



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Estrés oxidativo e interleucinas pro-inflamatorias y factor de necrosis tumoral alfa en adultos mayores y su asociación con enfermedad periodontal.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

NORMA LILIANA ANAYA ANAYA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
ASESOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ



CIUDAD DE MÉXICO. Noviembre 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

Los recursos para la elaboración de este proyecto fueron otorgados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave IN306213.

Agradezco a los miembros de la Unidad de Investigación en Gerontología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Raquel Retana Ugalde, por su paciencia, por el apoyo brindado y la dirección del trabajo.

Al Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez como responsable de la unidad y que me permitió realizar este proyecto.

A la Dra. Mirna Ruiz Ramos, por los consejos, por las correcciones realizadas, por su tiempo y paciencia

A mis sinodales el M.en C. Fernando Francisco Hernández Clemente y a la Mtra. Leonor Aguilar Santelises, por el tiempo que dedicaron a la revisión, los comentarios y las atinadas correcciones realizadas para la culminación de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios

Por permitirme llegar a este momento, por darme salud y fuerza para combatir cualquier adversidad.

A mis padres

Mamá gracias por todas tus enseñanzas, esfuerzos, sacrificios y regaños, porque me permitieron llegar a este punto, eres mi guía y mi ángel, te admiro tanto porque eres como el ave fénix que renace de las cenizas. Porque a pesar de todo siempre estás ahí para mí.

Papá gracias por todo tu esfuerzo, sacrificio, largas jornadas de trabajo, desvelos y regaños, por tus enseñanzas, por tus consejos, por creer y confiar en mí. Gracias por ayudarme a levantarme de mis caídas.

A ambos que, aunque hayan tomado caminos diferentes, siempre están en mi corazón y me brindan su apoyo incondicional, por esperar lo mejor de mí, por motivarme, por darme esta gran herencia, los adoro y los amo. Gracias por todo.

A mi Regina

Mi niña hermosa, gracias por haber llegado a mi vida, por ser mi motor, por darme fuerza cuando estoy agotada, por sacarme una sonrisa cuando estoy triste, porque eres mi gran tesoro y no te imaginas cuanto te amo. Gracias hija por acompañarme en esta parte del camino, por llenármelo de tantas alegrías.

A mis amigas

A Gise y Gaby, gracias por brindarme su amistad, por permitirme conocerlas, por regalarme tantas risas, por acompañarme y apoyarme, las quiero mucho.

A mi esposo

Hugo, por acompañarme en la parte final de este escrito, gracias por tu cariño y comprensión. Te amo.

Mi fiel amigo Shura gracias por acompañarme en todo momento.

CONTENIDO

I. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	7
II. RESUMEN	9
III. INTRODUCCIÓN	11
IV. MARCO TEÓRICO	13
IV.1. Envejecimiento.....	13
IV.2 Envejecimiento y su asociación con enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)	14
IV.3 Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)	14
IV.4. Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad	15
IV.5. Radicales libres en el envejecimiento	17
IV.6. Producción de oxidantes.....	19
IV.7. Antioxidantes	21
IV.8. Biomarcadores de estrés oxidativo	23
IV.9. Enfermedad periodontal.....	28
IV.10. Proceso inflamatorio crónico (PIC)	30
IV.11. Enfermedad periodontal y estrés oxidativo	32
IV.12. Interleucinas.....	34
IV.12.1 Interleucina 1 (IL-1)	35
IV.12.2 Interleucina 6 (IL-6)	35
IV.12.3 Interleucina-10 (IL-10)	36
IV.12.4. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).....	37
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
VI. HIPÓTESIS	40
VII. OBJETIVOS	41
VII.1. Objetivo general	41
VII.2. Objetivo específicos	41
VIII. MATERIAL Y MÉTODO	42
VIII.1. Tipo de estudio	42
VIII.2. Universo de estudio	42
VIII.2.1. Criterios de inclusión	42
VIII.2.2. Criterios de exclusión	42

VIII.2.3. Consideraciones éticas	43
VIII.3. Variables	43
VIII.3.1. Clasificación de variables	43
VIII.3.2. Operacionalización de variables.....	46
VIII.4.1. Evaluación de la profundidad del surco gingival.....	49
VIII.4.2. Sonda y procedimientos de sondaje.....	51
VIII.4.3. Colección de muestras sanguíneas.....	53
VIII.4.4. Determinación de los parámetros bioquímicos.....	53
VIII.4.5. Citometría de flujo	56
VIII.4.6 Biomarcadores de estrés oxidativo.....	64
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
X. RESULTADOS	73
XI. DISCUSIÓN.....	82
XII. CONCLUSIONES	86
XIII. PERSPECTIVAS	87
XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
XV. ANEXO	92
XV.1. Carta de consentimiento informado	92
XV.2. Índice Periodontal de Ramfjord	96

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro IV.4 1 Enfermedades vinculadas con el estrés oxidativo	17
Cuadro X. 1 Parámetros bioquímicos de los adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal.....	75
Cuadro X. 2 Marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal	76
Cuadro X. 3 Concentración de interleucinas en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal.	77
Cuadro X. 4 Frecuencia de los marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal	78
Cuadro X. 5 Relación de la enfermedad periodontal con los marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores.....	79
Figura IV.4. 1 Estrés oxidativo, homeostasis y enfermedad	16
Figura IV.7. 1 Clasificación de los sistemas antioxidantes.....	22
Figura IV.8. 1 Reacción de lipoperoxidación.....	25
Figura IV.9. 1 Relación espacial entre el infiltrado y la pérdida del hueso periodontal.....	29
Figura X. 1 Comparación de estrés oxidativo en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal.	80
Figura X. 2 Comparación de estrés oxidativo por grados en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal.....	81

I. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABTS	2,2'azido-di-etilbenzotiazolin sulfonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AOx	Antioxidantes
BHT	Butiril hidroxitolueno
CAT	Capacidad antioxidante total
°C	Grado Celsius de temperatura
DM	Diabetes mellitus
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
EDTA	Etilendiamintetraacetato
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EOx	Estrés oxidativo
EP	Enfermedad periodontal
ERNs	Especies reactivas del nitrógeno
EROs	Especies reactivas del oxígeno
GAP	Brecha antioxidante o capacidad antioxidante residual
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro (forma oxidada)
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
IC _{95%}	Índice de confianza al 95%
IEP	Índice de enfermedad periodontal
IL	Interleucina
INT	p-iodonitrotetrazolio
L	Litro
LAC	Limite amelo cementario
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPO	Lipoperóxidos
LPS	Lipopolisacaridos
MDA	Malondialdehído
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mmol	Milimol
NADPH	Nicotin adenin dinucleotido fosfato reducido
nm	Nanómetro
O ₂	Oxígeno molecular
PIC	Proceso inflamatorio crónico
pg	Picogramos
PMN	Polimorfonucleares
RL	Radical libre
rpm	Revoluciones por minuto

SINAIS	Sistema nacional de información en salud
SOD	Superóxido dismutasa
SOD/GPx	Razón SOD/GPx
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TEAC	Actividad antioxidante en equivalentes Trolox
Th	Células T cooperadoras
TLR	Receptores de tipo toll
TMP	Tetrametoxipropano
TNF	Factor de necrosis tumoral
XO	Xantina oxidasa
8-OHdG	8-hidroxi-2'desoxiguanosina

II. RESUMEN

ANTECEDENTES: La periodontitis es una infección que desencadena los mecanismos de inflamación, pérdida del ligamento periodontal y del hueso alveolar que soporta al diente, en este sentido se ha señalado que el estrés oxidativo (EOx) y la inflamación crónica están envueltas en la patogénesis de esta enfermedad. Las altas concentraciones de las especies reactivas del oxígeno (ERO's) y una disminución del sistema antioxidante provocan EOx, lo cual es perjudicial para el organismo, y puede favorecer la presencia o complicaciones de varios padecimientos agudos y crónicos. Además se ha observado que el tejido conectivo destruido durante la enfermedad periodontal (EP) desencadena la liberación de interleucinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6 y TNF- α .

En este sentido, la determinación de EOx y las interleucinas pro-inflamatorias puede ser un marcador biológico que permita conocer el grado de daño asociado con la enfermedad periodontal (EP) en los adultos mayores.

OBJETIVO: Determinar la asociación del estrés oxidativo y el proceso inflamatorio crónico con la enfermedad periodontal en adultos mayores.

MATERIAL Y MÉTODO: Se llevó a cabo un estudio observacional, prolectivo, transversal y comparativo con una muestra de 75 adultos mayores, de los cuales 41 eran sanos y 34 con enfermedad periodontal. A todos los participantes se les determinaron marcadores de estrés oxidativo: lipoperóxidos (LPO), y capacidad antioxidante total sérica (CAT) por métodos colorimétricos, así como la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) (Randox laboratorios Ltd®), se calculó la razón SOD/GPx y la brecha antioxidante (GAP). Asimismo, se clasificó a los pacientes con y sin EOx utilizando puntos de corte para cada marcador. La IL-1, IL-6, IL-10 y el TNF- α fueron determinados mediante citometría de flujo. (Citómetro BDFACSAria II). El estado de salud periodontal de cada sujeto fue medido utilizando el índice de enfermedad periodontal (PDI). El procedimiento de examen consistió en la inserción de una sonda periodontal entre el diente y la encía a una fuerza estándar para medir la profundidad de la bolsa. Los datos fueron analizados a través de estadística descriptiva, frecuencias, porcentajes, valores promedio y desviación estándar (DE), como prueba de comparación se empleó t Student y X² con un nivel de confianza del 95%, utilizando el paquete estadístico SPSS V.15.0.

RESULTADOS: Los resultados obtenidos mostraron una disminución estadísticamente significativa en la actividad antioxidante total en los adultos mayores que presentaron periodontitis (1.13 ± 0.39 vs. 0.92 ± 0.26 mmol/L), así como en la brecha antioxidante (GAP), también se observó un aumento estadísticamente significativo en la concentración de IL-1 (6.6 ± 1.7 vs 51.5 ± 17.6 pg/mL) e IL-6 (0.8 ± 0.16 vs 3.2 ± 0.77 pg/mL). En relación al EOx los

adultos mayores con enfermedad periodontal mostraron un 10% más EOx que los adultos mayores sanos, lo cual es acorde con el aumento de las ERO's provocado por el proceso inflamatorio de la enfermedad y la disminución de la eficiencia antioxidante.

CONCLUSIONES: Nuestros resultados sugieren que los adultos mayores con enfermedad periodontal muestran EOx, disminución de la actividad antioxidante total y un aumento de la concentración de interleucinas pro-inflamatorias en comparación con los adultos mayores sanos.

III. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso gradual y adaptativo que se caracteriza por una disminución de la respuesta homeostática, debido a las diferentes modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, generado por los cambios inherentes a la edad y al desgaste acumulado ante los retos que enfrenta el organismo. Una de las alteraciones bioquímicas que ha sido relacionada con el envejecimiento es el estrés oxidativo.¹

El estrés oxidativo (EOx) es un proceso que se caracteriza por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) con respecto a los antioxidantes a favor de los primeros, generando un daño oxidativo a macromoléculas: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. A su vez el EOx ha sido asociado con los mecanismos fisiopatológicos de numerosas enfermedades crónico degenerativas como es el caso de la periodontitis.^{1,2}

La periodontitis es una infección crónica bacteriana, que desencadena mecanismos de inflamación sistémica mediados por las interacciones parásito-hospedero donde hay pérdida y destrucción de tejido conectivo y del hueso alveolar que soportan al diente, ambos eventos se han asociado a la presencia de EOx, ya que el balance entre los mecanismos pro-oxidantes y la defensa antioxidante se encuentra a favor de la destrucción del periodonto por el aumento de las especies reactivas del oxígeno (ERO's) y la disminución de la actividad antioxidante.^{3,4,5} Se ha propuesto que el EOx es un elemento importante en la fisiopatogenia del proceso inflamatorio crónico que caracteriza a la enfermedad periodontal (EP).²

Asimismo, la destrucción del periodonto ocurre mediante la activación de los leucocitos polimorfonucleares lo cuales generan ERO's durante condiciones inflamatorias, así como el aumento de la producción de factores pro-inflamatorios como IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).^{6,7}

Sin embargo, hay pocos estudios en este sentido; por lo que es necesario conocer la asociación entre el EOx y las interleucinas pro-inflamatorias con la EP.

IV. MARCO TEÓRICO

IV.1. Envejecimiento

El envejecimiento humano es un proceso universal y multifactorial caracterizado por modificaciones a nivel biológico, psicológico y social, determinado por factores de tipo genético, ambiental y sociocultural que se presenta en todos los individuos a diferente ritmo y manera. ⁸ Es un “proceso gradual y adaptativo, caracterizado por una disminución relativa de la repuesta homeostática, debida a las modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, propiciadas por los cambios inherentes a la edad y al desgaste acumulado ante los retos que enfrenta el organismo a lo largo de la historia del individuo en un ambiente determinado”.¹

Algunas definiciones de envejecimiento lo describen como un proceso acumulativo e irreversible con deterioro progresivo de todos los órganos y tejidos con la subsiguiente disminución de la actividad fisiológica del organismo, hasta hacerlo incapaz de enfrentar las circunstancias y condiciones de su entorno, propiciando una mayor vulnerabilidad para enfermedades infecciosas, metabólicas, autoinmunes, neoplásicas, respiratorias, articulares y cardiovasculares.^{9,10} Además en la actualidad existe evidencia significativa de que el envejecimiento implica la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO's) y la correspondiente respuesta al estrés oxidativo como factores clave.¹¹

IV.2 Envejecimiento y su asociación con enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)

Las ECNT más frecuentes durante la vejez en el mundo son similares, entre las que se pueden mencionar la hipertensión arterial, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), el cáncer, la artritis, la osteoporosis, la depresión y demencia.¹²

El aumento en la prevalencia de la DM2 es una carga significativa para la salud de la población en nuestro país, sobre todo por las complicaciones que desencadena la enfermedad.¹⁴

En México se registra un aumento de las enfermedades no transmisibles, entre las que se encuentra la DM2, como consecuencia del envejecimiento de la población.¹⁵ Además el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) informó que en el 2008 la DM2 fue la primera causa de muerte en edad postproductiva (65 años y más).¹⁶

IV.3 Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)

Las ECNT son aquellas que comúnmente se adquieren por medio de estilos de vida inapropiados, aunque siempre hay que considerar que existen factores genéticos de naturaleza hereditaria que concierne a estas condiciones. La diferencia entre una condición crónica y una infecto-contagiosa se fundamenta sobre el hecho de que las enfermedades crónicas no son transmitidas mediante el contacto personal.⁹

Las ECNT afectan prácticamente a cualquier órgano o tejido del cuerpo humano, sin embargo, algunos de ellos destacan por su alta frecuencia y por

los graves daños que producen a quienes lo padecen; entre ellos se encuentran la obesidad, la enfermedad cardiovascular y cerebrovascular, hipertensión arterial y diabetes mellitus; cáncer pulmonar, cáncer cérvico uterino, cáncer de mama y cáncer de próstata, insuficiencia renal, trastornos oculares como el glaucoma o pérdida de la visión, así como los problemas articulares y de los tejidos blandos; depresión, demencias, caries y enfermedad periodontal.¹⁷

El envejecimiento cursa con un proceso inflamatorio crónico aumentando la vulnerabilidad para la presencia de las ECNT.¹⁸

IV.4. Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad

El estrés oxidativo (EOx) es un proceso que se caracteriza por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) con respecto a los antioxidantes a favor de los radicales libres, generando un daño oxidativo a macromoléculas (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), a su vez el EOx ha sido asociado con los mecanismos fisiopatológicos de numerosas ECNT.^{19,20} Por lo que el equilibrio entre la producción de las ERO's y las defensas antioxidantes determina el grado de EOx.¹¹

Sin embargo, el EOx severo puede ocasionar muerte celular y la oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis y si es muy intensa puede provocar necrosis.²¹

Es importante señalar que hay un aumento de la producción de los RL durante el envejecimiento, por lo que en esta etapa de la vida, el EOx se observa como una condición normal desde el punto de vista estadístico, aunque no deseable desde el punto de vista biológico, debido a que los RL provocan daño oxidativo a macromoléculas y esto favorece la presencia o complicaciones de varios padecimientos agudos y crónicos, entre los cuales se encuentran los procesos inflamatorios, DM2, aterosclerosis, EP y caries entre otros.¹

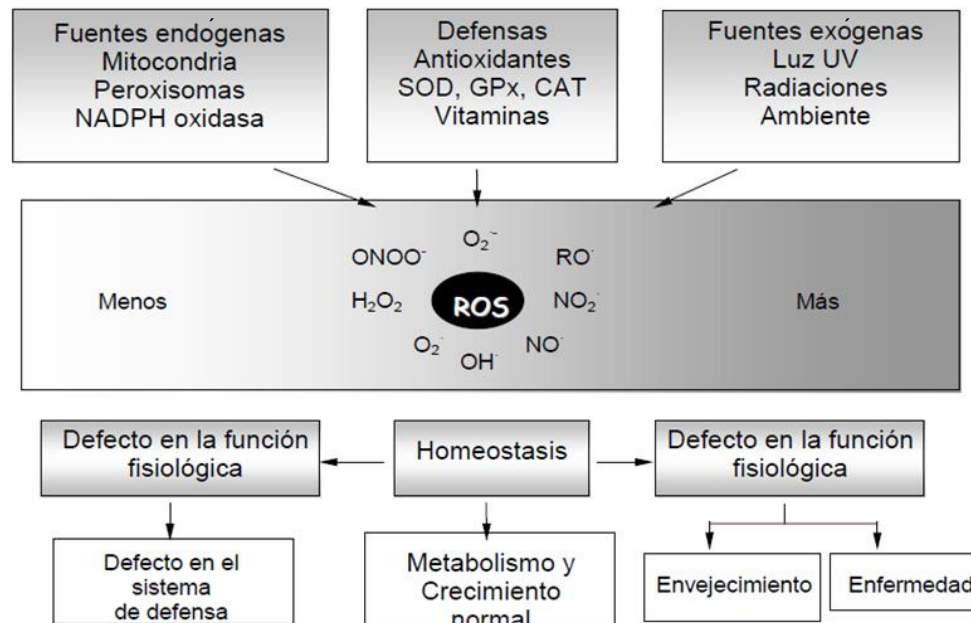


Figura IV.4. 1 Estrés oxidativo, homeostasis y enfermedad (Tomado de Finkel y Holbrook, 2000)

La producción de ERO's es inevitable en los organismos aeróbicos incluyendo los humanos, los cuales necesariamente poseen un complejo sistema de defensa antioxidante, si la homeostasis es interrumpida en favor de las ERO's se crea una situación de EOx.²²

Cuadro IV.4 1 Enfermedades vinculadas con el estrés oxidativo

I.	Cardiovascular
II.	Neurológico
III.	Infecciosos
IV.	Cáncer
V.	Isquemia-reperfusión
VI.	Respiratorio
VII.	Endocrino
VIII.	Renal
IX.	Hepático
X.	Huesos y articulaciones
XI.	Ojos
XII.	Páncreas
XIII.	Bucodental
XIV.	Piel

Tomado de: Sánchez-Rodríguez MA, 2004

IV.5. Radicales libres en el envejecimiento

Harman en 1956 propuso la teoría de los radicales libres (RL) en donde explica que el envejecimiento está asociado a la pérdida de capacidad funcional debido a la acumulación del daño molecular oxidativo generado por reacciones de RL a partir de este planteamiento se despertó un gran interés por estudiar el proceso de envejecimiento y el papel de los RL asociado a este fenómeno.²²

Un RL es un átomo o molécula que contiene un electrón desapareado, por lo cual es una especie altamente inestable y reactiva, por lo que precisa de

obtener el átomo que le falta de las moléculas vecinas y dependiendo de dónde y cuánto se genere, puede estabilizarse tomando el electrón que requiere de las biomoléculas cercanas a él, y si esto ocurre, se puede dañar la fisiología de las células al oxidar ya sea a los lípidos de la membrana, carbohidratos, proteínas y al ADN, esta oxidación es el origen de la mayoría de los trastornos orgánicos degenerativos.^{20,23,24,25,26}

La fuente más común de RL en los sistemas biológicos es el oxígeno molecular (O_2), este es fundamental para el metabolismo celular y la producción de energía además de ser más susceptible a ser transformado, su reducción involucra cuatro electrones y genera tres especies reactivas de oxígeno (ERO's): anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}).^{1,23} Las ERO's han surgido como una importante molécula de señalización en varios procesos celulares. Estas moléculas se originan del oxígeno molecular, y principalmente causan daño a células si no son neutralizados por los antioxidantes (AOx)²⁷

Otras fuentes de RL son los peroxisomas los cuales generan H_2O_2 y los leucocitos polimorfonucleares.²⁸

El H_2O_2 no es un radical libre, pero pertenece a las ERO's ya que es un compuesto intermediario importante en la bioquímica de los RL, debido a que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición, para producir el radical hidroxilo OH^{\cdot} , el cual es el más reactivo y dañino de los RL del oxígeno.^{1,29}

Estas moléculas, en particular el radical hidroxilo (OH^\cdot) ataca la base de los ácidos nucleicos, al aminoácido en la cadena de proteínas y el doble enlace de los ácidos grasos insaturados, lo cual compromete de manera rápida la integridad y función de la célula.³⁰

Los RL continuamente son elaborados como producto del metabolismo normal de cada célula por lo que al elevarse o disminuir las concentraciones de las ERO's puede acarrear importantes alteraciones funcionales, además cuando un RL oxida a una biomolécula, este pierde su función específica en la célula.²⁸ Numerosos estudios han demostrado que las ERO's participan activamente en las diversas gamas de procesos biológicos, incluyendo células de crecimiento, el envejecimiento de la célula y apoptosis.³¹

IV.6. Producción de oxidantes

Los oxidantes son generados como resultado del metabolismo intracelular normal en la mitocondria y en los peroxisomas, así como también de una variedad de sistema de enzimas citosólicas.¹¹ La mayor producción del radical superóxido (O_2^\cdot) mitocondrial ocurre en dos puntos discretos de la cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria), en el llamado complejo I (NADH deshidrogenasa) y en el complejo III (ubiquinona-citocromo c reductasa)^{12,13}. Bajo condiciones normales, el complejo III es el principal sitio de producción de ERO's. Los electrones del complejo I y II son transferidos a la coenzima Q o también llamada ubiquinona (Q), produciéndose la reducción de la coenzima

(QH₂) que posteriormente se somete a dos reducciones consecutivas de un electrón, en el ciclo Q, usando formas oxidadas y reducidas del citocromo *b* y *c*, se forma un intermediario inestable de la coenzima Q (Q^{•-}) y conduce a la formación de O₂^{•-} por la transferencia de electrones directamente del oxígeno molecular.¹¹

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos (y en menor cantidad eosinófilos, linfocitos y fibroblastos) son ejemplos de células que producen O₂^{•-} como agente antimicrobiano, ya que se encargan de la eliminación de las bacterias y otros patógenos que invaden el organismo. Esta eliminación se lleva a cabo a través de la fagocitosis en donde se generan RL de manera premeditadamente. La muerte de las bacterias ocurre debido a la producción de ERO's, los fagocitos se caracterizan por tener una gran capacidad de generar el radical O₂^{•-}.^{32,33,34} Además las ERO's tienen una vida media extremadamente corta, pero pueden causar daño al tejido mediante la iniciación de las reacciones en cadena de los RL.³⁵

Por lo que las fuentes endógenas principales de formación de RL y ERO's son:

- Subproductos de las rutas metabólicas, fuga de electrones mitocondrial de los sistemas de transporte de electrones formando O₂^{•-}.
- Generación por las células de defensa del huésped (fagocitos) y las células de los tejidos conectivos (osteoclastos y fibroblastos).³⁶

IV.7. Antioxidantes

El cuerpo consta de un número de mecanismos antioxidantes protectores, cuyo papel específico es eliminar el daño de los oxidantes una vez formados o reparar el daño causado por las ERO's.³⁷

Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que están presentes en concentraciones bajas, en comparación con las de un sustrato oxidable, por lo que significativamente retrasan o inhiben la oxidación de dicho sustrato.²⁶

En la fisiología normal existe un equilibrio dinámico entre la actividad de las ERO's y la capacidad del sistema de defensa antioxidante y cuando este equilibrio se desplaza en favor de ERO's; ya sea por una disminución de las defensas antioxidantes o un aumento de la producción de ERO's, da como resultado EOx.³⁶ En este sentido el sistema de defensa tanto enzimático como no enzimático, incluyendo superóxido dismutasa (SOD), y glutatión peroxidasa (GPx), contrarrestan y regulan los niveles de ERO's para mantener la homeostasis.¹¹

Los sistemas de defensa antioxidantes del cuerpo humano son complejos ya que operan a diferentes niveles y de acuerdo a estas características se le ha clasificado como primarios, secundarios y terciarios.

- Antioxidantes primarios: son aquellos que previenen la formación de radicales libres, estos son: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa, albúmina y proteínas atrapadoras de metales.
- Antioxidantes secundarios: estos capturan los RL, evitando las reacciones en cadena o interrumpiendo la propagación de estos, entre los cuales se encuentran: vitaminas C y E, ácido úrico, estrógenos, melatonina, β -carotenos y bilirrubina.
- Antioxidantes terciarios: estos reparan las biomoléculas dañadas, dentro de los cuales se encuentran: enzimas reparadoras tanto de lípidos, proteínas y de ADN.¹

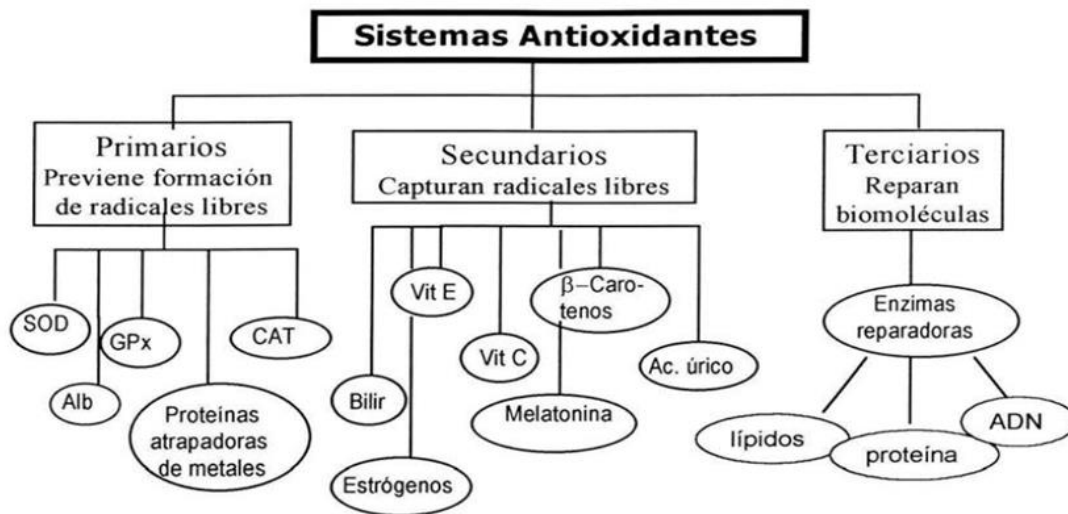


Figura IV.7. 1 Clasificación de los sistemas antioxidantes (Tomado del Sánchez-Rodríguez y Mendoza Núñez 2003)

IV.8. Biomarcadores de estrés oxidativo

Un marcador es un átomo o molécula fijada a un ligando o a una proteína capaz de generar una señal para monitorizar la reacción de unión. Por lo que debido al dinamismo y complejidad del proceso en el que se encuentran involucrados los biomarcadores de oxidación y los antioxidantes, se debe evaluar de manera simultánea varios marcadores para obtener una mejor aproximación en la determinación del EOx.²

Las principales fuentes de biomarcadores de la actividad de las ERO's son:

- Peroxidación de lípidos
- Productos de hidroxilación de proteínas como los aminoácidos oxidados
- Daño al ADN
- Daño a carbohidratos.^{2,36}

Peroxidación lipídica (LPO)

Los lípidos, son las biomoléculas más susceptibles a ser atacadas por los radicales libres (RL). La peroxidación lipídica se inicia por el ataque de un ácido graso, específicamente los poli-insaturados que son fácilmente oxidables por lo que cuanto mayor es el número de dobles enlaces en una cadena lateral de ácido graso, más fácil es la eliminación de un átomo de hidrógeno, que es la razón por la cual los ácidos grasos poli-insaturados son particularmente susceptibles a la peroxidación.^{38,39}

Las membranas celulares son ricas en ácidos grasos poli-insaturados lo que las hace muy accesibles y susceptibles al ataque oxidativo, este proceso daña de forma directa la estructura de la membrana celular y también de manera indirecta por la formación de aldehídos reactivos.^{2,38}

La activación de los leucocitos provoca la liberación de ERO's, que conlleva al desencadenamiento de la peroxidación lipídica, mecanismo por el cual se desarrollan los cambios morfofuncionales en el periodonto lo cual resulta en la destrucción del colágeno y reabsorción ósea.²⁸

El procedimiento frecuentemente utilizado en los tejidos y fluidos humanos es la medición del malondialdehído (MDA) acoplado a ácido tiobarbitúrico (TBA). Las sustancias de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS) comprenden uno de los marcadores más tempranos en el uso de estudios humanos y animales.³⁷ El ensayo de TBARS es un simple ensayo espectrofotométrico que mide un cromógeno que es producido por la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA), que es un producto final de la peroxidación lipídica. El ensayo espectrofotométrico de TBARS es extremadamente fácil y sencillo de utilizar, pero no es específico, ya que otros sustratos pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico.⁴⁰

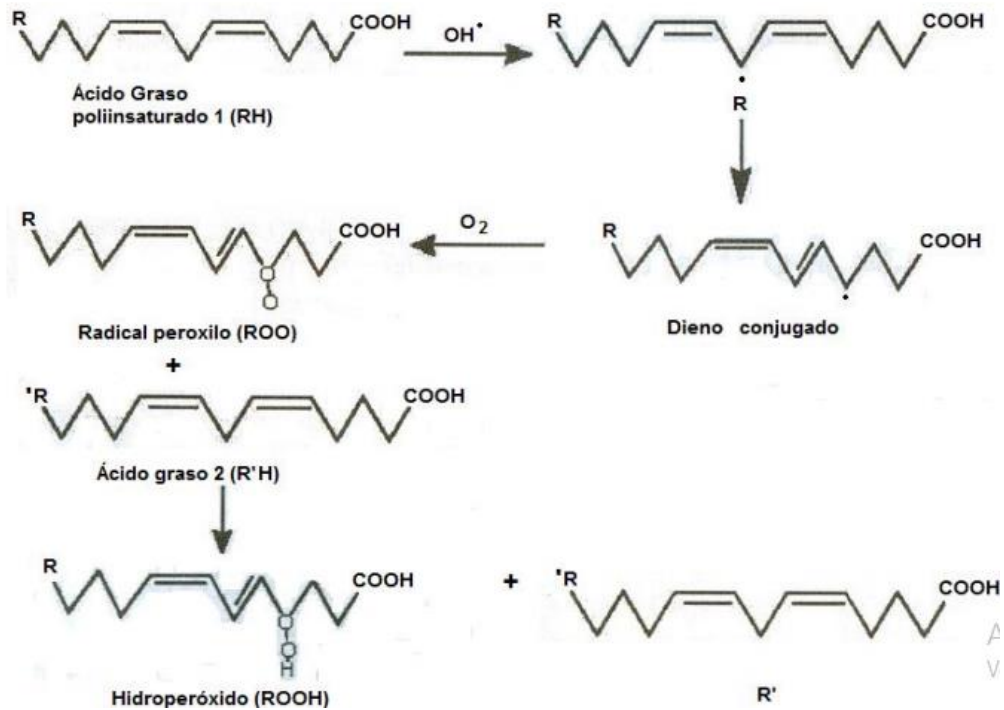


Figura IV.8. 1 Reacción de lipoperoxidación

Daño a proteínas

El ataque llevado a cabo por los RL a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede aumentar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de la estructura ya sea terciaria o cuaternaria, debido a que todos los residuos de aminoácidos son susceptibles del ataque por el radical hidroxilo (OH^\bullet), generándose una oxidación y se forman entonces las proteínas carboniladas. Estos compuestos son muy lábiles, por lo que se dificulta su medición.³⁸

Daño al ADN

El ADN es una de las biomoléculas altamente susceptibles al daño ocasionado por los RL, lo que da lugar a la oxidación de sus bases y del anillo del azúcar ribosa, lo cual lleva a la pérdida de la base y roturas de la cadena.²¹

El daño oxidativo al ADN se puede medir mediante la presencia de los productos de oxidación de la guanosina: 8-hidroxiguanosina (8OHG) y su nucleótido 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) por técnicas de HPLC, ELISA o por medio de la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa.³⁸

Enzimas antioxidantes

Por otra parte, también se han propuesto como biomarcadores de EOX al sistema antioxidante a través de la medición de las siguientes enzimas: SOD, GPx y catalasa, además de la capacidad sérica antioxidante total (CAT) y de la brecha antioxidante (GAP).³⁸

Para la medición de los antioxidantes extracelulares se realiza a través de la capacidad sérica antioxidante total (CAT), en la cual se considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes tanto en el plasma así como en los fluidos corporales y depende de la capacidad y cantidad de albúmina y de ácido úrico.^{38,41}

Las técnicas que se han desarrollado para medir la capacidad antioxidante total (CAT) de las muestras biológicas, valoran la capacidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes

en él o en la célula, para reducir las especies oxidantes introducidas en el sistema de ensayo.⁴⁰

Por otra parte, para la valoración de los mecanismos antioxidantes intracelulares se utiliza frecuentemente el seguimiento de la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD, GPx y catalasa, empleando diversos sustratos.⁴⁰

Para la SOD se emplea frecuentemente un método indirecto, en donde se genera $O_2^{\cdot-}$ con la enzima xantina oxidasa (XO) a partir de xantina (sustrato), y la SOD compite por un colorante indicador por el $O_2^{\cdot-}$.³⁸

Por otro lado la GPx cataliza la reacción a través de la cual el glutatión reducido (GSH) reacciona con los peróxidos para transformarlos en agua y alcohol. Durante este proceso el glutatión es oxidado (GSSG), para posteriormente ser regresado a su estado original, por la enzima glutatión reductasa.⁴²

Con respecto a la actividad de CAT, se utiliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por disminución de la absorbancia a 240 nm.³⁸

Cuando el sistema de defensa antioxidante no es suficiente y hay daño a macromoléculas se inicia un complejo sistema de reparación, lo que puede limitar y reparar parcialmente el daño o enviar la macromolécula a destrucción y de ser muy abundante el daño, someter la célula a apoptosis; tratando de evitar un daño grave al órgano o al organismo, por lo que todos estos mecanismos y respuestas condicionan el EOx.⁴¹

IV.9. Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal (EP) es uno de los trastornos crónicos más comunes, la cual es de origen infeccioso y con una alta prevalencia.²¹

La periodontitis es una infección crónica bacteriana, que desencadena los mecanismos de inflamación, pérdida de ligamento periodontal y del hueso alveolar que soporta al diente.^{4,43} La placa dental microbiana es el iniciador de la EP, la forma que toma la enfermedad y cómo progresa depende de las defensas del huésped hacia este desafío.⁴⁴

Para que aparezca esta infección, es necesario que intervengan una serie de bacterias, las cuales se acumulan y generan factores de virulencia, a través de los cuales causa daño a los tejidos. La EP es causada por microorganismos que se asocian y colonizan la superficie dentaria o el interior del surco periodontal.⁴⁵

Por lo que los componentes bacterianos, como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, proteasas y toxinas que desencadenan la reacción inflamatoria se pueden localizar en la biopelícula sobre la superficie del diente.⁴⁵ Los antígenos y productos, como lo son los LPS y peptidoglicanos, son liberados por las bacterias y además reconocidos por los receptores de tipo toll (TLR) en la superficie de las células huésped, como consecuencia se desencadena la respuesta inflamatoria.⁴

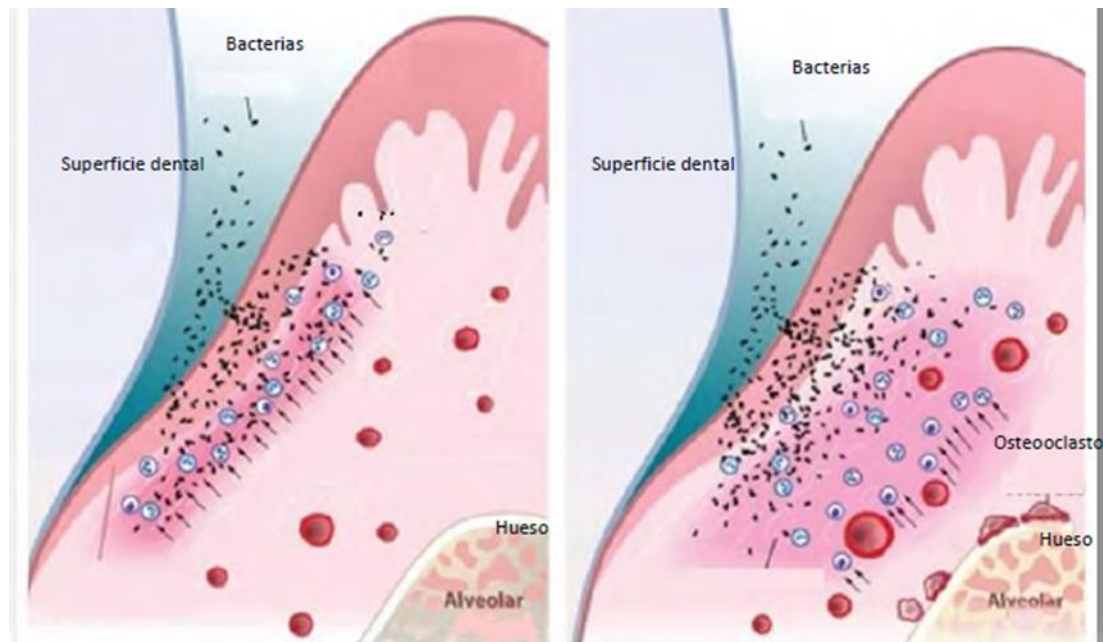


Figura IV.9. 1 Relación espacial entre el infiltrado y la pérdida del hueso periodontal. En la periodontitis, las bacterias se adhieren a la superficie del diente e invaden al epitelio adyacente y el tejido conectivo. En el panel de la izquierda se observa como el infiltrado inflamatorio es menor y está alejado del tejido óseo. En el panel de la derecha el infiltrado inflamatorio se mueve más cerca del hueso y los osteoclastos son inducidos. (Tomado de Graves DT 2011)⁴⁸

La mayoría del tejido conectivo destruido durante la enfermedad periodontal es resultado de la interacción de la bacteria y sus productos con las células fagocíticas mononucleares y fibroblastos, desencadenando la activación de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α y la IL-6. La secreción excesiva del TNF- α y también de la IL-1 media la destrucción del tejido conectivo y del hueso alveolar evidente en la EP.^{49,50, 51}

En la actualidad, la periodontitis, en su fase destructiva, se considera que se inicia y perpetúa por un pequeño grupo de bacterias predominantemente Gram

negativas, que se encargan de colonizar el área subgingival. Las bacterias causan la destrucción del tejido directamente por productos tóxicos e indirectamente mediante la activación de los sistemas de defensa del huésped, es decir, la inflamación, además aparecen una variedad de especies moleculares en el tejido inflamado, entre ellos los RL y las EROs.⁵²

IV.10. Proceso inflamatorio crónico (PIC)

La inflamación es una respuesta del organismo ante la exposición a agentes infecciosos, estímulos antigénicos o lesiones físicas que involucra a los sistemas nervioso, vascular e inmunológico, si el proceso es ineficiente, se transforma en un proceso fisiopatológico que favorece el incremento de RL y consecuentemente EOx.²⁰ Además se presentan cambios en la permeabilidad y dilatación vascular, con infiltración frecuente de los leucocitos en los tejidos afectados.⁵³ Estos cambios producen eritema, edema, calor, dolor y pérdida de la función.⁵³

Este es un mecanismo fisiológico por el cual el cuerpo busca reestablecer la homeostasis pérdida durante la agresión.⁵⁴

La inflamación puede ser aguda o crónica, la aguda es de duración corta (minutos o un par de días), y se caracteriza por la infiltración de fluidos y exudado proteico plasmático, produce edema y migración de leucocitos, principalmente neutrófilos durante las primeras 24 horas, seguido por

monocitos. La inflamación de tipo crónico es menos uniforme y de duración más larga (días a años), se caracteriza por la presencia de linfocitos y macrófagos.^{1,2,20} Los neutrófilos no se encuentran en los tejidos sanos, pero son los primeros elementos celulares en llegar en el proceso inflamatorio y su función es destruir cualquier microorganismo patógeno, esto lo llevan a cabo mediante la producción de ERO's.⁵⁴

En el proceso inflamatorio crónico (PIC), el cuerpo humano está equipado con una serie de mecanismos que son capaces de neutralizar el efecto negativo de los agentes estresantes, se encuentran los mecanismos a nivel molecular, celular, sistémico y a nivel del organismo.⁵⁵ No obstante en una reacción inflamatoria crónica se encuentran una gran cantidad de macrófagos activados que liberan ERO's e intermediarios del nitrógeno, los cuales causan la mayor parte de daño a los tejidos circundantes.⁵⁶

Asimismo, la inflamación crónica es caracterizada por la infiltración de varias células inflamatorias: macrófagos, linfocitos y células plasmáticas debido a la estimulación sostenida por EROs, implicando a estos como los participantes importantes en las reacciones de inflamación.⁵⁷

Cabe mencionar que la activación de macrófagos y su acumulación constituyen la base de la inflamación crónica.⁵⁶ En respuesta al reconocimiento del microorganismo, los macrófagos producen citocinas como IL-1 β , TNF- α o IL-6, estas citocinas proinflamatorias modifican la función del endotelio,

además de que actúan a nivel local y promueven la coagulación y el incremento de la permeabilidad vascular.⁵³

Las enfermedades periodontales pueden inducir un alto estado inflamatorio crónico sistémico, que se ve reflejado en el incremento de los niveles séricos de la proteína C reactiva, IL-6 y fibrinógeno. La inflamación es un factor crítico en esta asociación y su importancia apenas se está dando a conocer.¹⁴

IV.11. Enfermedad periodontal y estrés oxidativo

La periodontitis se manifiesta por sí misma como un fenómeno multifactorial, que está asociado con la activación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), que a su vez pueden generar ERO's durante condiciones inflamatorias.⁶

El EOx ha sido ligado con la destrucción del tejido periodontal, y se ha encontrado evidencia de que la periodontitis es una fuente potencial de un grado bajo de inflamación y que está asociado con un estado sistémico de EOx y con una reducción de la capacidad antioxidante.²⁷

Es importante señalar que el estrés es un factor clave en el desarrollo de problemas dentales, principalmente por la disminución significativa en la respuesta inmune que afecta a los leucocitos. Por ejemplo, por el efecto del estrés disminuye considerablemente la respuesta a la eliminación de bacterias, provocando un mayor desarrollo de gingivitis, periodontitis y

desgaste dental en el individuo estresado, con un aumento en sangrado e inflamación, comparado con individuos sin estrés.⁵⁴

El desequilibrio que se presenta entre las ERO's y los antioxidantes ha sido implicado como uno de los factores clave para desarrollar la enfermedad periodontal.⁵⁴

Existe evidencia que los individuos que cursan con periodontitis tienen un mayor riesgo de desarrollar otras enfermedades inflamatorias crónicas como enfermedad cardiovascular y diabetes. También se ha indicado que un exceso de las ERO's y una disminución de los antioxidantes, son los responsables de la activación local crónica de la inflamación periodontal y la destrucción del tejido.²⁷

En este sentido, Król en 2004, reportó la aparición de una alta concentración de ERO's y una disminución del sistema antioxidante, lo que provoca EOx en el tejido periodontal, además de que puede acelerar la formación de lesiones en el mismo tejido.⁵⁸

Se han realizado diversos estudios en los cuales se ha determinado la presencia del EOx en la periodontitis, mediante diversos marcadores.²¹

IV.12. Interleucinas

La comunicación entre células inmunes y las células inflamatorias es mediada en su mayoría por proteínas llamadas interleucinas, que promueven el crecimiento, diferenciación y activación celular. Estas moléculas efectoras son producidas transitoriamente y controlan localmente la amplitud y duración de la respuesta.

Ante los cambios vasculares las células endoteliales expresan moléculas de adhesión, por lo que los neutrófilos se les unen y emigran desde la sangre hacia el sitio de reacción, una vez unidos y activados por los mediadores locales e incluso por el patógeno en caso de infección, liberan agentes quimiotácticos que atraen a los macrófagos, los cuales incrementan la fagocitosis y la liberación de mediadores y citocinas, entre las que se encuentran la interleucina IL-1 y IL-6 y el TNF- α .

Las citocinas son los reguladores de la respuesta del huésped a la infección, así como de la respuesta inmune, inflamación y trauma, son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata así como de la inmunidad adquirida, son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana, sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica.^{45,59}

Algunas citocinas claramente promueven la inflamación y son llamadas citocinas pro-inflamatorias, mientras que otras citocinas suprimen la actividad de pro-inflamación y son llamadas citocinas anti-inflamatorias.⁴⁵

Las citocinas más importantes a nivel inflamatorio en el periodonto y endodonto son las pro-inflamatorias.⁵⁴

IV.12.1 Interleucina 1 (IL-1)

Se presenta en dos formas, la IL-1 α y la IL-1 β , poseen una actividad biológica semejante y la forma preferentemente secretada por el sistema nervioso central es la IL-1 β .^{20,59} Su actividad más importante es la estimulación de la proliferación de los linfocitos T.⁶⁰

Las principales células que la producen son los macrófagos, las células endoteliales, los linfocitos B y T entre otras. Ha sido reconocida como el mediador endógeno de la fiebre y de la anorexia, así como un estimulador de la síntesis de proteínas de fase aguda.⁶¹

El estímulo más común para la secreción de IL-1 son las endotoxinas de los lipopolisacáridos.⁵⁴

Hay varias líneas de evidencia que implican a la IL-1 en la patogénesis de la EP, ya que los niveles de esta interleucina se encuentran elevados en los sitios con enfermedad periodontal.⁶²

IV.12.2 Interleucina 6 (IL-6)

Es una citocina inducida por estrés que actúa como mediador de la respuesta inflamatoria. Es sintetizada por células T (th2), células cebadas, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, queratinocitos y muchas líneas de células tumorales, interviene en la inducción de proteínas de fase aguda en

las células del hígado, en respuesta a procesos inflamatorios.²⁰ Esta citocina ha demostrado tener niveles elevados en numerosos estudios, por lo que es un estimulador muy importante de la producción de proteínas de fase aguda, que muestra un incremento de riesgo para la DM. Sin embargo, en adición con la IL-6 y otras citocinas como lo es IL- β o el TNF- α , son mediadores centrales de las reacciones de inflamación.⁶³

Las endotoxinas son buenos inductores de la síntesis de esta interleucina, y es por ello que se encuentra elevada en el suero de pacientes con infecciones.⁶¹

IV.12.3 Interleucina-10 (IL-10)

Es una citocina con actividad anti-inflamatoria, sobre linfocitos T, monocitos y macrófagos, regulando la sobreproducción de citocinas inflamatorias como el TNF- α e interferón gamma. Esta citocina inhibe potencialmente la producción de la IL-1 α , IL-1 β , IL-6 entre otras, mediante la activación de los monocitos, macrófagos. Los efectos inhibitorios de la IL-10 sobre la producción de la IL-1 y el TNF- α , son cruciales para las actividades anti-inflamatorias, porque estas citocinas a menudo tienen actividad sinérgica sobre las diferentes rutas y procesos de inflamación y amplifican esta respuesta mediante la inducción secundaria de mediadores como lo son las citocinas y prostaglandinas.⁶⁴

A esta citocina se le atribuye un rol importante en la evolución de la enfermedad periodontal y dentro de las funciones de esta citocina se encuentra la capacidad de inhibir la función de los macrófagos.⁵⁴

IV.12.4. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

Es una citocina pleiotrópica que tiene diversas funciones, desde la migración de la célula hasta la destrucción del tejido.⁶⁵

Es producida usualmente por los macrófagos en procesos malignos y en estados de inflamación crónica, entre sus efectos biológicos incluyen anorexia, disminución de peso corporal y reducción del tejido adiposo. Interfiere en la vía de señalización de la insulina y este efecto se asocia con la resistencia a la insulina que se presenta en la obesidad. Su sobreproducción estimula la síntesis de otras citocinas proinflamatorias y, niveles altos de ésta interleucina, son marcadores clave en muchas enfermedades inflamatorias.^{20,66}

La mayor parte del daño que ocurre durante la enfermedad periodontal se le atribuye a TNF- α y a la IL-1.⁵

La IL-1 β , IL-6 y e TNF- α son producidas localmente en el tejido gingival inflamado, pueden entrar a circulación y tener un impacto sistémico.⁶⁵

En este sentido hay pocos estudios, por tal motivo es necesario conocer la asociación del EOx e interleucinas pro-inflamatorias con la EP, con el fin de tener elementos para responder oportunamente a esta condición.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al igual que la población en el resto del mundo, la de México experimenta un proceso de envejecimiento. El crecimiento de la población adulta mayor y el aumento de las ECNT y sus complicaciones en nuestro país, representa una carga social y económica.³⁸

La organización mundial de la salud (OMS) ha informado que el número de adultos mayores se duplicará entre el .2000 y 2050, pasando de 11 al 22%. La cantidad de personas de 80 o más años de edad se incrementará casi cuatro veces hasta alcanzar los 395 millones.¹⁷ Con respecto a México, de acuerdo a las proyecciones del Consejo Nacional de Población (CONAPO), para el 2030 el porcentaje de adultos mayores será de 20.4 millones, lo que representará 14.8%.¹⁵

Aunque no se reconoce la importancia de los problemas de salud bucodentales durante la vejez. Estos son muy frecuentes y entre ellos se encuentra la periodontitis. La EP es un modelo de enfermedad crónica inflamatoria que da lugar a daño y pérdida del tejido conectivo y del hueso alveolar que soporta al diente; esto influye tanto en el estado general de la salud, como en la calidad del envejecimiento. En la actualidad alrededor del 85% de los adultos tiene gingivitis, el 30% padece periodontitis y el 15% cursa con periodontitis severa.^{9,39}

Es importante reconocer que los individuos que padecen periodontitis tienen un mayor riesgo de desarrollar otras enfermedades inflamatorias crónicas sistémicas.¹⁷

A su vez el EOx ha sido asociado con los mecanismos fisiopatológicos de numerosas ECNT como es el caso de la EP, ya que, durante el curso de esta, el balance entre los mecanismos pro-oxidantes y la defensa antioxidante se encuentran a favor de la destrucción del periodonto por el incremento de las especies reactivas del oxígeno y la disminución de la actividad antioxidante.^{10,12,17,27} y el aumento de la producción de los factores pro-inflamatorios como lo son la IL-1, IL-6 y TNF-alfa.

Sin embargo, hay pocos estudios en este sentido, por lo tanto, es necesario conocer la asociación del EOx y las interleucinas pro-inflamatorias con la EP con el fin de tener elementos para responder a tiempo a esta condición.

De todo lo anterior, se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será la relación del estrés oxidativo y el proceso inflamatorio crónico con la enfermedad periodontal en adultos mayores?

VI. HIPÓTESIS

De acuerdo con la información teórica encontrada respecto al estrés oxidativo y su asociación con patologías que cursan con inflamación crónica como la periodontitis, suponemos que los adultos mayores con enfermedad periodontal mostrarán un aumento significativo en el nivel de estrés oxidativo e interleucinas pro-inflamatorias en comparación con los adultos mayores sanos.

VII. OBJETIVOS

VII.1. Objetivo general

- Determinar la asociación del estrés oxidativo y el proceso inflamatorio crónico con la enfermedad periodontal en adultos mayores.

VII.2. Objetivos específicos

- Determinar los niveles séricos de IL1, IL6, IL 10 y FNT- α , en adultos mayores con EP.
- Evaluar los marcadores de EOx: LPO, actividad de enzimas antioxidantes SOD, GPx, CAT, razón SOD/GPx y (GAP) en adultos mayores con EP.

VIII. MATERIAL Y MÉTODO

VIII.1. Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional, prolectivo, transversal; comparativo.

VIII.2. Universo de estudio

El estudio se realizó en una población de 75 adultos mayores de los cuales 41 son sanos y 34 con enfermedad periodontal, tomando en cuenta los siguientes criterios:

VIII.2.1. Criterios de inclusión

- Adultos mayores de 60 a 74 años de edad que acepten participar en el estudio
- Pacientes que no realicen ejercicio físico
- Adultos mayores que hayan firmado el consentimiento informado
- Sexo indistinto

VIII.2.2. Criterios de exclusión

- Pacientes con procesos malignos
- Pacientes que no deseen participar en la investigación
- Pacientes que presenten cualquier tipo de enfermedad física o mental

VIII.2.3. Consideraciones éticas

Los individuos que aceptaron participar en este estudio firmaron una carta de consentimiento informado (anexo).

VIII.3. Variables

VIII.3.1. Clasificación de variables

Independiente:

- Enfermedad Periodontal
- Edad
- Sexo

Dependiente:

- Proceso inflamatorio crónico (PIC)
 - Medido a través de los siguientes marcadores
 - IL-1
 - IL-6
 - IL-10
 - TNF- α

- Estrés oxidativo (EOx)
 - Medido a través de los siguientes marcadores
 - Lipoperóxidos
 - GPx
 - SOD
 - CAT
 - GAP
 - Relación SOD/GPx

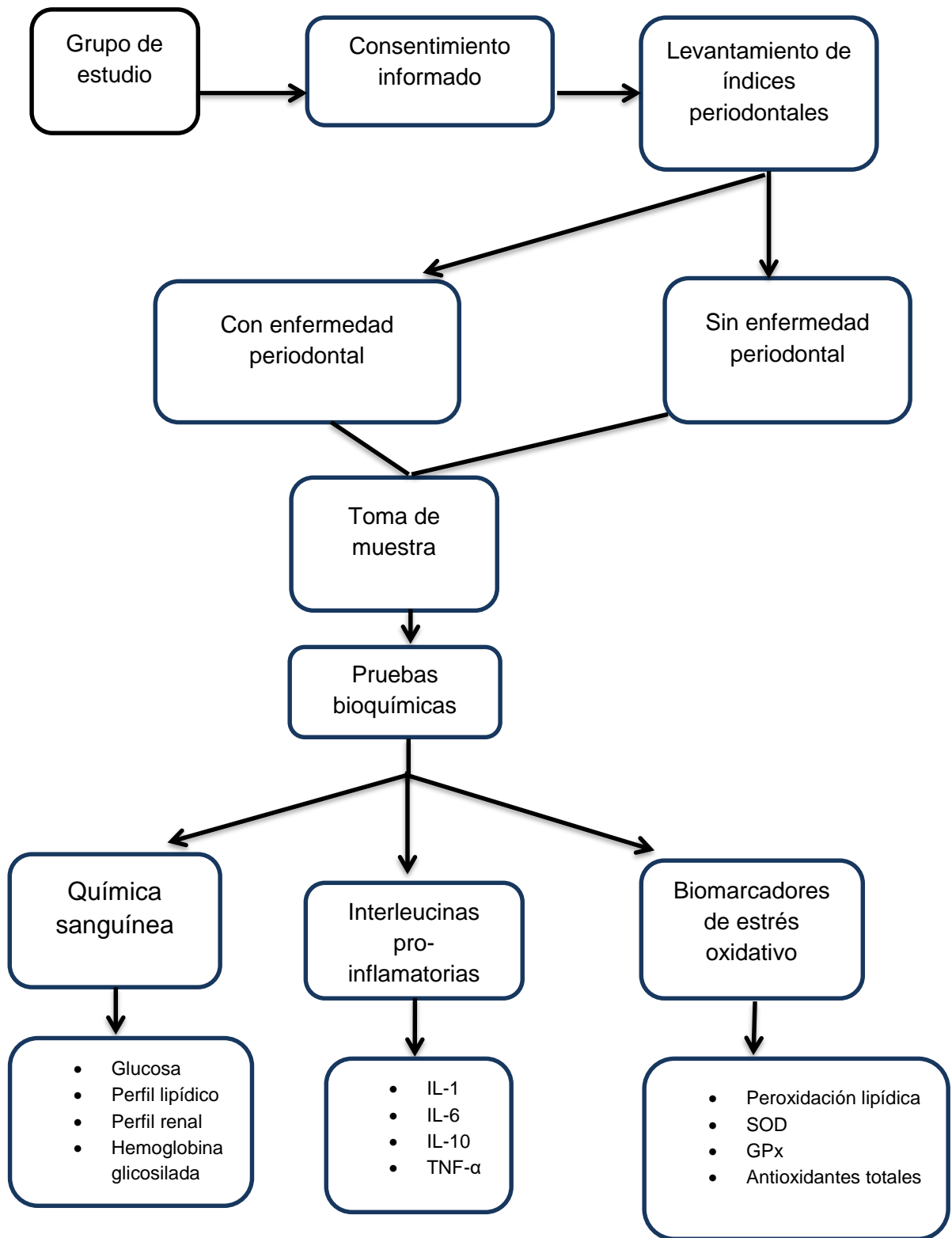


Figura VIII.3 Esquema general de estudio

VIII.3.2. Operacionalización de variables

- Independientes: Enfermedad periodontal, edad y sexo.

Variable	Definición	Nivel de medición	Categorías
Enfermedad periodontal	Infección crónica bacteriana, que desencadena los mecanismos de inflamación, pérdida de ligamento periodontal y del hueso alveolar que soporta al diente	Cualitativa ordinal	Leve(0-0.99) Moderada(1.0-1.99) Severa(>2.0)
Edad	Tiempo cronológico transcurrido desde el nacimiento hasta la captación del individuo en estudio	Cuantitativa discreta	Años cumplidos
Sexo	Características fenotípicas que distinguen al individuo.	Cualitativa nominal	Hombre Mujer

- Dependientes: Biomarcadores de estrés oxidativo e interleucinas pro-inflamatorias

IL-1	Interleucina mediadora endógena de la fiebre y de la anorexia, fase aguda	Cuantitativa continua	pg/mL
IL-6	interleucina inducida por estrés que actúa como mediador de la respuesta inflamatoria	Cuantitativa continua	pg/mL
IL-10	Interleucina con actividad inmunosupresora y anti-inflamatoria, sobre linfocitos T, monocitos y macrófagos.	Cuantitativa continua	pg/mL
TNF- α	Marcador clave en la reacción de fase aguda.	Cuantitativa continua	pg/mL
Estrés oxidativo	Desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) con respecto a los antioxidantes a favor de los radicales libres	Cualitativa nominal/ordinal	Presente/ausente Sin EOx EOx leve EOx moderado EOx severo
Lipoperóxidos	Concentración de lipoperóxidos plasmáticos	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	$\mu\text{mol/L}$ $\geq 0.340 \mu\text{mol/L}$ $< 0.340 \mu\text{mol/L}$
GPx	Actividad que posee la enzima para convertir oxidantes en moléculas menos dañinas.	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	U/L $\leq 5500 \text{ U/L}$ $> 5500 \text{ U/L}$
SOD	Actividad que posee la enzima en la conversión de superóxidos a moléculas menos dañinas.	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	U/L $\leq 170 \text{ U/L}$ $> 170 \text{ U/L}$

Anaya Anaya Norma Liliana

Capacidad antioxidante total	Capacidad antioxidante del plasma que inhibe o previene el daño oxidativo provocado por radicales libres.	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	mmol/L ≤0.90 mmol/L >0.90 mmol/L
GAP	Actividad antioxidante de componentes plasmáticos como ácido ascórbico, tocoferol, bilirrubina, transferrina y otros antioxidantes no medidos.	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	μmol/L ≤190 μmol/L >190 μmol/L
Relación SOD/GPx	Indicador del funcionamiento del sistema enzimático, ofrece una estimación del desequilibrio enzimático.	Cuantitativa continua Cualitativa nominal	————— ≥ 0.23 < 0.23

VIII.4. Procedimientos y técnicas

Evaluación gerontológica integral completa con estudios de laboratorio: química sanguínea.

VIII.4.1. Evaluación de la profundidad del surco gingival

La enfermedad periodontal se diagnosticó a través de la evaluación de la profundidad del surco gingival, para ello se utilizó el Índice Periodontal de Ramfjord, que combina el puntaje para la Gingivitis, basado en el color, la forma, densidad y tendencia a la hemorragia de los tejidos gingivales (Cuadro VIII.4.1) con la medición de la profundidad de la bolsa en relación con el límite amelo cementario (LAC).

Los dientes que se examinaron para la obtención del IEP son:

- 16: Primer Molar Superior Derecho
- 21: Incisivo Central Superior Izquierdo
- 24: Primer Premolar Superior Izquierdo
- 36: Primer Molar Inferior izquierdo
- 41: Incisivo Central Inferior Derecho
- 44: Primer Premolar Inferior Derecho

Cuadro VIII.4.1 Criterios para determinar el componente gingival del índice.

Puntuación	Clasificación
0	Ausencia de signos de inflamación
1	Cambios gingivales inflamatorios entre leves y moderados que no se extienden alrededor de la totalidad del diente.
2	Gingivitis entre leve y moderada y que se extiende alrededor de todo el diente.
3	Gingivitis severa caracterizada por enrojecimiento marcado tendencia a la hemorragia espontánea y ulceración.

Después de determinar el Componente Gingival se procedió a determinar la profundidad de las bolsas desde el LAC en las partes mesiales, vestibulares, distales y linguales de cada uno de los 6 dientes en evaluación.

Si el margen gingival está sobre el esmalte, se registra:

- 1) La distancia desde el margen libre gingival hasta el límite amelocementario.
- 2) La distancia desde el margen libre gingival hasta el fondo de la bolsa.

La medición 1 se resta de la 2 y se obtiene así la medida de la distancia desde el LAC hasta el fondo de la bolsa.

Si el margen gingival está sobre el cemento, el valor desde el LAC hasta el fondo de la bolsa se mide directamente.

Para determinar el puntaje de la Enfermedad Periodontal para cada diente se emplea el siguiente sistema:

- 1) Sí el surco gingival no se extiende hacia el ápice más allá del LAC, se considera que el puntaje 0-3 registrado para el estado de salud gingival es el IEP del diente.
- 2) Sí la profundidad de la bolsa se extiende hacia el ápice más allá del LAC, pero no más de 3 mm en ninguna de las 4 zonas del diente, se asigna a ese diente un puntaje de 4.
- 3) Sí la bolsa se extiende más de 3 mm y hasta 6 mm hacia el ápice desde el LAC, el diente recibe un puntaje de 5.
- 4) Sí la distancia entre el LAC y el fondo de la bolsa es mayor de 6 mm a lo largo de la raíz, el diente tiene un puntaje de 6.

VIII.4.2. Sonda y procedimientos de sondaje

Se utilizó la sonda periodontal, la cual está particularmente diseñada para una manipulación suave de los tejidos blandos ubicados alrededor de la pieza dentaria. La sonda presentó una porción codificada, la cual debe usarse con una fuerza suave para determinar la profundidad de la bolsa y para detectar la presencia de cálculo subgingival. Esta presión no debe ser mayor de 20 gramos. La sonda se introduce entre el diente y la encía, lo más paralelamente posible a la superficie de la raíz. La profundidad del surco gingivodentario se determinó observando la marca, al nivel del margen gingival. El extremo de la sonda debe mantener el contacto con la superficie de la raíz.

Sitios recomendados para el sondaje son mesial y distal en las superficies vestibular y punto medio de la superficie palatina/lingual.

El puntaje de IEP para el individuo es el puntaje medio de todos los dientes examinados; la suma de los puntajes correspondientes a cada diente se divide entre el número de dientes examinados.

VIII.4.3. Colección de muestras sanguíneas

Previo consentimiento informado, las muestras sanguíneas de todos los pacientes se obtuvieron por venopunción entre las 8:00 y 9:00 am con un ayuno previo de 8 horas en tubos al vacío (Vacutainer, Beckton-Dickinson), sin anticoagulante para la determinación de las pruebas bioquímicas (glucosa, perfil lipídico, perfil renal, así como de las interleucinas), con EDTA disódico para hemoglobina glicosilada y con heparina para las pruebas de estrés oxidativo.

VIII.4.4. Determinación de los parámetros bioquímicos

Para determinar los parámetros bioquímicos se centrifugaron las muestras coaguladas a 3500 rpm durante 10 min. y se realizó la separación del suero. Se tomaron alícuotas de 300µL y se congelaron a -70°C en microtubos para determinar posteriormente las interleucinas. Por otra parte las determinaciones bioquímicas (glucosa, perfil renal y perfil lipídico) se realizaron utilizando un analizador automatizado Selectra Junior, de acuerdo a los siguientes métodos:

- Glucosa: Estuche comercial para la determinación de glucosa (método de la glucosa oxidasa GOP-PAP, Randox GL2614). La glucosa se determinó colorimétricamente después de una oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. La muestra y el patrón.

• **Colesterol:** estuche comercial para la determinación de colesterol (método enzimático de punto final) CHOD-PAP (Randox Laboratories Ltd, UK, CH201). El colesterol se determinó colorimétricamente después de la hidrólisis enzimática y oxidación.

• **HDL-Colesterol:** estuche comercial para la determinación de Colesterol HDL directo (método enzimático de punto final) Aclaramiento (Randox Laboratories Ltd, UK, CH3811). El ensayo consistió en 2 partes: la primera fue la fase de aclaramiento en donde se eliminan los quilomicrones, VLDL Y LDL colesterol por medio de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y subsecuentemente la catalasa y la segunda fase de reacción, que es la determinación específica de la fracción HDL-Colesterol después de la fase de aclaramiento.

• **Triglicéridos:** estuche comercial para la determinación de triglicéridos Randox GPO-PAP (Randox Laboratories Ltd, UK, TR212). Se determinó tras hidrolisis enzimática con lipasas.

• **Urea:** estuche comercial para la determinación de urea (Randox Laboratorios Ltd, UK UR 107). El método que se utilizó fue ureasa-Berthelot modificado. Iones amonio producidos por acción enzimática reaccionan con salicilato e hipoclorito sódico para formar un complejo verde que se lee a 600 nm. Muestras y patrón se mezclaron con ureasa por 5 min. A 25°C y posteriormente

con hipoclorito sódico, se leera contra el blanco de reactivo tras incubar 10 min.

Hemoglobina glicosilada: estuche comercial para la determinación de hemoglobina glicosilada (Randox HA). El primer paso involucra el pretratamiento de la muestra de sangre total, se lisaron las células rojas y se provocó la hidrólisis de la hemoglobina por la acción de una enzima proteasa, posteriormente la presencia de HbA1c se mide por aglutinación en látex, compitiendo la glucohemoglobina con anticuerpos monoclonales HbA1c.

VIII.4.5. Citometría de flujo

Se utilizó el citómetro BDFACSAria II

Es una técnica que permite que las células (500 – 4000/ seg) pasen en fila dentro de un flujo a través del aparato, se puede realizar la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. La ventaja de la citometría de flujo tiene como base la habilidad de realizar mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular. Con el análisis multiparamétrico es posible evaluar poblaciones celulares particulares dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha tanto propiedades intrínsecas de la célula así como la dispersión de la luz, y características controladas como la fluorescencia. Al mismo tiempo, es posible realizar la separación de las poblaciones definidas por éste análisis. Estas bases son la base de la técnica conocida como FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).

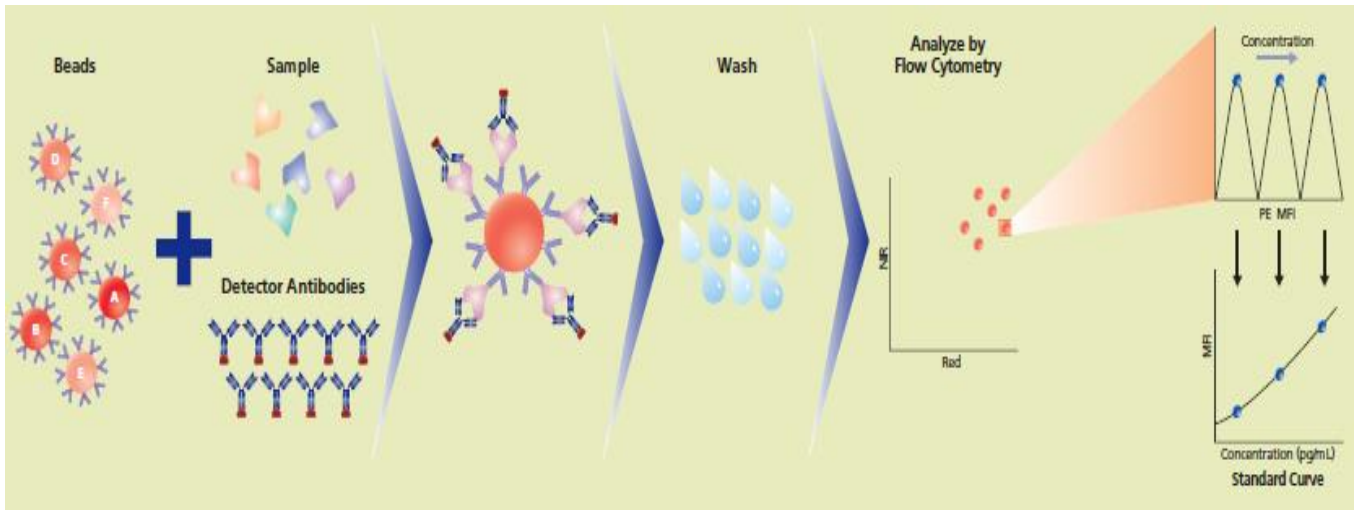
El FACS proporciona datos como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia. Para llevar a cabo lo anterior, el aparato necesita de un sistema combinado de flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computadora. El sistema de citometría de flujo está compuesto por cinco unidades principales:

una fuente de luz (lámpara de mercurio o láser), flujo celular, unidad de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específicas, fotodiodos o fotomultiplicadores para la amplificación de la señal y una unidad de operación y procesamiento de datos.

BD Cytometric Bead Array

Es la aplicación de la citometría de flujo que permite cuantificar múltiples proteínas simultáneamente. Este sistema utiliza una gama dinámica de rangos de detección de fluorescencia ofrecido por la citometría de flujo y el anticuerpo recubierto con perlas para una eficiente captura del analito. Cada perla, tiene una única intensidad de fluorescencia, por lo que las perlas pueden ser mezcladas y correrse simultáneamente en un solo tubo. Esta técnica reduce significativamente el requerimiento de muestra y el tiempo para los resultados en comparación con ELISA tradicional.

BD.CBA puede cuantificar múltiples citocinas de la misma muestra simultáneamente mientras que ELISA es útil para la medida de los niveles de una sola citocina.



Principio del ensayo CBA

Es un método que captura un analito soluble o un grupo de analitos con perlas de tamaño y fluorescencia conocida, haciendo posible la detección de los analitos utilizando citometría de flujo.

Cada perla capturada en el kit ha sido conjugada con un anticuerpo específico. La detección del reactivo de prueba en el kit es una mezcla de ficoeritrina conjugada con el anticuerpo, que da una señal de fluorescencia en la proporción a la cantidad del analito obligado.

Cuando la perla capturada y el reactivo detector son incubados con un muestra que contiene analitos reconocidos, el complejo sándwich (captura de la perla +analito+reactivo) ha sido formado. Estos complejos pueden ser medidos utilizando citometría de flujo para identificar partículas con características fluorescentes tanto de la perla como del detector.

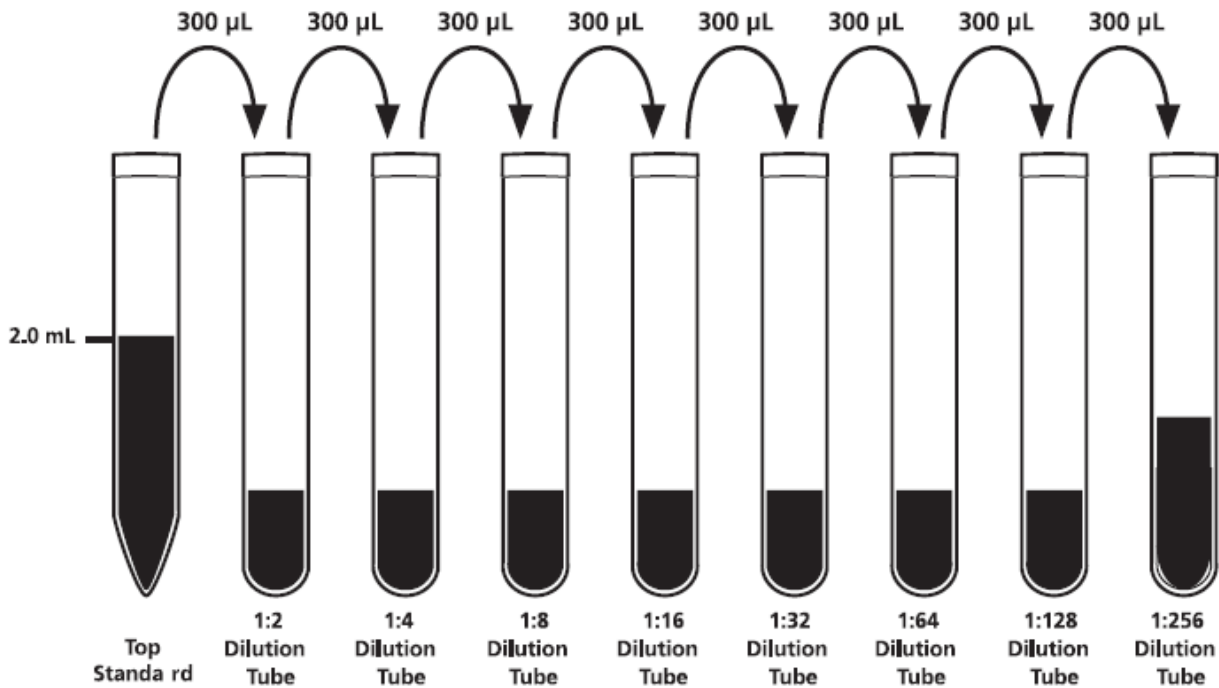
Seis poblaciones de perlas con distinta intensidad de fluorescencia han sido recubiertas con el anticuerpo específico capturado para IL-8, IL- β , IL-6, IL-10,

TNF y IL-12p70. Las seis poblaciones de perlas se mezclan juntas para formar una perla matriz que se resuelve en el citómetro de flujo.

Preparación del estándar de citocinas inflamatorias humanas

Procedimiento:

1. Se abrió el vial del estándar de citocina inflamatoria humana liofilizado. Transferir las esferas estándar a un tubo del polipropileno de 15 mL y etiquetar como "Top estándar"
- 2.- Se reconstituyó el estándar con 2 mL de diluyente del ensayo.
 - a) Se permitió que el estándar reconstituido se equilibrara por lo menos 15 minutos a temperatura ambiente.
 - b) Suavemente se mezcló la proteína reconstituida solamente por pipeteo. No se utilizó el vortex ni se mezcló vigorosamente.
- 3.- Se etiquetaron 8 tubos de 12x75-mm y se acomodaron en el siguiente orden: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, y 1:256.
- 4.- Se pipetearon 300 μ L del diluyente de ensayo (buffer de ensayo) en cada tubo de 12x75mm, se puede utilizar la misma punta.
- 5.- Se prepararon las diluciones seriadas:
 - a) Se transfirió 300 μ L del top estándar al tubo de la dilución 1:2 y mezcló por pipeteo, no se utilizó vortex.
 - b) Se continuó realizando las diluciones seriales transfiriendo 300 μ L de la dilución de tubo 1:2 al tubo de la dilución 1:4 y así sucesivamente hasta el tubo 1:256



6.- Se preparó en un tubo de 12x75 mm que contenía solamente el diluyente de ensayo (buffer de ensayo) que sirvió como control negativo.

Para la mezcla de la captura de perlas

1.- Se determinó el número de tubos para el ensayo (incluyendo estándar y control) que son requeridos para el experimento (por ejemplo, 8 muestras + 9 diluciones estándares + 1 control negativo = 18 tubos de ensayo).

2.- Se agitó vigorosamente en el vortex de 3 a 5 segundos cada vez que se capturó la perla después de mezclado.

Nota: el anticuerpo conjugado con la perla se asentará al paso del tiempo. Mezclar en el vortex el vial antes de tomar la alícuota de la suspensión de la perla.

3.- Se agregó una alícuota de 10 μ L de la captura de perlas por cada tubo de ensayo que fue analizado, en un tubo etiquetado como mezcla de captura de perlas (ejemplo: 10 μ L de perlas capturadas de IL-8 \times 18 tubos de ensayo = 180 μ L se requieren de perlas capturadas de IL-8).

4.- Se mezcló en el vortex la mezcla de perlas

Resuspensión de perlas

1.-Se centrifugó la mezcla de perlas a 200g por 5 minutos

2.- Se aspiró de manera cuidadosa el sobrenadante y se eliminó.

3.- Se resuspendió el pellet de la mezcla de la captura de perlas en el suero (el mismo volumen que en el paso anterior)

4.- Se incubó la mezcla de la captura de perlas durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz

Para realizar el ensayo:

1.- En el vortex se mezcló la captura de perlas y agregó 50 μ L a cada uno de los tubos de ensayo

2.- A los tubos control se les agregó 50 μ L de la dilución de las citocinas inflamatorias

3.- Se le agregó 50 μ L de cada muestra a cada tubo etiquetado

4.- Se agregó 50 μ L de PE citocina inflamatoria, detección del reactivo a todos los tubos del ensayo

5.- Los tubos de ensayo se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz

6.- A cada tubo de ensayo se le agregó 1 mL del buffer de lavado y se centrifugó a 200 g por 5 minutos

7.- Cuidadosamente se aspiró y desecho el sobrenadante de cada tubo de ensayo

8.- Se colocaron 300 μ L del buffer de lavado por cada tubo de ensayo para resuspender el pellet de perlas.

Procedimiento para las muestras de plasma

1.- En el vortex se mezcló la captura de perlas y se agregaron 50 μ L a los tubos de ensayo

2.- Se agregaron 50 μ L del estándar de dilución de citocina inflamatoria a los tubos control que son listados en la siguiente tabla

3.- Se agregó 50 μ L de cada muestra al tubo etiquetado de manera apropiada.

4.- Los tubos se incubaron por 1.5 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz

5.- A cada tubo de ensayo se le agrego 1 mL del buffer de lavado y centrifugo a 200 g por 5 minutos.

6.- Cuidadosamente se aspiró y desecho el sobrenadante, dejando aproximadamente 100 μ L del líquido en cada tubo de ensayo.

7.- Se adicionaron 50 μ L de PE reactivo detector de citocina inflamatoria a todos los tubos de ensayo. Se agitaron de manera suave los tubos para resuspender el pellet.

8.- Los tubos de ensayo se incubaron durante 1.5 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz

9.- Se agregaron 1 mL del buffer de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugaron a 200 g por 5 minutos.

10.- Cuidadosamente se aspiró y desecho el sobrenadante de cada tubo de ensayo.

11.- Se agregaron 300 μ L del buffer de lavado a cada tubo de ensayo y se resuspendieron las perlas del pellet

13.- Se cuantificaron y analizaron en el citómetro de flujo.

Especificidad de la técnica

Los pares de anticuerpos usados en el kit BD CBA de citocinas inflamatorias humanas han sido examinados para la reactividad específica con su correspondiente proteína específica. El análisis de las muestras contiene una sola proteína recombinante y no se encuentra ninguna reactividad cruzada ni que se capture otra población de proteína que no sea.

VIII.4.6 Biomarcadores de estrés oxidativo

Peroxidación lipídica (LPO)

Fundamento: Peroxidación lipídica por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA). La prueba del TBA es el ensayo más utilizado para la medición de la lipoperoxidación. Durante la prueba, la muestra fue tratada con TBA; en la reacción del TBA, una molécula de malondialdehído (MDA) reaccionó con dos moléculas de TBA con la producción de un pigmento rosa cuya absorción máxima es a los 532-535 nm. Durante la reacción por un proceso de auto-oxidación se incrementaron los TBARS, al agregar el butiril-hidroxitolueno (BHT) se reduce la formación de lipoperóxidos in vitro.

Procedimiento: Se utilizó el método de Jentsch (1996). Se recolectaron 400µL de plasma heparinizado al cual se le adicionaron 10 µL de butiril-hidroxitolueno (BHT) 2mM por mL de sangre, para evitar la auto-oxidación de las muestras. Se colocaron 50 µL de BHT (12.6 mmol/L) y 400 µL de ácido ortofosfórico (0.2M) se agitaron en vortex 10 seg y posteriormente se adicionaron 50 µL de TBA (0.11 mol/L), se agitaron en vortex por 10 seg. Esta mezcla se incubó por 45 minutos a 90 °C en un baño de agua, pasado este tiempo se colocaron los tubos en hielo por 5 minutos para detener la reacción.³⁵

Posteriormente se adicionaron 1200 µL de butanol en cada tubo y 100 µL de solución salina saturada, se agitó vigorosamente por 30 seg., se centrifugó a 5000 rpm 1 min., se pasó la fase de butanol a una celda y se midió la absorbancia a 535 nm y 572 nm.

La concentración de ácido tiobarbitúrico que reacciona se calculó por medio de una curva estándar de MDA, que se obtuvo a partir del estándar de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP).

Preparación de la curva estándar

Se prepararon las siguientes soluciones:

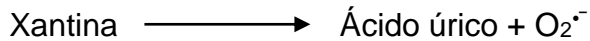
- 1.- TMP 1mM. – Se Diluyó 17 μL de TMP en 100 mL de agua bidestilada.
- 2.- TMP 0.2 mM.- Se tomó un ml de TMP 1mM y se añadieron 4 mL de agua bidestilada (preparar cada vez que se use).
- 3.- Se prepararon 8 tubos con diferentes concentraciones de TMP, como se describe a continuación:

Tubo	TMP (μL)	H ₂ O (mL)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)
1	0	400	0
2	10	390	0.4
3	20	380	0.8
4	40	360	1.6
5	60	340	2.4
6	100	300	4.0
7	140	260	5.6
8	200	200	8.0

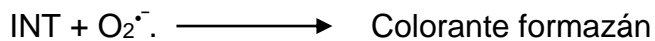
- 4.- A cada uno de los tubos de la curva se les dio el mismo tratamiento que a la muestra.

- **Superóxido dismutasa (SOD)**

Fundamento: La técnica se basa en la reacción entre la xantina y la xantina oxidasa para generar radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$).



Los radicales superóxido generados reaccionaran con sales de p-iodonitrotetrazolio (INT) para producir el colorante rojo formazán.



La SOD presente en las muestras compite con el INT por los radicales superóxido y por tanto inhibe la producción del colorante formazán.



La SOD se mide por el grado de inhibición de la formación del colorante formazán, a 505 nm. Se usará el equipo comercial Ransod (Randox Laboratorios Ltd, UK).

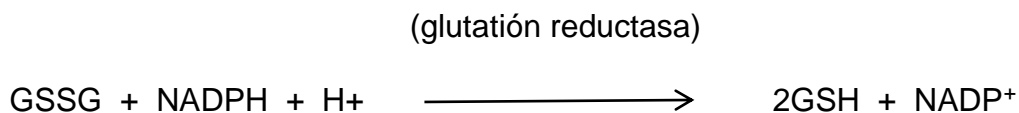
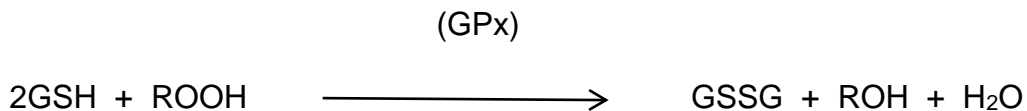
Procedimiento: Se tomaron 0.5 μL de sangre total y se lavaron los eritrocitos 3 veces con 3 mL de solución de NaCl al 0.9 %, se centrifugó durante 10 min. a 3000 rpm en cada lavado. Al botón de eritrocitos lavados se le adicionaron 2 mL de agua bidestilada fría, se mezclaron y se dejaron reposar durante 15 min a 4 °C. Del lisado se tomaron 0.100 μL y se diluyeron con 1.9 mL de tampón de fosfato 0.01 mmol/L pH 7.0.

Para el ensayo se pipetearon 0.050 mL de muestra diluida y se adicionaron 1.7 mL de sustrato mixto (xantina 0.05 mmol/L, INT: 0.025 mmol/L), después de mezclar se agregaron 0.25 mL de xantin oxidasa (0.94 mmol/L). Se mezcló y se registró la absorbancia A1 al cabo de 30 seg y se empezó a cronometrar el tiempo simultáneamente para leer la absorbancia final A2 al cabo de 3 min frente al blanco de agua a una longitud de onda de 505 nm

- **Glutación peroxidasa (GPx)**

Se emplea el equipo comercial Ransel (Randox Laboratorios Ltd, UK).

Fundamento: La cuantificación de esta enzima se basa en el método desarrollado por Paglia y Valentine con base en la siguiente reacción.



(GSH= Glutación reducido) (ROOH=hidroperóxido) (Gpx= Glutación peroxidasa) (GSSG= glutación oxidado)

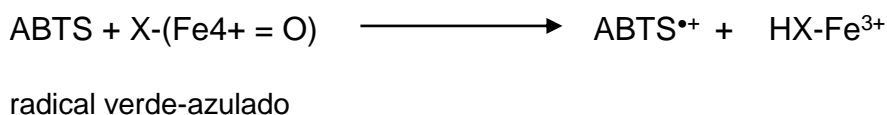
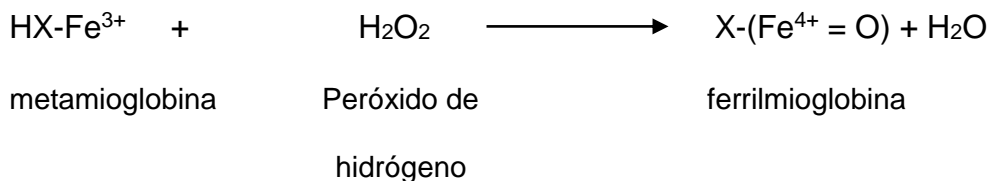
La concentración de GPx se evalúa por la disminución en absorción a 340 nm, debida a la oxidación de NADPH a NADP⁺.

Procedimiento: Se realizó la dilución de 0.05 mL de sangre entera heparinizada en 1 mL de solución diluyente (proporcionada por Randox), se incubó durante 5 min. Posteriormente se añadió 1 mL de reactivo de Drabkin a doble concentración. Las muestras se analizaron en los siguientes 20 min.

Para el ensayo, se colocaron 0.02 mL de muestra diluida, 1 mL de reactivo de trabajo (glutati6n 4 mmol/L, glutati6n reductasa \geq 0.5 U/L y NADPH 0.34 mmol/L) y 0.04 mL de cumeno (hidroper6xido de cumeno 0.18 mmol/L). Se mezclaron y se realizó la lectura de la absorbancia inicial al cabo de 1 min. y se empezó a cronometrar simultáneamente para leer de nuevo al cabo de 1 y 2 min. La cinética de esta reacci6n se ley6 a 340 nm.

- **Capacidad antioxidante total (CAT)**

Se emple6 el equipo comercial (Total antioxidant status, Randox Laboratorios Ltd, UK). Fundamento: Se trata de una prueba en donde se combinan la peroxidasa (metamioglobina) con per6xido de hidr6geno y ABTS (2,2'-azido-di-etilbenzotiazolin sulfanato) para dar como resultado la formaci6n del radical cati6n ABTS⁺. Este radical presenta una coloraci6n verde-azulada, la presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresi6n de esta coloraci6n, siendo 6sta proporcional a la concentraci6n de antioxidantes. La cinética de la reacci6n se mide a 600 nm.



Procedimiento: Se pipetearon 0.02 mL de plasma y se adicionaron 1 mL de cromógeno, después de mezclar perfectamente se continua con la lectura de la absorbancia inicial A1, después de esto se adicionaron 0.200 mL de sustrato, se empieza a cronometrar para leer la absorbancia A2 al cabo de exactamente 3 min las lecturas se realizaron a 600 nm. Este mismo procedimiento se realizó para el blanco (agua destilada) y con el estándar que se proporciona en el estuche. Para el cálculo se obtuvieron los deltas de las absorbancias A2 – A1 tanto para el blanco, las muestras y el estándar, posteriormente se obtuvo el delta del estándar del delta del blanco y se calculó el factor: Factor= (Concentración del estándar)/ Delta del blanco-delta del estándar. Este factor se multiplicó por la diferencia entre el delta del blanco y de las muestras para obtener la concentración de antioxidantes en mmol/L.

- **Brecha antioxidante (GAP)**

La brecha antioxidante (GAP), se calculó a partir de la CAT en $\mu\text{mol/L}$, las concentraciones de albúmina y ácido úrico, con base en la siguiente fórmula:

$$\text{GAP antioxidante} = \text{CAT} - [(\text{albúmina} \times \text{TEAC}) + (\text{ácido úrico} \times \text{TEAC})]$$

El TEAC para albúmina es de 0.69 y para ácido úrico es 1.0

- **Razón SOD/GPx**

Este parámetro se calculó como cociente entre la actividad de la enzima SOD y la actividad de la GPx.

- **Cálculo del nivel de estrés oxidativo**

Para la determinación la existencia de alteraciones en los parámetros anteriores y determinar la existencia de EOX se manejaron como valores de corte los obtenidos de una población de adultos jóvenes sanos, siendo los siguientes:

LPO ($\mu\text{mol/L}$)	≥ 0.340
SOD (U/L)	≤ 170
GPx (U/L)	≤ 5500
SOD/GPX	≥ 0.023
CAT (mmol/L)	≤ 0.90
GAP ($\mu\text{mol/L}$)	≤ 190

Para determinar si los sujetos presentaron EOx, se ha obtenido un índice, el cual se calculó al dicotomizar cada uno de los parámetros determinados, dando el valor de 1 cuando las concentraciones estaban por arriba (en caso de LPO y la razón SOD/GPx) o por debajo (todos los demás parámetros) del valor de corte. Así el sujeto con todos los parámetros alterados tenía un índice igual a 6 y EOx severo,

Para evaluar grados de EOx se generó una escala:

Índice: 0 sin EOx

Índice: 1-2 EOx leve

Índice: 3-4 EOx moderado

Índice: 5-6 EOx severo

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados utilizando medidas descriptivas, promedio y desviación estándar (DE), como pruebas de comparación t de Student. Para todas las pruebas se considera un valor de p menor de 0.05 como significancia estadística. Para tal efecto se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15.0.

X. RESULTADOS

En el cuadro X.1 se presentan los valores promedio de los parámetros bioquímicos en los adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal. En este sentido no se encontraron diferencias significativas.

Por otro lado, al cuantificar los marcadores de estrés oxidativo se encontró una disminución de la capacidad antioxidante total (CAT) en los adultos mayores con enfermedad periodontal (0.92 ± 0.26 mmol/L) en comparación con los sanos (1.13 ± 0.39 mmmol/L); con respecto a la brecha antioxidante también hubo una disminución estadísticamente significativa en los adultos mayores con periodontitis (238.2 ± 253.58 mmol/L) en comparación con los adultos mayores sanos (503.2 ± 374.95 mmol/L), con lo que se puede observar que hay una disminución de los marcadores de estrés oxidativo en los adultos mayores con enfermedad periodontal (Cuadro X.2).

Con relación a las interleucinas pro-inflamatorias se encontró un aumento significativo en la concentración de IL-1(51.1 ± 17.6) y la IL-6(3.2 ± 0.77) en los adultos mayores con enfermedad periodontal en comparación con los adultos mayores sanos. (Cuadro X.3)

Con respecto a la figura X.1 se puede observar que el 55% de los adultos mayores que padecen enfermedad periodontal presentaron estrés oxidativo en comparación con el 45% de los sanos, aunque la diferencia entre estos dos grupos es del 10%, es importante ya que en los adultos mayores con periodontitis se encontró un aumento del estrés oxidativo.

Por otro lado, para la determinación de factores de riesgo para presentar enfermedad periodontal (cuadro X.5), se encontró que tener la GAP disminuida es factor de riesgo (RM= 3.03, IC_{95%}= 1.09-8.39, p= 0.03).

Cuadro X. 1 Parámetros bioquímicos de los adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal

Variables	Sanos n = 41	Con EP n = 34
Colesterol mg/mL	211.97±36.95	203.34±48.18
Triglicéridos mg/mL	179.69±69.62	169.03±93.73
Glucosa mg/mL	128.97±55.09	129.13±33.78
Ácido úrico mg/dL	2.13±1.9	2.88±4.8
Urea mg/dL	32.83±8.3	41.36±28.07
Creatinina mg/mL	0.79±0.23	0.83±0.16
Albúmina mg/mL	4.77±0.34	4.74±0.25
HbA1c %	8.8±1.77	9.18±1.85
IEP mm	1.59±0.29	2.9±0.72

Los datos se presentan en promedios ± DE. Prueba t de Student, *p<0.05.

Cuadro X. 2 Marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal

Variable	Sanos	Con enfermedad periodontal
Lipoperóxidos ($\mu\text{mol/L}$)	0.39 \pm 0.15	0.37 \pm 0.16
Capacidad antioxidante total (mmol/L)	1.13 \pm 0.39	0.92 \pm 0.26*
Superóxido dismutasa (U/L)	180 \pm 11.1	180 \pm 13.5
Glutación peroxidasa (U/L)	8145 \pm 6097	6806 \pm 3073
Relación SOD/GPx	0.041 \pm 0.059	0.031 \pm 0.015
Brecha antioxidante (mmol/L)	503.2 \pm 374.95	238.2 \pm 253.58*

Los datos se presentan en promedios \pm DE. Prueba t de Student, *p<0.05. Las diferencias se presentan en la capacidad antioxidante total (CAT) y brecha antioxidante.

Cuadro X. 3 Concentración de interleucinas en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal.

Variable	Sanos	Con enfermedad periodontal
IL-1 (pg/mL)	6.6±1.7	51.5±17.6*
IL-6 (pg/mL)	0.8±0.16	3.2±0.77*
IL-10 (pg/mL)	2.68±1.08	2.63±1.17
TNF-α (pg/mL)	3.6±0.46	3.8±1.4

Los datos se presentan en promedios ± DE. Prueba t de Student, *p<0.05.

Cuadro X. 4 Frecuencia de los marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal

Variable	Con Enfermedad Periodontal n (%)	Sanos n(%)
LPO	19 (45)	23 (55)
Alto (≥ 0.321)		
CAT	16 (55)	13 (45)
Bajo (≤ 0.90)		
SOD	8 (50)	8 (50)
Bajo (≤ 170)		
GPx	11 (50)	11 (50)
Bajo (≤ 5500)		
GAP	23 (59)	16 (41)*
Bajo (≤ 190)		
SOD/GPx	9 (39)	14 (61)
Bajo (≤ 0.023)		

Prueba de Ji cuadrada. LPO, lipoperóxidos; CAT, capacidad antioxidante total; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa. * $p < 0.05$.

Cuadro X. 5 Relación de la enfermedad periodontal con los marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores

Variables	RM	IC95%	Valor p
LPO	0.635	0.228-1.77	0.384
CAT	1.93	0.717-5.21	0.191
SOD	1.12	0.366-3.46	0.837
GPx	1.14	0.412-3.17	0.798
GAP	3.03*	1.09-8.39	0.030*
SOD/GPx	0.614	0.219-1.71	0.351

Prueba de Ji, *p<0.05

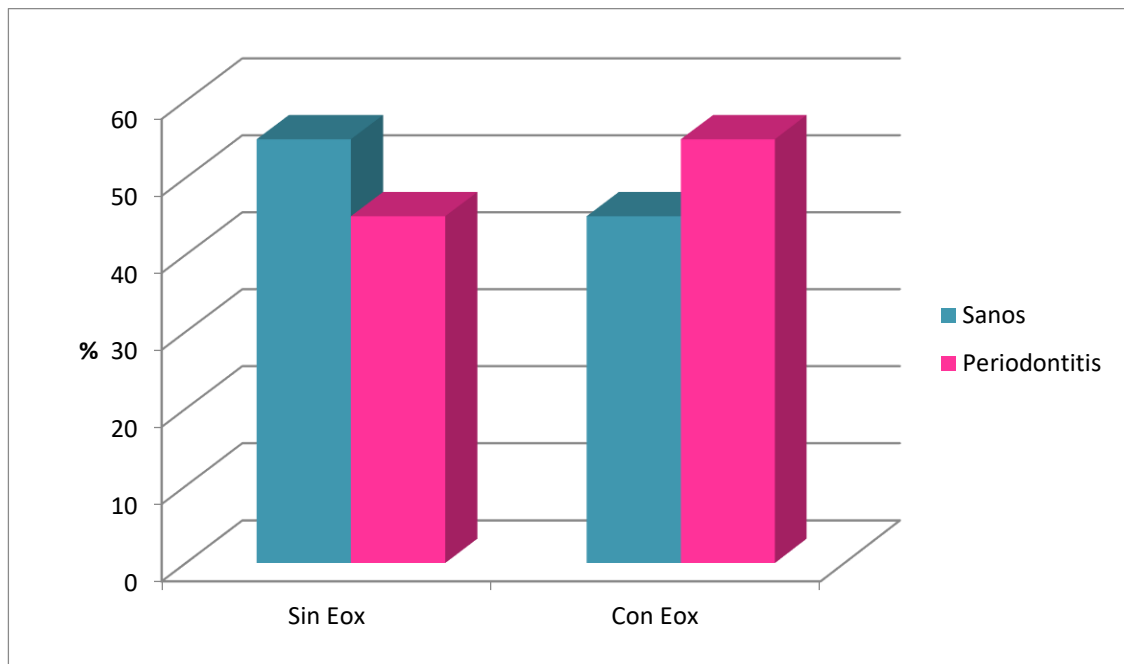


Figura X. 1 Comparación de estrés oxidativo en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal.

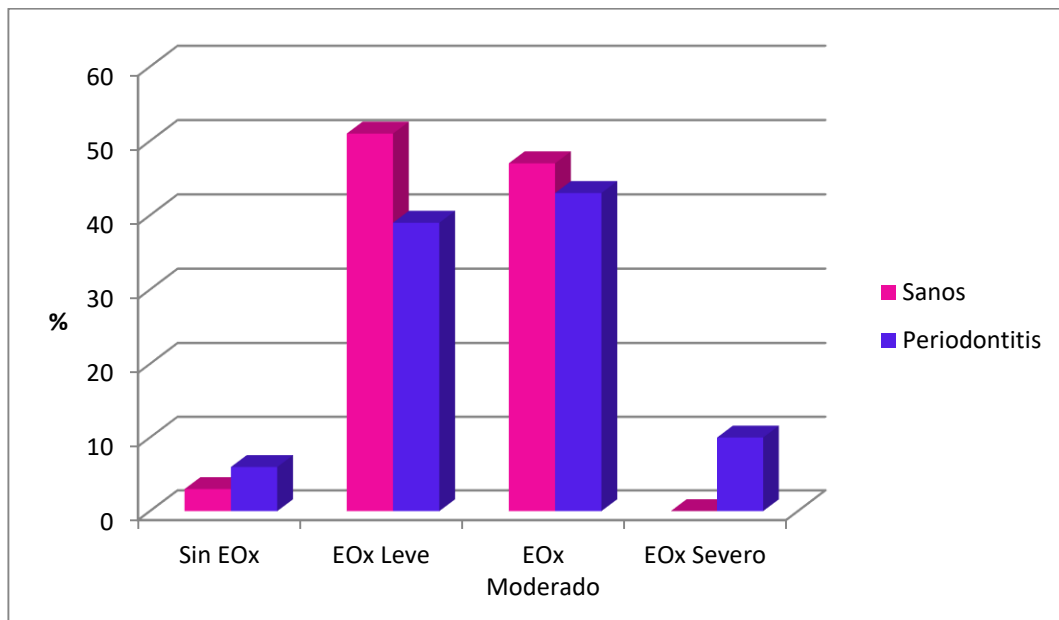


Figura X. 2 Comparación de estrés oxidativo por grados en adultos mayores sanos y con enfermedad periodontal.

XI. DISCUSIÓN

El estrés oxidativo (EOx) ha sido implicado como factor etiológico y fisiopatológico de diferentes enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) de mayor prevalencia durante el envejecimiento.¹ Existe evidencia que cuando hay un exceso de radicales libres (RL) y no son contrarrestados por el sistema antioxidante, se induce un desequilibrio bioquímico lo que conduce al EOx, el cual ha sido implicado en la patogénesis de varias enfermedades, entre las cuales se encuentra la periodontitis.^{27,34}

La enfermedad periodontal (EP) es un trastorno oral inflamatorio crónico de origen infeccioso con una alta prevalencia, que afecta a los tejidos del soporte del diente, encía, hueso y ligamento periodontal, que en general está asociado con la activación de los leucocitos polimorfonucleares, que a su vez pueden generar especies reactivas del oxígeno (ERO's) durante condiciones inflamatorias.^{6,7,21} En este sentido *Krol* en 2004 reportó que la aparición de una alta concentración de ERO's y una disminución del sistema antioxidante provoca EOx en el tejido periodontal, además de que puede acelerar la formación de lesiones en el mismo tejido.⁵⁸

Asimismo, la mayoría del tejido periodontal destruido en la periodontitis es mediada por el huésped a través de la liberación de interleucinas (IL)-pro-inflamatorias, IL-1. IL-6 y TNF- α .^{65,69} Por otro lado se ha establecido una

relación causa-efecto entre las interleucinas y la pérdida del tejido periodontal.⁶²

Recientemente los datos epidemiológicos muestran que las enfermedades orales tienen efectos importantes sobre la salud en general de los individuos.²¹

En este sentido, la determinación del EOx y las interleucinas pro-inflamatorias puede ser un marcador biológico que permita conocer el grado de daño asociado con la EP en adultos mayores. ^{4,26}

Al respecto para contrarrestar los efectos perjudiciales de las ERO's existe una variedad de mecanismos de defensa antioxidante en el cuerpo, cuya función específica es la de eliminar los oxidantes perjudiciales que se forman o reparar el daño causados por estos.^{34,37}

En este estudio se observó una disminución estadísticamente significativa en la actividad antioxidante total (CAT) y la brecha antioxidante (GAP) de los adultos mayores con periodontitis, lo cual es acorde con lo reportado por Król y Shree que encontraron una disminución de la CAT, lo cual favorece la formación de lesiones en el tejido periodontal y la destrucción del mismo. ^{7,5}

Por otro lado en respuesta al reconocimiento de los microorganismos patógenos, los leucocitos PMN producen interleucinas como: IL-1 β , TNF- α ó IL-6, las cuales se encargan de iniciar la respuesta inflamatoria ^{54,69} Como consecuencia de la infección, la respuesta inflamatoria es establecida en el

tejido periodontal, caracterizado por la síntesis de interleucinas pro-inflamatorias, por lo que el incremento de los niveles de éstas, ha sido asociada con la periodontitis.^{62,65, 67, 68} Al respecto, en la presente investigación se observó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de IL-1 β e IL-6 en los adultos mayores con EP en comparación con los sanos. En este sentido nuestros hallazgos coinciden con otros estudios que reportan niveles elevados de interleucinas pro-inflamatorias en sujetos con enfermedad periodontal.^{35,65,65} Asimismo, coincide con lo descrito por Graves *et al*; quienes encontraron que la IL- β juega un papel importante en la periodontitis, puesto que es sintetizada por varios tipos de células en el tejido periodontal, lo cual la hace esencial en el desarrollo de la enfermedad.⁶²

Al analizar las frecuencias de los biomarcadores de EOX encontramos un porcentaje mayor de adultos mayores con enfermedad periodontal que cursan con la GAP disminuida (59), comparado con el grupo de sanos (41), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Además, los adultos mayores que presentaron una disminución en la GAP, tienen un mayor riesgo de presentar EP.

Otro hallazgo del presente estudio mostró que los adultos mayores con periodontitis tienen un 10% más EOX en comparación con los sanos, lo cual es acorde con el aumento de las ERO's, provocado por el proceso inflamatorio de la EP y la disminución de la eficiencia del sistema antioxidante, resultados

que son acordes con lo reportado por Krol *et al.* donde se indica una asociación entre el EOx y la EP debido a las altas concentraciones de las ERO's , acompañada de la supresión de la actividad antioxidante que puede favorecer la formación de lesiones en el tejido periodontal.⁵⁸

Por último, es importante mencionar las limitaciones del estudio, una de ellas es ser de tipo transversal y que el tamaño de la muestra no es representativo, por lo que será necesario realizar estudios longitudinales con muestras representativas para así poder confirmar nuestros hallazgos. No obstante apoyan la propuesta de indicar algunas alternativas preventivas y terapéuticas para contrarrestar las alteraciones bioquímicas entre los que se destacan los suplementos antioxidantes y la administración de antiinflamatorios no esteroideos

Además, el estilo de vida saludable y la higiene bucal, son factores que contribuyen al estado de salud bucodental en los adultos mayores.

XII. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta la hipótesis inicial:

Hipótesis:

De acuerdo con la información teórica encontrada respecto al estrés oxidativo y su asociación con patologías que cursan con inflamación crónica como la periodontitis, suponemos que los adultos mayores con enfermedad periodontal mostrarán un aumento significativo en el nivel de estrés oxidativo e interleucinas pro-inflamatorias en comparación con los adultos mayores sanos.

Llegamos a las siguientes conclusiones:

- Nuestros hallazgos sugieren que los adultos mayores con enfermedad periodontal presentan mayor estrés oxidativo; además de un aumento en la concentración de interleucinas pro-inflamatorias en comparación con los adultos mayores sanos.
- Al obtener los resultados se observó la asociación del EOx y la EP, lo cual tiene la finalidad de obtener los elementos suficientes para atender oportunamente este padecimiento.

XIII. PERSPECTIVAS

- Es conveniente aumentar el tamaño de la muestra y continuar el estudio para confirmar el aumento de estrés oxidativo e interleucinas pro-inflamatorias en adultos mayores, así como su asociación con la enfermedad periodontal.

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Nuñez VM. Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2003 p 5-82.
2. Mendoza-Nuñez VM, Retana-Ugalde R. Estrés oxidativo e inflamación México: UNAM; 2009 p81-109.
3. Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. Australian Dental Journal 2001;46:(1): 2-12.
4. Khiste SV, Ranganath V, Nichani AS, Rajani V. Critical analysis of biomarkers in the current periodontal practice. J Indian Soc Periodontol. 2011;15(2):104-10.
5. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. Oral Dis 2000; 6: 138-151.
6. Boesing F, Patiño J, Da Silva VRG, Moreira EAM. The interface between obesity and periodontitis with emphasis on oxidative stress and inflammatory response. Obesity reviews 2009; 10: 290–297.
7. Shree DP, Suryakar NA, Bhogade BR. Oxidative stress in periodontitis. Eur J Gen Med 2012; 9(2):81 84.
8. Semsei I. On the nature of aging. Mech ageing Dev 2000, 117:93-108.
9. Mendoza-Nuñez VM, Correa-Muñoz E, Sanchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R. Modelo de atención comunitaria de núcleos gerontológicos. Geritric. 1996. 12:447-453.
10. Strehler B, North D. Cell type specific codon usage and differentiation. Mech Ageing Dev. 1982, 18:285-313.
11. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 2000; 408: 239-247.
12. World Health Organization. Active ageing. A policy framework. Geneva: WHO; 2002. Available from: <http://www.who.int/hpr/ageing/publications.htm>.
13. Balaban R, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants and aging. Cell 2005; 120:483-495.
14. Hernández-Hernández C. Interrelación entre diabetes, obesidad y enfermedad periodontal. Revista Mexicana de Periodontología 2011; 2(1): 7-11.
15. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Censo de población y vivienda 2015. Resultados definitivo. México: INEGI, 2016. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx>
16. Sistema Nacional de Información en Salud. Principales causas de mortalidad en edad posproductiva 2008. México: Secretaría de Salud-SINAIS; 2007. Disponible en: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
17. Organización Mundial de la Salud. Envejecimiento y salud 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/es/>

18. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovanni S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2009; 8(1):18-30.
19. Campisi G, Chiapelli M, De Martinis M, Franco V, Ginaldi L, Guiglia R, Licastro F, Lio D. Pathophysiology of age-related diseases. *Immun Ageing.* 2009; 6(12): 1-9.
20. Rosado-Pérez J, Mendoza-Núñez VM. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 2007; 32: 58-69.
21. Ortiz Garcia Y, Morales Velazquez G. Estrés oxidativo su papel en la periodontitis. *Tamé.* 2013;2(5):165-169.
22. Borges I, Machado E, Wilhem D, Bittencourt T. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators of inflammation.* 2007: 1-5.
23. Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11: 298-300.
24. Serhan C, Ward P, Gilroy D. *Fundamentals of inflammation.* USA: Cambridge University press; 2010. p.433-447.
25. Bergendi L, Benes L, Duraccik M. *Chemistry physiology and pathology of free radicals.* Life Sci. 1999; 65: 1865-1874.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in Biology and Medicine,* 2a ed. Gran Bretaña: Oxford University Press, 1989: 10-12.
27. Dáiuo F, Nibali L, Parkar M, Patel J, Donas N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res.* 2010; 89(11): 1241-1246.
28. García Montes de Oca A. Influencia del estrés oxidativo en la enfermedad periodontal. *Rev Ciencias Médicas La Habana.* 2004; 10(2).
29. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine.* 2000; 108: 652-659.
30. Warner HR. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free radial biology & medicine.* 1994; 17: 249-258.
31. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology.* 2003;15: 247-254.
32. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78: 7124-7128.
33. Esterbauer H, Waeg G, Puhl H, Dieber-Rotheneder M, Tatzber F. Inhibition of LDL oxidation by antioxidants. In: Emerit I, Chance B. *Free Radicals and aging.* New York: Birkhäuser Verlag; 1992.p. 145.
34. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral diseases.* 2000; 6: 138-151.
35. Alok Sharma. Reactive oxygen species and antioxidants in periodontics. *International journal of dental clinics.* 2011; 3(2): 44-47.

36. Chapple ILC, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology* 2000. 2007; 43:160–232.
37. Chapple ILC. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *J Clin Pathol.* 1996; 49: M247-M255.
38. Sánchez-Rodríguez MA, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica.* 2004; 29(3): 81-90.
39. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57 (Suppl. 7):S715-S725.
40. Mayne S. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiological research. *J Nutr.* 2003; 133: 933-940.
41. Quintanar Escorza MA, Calderón Salinas JS. La capacidad antioxidante total. *Bases y aplicaciones. REB.* 2009; 28(3): 89-101.
42. González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica.* 2000; 25(1): 3-9.
43. Kinane D, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Australian Dental Journal.* 2001; 46 :(1):2-12.
44. Rioboo Crespo M, Bascones A. Factores de riesgo de la enfermedad periodontal: factores genéticos. *Av Periodon Implantol.* 2005; 17, 2: 69-77.
45. Dinarello C. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508.
46. Medianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl6:57-71.
47. Mahanonda R, Pichyangkui S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 41-55.
48. Graves DT, Oales T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011; 17.3.
49. Grossi S, Genco RJ. Periodontal Disease and Diabetes Mellitus: A Two-Way Relationship. *Annals of Periodontology* 1998;3: 51-59.
50. Nishimura F, Iwamoto Y, Mineshiba J, Shimizu A, Soga Y, Murayama Y. Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor- α in a 2-way relationship. *J Periodontol* 2003; 74: 97-102.
51. Rescala B, Rosalem W, et al. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol.* 2010;81(9):1308-1316.
52. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(4): 458-476.
53. Newman G. *Periodontología clínica de Carranza.* México: McGraw Hill; 2014. p.209-227.

54. Arce Y. Inmunología e inmunopatología oral. México: Manual Moderno; 2009. P27-40.
55. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007; 128: 92-105.
56. Goldsby R. Inmunología. México: McGraw Hill; 2004. p373-375.
57. Chung H, Kim H, Kim K, Choi J, Pal Yu. Molecular inflammation Hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microscopy research and technique.* 2002; 59:264-272.
58. Król K. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in the pathogenesis of periodontitis. *Ann Acad Med Stetin.* 2004; 50 (2): 135-148.
59. Hernández-Urzúa M, Alvarado-Navarro A. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* 2001; 12: 272-280.
60. Larsen C, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehres J, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Marc Y. Donath. Interleukin-1–Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 2007;356: 1517-26.
61. García F. Fundamentos de inmunobiología. UNAM 1997; 355-368.
62. Graves DT, Cochran. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J. Periodontol* 2003: 391-401.
63. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffman K, Bergmann M, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer FH. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003, 52: 812-816.
64. Moore, Waal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A. interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19:683–765.
65. Van Dyke TE. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(14): S1-S7.
66. González-Hita M, Bastidas-Ramírez BE, Ruiz-Madrigal B, Godínez S, Padero A. Funciones endocrinas de la célula adiposa. *Rev Endocrinol Nutr.* 2002; 10: 140-146.
67. Hernández M, Dutzan N, García J. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res* 2011; 90(10):1164-1170.
68. Rescala, Rosalem, Teles, et al. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J periodontol.* 2010; 9(81): 1308-1316.
69. Lacopino A. Periodontitis and diabetes interrelationship: role of inflammation. *Ann Periodontol.* 2001(6): 125-137.

XV. ANEXO

XV.1. Carta de consentimiento informado

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

* Z A R A G O Z A *

INSTITUTO PARA LA ATENCIÓN DE LOS ADULTOS MAYORES

DEL ESTADO DE HIDALGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO: “Estrés oxidativo e interleucinas pro-inflamatorias y factor de necrosis tumoral alfa en adultos mayores y su asociación con enfermedad periodontal.”

Antecedente y Objetivo

Estudios recientes han demostrado una asociación etiológica y fisiopatológica del estrés oxidativo con la enfermedad periodontal, así como con el proceso crónico inflamatorio, no obstante, las evidencias científicas en humanos son escasas e inconsistentes.

Procedimiento:

Se invitarán a personas adultas mayores del Estado de Hidalgo sanas y con enfermedades crónicas no descompensadas (**glucosa en sangre en ayuno menor de 180 mg/dL; presión arterial máxima, 160 sistólica/100 diastólica**) a que participen de manera voluntaria en el proyecto. A todas las personas incluidas en el estudio se les realizará un examen médico, incluyendo una historia clínica completa, electrocardiograma en reposo, toma de cuatro tubos de sangre para mediciones bioquímicas, medición de composición corporal, determinación de funcionalidad física y evaluación gerontológica integral, antes de iniciar el programa y, a los 12 meses posteriores al programa.

Condiciones para ingresar al estudio

- Adultos mayores de 60 a 74 años, no importando el sexo.
- Clínicamente sanos o con enfermedades crónico-degenerativas controladas.
- Firmar o poner su huella digital en esta carta de compromiso.

Riesgos

No existe ningún riesgo para su salud, las tomas de muestras sanguíneas serán llevadas a cabo por personal experimentado con material nuevo y desechable y el programa será monitorizado por personal del Instituto para la Atención de los Adultos Mayores del Estado de Hidalgo.

Beneficios

Las pruebas **no tendrán ningún costo** y los resultados de glucosa, perfil lipídico, perfil renal, biometría hemática, así como los de las pruebas de funcionalidad física y de la evaluación gerontológica integral se les entregarán a los participantes para el control y vigilancia de su estado de salud.

Confidencialidad

Toda la información obtenida es **ESTRICTAMENTE CONFIDENCIAL**, por lo que sólo se le proporcionará al participante y a su médico tratante.

Preguntas

Toda duda que tenga durante el tiempo que dura la investigación la podrá consultar con su médico tratante y con los participantes de la Unidad de Investigación en Gerontología.

Derecho a rehusar

La aceptación a participar en este estudio es enteramente **VOLUNTARIA**. Por lo que si decide no hacerlo no le afectará en su atención que le brinda el Instituto para la Atención de los Adultos Mayores del Estado de Hidalgo. Así mismo, puede decidir abandonar el estudio en el momento que usted lo considere conveniente.

En caso de cualquier duda o sugerencia en relación al proyecto comunicarse con:

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez

Dra. Mirna Ruiz Ramos

Unidad de Investigación en Gerontología, FES Zaragoza UNAM, México D.F.,

Tel. 015556230700, #, 39182, 015556230770, o a los correos:

mendovic@servidor.unam.mx, mirnar@comunidad.unam.mx

En el estado de Hidalgo:

Psic. Gustavo Carrasco gustavocvera@yahoo.com.mx

CONSENTIMIENTO

DECLARO QUE HE LEÍDO O ME HAN LEÍDO EN PRESENCIA DE UN FAMILIAR RESPONSABLE EL CONTENIDO DEL PRESENTE DOCUMENTO, COMPRENDO LOS COMPROMISOS QUE ASUMO Y LOS ACEPTO EXPRESAMENTE. POR ELLO, MANIFESTO MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACIÓN CON TÍTULO: “Estrés oxidativo e interleucinas pro-inflamatorias y factor de necrosis tumoral alfa en adultos mayores y su asociación con enfermedad periodontal.” Y FIRMO VOLUNTARIAMENTE ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos y he recibido una copia de este impreso.

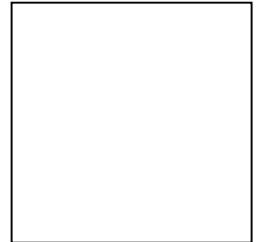
Nombre y firma del participante:

Nombre y firma de un familiar
(testigo): _____

Nombre y firma del investigador:

Pachuca, Hidalgo a ____ de _____ del _____.

En caso de no saber leer y escribir poner huella digital en el cuadro después de haberle leído el documento al participante en presencia del testigo.



XV.2. Índice Periodontal de Ramfjord



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGIA



ÍNDICE DE ENFERMEDAD PERIODONTAL DE RAMFIJORD (IEP)

Nombre: _____ Edad: _____ Sexo: _____ Fecha de evaluación: _____ Folio: _____

Diente	V	MV	L	DL	IEP
16					
21					
24					
36					
41					
44					

Códigos y criterios del IEP	
0	Ausencia de signos de inflamación
1	Inflamación leve o moderada que no se extiende por completo alrededor del diente.
2	Inflamación leve o moderada que se extiende alrededor del diente.
3	Gingivitis severa, que se caracteriza por un marcado enrojecimiento, ulceración y tendencia a la hemorragia.
4	Hasta 3 mm de prolongación apical del surco a partir de la unión amelocementaria.
5	De 3 a 6 mm de prolongación apical del surco a partir de la unión amelocementaria.
6	De más de 6 mm de prolongación apical del surco a partir de la unión amelocementaria.

Parámetros para la comparación de la condición clínica del valor del IEP de Ramfjord	
0	Ausencia de signos de inflamación.
1	Gingivitis leve o moderada localizada.
2	Inflamación leve o moderada generalizada.
3	Gingivitis severa.
4	Presencia de bolsas periodontales hasta de 3 mm.
5	Presencia de bolsas periodontales hasta de 3 a 6 mm.
6	Presencia de bolsas periodontales de más de 6 mm.

Observaciones: _____

Evaluador(a): _____ Supervisor(a): _____