, de 0.5 a 1.0%. Además del síndrome primario, 30% de los pacientes con enfermedad reumática de origen inmunitario presenta un SS secundario. La etiología del SS es desconocida, actualmente se piensa que es consecuencia de la interacción de algún factor ambiental con factores constitucionales determinados genéticamente, esto provoca una respuesta inmune alterada que se perpetúa por diversos mecanismos y que produce por consiguiente la destrucción del tejido afectado ^{2,3,4}.

2.1.1. Características clínicas

El SS se ha caracterizado por ser una patología que para la mayoría de los clínicos representa un reto y un problema al mismo tiempo, ya que su baja mortalidad e incidencia no despierta mayores contribuciones en su investigación ². En los primeros estadios de la enfermedad, los síntomas se pueden presentar de forma aguda o subaguda, generalmente iniciando con una leve xerostomía y xeroftalmia que pueden pasar desapercibidas durante un largo curso de la enfermedad en la que aún no se ha perdido la mitad de las glándulas secretoras y por lo tanto es necesario utilizar algunas pruebas de laboratorio para poder detectarla. A medida que la enfermedad evoluciona, es frecuente encontrar otros tipos de xerosis exocrinas, que producen sequedad de algunas mucosas como vagina, piel, nariz, etc ¹. También pueden presentarse manifestaciones de invasión linfocitaria en otros órganos como pulmones y riñones (cuadro 1)

Cuadro 1. Signos y síntomas de los pacientes con SS

Bucal	Sequedad, molestia quemante y dificultad para deglutir. Flujo salival por debajo del normal 5mL /10min/glándula Poliuria y nicturia Lengua con fisuras y úlceras. Presencia de caries dental graves
Ocular	Queratoconjuntivitis seca, prurito y disminución del lagrimeo. Fotofobia, dolor y sensación de ojos “terrosos”
Otros	La sequedad de nariz, orofaringe, laringe y árbol bronquial puede originar epistaxis, disfonía, otitis media traqueobronquitis y neumonía. El 10% de los individuos tiene infiltrados linfocitarios extraglandulares, en particular en riñones, pulmones ganglios linfáticos y músculo.

Adaptado de Stites D, Terr A, Parslow T. Inmunología básica y clínica. 9ª ed. México: El Manual moderno; 2000.

El curso de la enfermedad es muy variado, es común encontrar casos de años de evolución, que por su baja sintomatología no han sido diagnosticados y otros donde la evolución es rápida, la variación depende del tipo de paciente y a la posible entidad asociada. Para poder realizar un estudio completo y detallado de las manifestaciones que se presentan en el síndrome de Sjögren, es necesario dividir las en dos tipos: glandulares y extraglandulares^{5,6}.

2.1.1.1. Manifestaciones glandulares

Sequedad ocular o queratoconjuntivitis seca. La principal causa de esta deficiencia es la atrofia y fibrosis del tejido lagrimal como resultado de un proceso de infiltración destructiva ocasionada por células mononucleares. Los síntomas más frecuentes del paciente son la irritación y sequedad ocular, acompañada de sensación de cuerpo extraño y escozor. En ocasiones se presenta con visión borrosa momentánea y dolor.

Sequedad oral o xerostomía. Histológicamente existe un infiltrado linfocítico en las glándulas salivales. La mucosa bucal es seca y eritematosa, la lengua tiene fisuras y se ulcera. A menudo hay caries dentales graves. La mitad de los pacientes tienen crecimiento intermitente de la glándula parótida con fluctuaciones rápidas de su tamaño, debido a infiltración celular y obstrucción de los conductos. Este aumento de tamaño, que por lo general es asintomático y puede resolverse espontáneamente, tiene origen inmunológico. Las glándulas más afectadas son las parótidas y las menos, las sublinguales. Existe un signo característico llamado el “signo de la galleta seca”, que describe la dificultad que tiene el paciente al intentar comer alimentos secos a falta de lubricación suficiente. Desarrollan poliuria y nicturia porque el sujeto ingiere cantidades mayores de agua en un esfuerzo por aliviar sus síntomas. La glositis y queilitis angular son manifestaciones de candidiasis bucal en el SS.

2.1.1.2. Manifestaciones extraglandulares

Sequedad dérmica o xerodermia. La xerodermia con o sin prurito, suele ser un signo frecuente en pacientes con SS. Puede haber infecciones secundarias y un tercio de los pacientes refieren fenómeno de Reynaud no evolutivo con carcinoma ocasional. Otras manifestaciones clínicas posibles son la alopecia, fotoalergias, urticaria difusa, que predomina en extremidades inferiores y puede acompañarse de lesiones petequiales, semejando la vasculitis urticariforme y eritemas diversos (multiformes, anulares, etc.) que se parecen a los observados en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y dificultan el diagnóstico.

Manifestaciones pleuropulmonares. La xerotraquea, infecciones recurrentes o la enfermedad obstructiva crónica son las alteraciones de las vías aéreas. Los pacientes con SS primario no refieren mayor sintomatología a nivel respiratorio. La resequedad afecta la mucosa nasal, lo que conduce a epistaxis recurrente, anosmia, tos y disfonía. Otras manifestaciones excepcionales son la vasculitis pulmonar, hipertensión arterial pulmonar, pleuropatía con o sin derrame, pseudolinfoma endobronquial, amiloidosis, etc.

Manifestaciones gastrointestinales. El esófago puede presentar disfagias con atrofia de mucosas y dismotilidad. Hay queilitis angular y se pierde la capacidad de reconocer y degustar los

alimentos con base en su sabor y olor. Las formas graves ocasionan al paciente la imposibilidad de comer y de hablar o dolor al hacerlo. Pueden presentarse ulceraciones a nivel de las mucosas, estomatitis infecciosas, gastritis atróficas y en intestino y páncreas, malabsorción o pancreatitis agudas o crónicas. A nivel hepático se pueden encontrar hepatitis autoinmunes, cirrosis biliar primaria (CBP) y fibrosis portal.

Manifestaciones articulares y musculares. La artralgia o artritis, tiene una alta repercusión en los pacientes con SS primario y unida a las mialgias, afectan un 75 % del total de pacientes enfermos. La artralgia consiste en una artritis poliarticular, con mayor frecuencia en rodillas.

Manifestaciones genito-urinarias. Un bajo porcentaje de pacientes presenta sequedad y prurito vaginal, acompañado de colpitis, dispareunia y polaquiuria. A nivel renal, un 10% de pacientes con SS tienen manifestaciones nefrológicas, seguido de elevación en el pH de la orina, hipopotasemia o hipercloremia, que caracterizan a la acidosis tubular distal. Estas manifestaciones se encuentran relacionadas con infiltraciones linfocitarias intersticiales del riñón que conducen a la atrofia tubular, fibrosis y, por supuesto, insuficiencia renal.

Manifestaciones Neurológicas. Las manifestaciones de esos pacientes se caracterizan por déficit motor o sensitivo. Presentan encefalopatía aguda y subaguda, meningitis asépticas (con frecuencia recurrentes), demencia y alteraciones cognoscitivas (fallos de memoria y demencia multiinfarto), y alteraciones psiquiátricas. Las hemorragias subaracnoideas e intracerebrales son frecuentes en los pacientes que cursan con vasculitis y anticuerpos anti-Ro y anti-La. El líquido cefalorraquídeo suele tener proteínas normales o ligeramente elevadas, aumento de las IgG con pleocitosis mononuclear. En estos pacientes es frecuente ver el factor reumatoide, anticuerpos Anti Ro/La, y anticuerpos a fosfolípidos y crioglobulinas ^{4, 5, 6, 7}.

2.1.2. Patogenia inmunitaria

El síndrome de Sjögren se caracteriza por la existencia de un proceso inflamatorio constituido principalmente por linfocitos T CD4 activados que destruyen progresivamente las glándulas exocrinas, con pérdida del parénquima glandular y la consiguiente disminución de la función de la glándula, también pueden hallarse linfocitos B activados. Los pacientes con SS desarrollan anticuerpos característicos, que incluyen anti-Ro/SSA y anti-La/SSB, estos autoanticuerpos están fuertemente asociados a las formas severas del SS.

La etiología del SS es desconocida, pero todo proceso autoinmune requiere de la coincidencia de al menos cuatro factores: la predisposición genética, factores inductores (microorganismos, fármacos o radiaciones), factores hormonales y los factores psiconeuroinmunológicos como el estrés. Entre los mecanismos implicados en la respuesta inmune alterada de estos pacientes se han propuesto tres líneas principales: anomalías en la regulación linfocitaria periférica y en la selección del repertorio de células T, alteraciones en la proliferación de células B y, finalmente, la expresión de autoantígenos.

Los mecanismos inmunes mediados por células posiblemente desempeñan una función central en la inflamación que lleva al daño tisular en el síndrome de Sjögren. Las células T CD4 predominan en los infiltrados, tales células son tipo T_H1 activadas con base en la presencia de interleucina 2 (IL-2) e interferon γ (IFN γ) y la ausencia de interleucina 4 (IL-4). Las células

epiteliales de las glándulas salivales de los pacientes con SS expresan moléculas HLA clase II (Antígeno Leucocitario Humano, término que se utiliza como sinónimo para referirse a las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad o MHC humano) y moléculas B7 (proteínas coestimuladoras de las células T cooperadoras, lo cual sugiere que su función pudiera ser presentar antígenos a las células T CD4; no obstante, se desconoce la especificidad antigénica de las células T intralesionales. Se dispone de evidencia que sugiere la implicación inmunopatogénica de anomalías de las células B y células plasmáticas, aún cuando estas células son menos abundantes que las células T, también se encuentran en los infiltrados glandulares.

Aún no se sabe si la presencia de anticuerpos anti-Ro y anti-La contribuye a la inflamación específica de órgano (glándulas salivales y lagrimales únicamente) en el SS y, en caso de ser así, cómo es que logran hacerlo ^{1, 5, 8, 9}.

2.2.Mecanismos inmunológicos de lesión celular y tisular que se involucran en las enfermedades autoinmunes

La capacidad de la respuesta inmune, o mejor aún, de sus efectores humorales y celulares, para producir lesiones en el organismo en que se desarrolla, se conoce desde principios del siglo XX. Quizá el primero en observar una reacción nociva, en vez de protectora, fue Koch en 1890, cuando describió la respuesta inflamatoria local a la inyección de bacilos tuberculosos en animales previamente inoculados con los mismos gérmenes. En la actualidad la lista de enfermedades en que se puede relacionar la participación de una respuesta inmunológica nociva es prácticamente interminable. Las enfermedades autoinmunes se clasifican dependiendo si la respuesta está dirigida principalmente frente a antígenos localizados en un tejido específico o frente a antígenos sistémicos, en órgano-específicas y no órgano-específicas respectivamente. El SS, al igual que la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico se consideran no órgano-específicas. Esta clasificación, no tiene en cuenta la causa o los mecanismos inmunológicos que han producido la enfermedad. Estos mecanismos no difieren de los que se activan en respuesta a un patógeno o en el caso de una alergia. Por ello, las enfermedades alérgicas y autoinmunes pueden clasificarse en función del mecanismo inmunopatológico que genere el daño tisular ^{1, 10, 11}.

2.2.1. Clasificación de los mecanismos inmunopatológicos.

Se han propuesto diversas maneras de clasificar a los mecanismos inmunopatológicos, aquí se retoma la propuesta de Perez-Tamayo, Larralde y Kretschmer:

A. Humorales

1. Inactivación o estimulación
 - a) Hormonas
 - b) Enzimas
 - c) Receptores
 - d) Proteínas nucleares
2. Liberación de mediadores químicos
 - a) Anafilaxia generalizada
 - b) Anafilaxia localizada

3. Efecto citotóxico
 - a) Elementos formes de la sangre
 - b) Células endoteliales
 - c) Otras células
4. Depósito de complejos inmunes
 - a) Con leucocitos polimorfonucleares
 - b) Sin leucocitos polimorfonucleares

B. Celulares

1. Acción citotóxica
2. Citotoxicidad mediada por anticuerpos
3. Citocinas
4. Macrófagos citotóxicos

C. Mecanismos combinados humorales y celulares ^{10, 11}.

2.2.2. Mecanismos involucrados en el desarrollo de la hipersensibilidad.

Los procesos inmunitarios son utilizados por el organismo para defenderse de las agresiones por agentes infecciosos. En ciertos casos los individuos montan una respuesta adaptativa (inadecuada o excesiva) frente a algunos procesos infecciosos o sustancias extrañas, de manera que se pueden generar diversos tipos de daño tisular, estas reacciones suelen denominarse hipersensibilidad o alergias ^{1, 10}. Gell y Coombs en 1963 implementaron un sistema de clasificación de las reacciones de hipersensibilidad las cuales pueden distinguirse por el tipo de inmunorreacción y por diferencias en las moléculas efectoras generadas durante la evolución del fenómeno ^{10, 12, 13}. Este sistema clasifica a las reacciones de hipersensibilidad en cuatro tipos:

Hipersensibilidad de tipo I, también llamada anafilaxia, es mediada por anticuerpos citotrópicos. Este tipo de reacción es prácticamente inmediata. Son consecuencia de la existencia de anticuerpos tipo IgE específicos contra el antígeno que se une a las células cebadas. Las consecuencias de esta unión es la degranulación de la célula cebada y la liberación de sustancias vasoactivas como la histamina y leucotrienos (LTB₄) que median la reacción inflamatoria. Se ha sugerido que las reacciones de tipo I pueden ocurrir en los tejidos periodontales. La encía contiene un gran número de células cebadas, las cuales parecen degranularse durante un proceso inflamatorio. Así mismo se han detectado células plasmáticas productoras de IgE, y es posible que los antígenos derivados de la placa puedan lograr penetrar el tejido conectivo dando como resultado una reacción inflamatoria en respuesta a la acumulación de la placa.

Hipersensibilidad de tipo II o citotoxicidad anticuerpo dependiente. Son reacciones mediadas por la interacción de antígenos presentes en la superficie de diferentes células con anticuerpos de tipo IgM e IgG contra el tejido en cuestión. Se caracteriza porque el anticuerpo hace de puente entre un epítopo antigénico localizado en una célula blanco a través de su paratope, y un linfocito citotóxico. La unión ocurre por fijación del fragmento Fc de la inmunoglobulina a un receptor Fc presente en la célula efectora. No se sabe si las reacciones de este tipo se presentan en la enfermedad periodontal. Se ha sugerido que el mecanismo de las reacciones de tipo II puede ser responsable de las alteraciones en los fibroblastos y las células plasmáticas en las diferentes etapas de la enfermedad.

Hipersensibilidad de tipo III. Son producidas por la existencia de complejos inmunes con anticuerpos IgG, fijadores de complemento que al depositarse causan reacciones inflamatorias. La activación de este sistema libera C3a y C5a con efecto quimiotáctico, por eso la iniciación de la reacción es más lenta que el tipo I y II, y requiere de 4 a 6 horas para llegar a su máxima intensidad. Las sustancias biológicamente activas y liberadas por la activación del complemento provocan una reacción inflamatoria de tal magnitud que se presenta trombosis y necrosis de vasos. La mayor parte del tejido dañado puede adjudicarse a la actividad de enzimas liberadas por neutrófilos.

Hipersensibilidad de tipo IV o retardada: el antígeno reacciona con linfocitos T CD4 o colaboradores, productores de citocinas como el IFN γ , que ocasiona un acumulo inicial de neutrófilos y luego de macrófagos en el sitio de lesión, la activación del infiltrado monocuclear rico en linfocitos T y monocito-macrófago causa el daño tisular. En algunas etapas, las enfermedades inflamatorias gingivales y periodontales presentan características típicas de reacciones de tipo IV. Los tres primeros tipos se desarrollan dentro de la rama humoral y son mediados por anticuerpo o complejos antígeno-anticuerpo. El cuarto tipo depende de las reacciones que ocurren dentro de la rama mediada por células. El futuro de la hipersensibilidad retardada depende de las interacciones entre el sistema inmune y el agente etiológico; si el sistema inmunitario controla y elimina la causa que origina la hipersensibilidad retardada, la inflamación desaparece. Los macrófagos eliminan los restos de desechos celulares y secretan una serie de citocinas como el factor β transformador del crecimiento (TGF β) que inducen la síntesis de proteínas de la matriz extracelular con lo que se produce el proceso de reparación tisular. Si el sistema inmune es incapaz de eliminar el agente etiológico, entonces intenta localizarlo e inactivarlo produciendo un granuloma. Por último, si el agente etiológico es superior al sistema inmunitario, se produce la invasión local y sistémica del organismo ^{1, 12, 13, 14, 15}.

2.2.3. Elementos que intervienen en la respuesta inflamatoria

Las respuestas inmunitarias, innatas o adquiridas, a menudo se acompañan de otro tipo de reacciones celulares fisiológicas o bioquímicas en el huésped. Muchas de éstas son defensas primitivas que se pueden movilizar con o sin activación inmunitaria. La inflamación se considera una reacción vascular, linfática y del tejido local muy compleja, observable en animales superiores por la presencia de microorganismos o de irritantes no viables. Algunos autores la definen como una reacción completa y multifacética del huésped al trauma ^{1, 11, 14}. Existen distintas vías inflamatorias, cada una controlada por una secuencia de eventos biológicos, controlados por citocinas u otras moléculas que reciben el nombre de mediadores inflamatorios. El resultado final de estos eventos puede ser benéfico, perjudicial o ambos. Las alergias y la hipersensibilidad son términos que se utilizan para describir reacciones inflamatorias dirigidas contra sustancias extrañas que normalmente serían inocuas. Las enfermedades autoinmunes tienen lugar en parte debido a la inflamación mediada inmunológicamente dirigida contra los propios tejidos ¹. Las reacciones que se suscitan durante la inflamación varían de acuerdo al tejido y tipo de trauma involucrado, estas reacciones están controladas por moléculas de señalización con capacidad de difusión, conocidas como mediadores inflamatorios, comprenden una gran variedad de moléculas que involucran proteínas, péptidos y compuestos orgánicos pequeños, cada uno con efectos biológicos únicos. Algunos llamados mediadores vasoactivos, actúan principalmente sobre la vasculatura, otros median el dolor, la fiebre, la coagulación o la quimiotaxis ^{13, 14, 16}.

2.2.3.1. Proteínas de fase aguda

Ciertas proteínas plasmáticas, denominadas en conjunto proteínas de fase activa, muestran un notable aumento de concentración en respuesta a mediadores como IL-1 derivada de macrófagos y liberada como consecuencia de infección o daño tisular. Estas proteínas son: proteína C reactiva (CRP), la proteína fijadora de manosa (MBP) y el componente P de amiloide sérico. Otras proteínas de fase aguda cuya concentración se ve alterada de forma moderada son: fibrinógeno, factor B, α_1 -antiquimiotripsina y la ceruloplasmina. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de las proteínas de fase aguda		
Reactante de fase aguda	Función	Nivel en plasma
Proteína C reactiva (CRP)	Fija complemento, opsoniza	100-1000 x
Proteína fijadora de manosa (MBP)	Fija complemento, opsoniza	↑ 100-1000 x
Componente P de amiloide sérico	Precursor de componente amiloide	↑ 100-1000 x
C3, C9, Factor B	Aumenta función del complemento	↑ 50 %
Fibrinógeno	Coagulación	↑ 2-4 x
Ceruloplasmina	Recolector de detritos•O ₂ -	↑ 50 %

Adaptado de: Roitt I. Inmunología fundamentos. 10ª ed. Buenos aires: Médica panamericana; 2003.

La ceruloplasmina es una α_2 globulina. Se sintetiza principalmente en los hepatocitos, también se encuentra en otros tipos celulares como los monocitos, astrocitos y células de Sertoly. La ceruloplasmina ayuda a transportar el cobre desde el hígado a los tejidos periféricos. Tiene la propiedad de actuar en la eliminación de radicales libres del oxígeno de forma no catalítica y estequiométrica y tiene actividad de superóxido dismutasa, protegiendo del daño tisular, además participa en la homeostasis del hierro, se le reconocen propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica y oxidantes frente a varias aminos. Entre sus principales características encontramos, peso molecular de 132 KDa, movilidad electroforética de 406 y un punto isoelectrico de 4.4^{13, 14, 17, 18, 19}.

2.2.3.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO), es un radical libre, potencialmente tóxico, que se puede difundir libremente a través de las membranas celulares. Es un potente vasodilatador formado por las células endoteliales, inicialmente fue denominado como factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Tiene una vida media de 3-50 segundos y su labilidad es debida a su rápida conversión de nitritos y nitratos por el oxígeno. El NO se sintetiza por acción de la NO-sintetasa (*NOS, del inglés nitric oxide synthase*) que actúa sobre la L-arginina. Se han descrito dos formas distintas de la enzima, una forma constitutiva y otra inducible.

La forma constitutiva de la NOS es calcio-calmodulina dependiente. Es la responsable del aumento del NO por el endotelio vascular, plaquetas, tejido nervioso, células mesangiales de la médula adrenal y de las células de la mácula densa. Se activa por aminoácidos excitatorios, por la

acetilcolina y calcio. La NOS constitutiva proporciona con rapidez unas cantidades relativamente pequeñas de óxido nítrico durante cortos periodos de tiempo.

La forma inducible no es dependiente de calcio-calmodulina, y produce una liberación de grandes cantidades de NO de forma prolongada por macrófagos, neutrófilos endotelio vascular y células microgliales. Los más importantes inductores de la forma inducible de la NOS son el LPS o endotoxinas, el Factor de necrosis tumoral α (TNF α), IL-1 y INF γ . Esta activación de la forma inducible por citocinas proinflamatorias implican el mecanismo por el cual el tono del NO se encuentra elevado en la reacción inflamatoria.

El NO ejerce sus acciones vasodilatadoras por difusión local desde las células endoteliales a las células del músculo liso vascular donde estimulan la guanilato-ciclasa y provoca un aumento de la formación de 3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), así como la relajación del músculo liso vascular, probablemente por alteración de la concentración de calcio intracelular. La interacción del NO con enzimas microbianas que contienen Fe-S puede ser la causa de su efecto bactericida. Otro mecanismo de citotoxicidad se debe a la nitrosilación de los ácidos nucleicos causando ruptura del ADN.

El NO provoca daño tisular debido a productos como el peroxinitrilo (ONOO-), generado por la interacción del NO con otras especies de oxígeno reactivo. El efecto fisiológico más importante del NO, es el de actuar como vasodilatador, esta propiedad y su capacidad de inducir a la COX-2 hacen que sea un importante mediador del proceso inflamatorio^{1, 14, 17}.

El NO puede ser cuantificado por métodos directos (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detectores electroquímicos, resonancia electrónica paramagnética, quimioluminiscencia) y por métodos indirectos (espectrometría de masas, espectrometría de UV-Vis, y métodos electrométricos), las concentraciones de éste en un organismo vivo se encuentran entre 10 nM a 1 μ M y su vida media en disolución acuosa (entre 3.8 a 6.2 s), reducen la aplicabilidad de estos métodos para la evaluación de muestras biológicas.

Las dificultades inherentes a la cuantificación del NO pueden ser reducidas cuantificando a sus metabolitos estables NO₂ y NO₃, pero en muestras plasmáticas, el NO es oxidado completamente a NO₃ el cual es estable durante varias horas. En contraste, el NO₂ es convertido rápidamente a NO₃ en la sangre mediante la oxidación de la hemoglobina por el NO₂ bajo condiciones aeróbicas mediante la transferencia de un electrón del NO₂ hacia la oxihemoglobina unida.

Se han reportado varias técnicas para la detección de los metabolitos estables del NO (NO₃ y NO₂), siendo la más utilizada la detección colorimétrica con reactivos de Griess. Esta reacción involucra la formación de un cromóforo mediante la diazoación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguido de una copulación con una amina bicíclica. Debido a que la reacción de Griess no detecta al anión NO₃, se ha propuesto la reducción de NO₃ a NO₂ con metales reductores tales como el cadmio, o bien, mediante métodos enzimáticos como la reducción con nitrato reductasa bacteriana^{20, 21}.

2.3. Enfermedad periodontal

2.3.1. Características del periodonto sano

El periodonto está formado por cuatro estructuras principales que dan soporte y proporcionan la inserción del diente al alveolo de los tejidos periodontales, además soportan las fuerzas generadas durante la masticación, fonación y la deglución (figura 1). Estas estructuras son 1) la encía, la cual es la parte de la mucosa bucal que recubre las apófisis óseas alveolares y rodea la porción cervical de los dientes; 2) ligamento periodontal, que es la estructura del tejido conectivo situada entre el cemento y la lámina dura alveolar; 3) cemento radicular, se trata de un tejido conectivo calcificado; y 4) hueso alveolar, que es la cavidad ósea en la que se aloja y sostiene el diente^{22,23}.

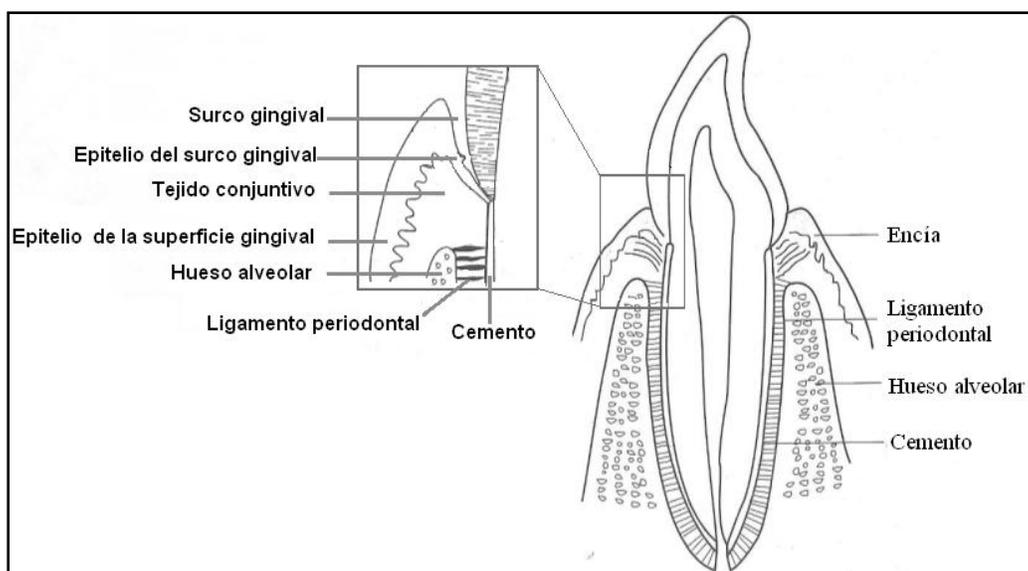


Fig. 1. Corte longitudinal del diente, se pueden observar todas las estructuras que componen el periodonto²²

2.3.2. Biota asociada al periodonto

La cavidad bucal es un ecosistema abierto y dinámico, expuesto a numerosos factores que condicionan las características y composición de la biota. La boca del recién nacido es estéril al momento del nacimiento, pero la colonización microbiana comienza pocas horas después del mismo. Conforme los días pasan la biota aumenta y cuando aparecen los primeros dientes, la placa bacteriana comienza a depositarse en ellos. El gram positivo *S. sanguis* es quizá el más prevalente, posteriormente hay colonización de anaerobios, como la *Veillonela*, *Actinomyces* y *Fusobacterium*^{23, 24, 25}.

La biota bucal es una de las que presenta mayor complejidad en el organismo, se han aislado entre 200 y 400 especies distintas en una misma cavidad bucal en el transcurso del tiempo; la mayor parte de estas son transitorias, de forma que solo unas 20 especies son residentes permanentes, y

solo se han identificado entre 30 y 40 especies causantes de enfermedad periodontal ²⁶. Algunos de los microorganismos que constituyen la biota, especialmente de carácter permanente son:

Cocos gram positivos: *Enterococcus sp*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, y los anaerobios *Peptostreptococcus spp.*, y *Peptococcus spp.*, que se aíslan ocasionalmente y en baja proporción, los *Streptococcus viridans* los más aislados (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *Streptococcus oralis*, y *Streptococcus mitis*)

Cocos gram negativos: diversas especies, aerobias del genero *Neisseria* (*N. sicca*, *N. flavescens*), anaerobias facultativas del género *Moraxella* y anaerobias estrictas del género *Veillonella* (*V. párvula*, *V. atypica*) y del género *Acidaminococcus*.

Bacilos gram positivos: destacan *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Bacilos gram negativos: encontramos especies pertenecientes al género *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Actinobacillus*, *Campylobacter* y *Haemophilus*.

Otros microorganismos: cabe destacar las espiroquetas comensales, hongos como *Candida albicans*, *Mycoplasma spp.*, y escasos protozoarios pertenecientes a especies de *Trichomonas tenax* y *Entamoeba gingivalis* ^{25, 27, 28}.

Algunas de estas especies bacterianas protegen o benefician al huésped, entre ellas *S. sanguis*, *Veillonella párvula* y *C. achracea*. Es característico que haya cantidades altas en áreas periodontales sin pérdida de inserción, pero bajas en sitios donde hay destrucción activa del periodonto. Dichas especies impiden la colonización o proliferación de los microorganismos patógenos, por ejemplo, la producción de H₂O₂ por *S. sanguis* inhibe el crecimiento de *A. actinimycetemcomitans* ²⁸.

2.3.3. Sistema inmune de la cavidad bucal

Los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal están bajo protección de factores inmunes específicos e inespecíficos. Topográficamente la protección específica de las piezas dentarias está dividida en dos sectores: uno de ellos es territorio de la inmunidad local secretora y corresponde al dominio salival. El segundo sector está protegido por la inmunidad sistémica (sérica) que ingresa como líquido crevicular; esta zona recibe el nombre de dominio gingival.

Las secreciones salivales son de naturaleza protectora porque conserva los tejidos bucales en un estado fisiológico. La saliva ejerce una gran influencia sobre la paca mediante la limpieza mecánica de las superficies bucales expuestas, la neutralización de los ácidos para conservar el pH fisiológico en la superficie de la célula epitelial de la mucosa y la superficie dental mediante el sistema bicarbonato-ácido carbónico, factores de la coagulación (factores VIII, IX, y X, precursor plasmático de tromboplastina y factor de Hageman) que aceleran la coagulación sanguínea y protegen las heridas, además de regular la actividad bacteriana

Los factores inmunes inespecíficos de la saliva, lisozima, sistema de lactoferrosidasa, lactoferrina y otras componentes que actúan como aglutininas bacterianas, carecen totalmente de memoria inmunológica y no están sujetos a estimulación específica. La única inmunoglobulina secretada es la IgA. Cuando alguna persona padece periodontitis o gingivitis, la inflamación se traducirá en una trasudación, de suero con proteínas que incluirá IgM, IgA sérica, factores de

complemento y fagocitos, este exudado recibe el nombre de líquido crevicular. Hasta ahora se han encontrada más de 40 elementos en el líquido crevicular (Cuadro 3), entre ellos, factores del complemento, citocinas proinflamatorias y otros elementos séricos.

Cuadro 3. Componentes del líquido crevicular

Células	Bacterias, células epiteliales, leucocitos.
Electrolitos	Ca ⁺² , Na ⁺ , F ⁻ , Mg ⁺² , PO ₄ ⁺² , K ⁺
Productos de la placa bacteriana	Enzimas bacterianas, citotoxinas, productos del metabolismo bacteriano, LPS
Productos de células de la inflamación	Citocinas, inmunoglobulinas, enzimas, lisozima, prostaglandinas.
Tejidos	Complemento, fibrina, fibrinógeno, colágeno, proteoglicanos.

Adaptado de: Bartold P, Narayaan A S. Biology of the periodontal connective tissues. Illinois: Quintessence Publisher Co; 1998.

En el dominio gingival hay predominio de IgG sobre IgA, de origen sérico. El complemento presente en el exudado puede activarse por vía clásica o alterna. Hay una elevada proporción de neutrófilos, que representa el 90 % de los elementos celulares, el resto está constituido por células monocucleares, linfocitos B y T, macrófagos y células plasmáticas ^{1, 10, 22, 24}.

2.3.4. Placa bacteriana

Es un material blando y adherente al diente, constituido por microorganismos y productos bacterianos derivados de ellos que se encuentran en la superficie de los dientes, la encía, la lengua y otras superficies bucales, y no son fácilmente eliminados con el cepillado, ni con sustancias procedentes de restos alimenticios y de la saliva ^{22, 23}. Según su localización la placa puede ser supragingival, subgingival, de fosas y fisuras, proximal y radicular. La placa supragingival y subgingival en contacto con el diente son decisivas en la formación de caries dental, en tanto que la placa subgingival en contacto con el tejido es esencial en la destrucción de tejido blando que caracteriza a las diferentes formas de periodontitis ^{23, 24, 25}.

La masa de la placa, consta de materiales orgánicos e inorgánicos derivados de la saliva, el líquido crevicular y productos bacterianos. Los componentes orgánicos de la placa incluyen polisacáridos, proteínas, glucoproteínas y lípidos. Los componentes inorgánicos son en esencia calcio y fósforo, con vestigios de otros minerales como sodio, potasio y fluoruro ²⁴. La placa crece por agregación de nuevas bacterias, un gramo de placa (peso húmedo) contiene aproximadamente 2×10^{11} bacterias ²⁶. La colonización de más microorganismos sobre ella depende de la higiene, nutrición, oxigenación y composición de la saliva. Estudios de cultivos en los cuales las bacterias se aíslan y caracterizan indican que en la placa se hallan más de 500 especies de bacterias distintas. Cuando la placa bacteriana se calcifica se denomina cálculo dental o sarro que también depende de la higiene bucal.

El sarro contribuye al mantenimiento de bacterias en la placa, irrita la encía y la inflama. La placa bacteriana altera la configuración normal de la encía debilitándola y permitiendo así que las bacterias pasen a ella y la inflamen generando gingivitis. Cuando dicha inflamación no puede ser

retenida por la encía pasa al tejido de soporte provocando periodontitis o enfermedad periodontal. En la periodontitis, hay un aumento en el total de la carga microbiana en la placa y una fuerte asociación con la presencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola*.^{22, 23, 25, 26, 27}

Aunque en el origen de la enfermedad periodontal intervienen muchos factores, es la placa bacteriana el factor determinante más importante y posiblemente el único. Existen otra serie de factores que una vez iniciada la enfermedad van a modificar su evolución, ninguno de ellos por sí solo es capaz de causar la enfermedad periodontal si no existe la placa previamente. Pueden ser locales o sistémicos (cuadro 4), los factores locales determinan la presencia de la placa, la predisposición al edema y desgaste de la encía. Los factores sistémicos favorecen la progresión de la periodontitis, pueden alterar la mucosa oral provocando patología, pero por mecanismos distintos a los de la enfermedad periodontal, muchas veces agravando el cuadro clínico²⁶.

Cuadro 4. Factores que favorecen la enfermedad periodontal.

Factores Locales	Factores sistémicos
Flujo salival	Déficit de vitamina C, E, D, K, de proteínas, de calcio, y fósforo
Falta de órganos dentarios	Factores hormonales o nutricionales
Alineación inadecuada de los dientes	Enfermedades hematológicas
Cepillado dental inadecuado	Fármacos
Otros: tabaco como irritante local, quemaduras gingivales secundarias a aspirinas, etc.	Edad
	Intoxicaciones

Adaptado de: Murrieta JF, López Y, Juárez LA, Linares C, Zurita V. Índices epidemiológicos de morbilidad bucal. México: UNAM Proyecto PAPIME; 2006.

2.3.5. Clasificación de las enfermedades periodontales

El término enfermedades gingivoperiodontales alude a procesos patológicos que alteran las estructuras del periodonto. Estos procesos se agrupan en dos grandes grupos:

- A. Gingivitis: inflamación de los tejidos blandos, que rodean el diente, sin extenderse a otras estructuras.
- B. Periodontitis: procesos que comprometen todas las estructuras del periodonto. Se tratan de procesos destructivos con pérdida de hueso y ligamento periodontal.

La periodontitis presenta una lesión celular y molecular avanzada, con un daño en la estructura del periodonto, prácticamente irreversible, en su avance, involucra regiones anatómicas y crea deformaciones estructurales severas en la unidad dentogingival y en la unidad dentoalveolar. Además suele existir una alteración en los factores que normalmente limitan la respuesta inflamatoria, de forma que esta es excesiva, hasta provocar la destrucción progresiva del hueso. Los mecanismos que, se considera, participan en la enfermedad periodontal son: efectos directos de las bacterias de la placa, daño inducido por polimorfonucleares, daño por neutrófilos mediado por complemento, y daño mediado por células.

En los últimos años se han presentado muchas clasificaciones de las diferentes manifestaciones clínicas de la periodontitis, los consensos realizados en Europa y Estados Unidos (1989 y 1993) clasifican a la periodontitis en tres grandes tipos con base en sus características clínicas, radiográficas y de laboratorio²⁸. El primer grupo corresponde a la periodontitis crónica, que puede subclasificarse a su vez en formas localizada y generalizada, y caracterizarse como leve, moderada o grave con base en el porcentaje de sitios afectados y la pérdida de inserción. El segundo grupo corresponde a la periodontitis agresiva donde la pérdida de inserción y destrucción ósea son rápidas, también puede dividirse en localizada o generalizada. La periodontitis relacionada con enfermedades sistémicas es el tercer grupo, en este tipo la periodontitis se presenta como una manifestación de algunas enfermedades tales como trastornos hematológicos (leucemias) o trastornos genéticos (síndrome de Down, síndrome de Chediak-Higashi)^{22, 23, 24, 28, 29}.

2.3.6. Patología inmunitaria de la periodontitis

El análisis de las características histopatológicas y de la ultraestructura de la enfermedad permite una división clara en etapas (cuadro 5). Se ha sugerido cuatro etapas, *inicial*, *temprana*, *establecida* y *lesión avanzada*. Esta división es un poco arbitraria, generalmente está apoyada por los datos morfológicos y permite fijar la atención sobre los aspectos patológicos importantes de la enfermedad y sobre los mecanismos patógenos asociados.

En la lesión inicial hay inflamación de los tejidos debido a la placa supragingival y subgingival, la carga bacteriana es de 10 a 20 veces mayor que en los sitios sanos, y la complejidad de la biota aumenta. La lesión es localizada en el surco gingival y epitelio de unión y tejido conjuntivo. Existe una dilatación de vasos sanguíneos y exudado de líquido crevicular al espacio extravascular. El inicio del flujo del líquido crevicular constituye el estadio importante en el progreso de la periodontitis. El complemento del líquido crevicular se activa con rapidez por una combinación de efectos, como la activación de la vía clásica por anticuerpos IgG e IgM contra antígenos subgingivales de la placa; activación vía alterna del complemento por endotoxinas, y peptidoglucanos de microorganismos gram negativos y gram positivos respectivamente, y activación de los componentes del complemento por enzimas proteolíticas del huésped y las bacterias. Hay presencia de linfocitos y macrófagos en el epitelio de unión, el surco gingival presenta leucocitos, células epiteliales de la descamación y microorganismos. En suero podemos encontrar anticuerpos circulantes contra una variedad de bacterias de la placa, además algunos complejos inmunes podría estar formándose con algunos antígenos de la placa. Los complejos inmunes activan complemento por vía clásica, generando C3a y C5a. Eso induce a una permeabilidad vascular aumentada y quimiotaxis de polimorfonucleares.

La lesión temprana se confunde y evoluciona a partir de la lesión inicial sin una línea divisoria clara. En esta etapa los linfocitos constituyen el 75 % de la infiltración leucocítica. La celularidad corresponde a linfocitos T, B y macrófagos. Hay un incremento de inmunoglobulinas, complemento, fibrinógeno y leucocitos en el exudado crevicular. Los linfocitos y macrófagos en esta etapa son capaces de liberar por lo menos algún mediador para así aumentar la localización de leucocitos y proliferación de linfocitos. Entre las principales citocinas liberadas encontramos: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, TNF α y TNF β , IFN γ y prostaglandina E (PGE₂). (Véase más adelante, figuras 3 y 4). El área del tejido conectivo afectada puede diferenciarse claramente del tejido normal

por la disminución del contenido de colágeno que puede llegar a ser hasta del 70% con relación al tejido conectivo no inflamado. Se ha demostrado que los linfocitos de la sangre periférica obtenidos en pacientes con enfermedad periodontal están sensibilizados a las sustancias antigénicas de la placa dental, este fenómeno se presenta durante la etapa temprana de la enfermedad, por lo tanto, un componente importante en el desarrollo de la lesión temprana es una forma de hipersensibilidad celular a los antígenos de la placa.

Cuando la lesión se establece, hay una infiltración de células plasmáticas y presencia de inmunoglobulinas extravasculares. El epitelio de unión y el surco bucal pueden proliferar y emigrar hacia el tejido conectivo infiltrado y a lo largo de la superficie radicular, convirtiéndose en epitelio propio de una bolsa. La lesión aun se encuentra centrada alrededor del fondo del surco y limitada a una porción relativamente pequeña del tejido conectivo gingival. Sin embargo, las células plasmáticas no se encuentran limitadas al sitio de reacción; aparecen entre los vasos sanguíneos y las fibras de colágeno, estas células pueden producir IgG, IgM y algunas IgA. Existen algunos linfocitos T. Conforme el tiempo pasa, comienzan a proliferar los linfocitos T y B, éstos son estimulados por los antígenos de la placa. La pérdida continua de colágeno es evidente en la zona de infiltración, en otras regiones distantes pueden empezar la fibrosis y la cicatrización.

La lesión establecida puede persistir por muchos años, en algunas personas puede progresar a una lesión avanzada. Una vez que se ha llegado a una lesión avanzada, todas las características inmunológicas de la lesión establecida se extienden al hueso alveolar y ligamento periodontal. La lesión ya no se encuentra localizada, puede extenderse en dirección apical, así como lateralmente, formando una banda ancha y variable alrededor de los cuellos y raíces de los dientes. Hay pérdida continua de colágena con fibrosis del área inflamada, la bolsa periodontal aumenta de tamaño. Existe un denso infiltrado de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. La característica esencial de esta etapa es la pérdida de ligamento periodontal y hueso alveolar. Se considera que la liberación de enzimas proteolíticas con actividades tipo colagenasa y tripsina, por las células del huésped, daña los tejidos y activa componentes del complemento, así como la liberación subsecuente de PGE₂^{1, 10, 24, 28, 29, 30, 31}

Cuadro 5. Características del tejido periodontal durante la evolución de la enfermedad.

Tipo de lesión	Características
Inicial	Vasculitis clásica de vasos bajo el epitelio de unión, exudación de líquido crevicular al surco gingival, aumento en la migración de leucocitos, presencia de proteínas séricas, principalmente fibrina extravascular, pérdida de colágeno perivascular.
Temprana	Acentuación de las características de la lesión inicial, acumulación de células linfoides debajo del epitelio de unión en el sitio de la inflamación aguda, alteración de los fibroblastos residentes posiblemente asociado a las interacciones con los linfocitos, pérdida de fibras de colágena que apoyan la encía marginal, comienzo de la proliferación de células basales del epitelio de unión.

Adaptado de Schluger S, Yuodelis R, Page R. Enfermedad periodontal, fenómenos básicos, manejo clínico e interrelaciones oclusares y restauraciones. México: Continental S. A; 1981.

Continuación cuadro 5. Características del tejido periodontal durante la evolución de la enfermedad.

Tipo de lesión	Características
Establecida	Persistencia de las manifestaciones de la inflamación aguda, predominio de células plasmáticas, sin pérdida ósea apreciable pérdida continua de la sustancia del tejido conectivo observada en la lesión temprana, migración y extensión lateral del epitelio de unión, existe la formación de la bolsa periodontal.
Avanzada	Persistencia de las características de la lesión establecida, extensión de la lesión hacia el hueso alveolar y ligamento periodontal con pérdida importante de hueso, pérdida continua de colágeno bajo el epitelio de la bolsa con fibrosis en los sitios más distantes, es un periodo de remisión y exacerbación, conversión de la médula ósea distante a la lesión en tejido conectivo fibroso, manifestaciones generales de reacciones tisulares inflamatorias e inmunopatológicas.

Adaptado de Schluger S, Yuodelis R, Page R. Enfermedad periodontal, fenómenos básicos, manejo clínico e interrelaciones oclusares y restauraciones. México: Continental S. A; 1981.

2.3.7. Mecanismos de destrucción celular en la periodontitis

Una de las características fundamentales en la periodontitis es la remodelación del tejido conectivo que lleva a una pérdida neta de los tejidos blandos, hueso y el aparato de inserción periodontal. En la periodontitis pueden intervenir las hipersensibilidades tipo I, III y IV, la hiperactivación del complemento y células fagocíticas (figuras 3 y 4).

Los mediadores producidos como parte de la respuesta del huésped que contribuyen a la destrucción tisular son:

Proteasas: las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son las proteasas más importantes que intervienen en la destrucción del tejido periodontal mediante la degradación de la matriz extracelular. Las MMP son una familia de enzimas proteolíticas que degradan las moléculas de la matriz como la colágena y elastina. Las MMP-8 y MMP-1 son colagenasas; las primeras son liberadas por neutrófilos, en tanto que las MMP-1 se expresan en células residentes como fibroblastos, monocitos, macrófagos y células del epitelio. La función de estas enzimas en la patogenia depende del equilibrio de enzimas y sus consiguientes inhibidores enzimáticos en el tejido local ^{1, 24, 28, 30}.

Metabolitos reactivos del oxígeno: son excretados al medio circundante de las células fagocíticas, ejerciendo importantes efectos en los tejidos periodontales como el deterioro de células próximas (p. ej., fibroblastos y células endoteliales), inactivación de los inhibidores séricos de las proteasas de las células fagocíticas y la oxidación del ácido araquidónico, con producción de diversos metabolitos que incrementan el proceso inflamatorio local.

Citocinas: Se denomina genéricamente citocinas al conjunto de proteínas de bajo peso molecular, por lo común de 15-25 KDa a menudo glicosiladas y generalmente monoméricas que sintetizan las células del sistema inmune. Median el crecimiento celular, la inflamación, la inmunidad, la diferenciación, la migración y la reparación celular ^{12, 13}.

A pesar de que son múltiples y muy heterogéneas las citocinas comparten ciertas propiedades que les permite agruparse:

- Bajo peso molecular
- Su secreción es autolimitada y su vida media muy corta
- Se producen durante la fase efectora de la inmunidad, específica o inespecífica.
- Actúan sobre distintas células u órganos blanco, propiedad que se denomina pleitropismo
- Pueden ser producidas por diversos tipos celulares
- Influyen en la síntesis y en los efectos de otras citocinas
- Solo estimulan a las células que posean receptores específicos en la membrana.
- La expresión de dichos receptores depende de diversas señales, incluida la misma u otras citocinas.

Al parecer, dos citocinas proinflamatorias, IL-1 y TNF, tienen un papel fundamental en la destrucción del tejido periodontal. La IL-1 se encuentra en dos formas activas, IL-1 α e IL-1 β , ambas son moléculas proinflamatorias potentes y son los principales constituyentes del llamado “factor activador del osteoclasto”. El TNF se encuentra también en dos formas TNF- α y TNF- β , el primero comparte muchas de las actividades biológicas de la IL-1, sin olvidar la estimulación de la resorción ósea. Los macrófagos o linfocitos activados son los principales productores de IL-1, aunque también puede ser liberado por células cebadas, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales. El LPS bacteriano es un fuerte inductor de IL-1 en tanto que TNF- α e IL-1 también activan la producción de IL-1 por el macrófago.

La capacidad de la IL-1 para regular positivamente su propia producción, puede representar un mecanismo de amplificación importante. El TNF- α también es sintetizado por el macrófago en respuesta al LPS bacteriano. Las propiedades de estas citocinas relacionadas con la destrucción del tejido tienen que ver con la estimulación de la resorción ósea y la inducción de proteinasas y PGE₂ por macrófagos y fibroblastos gingivales. La IL-1 es un potente estimulador de la proliferación, diferenciación y activación de los osteoclastos¹.

Prostaglandinas: las prostaglandinas (PG) constituyen una familia de ácidos grasos, metabolitos del ácido araquidónico que generan las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). El LPS bacteriano, el TNF- α y la IL-1 regulan positivamente la COX-2, que es la que genera la PGE₂ que se relaciona con la inflamación. Las principales células productoras de PGE₂ en el periodonto son los macrófagos y fibroblastos. Los aspectos de la lesión periodontal donde participan las PGE₂ son los siguientes: 1) mediación de la reacción inflamatoria, que es la manifestación más temprana de las alteraciones tisulares después del comienzo de la acumulación de la placa, 2) inhibición de la mitosis de los fibroblastos con la incapacidad consecuente para reponer las células alteradas en forma citopatológica en la encía marginal, 3) supresión de la síntesis y recambio de proteínas de colágeno y no colagenosas de los tejidos conectivos, 4) inducción de la resorción del hueso alveolar^{15, 24, 25, 31}.

2.3.8. Signos y síntomas de la periodontitis

Al principio de la enfermedad no existe prácticamente ningún síntoma pero una buena exploración dentaria determinará la existencia de zonas con placa bacteriana, sobre todo en los bordes visibles de las coronas dentarias y al levantar la encía marginal. Cuando se ha establecido la gingivitis la encía aparecerá más roja, secundaria a la inflamación, su consistencia será blanda con pérdida de su textura brillante. En esta etapa es frecuente el sangrado de encías y su hipersensibilidad. A medida que los tejidos se van destruyendo comienza la retracción de los mismos. El surco gingival se va elevando permitiendo ver las raíces dentarias lo que provoca mucha sensibilidad de las piezas e incluso dolor. Cuando hay presencia de bolsas periodontales, pueden llegar a formarse abscesos crónicos o agudos, en estos últimos el dolor puede llegar a ser severo y puede haber fiebre, edema de las encías y deformidad facial. Conforme la enfermedad avanza, las bolsas periodontales se extienden apicalmente con progresión de la destrucción del hueso alveolar y el diente presenta movilidad^{26, 32, 33}.

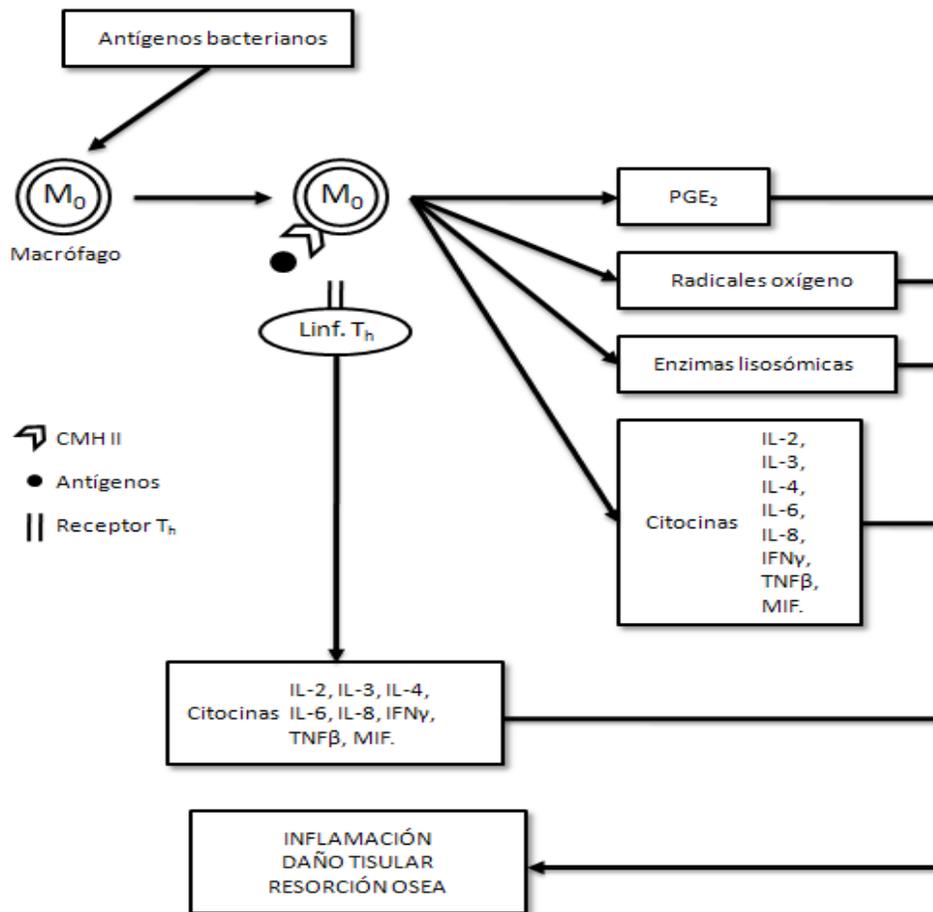


Fig.3. Mecanismo de la hipersensibilidad tipo III, relacionado con la enfermedad periodontal²³.

† Véase texto para la explicación de abreviaturas.

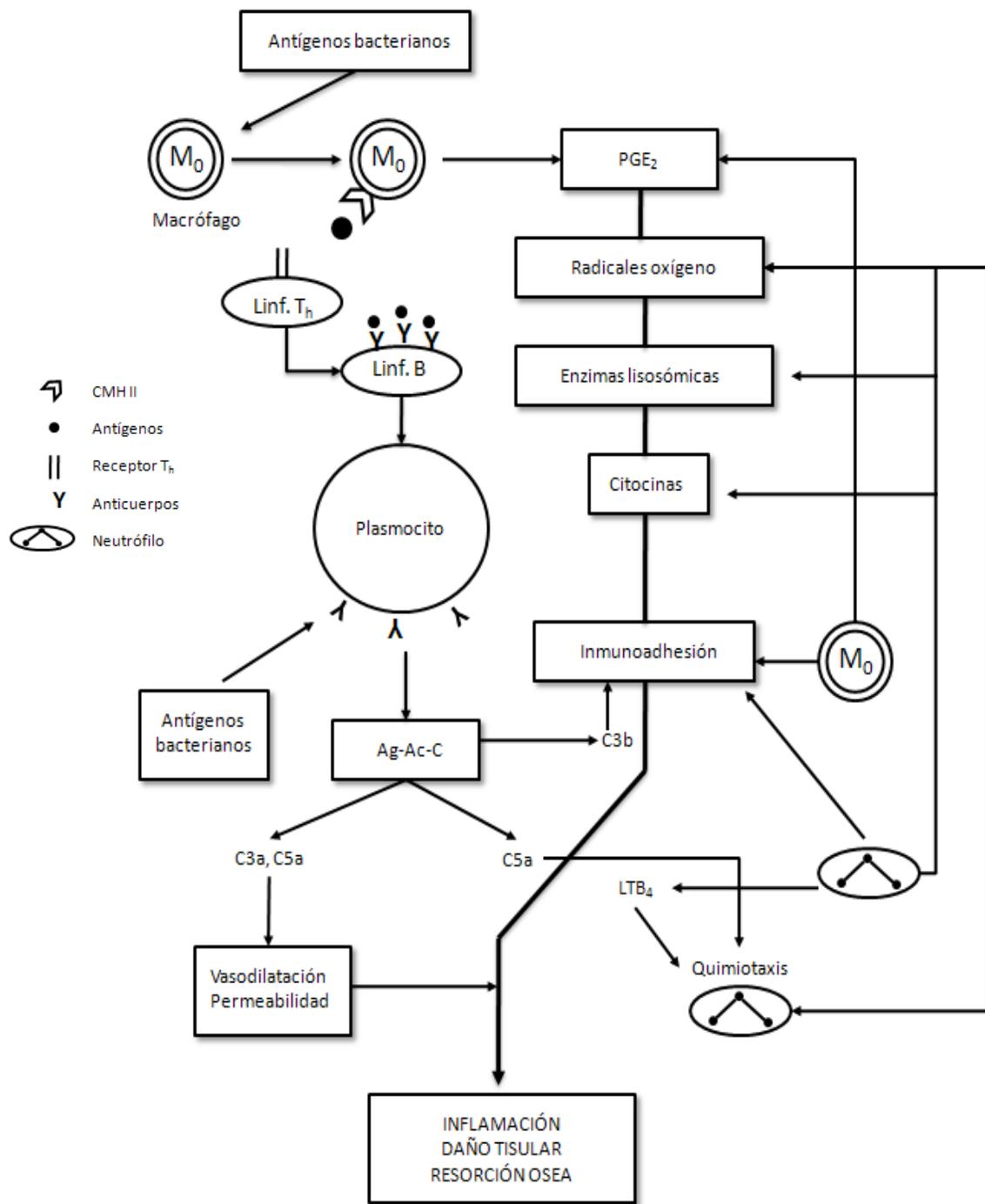


Fig.4. Mecanismo de la hipersensibilidad tipo IV, relacionado con la enfermedad periodontal²³.
 † Véase texto para la explicación de abreviaturas

2.4. *Porphyromonas gingivalis* como organismo periodontopatogénico

P. gingivalis es la especie más importante del género en la cavidad oral. Se localiza en el surco gingival especialmente cuando no existe una buena salud periodontal; más rara vez, se aísla de la lengua, amígdalas, e incluso saliva. Se relaciona con infecciones endodontales, abscesos periapicales y periodontales, especialmente con la destrucción y progresión de las periodontitis, cuadro 5. Este microorganismo ha sido identificado en escasa proporción en sitios con gingivitis crónica y en elevada proporción en la placa subgingival de sitios con periodontitis del adulto, periodontitis rápidamente destructiva, periodontitis juvenil generalizada y periodontitis refractaria. Se ha demostrado una correlación entre *P. gingivalis* y la profundidad de la bolsa con el sondaje, la pérdida del nivel de inserción y la destrucción ósea ^{26, 28, 29, 32, 33}.

Cuadro 6. Criterios de asociación de *P. gingivalis* en enfermedades periodontales: criterios de Socransky ²².

Criterio	Hallazgo
Asociación con la enfermedad	Mayor número en lesiones de periodontitis No aislado o aislado esporádicamente en sujetos sanos Presente en células epiteliales del surco gingival
Eliminación	La eliminación o supresión determina un tratamiento satisfactorio Las lesiones recurrentes se asocian especies.
Respuesta del huésped	Anticuerpos séricos elevados en periodontitis Anticuerpos locales elevados en periodontitis
Factores de virulencia	Colagenasa, tripsina, fibrolisina, proteasas, fosfolipasa A, endotoxinas, ácidos grasos, amoníaco y factores con efectos adversos sobre PMN
Estudios en animales	Importante función en infecciones experimentales mixtas. Resulta ser patógeno en modelos de periodontitis en primates y roedores.

2.4.1. Características generales

P. gingivalis es una bacteria Gram Negativa, bacilo o cocobacilo inmóvil. Sensibles a bilis al 20%, carecen de metabolismo fermentativo y de las enzimas glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa y 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa de la vía pentosa fosfato. Son asacarolíticos y utilizan sustratos nitrogenados como fuentes de energía. Es la única especie de *Porphyromonas* que produce ácido fenilacético como producto final de su metabolismo. Es uno de los microorganismos reconocidos como causantes de infecciones de tipo exógeno al no ser parte de la biota. La bacteria crece bajo una atmósfera con 5% de CO₂, 10 % H₂, y 85 % de N₂ en agar sangre suplementado con hemina y menadiona a 37°C de 4 a 7 días. Las colonias en agar sangre son lisas, brillantes, convexas, circulares y con un pigmento marrón oscuro o negro tras varios días de incubación (figura 5). Los pigmentos se deben a la presencia de protohem y protoporfirina, que se ve influenciada por el medio de cultivo ^{35, 36, 37}.



Figura 5. Colonias de *Porphyromonas gingivalis* sobre Agar Sangre Hemina-Menadiona

Porphyromonas gingivalis es incapaz de degradar carbohidratos como fuentes de energía, o bien captar y usar aminoácidos libres como unidades metabólicas. Más bien, *P. gingivalis* depende de su capacidad de degradar proteínas en péptidos cortos que son captados y usados metabólicamente para la generación de energía y como fuente de carbono y nitrógeno. En el ambiente periodontal, los tejidos del huésped proporcionan una fuente abundante de proteínas. Uno de los constituyentes proteicos principales de los tejidos periodontales es la colágena, y *P. gingivalis* tiene la actividad proteolítica necesaria para degradar la colágena en componentes peptídicos que puede utilizar en su metabolismo. La colagenasa bacteriana, las colagenasas celulares del huésped o probablemente ambas, contribuyen a la patogenia debido al daño tisular resultante ^{35, 36, 37, 38, 39}.

2.4.2. Factores de virulencia

Su patogenicidad está relacionada con varios factores de virulencia. Estos factores incluyen colagenasas, fibrinolisin, varias proteasas, y enzimas que alteran los mecanismos defensivos del huésped, ^{39, 40, 41, 42}.

Enzimas que alteran los mecanismos defensivos del huésped: Las enzimas más estudiadas de *P. gingivalis* son un grupo de proteasas relacionadas, conocidas como gingipaínas. Estas proteasas existen en varias formas y se encuentran en el medio extracelular o sobre la superficie bacteriana; en algunos casos, están en regiones relacionadas con las propiedades de adhesión. Las gingipaínas degradan las proteínas en las uniones peptídicas que siguen a los residuos de arginina (Arg-gingipaínas o Rgps) o a los residuos de Lisina (Lis-gingipaínas o Kgp)

Las gingipaínas de *P. gingivalis* son capaces de alterar los sistemas normales del huésped en forma tal que contribuyen al desarrollo y virulencia de la bacteria y a la destrucción de los tejidos del huésped. Ver cuadro 7.

Cuadro 7. Ejemplos de las gingipaínas de <i>P. gingivalis</i> sobre los sistemas biológicos.			
Sistema biológico	Proteasas de <i>P. gingivalis</i>	Mecanismo de acción	Efecto
Fagocitosis por PMN	Rgps*	Segmentación del componente del complemento C5 a la forma C5a	Aumenta la afluencia de PMN al sitio de la infección
	Rgps, Kgp**	Descomposición del factor del componente C3 y de la inmunoglobulina IgG	Disminuye la opsonización y la fagocitosis.
	Rgps de membranas	Ruptura específica de IL-8	Aumenta la afluencia de PMN
	Kgp (proteasas de serina de membrana)	Descomposición del receptor de superficie celular para C5a del PMN	Disminuye la afluencia de PMN
Respuesta inmunitaria innata.	Rgps, Kgp	Descomposición de monocitos CD14, del receptor para LPS y activación de los receptores tipo Toll	Incapacita a las células del huésped para reconocer y responder frente a las bacterias
Red de citocinas del huésped	Rgps, Kgp	Degradación de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α	Altera la respuesta inflamatoria frente a la infección
Sistema calicreína/cinina	Rgps, Kgp	Liberación de bradicidina	Aumenta la permeabilidad vascular, aumento del flujo del líquido crevicular y edema de tejidos
Sistemas de coagulación	Rgps, Kgp	Activación y degradación de coágulos	La desregulación local se relaciona con una mayor hemorragia al sondear los sitios de enfermedad periodontal.

*Rgps, Arg-gingipaínas

**Kgp, Lis-gingipaína

Tomado de: Carranza F, Takel H, Newman M. Periodontología clínica. México: MacGraw-Hill; 2004:

La capacidad de las gingipaínas para estimular la liberación de bradicinina, que aumenta la permeabilidad vascular, proporciona un mecanismo que explica un flujo mayor del líquido crevicular evidente en los sitios de inflamación, situación que incrementa el suministro de nutrientes para los microorganismos residentes. La respuesta inmunitaria del huésped puede ser neutralizada por las gingipaínas porque degradan el receptor celular del LPS del huésped (CD14), las citocinas proinflamatorias, como IL-1 β e IL-6, y la quimiocina IL-8. Además, los efectos sobre la función de neutrófilos y la degradación de los mediadores inflamatorios del huésped alteran las respuestas normales contra el ataque bacteriano.

Al parecer las gingipainas estimulan e inhiben la respuesta inmunitaria del huésped en lo que respecta a la función del neutrófilo. Por ejemplo, las Rgps y Kgp solubles descomponen a la IL-8 de una manera tal que hace que esta citocina proinflamatoria sea más activa en el reclutamiento de neutrófilos. Sin embargo, las Rgps de las membranas pueden anular la actividad de la IL-8 al degradar por completo la molécula. Esto ha llevado a suponer que *P. gingivalis* tiene efectos proinflamatorios a distancias largas, mediados por proteasas solubles, pero efectos antiinflamatorios en las cercanías, mediados por proteasas de la membrana. En esta hipótesis *P. gingivalis* se beneficia con la presencia de neutrófilos en el área porque los neutrófilos liberan diversas enzimas proteolíticas que, sin duda, contribuyen a la degradación de proteínas tisulares y, por tanto, ayudan a la adquisición de nutrientes para la bacteria. Sin embargo, se cree que la función del neutrófilo es inhibida en la proximidad de las células de *P. gingivalis*, en virtud de las proteasas de membrana presentes en las vesículas liberadas en los alrededores para proteger a la bacteria de la fagocitosis. Los mecanismos de inhibición de la función de los neutrófilos son la degradación de IL-8 por las Rgps de las membranas, así como por las moléculas (componente C3 del complemento) y receptores (receptor C5a de neutrófilos) relacionados con la opsonización y la fagocitosis.

Así mismo, se han demostrados proteasas con capacidad de destruir IgA, AgG, IgM y proteínas plasmáticas importantes en la iniciación y control de la respuesta inflamatoria como α -2 macroglobulina, inhibidor de C1, antitrombina, α -2 antiplasmina y plasminógeno y proteínas plasmáticas transportadoras. Por otro lado *P. gingivalis* elabora superóxido dismutasa y peroxidasa, que le hacen relativamente resistente al oxígeno^{28, 41, 42, 43}.

Hemaglutinina. Su naturaleza no es bien conocida, aunque parece estar constituida por proteínas y lípidos asociados de alguna forma al lipopolisacárido (LPS) parietal, y cuyos receptores contienen L-arginina. Participa en los inicios de la colonización tisular al participar en la adhesión a células epiteliales, siendo además capaz de aglutinar eritrocitos de varias especies animales.

Fimbrias. Intervienen en el proceso de adhesión a tejidos del huésped y en la coagregación bacteriana

Capsula. *P. gingivalis* tiene una cápsula densa y amorfa de aproximadamente 15 nm de espesor alrededor de la membrana externa. Existe una fuerte relación entre la encapsulación de *P. gingivalis* y su habilidad para funcionar como patógeno oral. Esta encapsulación incrementa su resistencia a la fagocitosis, resistencia al suero e inducción decrecida a los PMN. Esta barrera física funciona como una máscara para los lipopolisacáridos, impidiendo la activación de la cascada del complemento, protegiéndose de esta manera de la opsonización y fagocitosis.

Lipopolisacáridos (LPS). El lipopolisacárido de *P. gingivalis* es sumamente mitogénico. Se ha reportado que los LPS de *P. gingivalis* son capaces de estimular la producción de Prostaglandinas E2 de los macrófagos de ratas y en fibroblastos gingivales humanos. Los reportes indican que los LPS de *P. gingivalis* inducen la producción de IL-6, se piensa que esta inducción es resultado de la estimulación de la IL-1 β en los fibroblastos gingivales humanos^{30, 33, 40, 42}.

2.5. Técnicas inmunológicas

2.5.1. ELISA polimixina

El inmunoensayo enzimático conocido como ELISA, fue descrito en 1971, se introdujo para cuantificar antígenos y posteriormente para la titulación de anticuerpos. Se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo y la sensibilidad del sistema indicador. Independientemente de los esquemas experimentales empleados, el ELISA comprende dos etapas generales:

- 1.-La reacción de un inmunorreactante con un antígeno o anticuerpo;
- 2.-La detección de ese inmunorreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático.

El ELISA ligado a polimixina se ofrece como método de detección al utilizar polimixina B que adhiere eficazmente a los lipopolisacáridos presentes en las membranas de las células bacterianas gram-negativas, además de utilizar anticuerpos específicos, traduciendo en un procedimiento sensible.

Esta técnica es una modificación del ELISA directo, en donde en lugar de utilizar un anticuerpo específico fijado al soporte (la placa de poliestireno), se utiliza polimixina que adhiere eficazmente a los LPS de manera inespecífica presentes en la muestra; después de realizar los respectivos lavados, se adiciona el anticuerpo específico (IgM-Anti LPS) generado para el agente que se pretende identificar. Los anticuerpos específicos unidos a la peroxidasa se unirán solo al LPS de interés, sin importar que otros LPS se hayan unido a la placa, una vez hechos los lavados, se adiciona el sustrato y cromógeno que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro^{13, 14, 15, 45, 46}.

2.5.2. Inmunodifusión radial

La Inmunodifusión se utiliza para el análisis cualitativo y cuantitativo de antígenos y anticuerpos en el suero y otros líquidos corporales. La interpretación del resultado del análisis es el desarrollo de una reacción de precipitación (la formación de un complejo antígeno-anticuerpo insoluble a partir de un antígeno-anticuerpo soluble). Aunque la formación de estos complejos en un medio semisólido como agar depende de los electrolitos amortiguadores, el pH y la temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo. Si se incorporan tres o más estándares de concentración conocida del antígeno en la placa, puede obtenerse una curva de calibración que sirve para determinar la cantidad del antígeno en las muestras desconocidas¹³.

2.6. Modelo experimental

El ratón desnudo et/et fue observado por primera vez en 1985 en una colonia cerrada no consanguínea de ratones albinos CD1 en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México. El término “et” se adoptó para nombrar a esa forma mutante.

Una de sus características principales es la alopecia, que es el resultado de un gen recesivo autosómico simple. En los animales adultos, los machos se caracterizan por presentar un timo histológicamente igual al de los ratones normales, pero con un tamaño y peso menor por lo que se les definió como hipotímicos, mientras que las hembras presentan un rudimento tímico, el cual se asemeja histológicamente a un nódulo linfoide por lo que están catalogadas como atímicas.

Otra de las características del ratón et/et es que presenta una leucocitosis circulante con linfocitosis, monocitosis y eosinofilia y una linfopenia en bazo, así como la hipersegmentación de neutrófilos; se considera como una posibilidad que esta última, sea el factor involucrado en la predisposición de los ratones a procesos infecciosos por una deficiencia en los procesos fagocíticos

Se ha observado que presentan baja fertilidad, mortalidad alta, lesiones en ojos y una marcada susceptibilidad a problemas cutáneos como abscesos, dermatitis bacterianas y dermatomicosis así como un incremento en la frecuencia de parasitosis, neumonías y signos clínicos de envejecimiento prematuro.

Los ratones et/et presentan anticuerpos antifosfolípidos de tipo IgA, IgG e IgM, autoanticuerpos (anti Ro y anti La), factor reumatoide, y desarrollan una exocrinopatía inflamatoria con daño histopatológico de glándulas salivales y lagrimales que asemeja a los pacientes con SS ^{8, 9, 47, 48, 49, 50}.

3. Planteamiento del problema

El problema dental predominante en pacientes con síndrome de Sjögren (SS) es la caries dental. La falta de saliva predispone a los pacientes al rápido desarrollo de lesiones cariosas a pesar de una buena higiene dental. Aún no se aclara si el SS incrementa o no el riesgo de enfermedad periodontal; algunos estudios sugieren que las personas con SS tienen más riesgo de padecer periodontitis que los pacientes saludables, así mismo se sugiere que el SS afecta la colonización de la placa bacteriana y favorece el rápido progreso de la enfermedad.

Numerosos modelos animales han sido estudiados para comprender la interacción entre *P. gingivalis* y el huésped, los más usados son roedores, primates, carneros y perros. Un aspecto importante al usar un modelo animal es que este simule la patogénesis de la infección lo más cercano al proceso en humanos, por lo tanto, en este estudio lo que se pretende es determinar el grado de daño ocasionado por la infección de *P. gingivalis* en el periodonto utilizando ratones desnudos CD1 et/et que asemejan el SS.

4. Hipótesis.

La xerostomía en los ratones *et/et*, es un factor que los predispone a la generación y evolución de un cuadro de periodontitis debido a la infección de *P. gingivalis*. Por lo tanto, los ratones de la cepa CD1 *et/et* desarrollaran un cuadro de periodontitis más severo en comparación con los ratones CD1 *+/+* y CD1 *et/+*, en cuyo caso se esperan menores alteraciones anatómico-funcionales.

5. Objetivos

Objetivos generales

- Comparar la susceptibilidad del ratón CD1 *et/et* con la de el ratón portador *et/+* y la del ratón progenitor CD1 *+/+* a desarrollar periodontitis a partir de una infección con *P. gingivalis*

Objetivos particulares

- A partir de los órganos obtener índices renal, esplénico y hepático.
- Determinar ceruloplasmina en suero por la técnica de inmunodifusión radial.
- Determinar nitritos en suero por la técnica de Griess
- Valorar el grado de avance de la pérdida de hueso alveolar.
- Determinar mediante ELISA-polimixina B la presencia de LPS específico en muestras de saliva.

6. Diseño de la investigación

Tipo de estudio: Experimental, prospectivo, longitudinal y descriptivo.

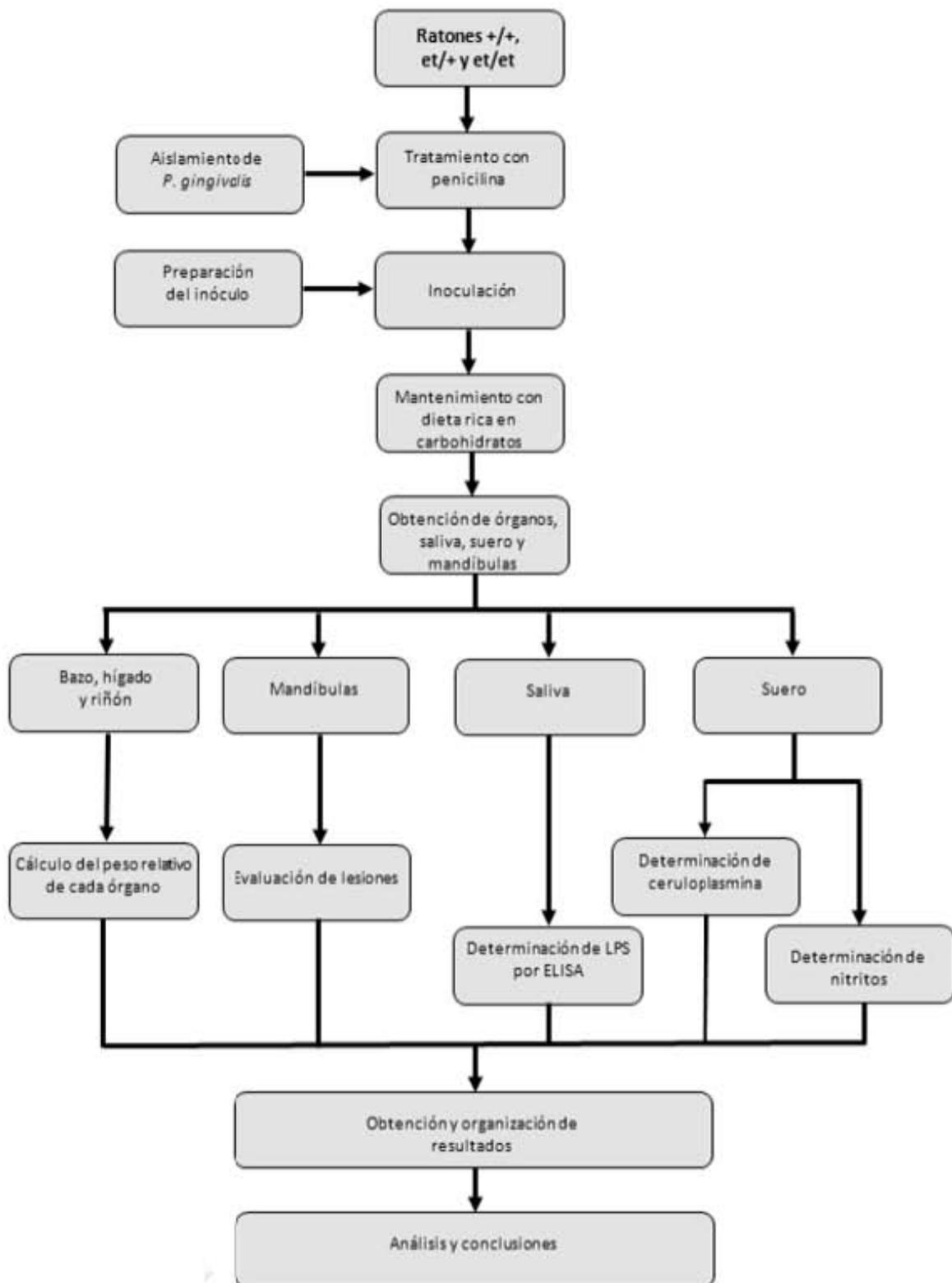
Población: 12 ratones de la cepa CD1, 12 et/+ y 12 et/et.

Criterios de inclusión: Ratones hembras de las cepas CD1: +/+, et/+, et/et, de 4 a 6 semanas de edad, con un peso entre 30-45 g, que no presenten ningún padecimiento, en caso de la cepa et/et que no presenten otro padecimiento.

Criterios de exclusión: Ratones machos de las cepas CD1, et/+, et/et, ratones que no se encuentren entre la edad requerida y que presenten otro padecimiento.

Criterios de eliminación: Ratones que mueran en el proceso de la investigación.

7. Diagrama de flujo



8. Material

8.1.Reactivos

Nombre	Proveedor
Acetona	J.T. Baker
Ácido acético	Merck
Acido cítrico	J.T. Baker
Ácido clorhídrico	Merck
Aceite de inmersión	Sigma
Ácido Ortofosfórico	JT. Baker
Agarosa	Bioxon
Agua destilada	Theissier
Albúmina sérica bovina	JT. Baker
Alcohol etílico	Bioxon
Albúmina sérica bovina	JT. Baker
Bicarbonato de sodio	JT. Baker
Borato de sodio	JT. Baker
Cadmio metálico	Técnica química S.A.
Carbonato de sodio	J.T. Baker
Cianuro de potasio	JT. Baker
Citrato de sodio	Merck
Cloruro de potasio	JT. Baker
Cloruro de sodio	JT. Baker
Colato de sodio	Sigma
Cristal violeta	Sigma Chemical Co.
Etanol	JT. Baker
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Merck
Fosfato de sodio	JT. Baker
Fosfato de sodio bibásico dodecahidratado	Hycel de México.
Hemina	Sigma
Hidróxido de sodio	Merck
Lugol	Hycel de México
Medios de cultivo	
Agar agar	Dibico
Agar soya tripticaseína	Bioxon
Extracto de levadura	Bioxon
Menadiona	Sigma
N-(1-naftil)-etilendiaminodihidratado (NED)	Merck
Nitrito de sodio	JT. Baker
Ortofenilendiamina	Sigma de México
Peroxidasa de rábano	Sigma
Peróxido de hidrógeno al 30%	Sigma Aldrich
Safranina	S.S.A
Sulfato de polimixina B	Lab. Sophia
Tween-20	Técnica Química S.A.
Zymosan A	Sigma

8.2. Equipo

Nombre	Marca
Agitador vortex genie	Scientific Industries Inc
Agitador rocker platform	Bellco Glass
Baño metabólico	Precisión
Campana de extracción	
Centrífuga	Solbat
Centrífuga clínica	Hamilton Bell
Congelador (-4°C)	Revco
Equipo de disección	
Lámpara de UV	Mineralight & Black-Ray
Microcentrífuga	Hermle 2233M-2
Microscopio	Zeiss
Microscopio digital	Dino-lite Am-311
Micropipeta de 5-40 µL	Finnpipette-Labsystems
Micropipeta de 10-100 µL	Labpette-Labnet
Micropipeta de 100-1000 µL	BIOHIT Proline
Olla de presión Presto	
Pipeta automática	Finnpipette, de 20-400 µL
Refrigerador	Philips 127 volts-VA
Cámara de anaerobiosis	
Mechero Fisher	

8.3. Instrumentos

Nombre	Marca
Balanza analítica	Mettler H33AR
Balanza granataria	Ohaus
Espectrofotómetro	6305 UV/ Vis, Jenway
Lector de ELISA	Awareness Technology INC

8.4. Material biológico

Nombre
Cepa de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Sangre desfibrinada de carnero.
LPS purificado de <i>P. gingivalis</i>
Anticuerpos anti-LPS de <i>P. gingivalis</i>

8.5. Materiales varios

Nombre
Matraz Erlenmeyer de 1L, 500 mL y 250 mL.
Pipetas graduadas de 0.1 mL
Probetas de 100 mL, 50 mL y 10 mL
Termómetro con escala -10 a 150° C.
Tubos de ensaye de 13X100
Tubos de 18X150 con tapa de baquelita
Tubos expendorf
Portaobjetos
Cubreobjetos
Desecador de vidrio
Jeringas estériles desechables de 1mL, 5ml, 20mL
Asa microbiológica
Algodón , gasas, papel estraza, masking tape
Cajas Petri estériles de plástico de 100 X 15 mm
Placa de microtitulación para ELISA de alta unión.
Placas para inmunodifusión
Tabletas efervescentes y Velas
Parafilm M de 4 pulgadas

9. Métodos.

9.1.Sacrificio de los animales

Se trabajó un grupo de 46 ratones (12 +/+, 12 et/+ y 12 et/et) los cuales fueron pesados y sacrificados por incisión axilar.

9.2.Obtención de órganos y suero del ratón.

Se obtuvieron muestras de sangre por incisión axilar en tubos Expendorf; el suero se separó y congeló a -20°C hasta su uso.

Se tomó una muestra de saliva en agua libre de pirógenos posteriormente se congeló a -20°C hasta su uso.

Se realizó la disección del bazo, riñón e hígado, se registró el peso de cada órgano, posteriormente fueron desechados.

Los ratones fueron decapitados y se esterilizaron las cabezas, posteriormente se descarnaron y clarificaron con KOH al 10 %.

9.3.Índice de órganos

A partir de los valores del peso final de los animales y el valor del peso de los órganos se obtuvo el índice renal, hepático y esplénico usando la siguiente fórmula:

$$IO = \frac{Po}{PT} \times 100$$

Donde

IO =índice de órganos (hepático esplénico o renal según corresponda).

Po = peso del hígado bazo y riñón de cada uno de los ratones.

PT = peso total de los ratones antes del sacrificio.

9.4. Determinación de ceruloplasmina por inmunodifusión radial

Se preparó agarosa al 1% en PBS. La cual se fundió en horno de microondas, se colocó en tubos de 13X100, se enfriaron a 45° C y se les adicionó 150 µL del suero anticeruloplasmina. Se colocó el medio descrito en el paso anterior en placas de 35 mm marca Falcon, se esperó a que solidificara el medio. Posteriormente se socavaron pozos de 3 mm sobre las placas de agarosa, en cada pozo se adicionaron 5 µL de los sueros problema y el patrón de ceruloplasmina. Se mantuvo las placas en refrigeración por 48 hrs, transcurrido este tiempo se midieron los diámetros de los halos de precipitación.

Preparación de soluciones

Soluciones	Reactivo	Cantidad
Agarosa al 1%	Agarosa	1g
	PBS	100 mL
Suero anticerculoplasmina	Suero anticerculoplasmina	150µL
	PBS	2 mL

9.5.Determinación de nitritos por el método de Griess

Plateamiento del cadmio: En tubos de 13X100 se colocaron 0.5 g de cadmio metálico y se agregaron 2 mL de sulfato de cobre al 5%, se agitaron en un Rocker por 10 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada para eliminar el cobre y se realizó un último lavado con ácido clorhídrico 0.1N para remover el hidróxido de cadmio, aproximadamente a 2 volúmenes con el tubo lleno. Después se lavó el cadmio con cloruro de amonio al 5% pH=9, y se guardó en esta solución hasta su uso.

Preparación de la muestra: A 100 µL de suero se le adicionaron 300 µL de agua destilada (Dilución 1:4), se desecharon 20 µL y se les agregó 20 µL de una solución de ZnSO₄ al 30%, se mezclaron perfectamente, recordando que esta solución forma un precipitado de proteínas, por ello fue necesario centrifugar a 10 000 rpm por 5 min.

A los tubos con el cadmio activado se les retirará el NH₄Cl y se les adicionará el sobrenadante de la centrifugación anterior. Se taparon con parafilm y se agitaron en una plancha de agitación horizontal por 15 min. Se centrifugaron los tubos a 3500 rpm por 5 min, y se tomó una muestra de 200 µL del sobrenadante para el ensayo. Se construyó una curva de calibración con el patrón.

Curva patrón de nitritos por el método de Griess		
Tubo	Estándar (µL)*	Agua destilada (µL)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Muestras	200 del sobrenadante	700

Adicionar 50 µL de sulfanilamida. Incubar 10 min. (Temperatura ambiente)
Adicionar 50 µL del reactivo de NED, se mezclar e incubar 30 min. (Temperatura ambiente)
Leer a 540 nm.

* Concentración del estándar: 200 µg/mL de Nitrito de sodio.

Preparación de soluciones

Soluciones	Reactivos	Cantidad
Cadmio metálico	Cadmio metálico	500 mg
Solución acuosa de sulfato de cobre al 5%	Sulfato de cobre (CuSO ₄)	500 mg
	Agua destilada	100 mL
Solución acuosa de cloruro de amonio al 5% pH=9.*	Cloruro de amonio (NH ₄ HCl)	500 mg
	Agua destilada	100 mL
Solución acuosa de sulfato de zinc	Sulfato de zinc (ZNSO ₄)	300 g
	Agua destilada	1 L
Solución acuosa de ácido acético al 15% (V/V)	Ácido acético	
	Agua destilada	
Reactivo de sulfanilamida. **	Sulfanilamida	500 mg
	Ácido acético 15%	150 mL
Reactivo NED. N-(1-naftil)-etilendiaminodichlorhidratado. **	NED	200 mg
	Ácido acético 15%	150 mL
Estándar de Nitritos	Nitrito de sodio (NaNO ₂)	200 µg/mL

* Se ajusta el pH con borato de sodio

**Guardar en un frasco oscuro y protegerlo de la luz

9.6.Determinación de LPS por el método de ELISA polimixina B

Preparación de la muestra: Se tomaron 450 µL de muestra de saliva en tubos de ensayo y se adicionaron 50 µL de colato de sodio al 5%, se calentaron por 10 minutos a 100° C. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos. Se separó el sobrenadante y se reservó hasta su uso.

Se disolvió 1 mg de Sulfato de polimixina B en 20 mL de PBS (amortiguador de fosfatos 0.01M con 0.85% de cloruro de sodio) para obtener una concentración final de 50 µg/mL. Se colocaron 100 µL en cada pozo de una placa de ELISA irradiada con lámpara de UV durante 1 hora, se incubó a 37° C, se lavaron 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05% y se colocaron 200 µL de bloqueador en cada uno de los pozos, se incubó nuevamente a 37° C durante 45 minutos, se lavó 4 veces y se adicionaron 100 µL de cada una las muestras biológicas tratadas en cada pozo. Se cubrió la placa y se incubó a 37° C por 45 minutos. Se lavaron 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05%. Se colocaron 100 µL del sustrato y el cromógeno en cada pozo, se cubrió la placa y se incubó a 37° C 30 minutos. Se leyó la placa en un lector de ELISA Awareness Technology INC, a 450 nm.

Preparación de soluciones

Soluciones	Reactivo	Cantidad
Amortiguador de recubrimiento	Carbonato de sodio anhidro (Na ₂ CO ₃)	0.318 g
	Bicarbonato de sodio (NAHCO ₃)	0.586 g
	Agua bidestilada	200 mL
PBS-Tween 20 al 0.05%	PBS	1 L
	Tween	0.5 mL
PBS (pH = 7.2)	Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
	Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
	Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado (NaH ₂ PO ₄ 12 H ₂ O)	2.9 g
	Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
	Agua bidestilada	1L
	Solución bloqueadora	Leche descremada <i>sueltes</i>
	Albúmina sérica	1%
Sustrato	PBS	100 mL
	Solución A	
	Ácido cítrico (H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ •H ₂ O) 0.1 M	1.050 g
	PBS	50 mL
	Solución B	
	Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado (NaH ₂ PO ₄ 12 H ₂ O) 0.02 M	1.4196
	PBS	50 mL
	Solución C**	
	Solución A	24.3 mL
	Solución B	25.7 mL
Peroxidasa de rábano	Solución C	50 mL
	O-fenilendiamina	20 mg
	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) al 30 %	30 mL

* Almacenar a 4°C

** Preparar al momento, se daña con la luz.

9.7.Evaluación de la pérdida del hueso alveolar

Se esterilizaron las cabezas a 121° C, 15 lb de presión durante 15 minutos. Se sometieron a un proceso de descarnación, se blanquearon las mandíbulas con KOH al 40% durante 48 horas. La pérdida del hueso alveolar en el plano horizontal y vertical se evaluó dividiendo la mandíbula en cuadrante superior derecho, izquierdo, cuadrante inferior derecho e izquierdo. A cada cuadrante se le asignó un código proporcional al daño presentado en el hueso alveolar.

Códigos para el índice periodontal (IP)

Código	Significado
0	Tejido óseo normal, ausencia de resorción.
1	Resorción ósea incipiente en el reborde óseo, sin movilidad ni desalajo de dientes.
2	Resorción ósea de moderada a severa del reborde óseo, con o sin desalajo de dientes.

Una vez que se evaluaron los cuadrantes de cada individuo el cálculo del valor del IP se llevó a cabo aplicando la siguiente fórmula.

$$IP = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

De donde

$\sum_{i=1}^n X_i$ = a la sumatoria de todos los valores de los hallazgos clínicos de la condición periodontal de los cuadrantes examinados, y n es igual a 4. De esta manera tendremos un valor de IP que corresponde a una calificación del estado general de cada individuo en cuanto a su salud periodontal.

Interpretación de la calificación del IP

Calificaciones IP	Fase de la enfermedad
0 - 0.5	Sin enfermedad ósea destructiva
0.6 - 1.0	Inicio de la enfermedad ósea destructiva, daño leve del periodonto.
1.01 - 1.5	Daño moderado al periodonto, resorción evidente.
1.6 - 2.0	Daño grave e irreversible del periodonto, pérdida de piezas dentarias.

9.8. Diseño estadístico

Los resultados obtenidos de ceruloplasmina, nitritos, índice de órganos e IP se evaluaron mediante análisis de varianza de un factor seguido de la prueba de Tukey, mientras que para los resultados de ELISA se aplicó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson

Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico SPSS versión 11.0 para MS Windows

10. Resultados

Al realizar el análisis de varianza, a los resultados obtenidos de la inmunodifusión radial para la determinación de ceruloplasmina en suero, no hubo asociación del incremento de la concentración de ceruloplasmina con ninguna cepa ($P = 0.207$). Con respecto a la determinación de nitritos, el análisis de varianza de un factor no mostró una diferencia significativa entre los grupos ($P = 0.212$) ver cuadro 9.1.

Cuadro 9.1. Análisis de varianza por HSD de Tukey para los valores de concentración de ceruloplasmina y nitritos por cepa

	+/+	et/+	et/et	Sig.
Tamaño muestral ^{a b}	10	11	11	
Medias de la concentración de ceruloplasmina mg/dL	56.16	50.07	54.00	0.207
Medias de la concentración de nitritos en $\mu\text{g/mL}$	0.05764	0.09649	0.07487	0.212

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.645

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo 1 no están garantizados

Se realizó un análisis de varianza de un factor tomando los pesos absolutos del riñón, bazo e hígado, y se encontró que los ratones et/et mostraron mayor peso del riñón comparados con los pesos del riñón de los ratones +/+ ($P = 0.039$), no hay diferencia significativa con respecto a los ratones et/+ ($P = 0.921$), y respecto a los valores del índice hepático y esplénico no se encontró diferencia significativa entre los grupos. ($P = 0.218$; $P = 0.349$ respectivamente). Así mismo en relación al Índice Periodontal (IP), el grupo et/et presentó el menor grado de lesión en hueso alveolar comparados con las lesiones encontradas en los ratones progenitores +/+ ($P = 0.001$) y los portadores et/+ ($P = 0.0001$). Ver cuadro 9.2.

Cuadro 9.2. Medias de los índices renal, hepático y esplénico, e IP de las diferentes cepas de ratones.

	+/+	et/+	et/et
Índice renal	1.0840 \pm 0.1368*	1.1018 \pm 0.1186	1.2036 \pm 0.0408 ^a
Índice hepático	5.9360 \pm 1.3345	5.3018 \pm 0.5581	5.9582 \pm 0.5954
Índice esplénico	0.8710 \pm 1.3503	0.4318 \pm 0.1337	0.4073 \pm 0.0942
IP	1.3000 \pm 0.5986	1.2273 \pm 0.3945	0.4318 \pm 0.3371 ^b

*Media \pm desviación estándar

a. $P = 0.039$ +/+ vs et/et

b. $P = 0.0001$ et/et vs +/+ y $P = 0.001$ et/et vs et/+

En relación con la determinación del LPS de *P. gingivalis* en muestras de saliva por el método de ELISA polimixina, se utilizaron los títulos de LPS y conjugado obtenidos en la estandarización de la técnica ⁵¹. Se realizó el cálculo del valor del corte para la identificación de las muestras positivas tomando los valores de absorbancia de los controles de PBS. De tal modo, en las muestras de ratones todo valor que estaba por arriba del valor de corte fue considerado positivo y lo que fue igual o menor se consideró negativo. (Cuadro 9.3).

Cuadro 9.3. Resultados del ELISA ligado a polimixina aplicado a muestras de saliva de diferentes cepas de ratones.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS	PBS										
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	PBS
C	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	PBS
D	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	PBS	PBS
E	a	B	c	d	e	f	g	h	i	j	PBS	PBS
F	l	M	n	o	PBS							
G	p	Q	r	s	t	u	v	w	x	y	PBS	PBS
H	PBS											

Valor de corte: 0.0240

	Control positivo (LPS de <i>Pg</i> dilución 1/8)
1-22	Ratones sometidos a la infección con <i>P. gingivalis</i> . (1-10 +/+, 11-21 et/+, 22-32 et/et)
a - y	Ratones sometidos a la infección con <i>Prevotella intermedia</i> . Datos no utilizados.
	PBS, controles negativos.
	Muestras positivas a la presencia de LPS de <i>P. gingivalis</i>

Para determinar si la presencia del LPS en las muestras de saliva está relacionada con el grado de daño del hueso alveolar o IP, se eligió la prueba de Chi-cuadrado de Pearson. Se obtuvieron los resultados presentados en el cuadro 9.4, donde se observa que el estadístico presenta un valor superior al 20% y una frecuencia inferior a 5 por lo que se usó la razón de máxima verosimilitud donde el valor de P = 0.260, por lo tanto, no hay asociación entre las variables.

Cuadro 9.4. Resultados del test de Chi-cuadrado, para el IP y la presencia del LPS de *P. gingivalis* en muestras de saliva de las diferentes cepas de ratones.

	Valor	Gl	Sig. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.692 ^a	3	0.297
Razón de verosimilitud	4.013	3	0.260 ^b
N de casos válidos	32		

a. 6 casillas (75.0 %) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2.25

b. $P \geq 0.05$, las variables son independientes.

Se realizaron evaluaciones macroscópicas y con aumento a 40X para el cálculo del IP. Se omitieron las lesiones cariosas así como los incisivos.



Figura 5. Resorción en el ápice de los dientes, que afecta a las dos terceras partes de la longitud total de la raíz, pérdida del hueso interalveolar con márgenes incongruentes. Maxilar inferior de la mandíbula del ratón CD1 +/-



Figura 6. Resorción en el ápice de los dientes que afecta a las dos terceras partes de la longitud total de la raíz, pérdida del hueso interalveolar con márgenes incongruentes. Maxilar inferior de la mandíbula del ratón CD1 et/+

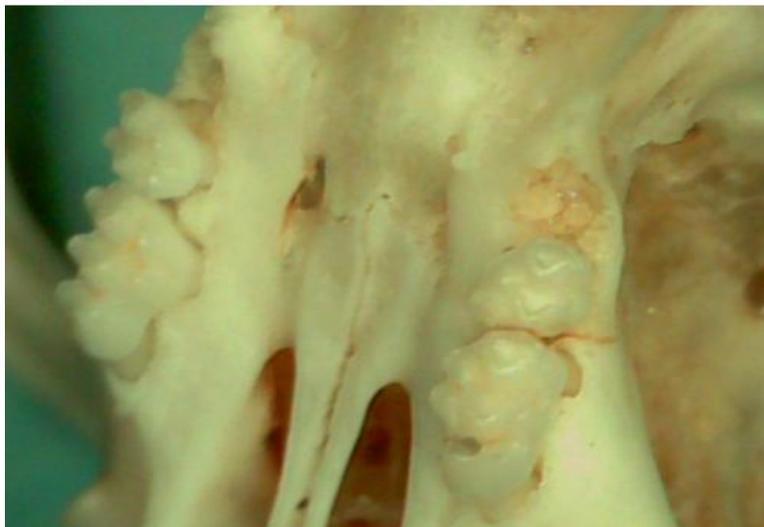


Figura 7. Resorción en el ápice de los dientes, exposición de las raíces dentales, pérdida dental en espejo del tercer molar, márgenes incongruentes con pérdida del hueso interalveolar afectando al segundo molar. Mandíbula del ratón CD1 et/+



Figura 8. Resorción moderada en el ápice de los dientes, que afecta la tercera parte de la longitud total de la raíz, no existe pérdida del hueso interalveolar, los márgenes son incongruentes sobre un diente sin afectar el hueso del diente contiguo. Mandíbula del ratón CD1 et/et.



Figura 9. Resorción moderada en el ápice de los dientes que afecta la tercera parte de la longitud total de la raíz, no existe pérdida del hueso interalveolar, los márgenes son congruentes. Mandíbula del ratón CD1 et/et.

11. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que los ratones et/et presentan un aumento en el tamaño del riñón con respecto a las cepa +/+ ($P = 0.039$), no hubo diferencia significativa respecto al grupo et/+. Solis G, 2005 reporta que los ratones et/et muestran una disminución en el peso del riñón debido a un claro daño a nivel glomerular y tubular implicado a la generación de complejos inmunes. Los complejos inmunes pueden formarse en la circulación cuando hay un exceso de antígenos o anticuerpos, los complejos tienden a depositarse en el riñón al filtrarse el suero a través de los glomérulos renales, de esta manera se acumulan dentro de las membranas basales de los capilares glomerulares. El depósito de estos complejos activa moléculas efectoras de la inmunidad del sistema del complemento lesionando los tejidos. Los datos encontrados en este experimento pueden explicarse con base en que el mecanismo de daño renal es el resultado de un proceso inflamatorio crónico generado a partir de la activación de la vía clásica del complemento por los depósitos de complejos inmunes, aunado a fallas en mecanismos regulatorios de la vía clásica y alterna encontradas en los ratones et/et, por tal motivo es claro inferir que el riñón presente un edema grave con infiltración celular que conlleva un aumento inicial en el peso del mismo, conforme la lesión avanza habrá pérdida de masa muscular y función renal. Este proceso inflamatorio crónico es similar al ocurrido en glándulas exócrinas, Marroquín *et al.* 2003 mencionan que los índices glandulares de las submaxilares de los ratones et/et alcanzan su máximo tamaño a las 19 semanas, mientras que para las lagrimales se alcanza su máximo entre las 22 y 26 semanas de edad. También se reporta que la severidad de las lesiones aparece a partir de la semana 22 y se incrementa conforme avanza la edad. Los ratones en este experimento fueron sacrificados entre la semana 21 y 23 de edad, periodo que corresponde al máximo tamaño glandular alcanzado por la cepa et/et. Por todo lo anterior el aumento en el peso del riñón en la cepa et/et no puede ser asociado a la infección por *Porphyromonas gingivalis*. En lo referente al índice esplénico y hepático no se encontró diferencias significativas entre los grupos ($P = 0.218$; $P = 0.349$ respectivamente).

En el cuadro 9.2 se observan los resultados referentes al Índice Periodontal (IP), donde el grupo et/et presentó el menor grado de lesión en hueso alveolar comparados con las lesiones encontradas en los ratones CD1 +/+ ($P = 0.001$) y los CD1 et/+ ($P = 0.0001$). Basurto *et al.*, 2000, indican que dentro de las características del ratón et/et se presenta la hipersegmentación de neutrófilos; factor que se traduce en una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas por una deficiencia en los procesos fagocíticos. Es ésta misma característica, la que en este caso proporciona mayor resistencia a los ratones et/et al desarrollo de la periodontitis generada por la infección de *Porphyromonas gingivalis*. Hay que recordar que las lesiones en el hueso alveolar observadas en la enfermedad periodontal son resultado de una hipersensibilidad celular a los antígenos de la placa. Dentro de este proceso de hipersensibilidad, los mecanismos que se consideran, participan en el desarrollo de las lesiones son: daño inducido por polimorfonucleares, daño por neutrófilos mediado por complemento, y daño mediado por células. Además al existir una alteración en los factores que normalmente limitan la respuesta inflamatoria, esta puede ejercer un efecto sinérgico sobre la respuesta inmune de forma que esta es excesiva, hasta provocar la destrucción progresiva del hueso.

En los ratones *et/et* se evita el proceso de hipersensibilidad y daño tisular debido a las alteraciones en las células fagocíticas posiblemente en lo referente a 1) liberación por parte de los neutrófilos de enzimas proteolíticas que contribuyen a la degradación de proteínas tisulares, 2) disminución de la desgranulación de PMNs que involucra la liberación de citocinas proinflamatorias y agentes quimiotácticos, y 3) la producción de IL-1 y TNF- α por macrófagos, relacionadas con la estimulación de la resorción ósea, la inducción de proteinasas y PGE₂. A diferencia de lo que ocurre en los ratones *et/et*, en los ratones de las cepas *+/+* y *et/+* éstos mecanismos no se ven alterados y por lo tanto la evolución de la enfermedad es rápida y puede verse claramente la resorción ósea y pérdida dental (fig. 5-9).

La determinación del LPS de *Porphyromonas gingivalis* con la técnica de ELISA ligado a polimixina se aplicó a las 32 muestras de saliva, de las cuales 16 resultaron positivas para el LPS representando el 50 % del total de las muestras tomadas, demostrando la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en los ratones trabajados.

Dado que *P. gingivalis* no es parte de la biota, al identificar el LPS, se establece la existencia de un proceso infeccioso, aunque esto no establece la etapa de la enfermedad periodontal, para que ocurra el daño tisular y la resorción ósea característicos de la periodontitis en etapa establecida o avanzada, es necesario que intervengan múltiples factores además de la existencia del agente patógeno, en muchos casos interviene la asociación con otras bacterias, la cantidad de placa bacteriana, un estado nutricional u hormonal alterado, así como una inadecuada o excesiva respuesta inmune por parte del huésped. Esta situación se comprueba al no encontrar asociación entre la presencia del LPS de *P. gingivalis* con el daño observado en el hueso alveolar ($P = 0.260$). Por ejemplo, en los ratones *+/+* y *et/+* donde el sistema inmune puede controlar y eliminar la infección por *P. gingivalis*, la existencia de linfocitos sensibilizados, los cuales pueden ser estimulados por antígenos de la placa, son los que llevan a cabo el proceso de hipersensibilidad. También es importante aclarar que este método aunque presenta una gran sensibilidad analítica, fue estandarizado para muestras tomadas directamente de las bolsas periodontales en humanos, situación que no pudo realizarse en los ratones, por lo que cabe esperar que las concentraciones de LPS en la saliva de los ratones sean menores.

Dado que las concentraciones séricas de ceruloplasmina y nitritos no difirieron entre tratamientos ($P = 0.207$; $P = 0.212$ respectivamente), se puede asumir que existe evidencia que indica que la reacción inflamatoria en los tejidos periodontales debido a la infección de *P. gingivalis* es idéntica en las tres cepas de ratones. Con base a lo anteriormente expuesto cabría esperar que los ratones de las cepas *+/+* y *et/+* presentaran mayores concentraciones de mediadores inflamatorios en respuesta a la enfermedad periodontal en comparación con los ratones *et/et*. Sin embargo, en el caso de los ratones *et/et* si bien la xerostomía no favorece el daño periodontal, si favorece el incremento de organismos generadores de caries, situación similar a la que presentan los pacientes con síndrome Sjögren, también favorece la formación de la placa lo que conlleva alteraciones en la configuración normal de la encía y permite la entrada de un mayor número de bacterias generando gingivitis; este proceso de inflamación crónica funciona como un mecanismo compensador, por lo tanto, los valores de concentración de nitritos y ceruloplasmina son semejantes en las tres cepas.

12. Conclusiones

Se logró montar satisfactoriamente el modelo animal de periodontitis causada por *P. gingivalis*, así como las técnicas inmunológicas y odontológicas, propuestas para la evaluación de la susceptibilidad de los ratones, que desarrollan la enfermedad.

Se consiguió obtener los índices renal, esplénico y hepático a partir de los órganos extraídos de los animales, además, se pudieron determinar a partir de las muestras de suero, las concentraciones de ceruloplasmina y nitritos. Al evaluar la hipótesis cabría esperar que los ratones de la cepa et/et, presentaran mayores índices en los órganos analizados y mayores concentraciones de mediadores inflamatorios en respuesta a la enfermedad periodontal en comparación con los ratones et/+ y +/+, sin embargo, en la determinación de nitritos, ceruloplasmina, índice hepático y esplénico, no hay diferencias entre las tres cepas. En cuanto a el índice renal, la cepa et/et es la que presenta los valores más elevados, esto debido a un proceso inflamatorio más que a uno infeccioso. Por tanto se concluye que la reacción inmunitaria inicial en respuesta a los antígenos de *P. gingivalis* es similar en las tres cepas trabajadas.

Se consiguió evaluar el grado de lesión del hueso alveolar mediante el cálculo del IP, encontrando que las lesiones de mayor grado se asocian a las cepas de ratones progenitores +/+ y portadores et/+. Las lesiones en el hueso alveolar de los ratones et/+ y +/+ se debe a la presencia de linfocitos sensibilizados que pueden reaccionar ante los antígenos de la placa u otros LPS de bacterias presentes en el ecosistema bucal, además las proteasas de *P. gingivalis* estimulan e inhiben la respuesta inmunitaria del huésped, estas enzimas degradan proteínas plasmáticas importantes en la iniciación y control de la respuesta inflamatoria, dando como resultado la activación de neutrófilos y macrófagos, que liberan mediadores cruciales en el proceso de inflamación con daño tisular y resorción ósea. La condición inmunológica del ratón et/et que incluye la disminución en la liberación de citocinas proinflamatorias, agentes quimiotácticos, moléculas relacionadas con la estimulación de la resorción ósea, la inducción de proteasas y prostaglandinas por parte de macrófagos y neutrófilos, evita el reclutamiento y el incremento en la densidad de células accesorias que es uno de los eventos más importantes en el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad.

No se encontró relación entre la presencia del LPS identificado por ELISA polimixina en muestras de saliva y el valor del IP, la presencia del LPS de *P. gingivalis* en saliva no indica el grado de avance del proceso periodontopagénico, puesto que si bien la periodontitis es una forma de hipersensibilidad, múltiples factores pueden relacionarse con la predisposición y progreso de la

enfermedad. Hay que destacar que en este trabajo se pudo aplicar una técnica estandarizada para muestras de bolsas periodontales en humanos y poderse montar en un modelo animal, con mínimas modificaciones y manteniendo un alta sensibilidad analítica.

La hipótesis del presente estudio planteaba que la xerostomía en los ratones *et/et*, era un factor que predisponía a estos ratones a sufrir un cuadro de periodontitis debido a la infección de *P. gingivalis*. Por lo anterior, la hipótesis se rechaza, ya que si bien los ratones *et/et* presentaron lesiones en el periodonto, los ratones CD1 *+/+* y CD1 *et/+* sufrieron mayores alteraciones anatómico-funcionales en la mandíbula.

Los resultados obtenidos muestran que el ratón CD1 *et/et* no puede ser ocupado como modelo animal para la investigación de enfermedades periodontales en pacientes que sufran el SS.

13. Glosario

Activación del complemento. Proceso por el cual las proteínas de la secuencia del complemento son alteradas por enzimas para volverlas funcionalmente activas.

Aerobio. Organismo capaz de aceptar el oxígeno como aceptor de electrones en el metabolismo.

Alergia. Estado alterado de reactividad inmunitaria, después de un segundo contacto con el Ag.

Anaerobio. Organismo que tiene la capacidad de vivir o metabolizar en ausencia de oxígeno.

Anaerobio estricto. Organismo que solo puede vivir en ausencia de oxígeno.

Anaerobio facultativo. Organismo que puede vivir en presencia de oxígeno, pero puede vivir sin él

Anosmia. Pérdida completa o parcial del olfato

Anticuerpo: inmunoglobulina producida como resultado de la introducción de un antígeno y que tiene la propiedad de combinarse específicamente con el antígeno que estimulo su producción.

Antígeno. Sustancia capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica de tipo humoral, celular o ambas.

Atrofia. Disminución en el tamaño o número, o en ambas cosas a la vez, de uno o varios tejidos que conforman un órgano, con la consiguiente pérdida de peso, volumen, y actividad funcional.

Autoanticuerpo. Anticuerpo capaz de reaccionar específicamente con un antígeno que es un constituyente normal del individuo en el cual el anticuerpo fue formado.

Autoantígeno. Sustancia capaz de provocar la aparición de anticuerpos (autoanticuerpos) en el seno mismo del organismo del cual proviene.

Autoinmunidad. Estado de inmunización de un sujeto a sus propios componentes antigénicos.

Bacilo. Bacteria en forma de bastón.

Biota. El total de organismos vivos en una región determinada.

Células B o linfocitos B. Células linfoides productoras de anticuerpos y sus precursores, que se diferencian bajo la influencia de la bolsa de Fabricio en las aves o su equivalente en los mamíferos.

Células cebadas. Célula de los tejidos que se parecen a los Basófilos de la sangre periférica, y que contienen gránulos con serotonina e histamina, así como receptores de membrana para la fracción FC de la IgE.

Células accesorias. Células predominantemente de tipo monocito y macrófagos que cooperan con los linfocitos T y B e la formación de anticuerpos y de otras reacciones inmunitarias.

Célula polimorfonuclear (PMN). Neutrófilo a granulocito, se deriva de una célula hematopoyética de la médula ósea y se caracteriza por su núcleo multilobulado. Los PMN migran de la circulación al sitio de inflamación por quimiotaxis y actúan como fagocitos.

Células T o linfocitos T. Células derivadas del timo que participan en diversas reacciones inmunitarias mediadas por células.

Citocinas. Término genérico para designar a las moléculas solubles que producen algunas células del sistema inmune.

Coco. Bacteria en forma esférica u oval.

Colpitis. También conocido como vaginitis, es una inflamación de la vagina.

Complejo inmune. Agregados macromoleculares de antígenos y anticuerpos que han reaccionado específicamente. Pueden presentarse en forma soluble cuando el antígeno o el anticuerpo se encuentra en exceso, o en forma de precipitados en la zona de equivalencia. Son importantes en la patogénesis de algunas enfermedades como la glomerulonefritis, vasculitis entre otras.

Complemento. Sistema enzimático de proteínas séricas que al activarse generan varias reacciones biológicas (fagocitosis, quimiotaxis, opsonización y citolisis). El sistema del complemento está constituido por nueve componentes que reaccionan en secuencia siguiendo dos vías (clásica y alterna) y se enuncian como C1, C2, C3, ----C9.

Coombs y Gell, clasificación. Esquema que distingue cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad.

Degranulación de células. Exocitosis de gránulos a partir de células cebadas y Basófilos.

Disfonia. Alteración en la voz que perturba la comunicación. Se manifiesta como un esfuerzo al emitir el sonido, dificultades para mantener la voz y cansancio al hablar.

Disnea. Dificultad para respirar.

Dispareunia. Coito doloroso en la mujer.

Ecosistema. El complejo de componentes vivos e inertes que interaccionan en un lugar determinado.

Elisa. Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas, técnica en la que una enzima se une en complejos con un antígeno o anticuerpo y un sustrato agregado que genera un color proporcional a la magnitud de la unión

Enfermedad. Estado en el que están alteradas las funciones del cuerpo como respuesta a una infección u otra condición.

Enzima. Catalizador orgánico que modifica la velocidad de reacción química sin sufrir cambio al terminar la reacción.

Epitopo. Un determinante antigénico. Funcionalmente es la porción de un antígeno, la cual se combina con el paratopo del anticuerpo.

Epistaxis. Hemorragia con origen en las fosas nasales.

Factor de necrosis tumoral. Citocina liberada por monocitos y macrófagos activados que tienen múltiples efectos en el sistema inmune, entre ellos, la regresión de tumores y la estimulación de algunas funciones de Eosinófilos, macrófagos y neutrófilos que permiten cierta protección contra patógenos.

Fc. Fragmento cristizable obtenido por la digestión de la molécula de IgG con papaína. Consiste en la mitad de los carbonos terminales de las dos cadenas H ligadas por enlaces disulfuro. No tiene capacidad de fijación del antígeno, pero es responsable de receptores celulares y la fijación del componente C1q del complemento.

Fagocitosis. Una forma de endocitosis. Importante mecanismo de defensa corporal, es el proceso por el cual las células especializadas atrapan y destruyen antígenos.

Fimbrias. Apéndices superficiales de algunas bacterias gramnegativas, compuestas de proteínas, son más cortas y delgadas que los flagelos.

Glositis. Inflamación de la lengua.

Hemaglutina. Cualquier sustancia que cause aglutinación de eritrocitos

Hemolisinas. Sustancia de origen bacteriano que provoca lisis de los eritrocitos.

Hipersensibilidad. Es un mecanismo de daño tisular, consecutivo a una respuesta inmune. Puede ser de tipo humoral o celular, y presentarse como respuesta secundaria, nunca como respuesta primaria a un antígeno.

HLA. Antígenos leucocitarios humanos, la mayor región genética de histocompatibilidad en el hombre.

Huésped. Hombre, animal o planta que aloja a un parásito.

Humoral. Relativo o perteneciente a los líquidos extracelulares, incluyendo la linfa y el suero.

IgA. Inmunoglobulina encontrada en las secreciones de mucosas. En el hombre se encuentra en forma de dímero. No atraviesa placenta, y su concentración en suero es de 3 mg/100 mL

IgD. Inmunoglobulina que predomina sobre los linfocitos B del hombre y tiene una baja concentración en suero.

IgE. Anticuerpo homocitotrópico. Presentes en el suero a una concentración de 0.05 mg /100 mL, pero elevada en los estados alérgicos y en infecciones por helmintos. Se une a la superficie de las células cebadas y causa degranulación al reaccionar con el antígeno específico, con la subsecuente liberación de sustancias vasoactivas.

IgG. Inmunoglobulina sérica más abundante en el humano. Atraviesa placenta, fija complemento y tiene buena capacidad precipitante y neutralizadora de antígenos. Se conocen 4 subclases en el hombre: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄

IgM. Macroglobulina. Es un pentámero cíclico con 5 unidades básicas unidas a través de puentes disulfuro. Excelente fijadora del complemento y aglutinante. No atraviesa placenta en el hombre. Es la primera inmunoglobulina que aparece en la escala filogenética y en el desarrollo ontogénico humano.

Infección. Invasión y multiplicación de microorganismos en los tejidos del huésped susceptible que puede llegar a producir enfermedad.

Inflamación. Reacción tisular a la lesión causada por agentes físicos o químicos, incluidos microorganismos. Los síntomas incluyen enrojecimiento, hipersensibilidad, dolor e hinchazón.

Inmunidad. Estado orgánico en el cual un individuo posee anticuerpos y linfocitos sensibilizados contra antígenos (simples o complejos). De tal suerte que éstos, son eliminados más rápidamente que en el estado no inmune. También es un estado orgánico que permite que un individuo resista a la infección.

Inmunidad innata. Son barreras mecánicas, químicas y celulares para resistir la infección.

Inmunidad mediada por células. Inmunidad en la cual participan predominantemente linfocitos y macrófagos.

Inóculo. Cierta cantidad utilizada para iniciar un cultivo bacteriano u otro ensayo biológico.

Interleucinas. Término genérico a un grupo de glicoproteínas que estimulan o afectan la función de los linfocitos y algunas otras células.

Lipopolisacárido. Compuestos derivados de diversas bacterias entéricas gramnegativas que tienen varias funciones biológicas, a concentraciones bajas el LPS estimula la producción de anticuerpos específicos para LPS. A concentraciones altas es un activador policlonal de células B. Los anticuerpos para los polisacáridos tienden a ser predominantes del tipo IgM.

Lisozima. Enzima que hidroliza la pared celular bacteriana. Se encuentra en las lágrimas y en los líquidos corporales.

Mc Farland. Método estandarizado de acuerdo al grado de turbidez para determinar el número de microorganismos en una suspensión o cultivo bacteriano, sin necesidad de cultivarlos o de hacer uso de algún aparato espectrofotométrico.

Medios de cultivo. Medio que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano. Puede ser líquidos (caldos) o sólidos (agar).

Medio de cultivo de enriquecimiento. Medio que favorece el desarrollo de uno o más microorganismos y suprime el resto.

Nicturia. Emisión de orina durante la noche.

Otitis. Inflamación del oído.

Patogenicidad. Capacidad de un microorganismo para causar una enfermedad.

Polaquiuria. Necesidad de orinar frecuentemente pero eliminando pequeñas cantidades de orina en cada micción.

Poliuria. Secreción y excreción de grandes volúmenes de orina.

Prostaglandinas. Derivados del ácido araquidónico farmacológicamente activos. Las diferentes prostaglandinas tienen la capacidad de modular la movilidad de las células y la respuesta inmunitaria.

Queilitis. Inflamación de los labios.

Xeroderma o xerodermia. Afección cutánea caracterizada por un estado rugoso, seco y descolorido de la piel.

Xeroftalmia. Enfermedad de los ojos caracterizada por la sequedad de la conjuntiva y opacidad de la córnea.

Xerostomía. Sequedad de la boca por mal funcionamiento de las glándulas salivales

14. Referencias

1. Stites D, Terr A, Parslow T. Inmunología básica y clínica. 9ª ed. México: El Manual moderno; 2000: p.28-36, 170-3, 178-80, 184-6, 214- 24, 244-47, 447-51,501-3, 509, 562-64, 651-54.
2. Fundación para el Síndrome de Sjögren. [internet] USA. Última actualización: mayo 2008. [Acceso octubre de 2009] Disponible en: <http://www.sjogrens.org/home/about-sjogrens-syndrome>.
3. Thomas E, Hay EM, Hajeer A, Silman AJ. Sjögren's syndrome: acommunity-based study of prevalence and impact. Br J Rheumatol 1998; 37:1069-76.
4. Andreoli T, Carpenter C, Griggs R, Loscano J. Cecil medicina interna. 5ª ed. Barcelona: Elsevier science; 2003: p.704-706.
5. Harrison T. Principios de medicina interna. 15ª ed. México: MacGraw–Hill interamericana; 2001: p.2277-2279.
6. Farreras P, Rozman C, Cardellach F, Serrano S, Ribera JM. Medicina interna. 14ª ed. Madrid: Elsevier; 2000: p.1272-1273.
7. Bardáles R. Manejo odontológico integral del paciente con síndrome de Sjögren. La carta odontológica 2001; 5(16):27-30.
8. Marroquín R, Lara MA, Calvillo R y col. Exocrinopatía mostrada en el ratón hipotímico CD1 et/et que semeja al síndrome de Sjögren. Vet. Méx 2003; 34 (2): 129-141.
9. Marroquín R, Martínez CF, García MM, Calvillo R, Mora JL, Flores M. Autoanticuerpos anti-Ro/ssa, anti-La/ssb y anticuerpos antifosfolípidos, en suero de ratones mutantes et/et que muestra exocrinopatía. Vet. Mex 2007; 38(3): 347-357.
10. Salinas MC. Inmunología médica. México: Mc Graw Hill; 2007: p.17-20, 149-54.
11. Peña J. Inmunología clínica bases moleculares y celulares. 2ª ed. Madrid: ARAN S. A; 2001: p.34-37, 159, 197-203.
12. Regueiro JR, López C, González S, Martínez E. Inmunología biología y patología del sistema inmune. 3ª ed. Madrid: Médica panamericana; 2002: p.111-19, 127-33, 147-55, 160-4.
13. Margni RA. Inmunología e inmunoquímica fundamentos. 5ª ed. Argentina: Médica panamericana; 1996: p.302, 378, 435-71, 639-48, 798.
14. Roitt I. Inmunología fundamentos. 10ª ed. Buenos aires: Médica panamericana; 2003: 17, 126-7, 147-57, 199-09, 283, 294.
15. Male D, Champion B, Cooke A. Advanced immunology. New York: J.B. Lippincott; 1987: 7.1-7, 11.1-3, 15.1-7.
16. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. Inmunología de Kubly.6a ed. México: MacGraw-Hill; 2007: p.340-6, 371-84,

17. Baynes J, Dominiczak M. Bioquímica médica. 2ª ed. Madrid: ELSEVIER MOSBY; 2006: p.8, 29, 69-70, 90, 590-91.
18. Yapur V, Bustos MF, González A, Negri G. Ceruloplasmin: measurement of serum ferroxidase activity. Acta Bioquím. Clín. Latinoam 2007; 41(3): 347-51.
19. Martínez-Subiela S, Tecles F, Parra M, Cerón J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. AN. VET. (MURCIA) 2001; 17: 97-114.
20. Guevara I, Iwannejko J, Dembinska-Kieé A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. Acta Bioquím. Clín 1998; 274: 177-8.
21. Tenorio FA, Valle L de, Pastelín G. Validation of a spectrophotometric analytical method for quantifying stable metabolites of nitric oxide in biological fluids. AFMAC 2005; 36 (1): 31-40.
22. Negroni M. Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica. 3ª ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2004: p.250-75.
23. Liébana J. Microbiología oral. México: MacGraw-Hill; 1997: p.247-48, 470-81.
24. Bartold P, Narayaan A S. Biology of the periodontal conective tissues. Illinois: Quintessence Publisher Co; 1998: p.200-15.
25. Burnett G, Schuster G. Oral microbiology and infectious disease. Student edition. Baltimore: The Williams & Wilkins; 1978: p.213-41.
26. Murrieta JF, López Y, Juárez LA, Linares C, Zurita V. Índices epidemiológicos de morbilidad bucal. México: UNAM Proyecto PAPIME; 2006: p.95-7, 137-53.
27. Neil J. Fisiología y bioquímica bucal. 4ª ed. México: Limusa; 1983: p.388-99.
28. Carranza F, Takel H, Newman M. Periodontología clínica. México: MacGraw-Hill; 2004: p.70, 104-7, 114, 149-51, 165-72.
29. Nolte W. Microbiología odontológica con nociones básicas de microbiología e inmunología. 3ª ed. México D.F: Interamericana; 1986: p.386-7, 620-35, 668-73.
30. Schluger S, Yuodelis R, Page R. Enfermedad periodontal, fenómenos básicos, manejo clínico e interrelaciones oclusares y restauraciones. México: Continental S. A; 1981: p.194-17, 224-28.
31. Torquil M, Geoffrey C. Fundamentos de parodoncia. México: Limusa; 1989: p.91-27.
32. Harris N, García-Godoy F. Odontología preventiva primaria. México: Manual moderno; 2001: p. 49-57,258-60.
33. Cuenca E, Manau C, Serra L. Odontología preventiva y comunitaria, principios métodos y aplicaciones. 2ª ed. Barcelona: MASSON; 2001: p.19-27, 137-52.
34. Higashida B. Odontología preventiva. México: Mac Graw-hill; 2000: p.61-87.
35. Finegold M, Baron J, Bailey & Scott E. Diagnóstico Microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004: p.548-50, 939.

36. Keith J, Westran R. Bacteriología clínica. Barcelona: MASSON; 2005: p.82-4.
37. Koneman E, Allen S, Janda W. Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas. 5ª ed. España: Médica panamericana; 2001: p.728-36.
38. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Madrid: Médica panamericana; 2003: p.228-30.
39. Romero R. Microbiología y parasitología humana, bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: médica panamericana; 2007: p.641-46, 671-73, 680-81.
40. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000, 1999; 20: 168-238.
41. Baker P, Dixon M, Roopenian D. Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. Infection and immunity 2000; 68(10): 5864-68.
42. López M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* en relación a las periodontitis agresivas. Rev Estomatol Herediana 2005; 15(2): 178-83.
43. Mikolajczyk J, Travis J, Potempa J. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. J Periodontol 2003; 74(1): 111-8.
44. Imamura T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. Microb Pathog 2002; 32(4): 173-81.
45. Brousseau P, Payette Y, Tryphonas H, Blakley B, Boermans H, Fournier M, et al. Manual of immunological methods. Florida: CRS Press; 1999: 87-92.
46. Flower D, Timmis J. In silico immunology. New York: Springer; 2007: 27-8.
47. Rojas O, Marroquín R, Wek K, Reyes E, Arce P. Susceptibility of “et,” the spontaneously mutating CD1-derived Nude Mouse, to infection of *M. lepraemurium*. International Journal of Leprosy 1998; 67(1): 46-51.
48. Solís González A. Determinación de constantes de unidades del complemento vía clásica y alternas en ratones CD1 et/et y su relación histopatológica de daño renal. Tesis de licenciatura. México D.F. Fes Zaragoza, UNAM; 2005.
49. Basurto FJ, Mondragón RL, Atilano D, y col. Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigoto et/+ y desnudo et/et. Vet. Méx 2000; 31 (3): 209-216.
50. Genco C, Van Dike T, Amar S. Animal models for *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. Trends in Microbiology 1998; 6 (11): 444-449.
51. Hernández León B. Z. Estandarización de ELISA polimixina para la identificación de LPS de *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* en muestras tomadas de bolsas periodontales. Tesis de licenciatura. México D.F. FES Zaragoza, UNAM; 2010.