



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

### PRODUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EN CAVIDAD ORAL DE PACIENTES CON APARATOLOGÍA DE ORTODONCIA

TESIS

Que para obtener el título de

**CIRUJANO DENTISTA**

P R E S E N T A:

Daniela Álvarez Trujano

TUTORA: Dra. Eileen Uribe Querol

ASESORA: Esp. Daniela Carmona Ruiz

CDMX

2020



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.

## DEDICATORIA

A mis padres, hermana y abuelitos:

Por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

*“El éxito consiste en ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo.”*

- Sir Winston Churchill

*“El esfuerzo continuo, y no la fuerza o la inteligencia, son la clave para*

*desbloquear nuestro potencial.”*

- Sir Winston Churchill

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Eileen Uribe Querol por su apoyo y sus buenos deseos en todo momento.

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma por permitirme estar en el laboratorio dentro del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A mis revisores de tesis Dr. Emiliano Jurado Castañeda, Dra. Nayeli Cordero Morales y Dra. Claudia Patricia Pedraza, a mi asesora Daniela Carmona Ruiz y tutora Dra. Eileen Uribe Querol por su tiempo y dedicación en hacer de esta tesis un trabajo respetable.

A Rafa, Charly y Nancy Mora Pérez por ayudarme y brindarme siempre apoyo en mis dudas en cuanto a técnica y conocimiento dentro del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio por hacer más amena y divertida esta última etapa de la licenciatura.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de estudiar y obtener el grado de licenciatura y por brindarme todas las herramientas necesarias para sacar adelante cada proyecto académico.

# ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO 1. ODONTOLOGÍA Y ORTODONCIA	7
1.1. Tratamiento en Ortodoncia	7
1.1.1. Ortodoncia preventiva	7
1.1.2. Ortodoncia interceptiva	8
1.1.3. Ortodoncia correctiva	8
1.2. Aparatología fija	8
1.2.1. Brackets de ligado convencional	8
1.2.1.1. Estructura básica de un bracket metálico de ligado convencional	8
1.2.1.2. Módulos elastoméricos	9
1.2.1.3. Principio mecánico que sigue el uso de brackets	10
1.2.2. Brackets de autoligado	11
1.2.2.1. Estructura básica de un bracket de autoligado	12
1.2.3. Propiedades de los sistemas de ligadura	14
1.3. Bases biológicas del tratamiento ortodóncico	15
1.4. Biopelícula dental	16
1.5. Brackets y su relación con la biopelícula dental	18
CAPÍTULO 2. SISTEMA INMUNOLÓGICO	20
2.1. Mecanismos de inmunidad innata	20
2.1.1. Barreras	21
2.1.1.1. Barreras físicas	21
2.1.1.2. Barreras químicas	21
2.1.1.3. Barreras biológicas	21
2.1.2. Componentes	21
2.1.2.1. Componentes celulares	21
2.1.2.1.1. Células asesinas naturales (Natural Killer- NK)	22
2.1.2.1.2. Neutrófilos	22
2.1.2.1.3. Macrófagos	22
2.1.2.2. Componentes solubles	22
2.1.2.2.1. Sistema del complemento	22
2.1.2.2.2. Quimiocinas y citosinas	23
2.2. Mecanismos de inmunidad adquirida	23
2.2.1. Respuesta inmune celular	23
2.2.1.1. Linfocitos	23
2.2.1.1.1. Linfocitos T	23
2.2.1.1.2. Linfocitos B	24
2.2.2. Respuesta inmune humoral	24
2.2.2.1. Anticuerpos	24

CAPÍTULO 3. NEUTRÓFILOS	25
3.1. Mecanismo que sigue un neutrófilo para llegar al sitio de infección	26
3.2. Mecanismo de eliminación de microorganismos	27
3.2.1. Fagocitosis	28
3.2.2. Degranulación	28
3.2.3. Trampas extracelulares de neutrófilos	28
3.3. NET (Trampas extracelulares de neutrófilos)	28
3.3.1. Formación y liberación de NET	28
3.3.2. Agentes inductores de NET	29
CAPÍTULO 4. INMUNOLOGÍA EN EL ECOSISTEMA ORAL	31
4.1. Respuesta inmune en el periodonto	31
4.1.1. Participación celular en el surco gingival	32
4.1.2. Enfermedad periodontal por alteración en el número de neutrófilos	35
4.1.3. Daño tisular regulado por NETosis	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
JUSTIFICACIÓN	38
HIPÓTESIS	39
OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS PARTICULARES	39
MATERIALES Y MÉTODOS	39
RESULTADOS	45
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	59
1. Control personal de placa usando el índice de O'Leary	59
2. Ficha clínica	60
3. Consentimiento informado para la toma de saliva	61
4. Consentimiento informado para la toma de sangre	62

## RESUMEN

El estado de homeostasis en la cavidad oral depende de varios mecanismos que son regulados por el sistema inmunológico. La inmunoglobulina A secretora y los neutrófilos son algunos de los participantes en el establecimiento de este equilibrio. Los neutrófilos son glóbulos blancos que representan la primera línea de defensa del organismo, la cual, se activa ante la presencia de cualquier microorganismo que interfiera con el equilibrio del cuerpo. Los neutrófilos eliminan microorganismos por medio de tres mecanismos: la fagocitosis, la degranulación y la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, por sus siglas en inglés). En el caso de la cavidad oral, los neutrófilos continuamente se activan ante la presencia de biopelícula dental en las superficies dentales y las superficies de los aparatos o prótesis. El tratamiento de Ortodoncia conlleva, en la mayoría de los casos, al uso de aparatología fija, siendo la colocación de brackets de ligado convencional el tratamiento predilecto entre los pacientes. Dentro de las desventajas que presenta dicho tratamiento se encuentran la gran retención de restos de alimento y de biopelícula dental en los brackets y la dificultad para realizar una adecuada higiene dental. La falta de higiene oral por periodos cortos de tiempo no representa un gran peligro para mantener el equilibrio de la microbiota oral residente. Sin embargo, si los periodos de higiene son largos o no se realizan, el paciente con aparatología ortodóncica fija puede desarrollar enfermedades periodontales como la gingivitis y la periodontitis. El desarrollo de nuevos aparatos fijos como los brackets de autoligado presentan una solución para disminuir la acumulación de biopelícula dental al excluir el uso de módulos elastoméricos. El papel de los neutrófilos en condiciones de acumulación de biopelícula dental por aparatología de ortodoncia no se ha estudiado, por lo que en este trabajo se exploró una de las funciones de los neutrófilos que es la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET).

# INTRODUCCIÓN

## CAPÍTULO 1

### ODONTOLOGÍA Y ORTODONCIA

En el transcurso del tiempo, la profesión Odontológica ha desarrollado un sinnúmero de funciones. Sin embargo, actualmente el servicio y la investigación son una prioridad. La profesión Odontológica requiere de valores humanos como el respeto, el conocimiento, el trabajo social, la responsabilidad, entre otros, que permiten desarrollar una interrelación humana. Y aquí, el área social constituye la base del desempeño de la profesión. (1)

La Odontología se define como la especialidad y área del conocimiento de las ciencias de la salud, que se encarga del diagnóstico, la prevención y el tratamiento de las enfermedades del aparato estomatognático. (2)

Por otro lado, la Sociedad Española de Ortodoncia, define a la Ortodoncia como una especialidad de la Odontología que estudia, previene y corrige las alteraciones del desarrollo craneofacial, la forma de las arcadas dentarias y la posición de los maxilares para poder restablecer el equilibrio morfológico y funcional de boca y cara, buscando mejorar también la estética facial. (3)

#### **1.1. Tratamiento en Ortodoncia**

El tratamiento de ortodoncia puede ser clasificado en tres tipos:

**1.1.1. Ortodoncia preventiva:** Se aplica cuando no está aún presente la maloclusión. Busca utilizar medidas adaptadas para preservar la integridad de lo que parece ser normal en un momento específico. La prevención en ortodoncia comienza en el momento mismo en que los dientes comienzan a erupcionar hasta que se produce el recambio dentario. (4, 5)



**1.1.2. Ortodoncia interceptiva:** Se aplica cuando se tienen los primeros signos de aparición de la maloclusión. Se comienzan a interponer barreras para evitar alteraciones mayores y una evolución desfavorable de la oclusión. (4)

**1.1.3. Ortodoncia correctiva:** Se encarga del tratamiento de las maloclusiones producidas por malposición dentaria, mediante el uso de aparatología fija (6). La cual, no puede ser retirada por el paciente. (7) En este tipo de aparatología se utilizan bandas y brackets. Estos actúan como soportes en la unión de los componentes que producen la fuerza. (8)

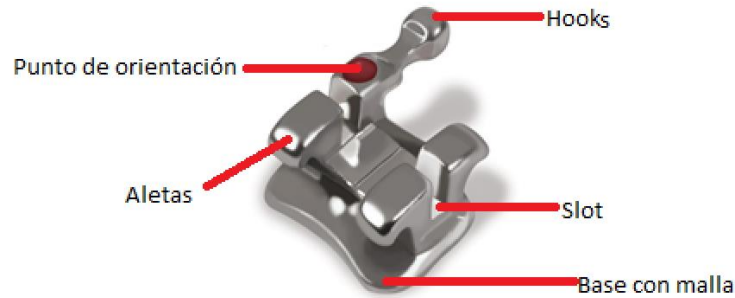
## **1.2. APARATOLOGÍA FIJA**

### **1.2.1. Brackets metálicos de ligado convencional**

Actualmente, el aparato dental mayormente utilizado durante el tratamiento de ortodoncia son los brackets metálicos, los cuales, están fabricados de acero y se caracterizan por el uso de módulos elastoméricos también conocidos como elásticos o ligas, que sirven para fijar el bracket al alambre y aplicar la fuerza necesaria para corregir los dientes. (9)

#### **1.2.1.1. Estructura básica de un bracket metálico de ligado convencional**

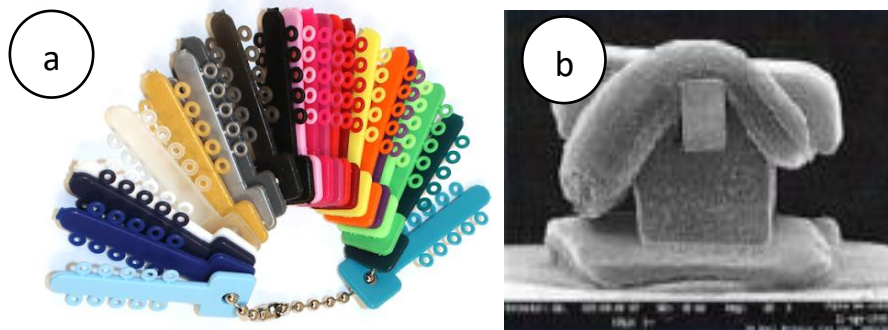
Los brackets convencionales tienen tres paredes en la ranura que son una pared gingival horizontal, una pared horizontal oclusal, y una pared vertical (Figura 1). (10)



**Figura 1. Estructura básica de un bracket metálico de ligado convencional.** El bracket presenta una base con malla que se adhiere a la superficie dental, una hendidura llamada slot que contiene el alambre de ortodoncia, un gancho para sostener distintos aditamentos como ligas o resortes, un punto de orientación para saber la correcta posición que debe tener el bracket en la boca y aletas que sirven para sostener ligas de ortodoncia. Imagen modificada de (11, 12).

### 1.2.1.2. Módulos elastoméricos

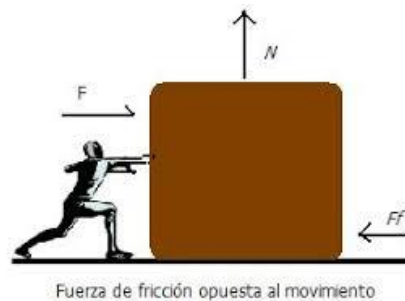
Los módulos elastoméricos, elásticos o ligas, son anillos pequeños individuales de diversos colores, hechos a base de polímeros de poliuretano que sirven para fijar el alambre al arco e incluso darle un toque divertido al aspecto del aparato. Por su composición, están sujetas a su deterioro y deformación plástica como resultado de la lenta hidrólisis que sufren al estar expuestos a un ambiente húmedo. Por ello, es importante cambiarlos con relativa frecuencia para evitar que se desplacen espontáneamente y que además se inactiven en la función que realizan. (13) (Figura 2)



**Figura 2. Módulos elastoméricos** a) Presentación clásica de módulos elastoméricos. Imagen tomada de (14). b) Fotografía con microscopio electrónico de un bracket convencional con módulo elastomérico. Fotografía tomada de (15).

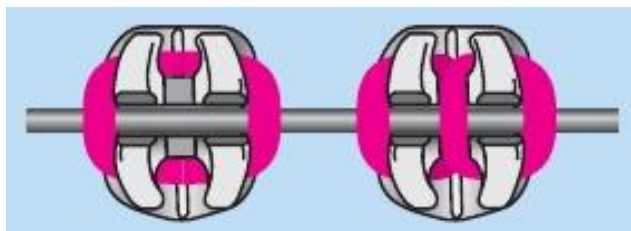
## Principio mecánico que sigue el uso de brackets

La fuerza tangencial que se produce entre dos cuerpos que se encuentran en contacto cuando uno de estos se resiste al movimiento sobre el otro se denomina fricción, por lo tanto, un término más preciso para la fricción en ortodoncia es la resistencia al deslizamiento. La resistencia al deslizamiento se conoce como la oposición al movimiento encontrado por el bracket a medida que trata de deslizarse a lo largo del alambre o viceversa. Por consiguiente, la fuerza que debe aplicarse sobre los dientes tiene que superar la resistencia al deslizamiento para lograr el movimiento ortodóncico deseado. (16) Esto requiere el menor grado de fricción posible para permitir el cierre del espacio de manera efectiva. (17) (Figura 3)



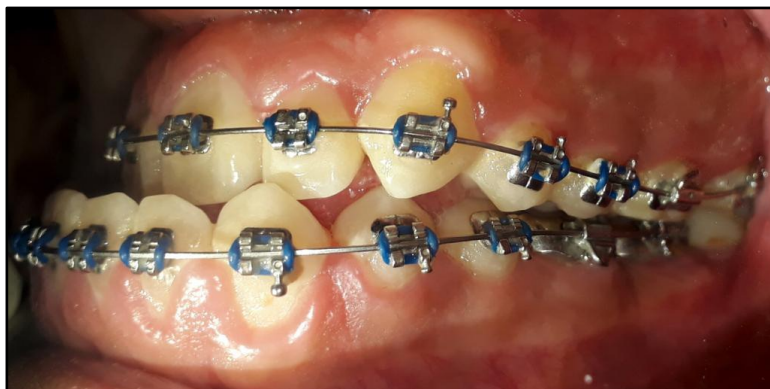
**Figura 3. Representación de la fricción.** La fuerza de fricción o la fuerza de rozamiento es la fuerza que existe entre dos superficies en contacto que se opone al inicio del deslizamiento. (18)

En el caso de los brackets metálicos de ligado convencional, los módulos elastoméricos puede ser colocados de manera convencional en un patrón de figura en O, o bien, pueden ser colocados en un patrón de figura en 8 alrededor del bracket, la segunda opción, aunque útil para asegurar la participación de arco completo en el interior de la ranura del bracket, produce fricción significativamente mayor que cuando se compara con la figura-O patrón o con la ligadura metálica. (13) (Figura 4)



**Figura 4. Diferentes formas de colocación de módulos elastoméricos.** Del lado izquierdo se observa un módulo elastomérico con patrón en forma de O y del lado derecho un patrón en forma de 8. (15)

En respuesta a este hecho, para superar las desventajas de las técnicas de ligado convencional, se introducen al mercado los brackets de autoligado, los cuales favorecen la disminución de la resistencia al deslizamiento, brindan mayor comodidad al paciente y reducen el tiempo de tratamiento y de consulta (Figura 5). (17)



**Figura 5. Brackets de ligado convencional.** Fotografía que muestra el uso de brackets de ligado convencional en la cavidad oral. Fuente directa.

### 1.2.2. Brackets de autoligado

El primer sistema de autoligado registrado fue el de Russell en 1935 descrito por el doctor Jacob Stolzenberg y renació el interés en el desarrollo de los brackets de autoligado por los fabricantes y ortodoncistas desde mediados de los años 70.

Según Zreaqat y Hassan, la filosofía del autoligado sugiere que la menor fuerza y la menor fricción, permiten al diente moverse a su posición fisiológica. Debido a que no sobrecarga la musculatura o no se induce la isquemia en los tejidos periodontales o hialinización, no se afecta el tejido periodontal.

Por otra parte, Orozco y Meza evaluaron los diferentes tipos de brackets de autoligado en el mercado y dedujeron que la fricción depende de la aleación de los alambres, la dimensión, angulación y material del slot, así como las fuerzas de ligado, la distancia interbracket y la manipulación del operador. (16)

La ortodoncia de autoligado es conocida porque no necesita ninguna ligadura para unir los arcos a los brackets, sino que se consigue su unión mediante un clip en el bracket. Los clips, permiten ejercer las fuerzas de los arcos con memoria elástica. (9) (Figura 6).



**Figura 6. Brackets de autoligado.** Fotografía que muestra el uso de brackets de autoligado en la cavidad oral. Fuente directa.

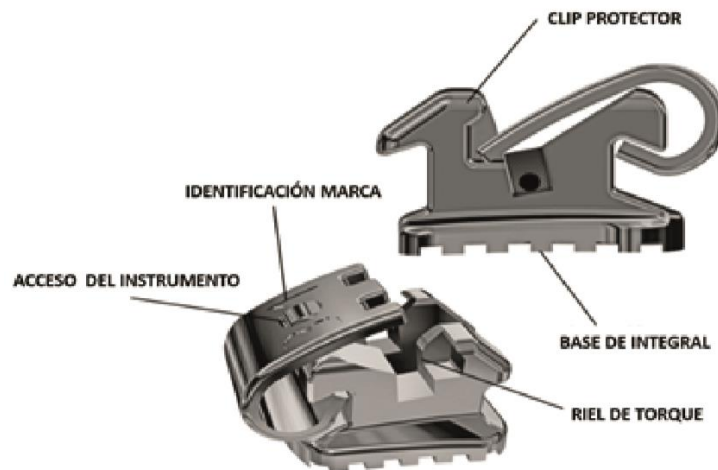
#### **1.2.2.1. Estructura básica de un bracket de autoligado**

Un bracket de autoligado además de las paredes anteriormente mencionadas en los brackets convencionales, tiene una pared facial adicional. La pared facial de los brackets de autoligado, cumplen un rol muy parecido al que desempeñan las

ligaduras metálicas o elastoméricas en los brackets convencionales (Figuras 7 y 8). Estas paredes son de dos tipos: los de tipo pasivo y tipo activo o interactivo. (10)



**Figura 7. Estructura básica de un bracket de autoligado.** De lado izquierdo se observa el clip abierto de un bracket de autoligado. Al centro se observan micro retenciones en la base del bracket para una mejor retención a la superficie del diente. Y por último, de lado derecho se observa el clip cerrado, un bisel del bracket para su retiro de la cavidad oral y una bolita para abrir el clip. (15)



**Figura 8. Estructura básica de un bracket de autoligado.** (10)

Básicamente los pasivos son aquellos en los cuales el clip de cierre nunca presiona o empuja al arco hacia el fondo de la ranura y sus clips pueden ser rígidos o flexibles. Los interactivos son denominados así ya que su clip es capaz de flexar e interactuar con el arco para corregir la posición de las piezas dentales. El clip en

éstos últimos se insinúa dentro del slot para empujar los arcos hacia el fondo. (19)  
(Figura 9)

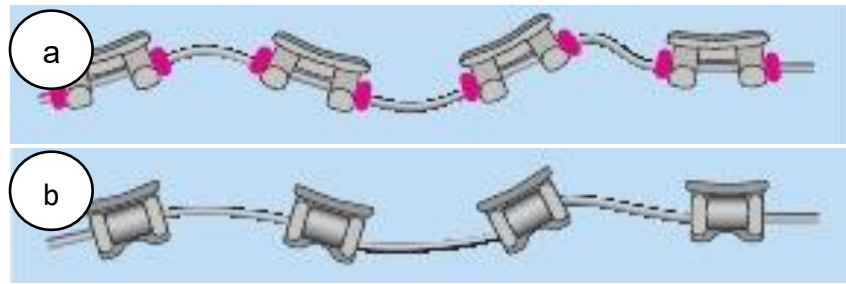


**Figura 9. Tipos de bracket de autoligado.** Del lado izquierdo se observa un bracket de autoligado de tipo pasivo, donde el clip no presiona el arco hacia el fondo de la ranura y del lado derecho, uno de tipo activo, donde el clip ejerce presión sobre el arco. (15)

### 1.2.3. PROPIEDADES DE LOS SISTEMAS DE LIGADURA

Los sistemas de ligadura de los brackets tanto de autoligado (pared facial y el clip) o convencionales (alambres y elásticos), deben contener al alambre en el slot del bracket, cumpliendo además ciertas propiedades para tener un sistema de ligadura óptimo en los diferentes tipos de brackets, tanto convencionales como de autoligado. Estas propiedades ideales son:

- Seguridad y resistencia.
- Que pueda asegurar completamente el alambre al slot del bracket.
- Mostrar baja fricción entre el bracket y el arco de alambre.
- Rápido y fácil de usar.
- Permitir una conexión fácil de la cadena elástica.
- Ayudar a una buena higiene oral.
- Comodidad para el paciente. (10)



**Figura 10. Representación de los diferentes tipos de ligado.** a) Brackets con ligado convencional.  
b) Brackets de autoligado. (15)

### 1.3. BASES BIOLÓGICAS DEL TRATAMIENTO ORTODÓNCICO

El tratamiento ortodóncico se basa en la aplicación de fuerza que producirá movimientos del órgano dental mediante la remodelación del hueso que lo rodea, eliminándose selectivamente de algunas zonas y formándose en otras. (20) De igual manera, el ligamento periodontal sufrirá una serie de modificaciones. En las zonas de presión se evidenciarán cambios vasculares con dilatación de los vasos, estasis y desintegración de las paredes vasculares. También podrán observarse en las zonas de tensión, cambios en el flujo sanguíneo con migración de leucocitos hacia el espacio extravascular, lo cual indica la presencia de una reacción inflamatoria leve. (21)

Por otro lado, los movimientos dentales afectarán la salud periodontal comenzando a desviar la biopelícula dental hacia la región subgingival, esto a su vez, alterará la morfología ósea, mientras aumenta la pérdida de inserción periodontal.

En consecuencia, presentarán alteraciones desfavorables en el periodonto tanto por el desplazamiento de los dientes ocasionado por las fuerzas aplicadas excesivas, como por la acumulación de placa debido a la dificultad de mantener una buena higiene oral, lo que conlleva a una inflamación de los tejidos blandos circundantes a los brackets y bandas de ortodoncia. (22)



#### 1.4. BIOPELÍCULA DENTAL

La biopelícula dental es una entidad o masa estructurada específica, adhesiva, altamente variable, que se forma por el crecimiento y colonización de microorganismos sobre la superficie de los dientes, de las restauraciones, de los aparatos protésicos o de cualquier otro material duro. A medida que los microorganismos se organizan en colonias, crecen y producen sustancias destructivas en los tejidos subyacentes. Esta comunidad organizada de numerosas especies de microorganismos, agrupadas en una matriz extracelular, compuesta de productos del metabolismo bacteriano, de exudado crevicular, de la saliva y partículas de alimentos, se forma como consecuencia de la organización y proliferación de las colonias de bacterias. (23). El desarrollo de la biopelícula supragingival se puede dividir en tres fases: primero, la formación de la película adquirida, luego la colonización bacteriana inicial o primaria y por último la colonización secundaria y maduración. (24) Después de realizada una profilaxis dental, la superficie del diente es cubierta en cuestión de minutos con una capa de material proteico de un espesor de 0,1 a 0,8 micrómetros, derivado de la saliva, conocido como película adquirida a la que se adhieren microorganismos de forma aislada inicialmente. Dentro de las primeras 24 horas, las bacterias Gram-positivas, principalmente *Streptococcus sanguis* y especies de *Actinomyces spp.* colonizan esta biopelícula. Posteriormente, la acumulación de la matriz extracelular y la adherencia de nuevos microorganismos a los receptores de superficie de los cocos y bacilos facultativos Gram-positivos, permite la adherencia de microorganismos Gram-negativos como los *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia* que no tienen la capacidad de adherirse directamente por sí mismos. Y por último se aumenta la complejidad y madurez hasta la colonización de bacterias estrictamente anaerobias. La adherencia bacteriana, el crecimiento, la eliminación y reunión es un proceso continuo y dinámico. La estructura de la biopelícula dental está en constante proceso de reorganización (Figura 11). (24, 25)

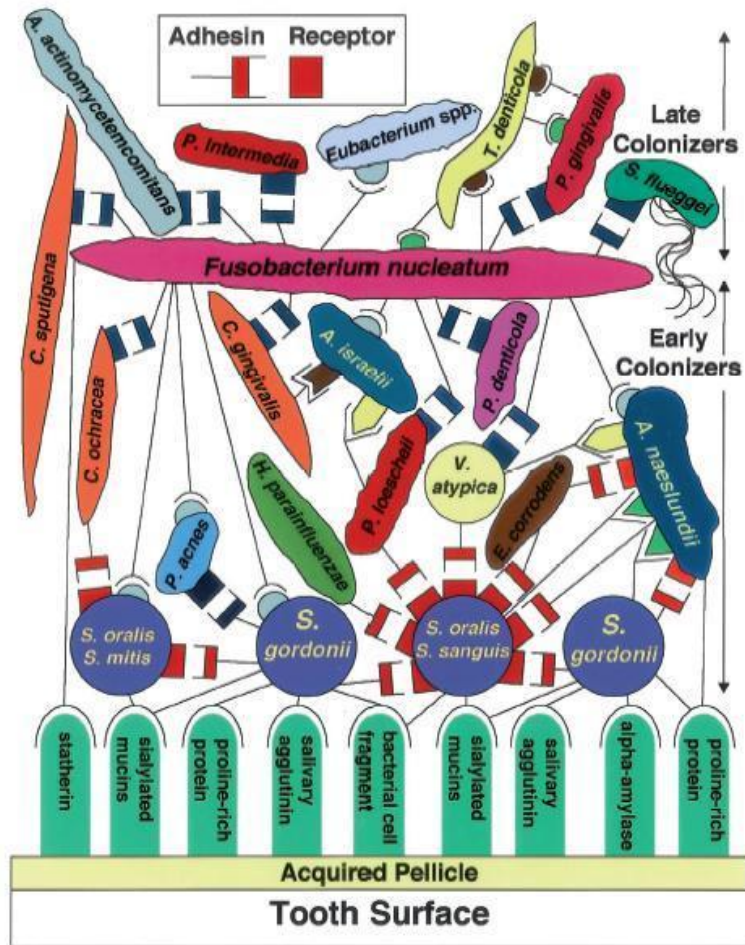


Figura 11. Esquema representativo de los microorganismos colonizadores de la biopelícula dental. (26)

El control de la biopelícula dental juega un papel clave en el proceso por el cual se producen las dos enfermedades orales más comunes: la caries y la enfermedad periodontal, las cuales se generan cuando el equilibrio entre la respuesta inmune del huésped y la patogénesis microbiana se alteran. (22, 23)

El tratamiento de ortodoncia crea nuevas áreas de retención y en combinación con una mala higiene oral dan lugar a un aumento en el número de microorganismos que pueden causar daño periodontal directamente por medio de la producción de toxinas bacterianas, enzimas, o los productos finales del metabolismo e indirectamente por la estimulación de respuestas inmunes que resultan en lesiones a los propios tejidos. La mayoría de los pacientes desarrollan gingivitis o hiperplasias en el primer o segundo mes después de colocados los

brackets, siendo más marcado en la zona posterior y con el uso de bandas, especialmente en los molares superiores. (25)

Si bien la lesión periodontal inicial aparece a los 4 días de acumulación de placa, esta no se evidencia clínicamente, sin embargo, a nivel celular se caracteriza por un aumento del líquido gingival crevicular y migración de neutrófilos desde el plexo vascular hacia el epitelio de inserción y surco gingival. (27) Para entender mejor este proceso es necesario conocer brevemente cómo funciona el sistema inmunológico en el siguiente capítulo de esta tesis.

## **1.5. BRACKETS Y SU RELACIÓN CON LA BIOPELÍCULA DENTAL**

Durante mucho tiempo el paciente ortodóncico fue considerado como paciente de bajo riesgo, ya que los procedimientos empleados en ellos no se consideraban invasivos. Sin embargo, los dispositivos utilizados durante el tratamiento se han asociado con una deficiente higiene oral. (8) El bracket es un dispositivo que se retiene en el diente. Dependiendo de su diseño, superficie y tamaño, será la cantidad de biopelícula dental que pueda retener y acumular, ocasionando un impedimento para que el paciente logre tener una buena salud oral sin los cuidados pertinentes. (9)

En condiciones normales, la formación de la biopelícula dental se presenta pocos minutos después de limpiar la superficie de los dientes. Su desarrollo se rige por una dinámica constante de acuerdo con la higiene oral del paciente. El tratamiento de ortodoncia con aparatos fijos está asociado con la inflamación gingival, el sangrado, la hiperplasia gingival y las lesiones de mancha blanca, ya que crea áreas de retención que predisponen a la mayor acumulación de placa supragingival, la cual altera las condiciones normales del medio oral cambiando la composición de la microbiota oral.

La higiene oral es más complicada de realizar especialmente cerca del margen gingival, en el área interproximal y alrededor de los brackets y las bandas. Éstos son los lugares donde se presenta mayor descalcificación del esmalte e

inflamación. Es por esto que los pacientes que van a iniciar un tratamiento de ortodoncia deben tener un buen estado periodontal y un seguimiento continuo durante todo el periodo de tratamiento.

Quintero descubrió en su análisis, que los brackets de ligado convencional en comparación con los brackets de autoligado presentan mayor retención de biopelícula dental y a su vez, mayor afectación de los tejidos blandos. (22)

Una parte integral de la práctica de ortodoncia debe ser un programa estructurado de higiene oral que incluya una explicación detallada de la relación entre la biopelícula dental y la inflamación, un asesoramiento sobre la dieta, una capacitación al paciente sobre las técnicas y los productos disponibles para la eliminación de la biopelícula y, por último, un monitoreo de la eficiencia de estos al ser usados por el paciente. (25)

## **CAPÍTULO 2**

### **SISTEMA INMUNOLÓGICO**

El sistema inmunológico es extraordinariamente complejo y se define como el conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas que, a través de diferentes procesos celulares responden y eliminan agentes extraños al cuerpo. Así, este sistema protege contra las diferentes enfermedades, identificando y matando patógenos de cualquier índole como virus, bacterias, hongos, parásitos o moléculas reconocidas como “no propias” y también eliminado células cancerosas (28, 29).

En condiciones fisiológicas, las células y moléculas que componen el sistema inmunológico no solamente reconocen componentes microbianos, sino que además tienen la capacidad para reconocer como extraños muchos componentes que no son de origen microbiano y moléculas propias alteradas como las que se forman en las células tumorales. En la actualidad, las reacciones coordinadas y reguladas de los componentes del sistema inmunológico para erradicar estímulos agresores o neutralizar sus efectos dañinos se denomina respuesta inmunitaria. (28)

De forma general, el sistema inmunológico se puede dividir en inmunidad innata o inespecífica e inmunidad adquirida o específica.

#### **2.1. MECANISMOS DE INMUNIDAD INNATA**

Este tipo de inmunidad es considerado el más antiguo dentro de la escala evolutiva. Está presente en el organismo de forma natural, antes del nacimiento y constituye la primera línea de defensa contra alguna infección. La inmunidad innata carece de memoria para agentes invasores y no es específica para antígenos, lo que significa que con el tiempo, no aumenta su eficacia en sucesivas exposiciones. A pesar de esto, la inmunidad innata es capaz de diferenciar patrones de estructuras microbianas pertenecientes a grandes grupos de microorganismos (secuencias de DNA viral, DNA bacteriano, etc.), de modo que puede activar diferentes mecanismos

dependiendo del grupo microbiano invasor. Los mecanismos que componen esta inmunidad son: (30)

### **2.1.1. Barreras**

**2.1.1.1. Barreras físicas:** Las barreras físicas son los epitelios que posee el organismo. Cada epitelio contiene diferentes cantidades de queratina y evitan que penetren o proliferen colonias de microorganismos por su continua descamación. Ejemplos de estas barreras físicas son la piel, el epitelio respiratorio y el epitelio digestivo.

**2.1.1.2. Barreras químicas:** Las barreras químicas son las diversas sustancias que engloban a una partícula extraña para su eliminación del cuerpo. Dentro de estas sustancias se encuentra el moco secretado por las diferentes mucosas del organismo, las lágrimas en los ojos, la cera en el conducto auditivo externo o la saliva en la boca. Además, estos fluidos contienen sustancias antimicrobianas. Por ejemplo, la saliva contiene lisozima. (27, 30)

**2.1.1.3. Barreras biológicas:** Las barreras biológicas son los microorganismos presentes de manera natural en el cuerpo, se conocen como microbiota comensal. Por ejemplo, las bacterias que forman la microbiota intestinal segregan sustancias que impiden que otras bacterias se instalen en el tracto digestivo.

### **2.1.2. Componentes**

Estos componentes son activados en caso de que el agente extraño logre atravesar las barreras. Estos componentes son un grupo heterogéneo de células y factores solubles.

**2.1.2.1. Componentes celulares:** Las células de la inmunidad innata se caracterizan en general por presentar una respuesta inmediata a la invasión.

**2.1.2.1.1. Células asesinas naturales (Natural Killer-NK):** Constituyen del 5 al 15% de las células mononucleadas de la sangre periférica en personas sanas. Son células linfoides citolíticas que provocan la muerte de los microorganismos, células infectadas, células tumorales o células ajenas, de modo que contienen la infección hasta que el sistema de linfocitos T se encuentre plenamente operativo.

**2.1.2.1.2. Neutrófilos:** Representan aproximadamente del 50 al 70% de los leucocitos en la sangre. Su función es alcanzar el sitio de la infección en pocas horas y eliminar a los microorganismos invasores, por lo que se los considera responsables de la primera respuesta de inmunidad, esta función se debe principalmente a que en su interior contienen gránulos ricos de lisosima, colagenasa, mieloperoxidasa y elastasa. (30)

**2.1.2.1.3. Macrófagos:** Son células que se originan en la médula ósea como monocitos, circulan por la sangre y pasan a los tejidos donde se diferencian en macrófagos, éstos se hallan vinculados a la inmunidad innata y a la inmunidad adquirida, de este modo sus funciones son activar a los linfocitos T por coestimulación y fagocitar a las células reconocidas como extrañas (células tumorales, células infectadas, microorganismos. (27, 30)

**2.1.2.2. Componentes solubles:** Además del componente celular, existen los componentes solubles, que son una variedad de sustancias que coadyuvan en la inmunidad innata.

**2.1.2.2.1. Sistema del complemento:** Es un grupo de proteínas sintetizadas en el hígado y circulantes en el plasma sanguíneo, cuya función principal es potenciar la inflamación, facilitar la fagocitosis con la opsonización de microorganismos y dirigir la lisis de células. Participan en la inmunidad innata y adquirida.

Este sistema se activa mediante tres posibles rutas: a) La vía clásica, sucede cuando se reconocen a los microorganismos recubiertos de anticuerpos, b) la

vía alterna, capaz de reconocer a estructuras propias de las bacterias y c) la vía de las lectinas, que se produce cuando se reconoce a una proteína denominada "lectina de unión a manosa", la misma que se ancla a residuos de manosa en las glucoproteínas y glucolípidos de la membrana de las bacterias.

**2.1.2.2.2. Quimiocinas y citosinas:** Son mediadores proteicos liberados por los elementos celulares del sistema inmune que intervienen en la regulación tanto de la inmunidad innata como de la adquirida, jugando un papel importante en la activación y regulación de la respuesta inmune, así como en la hematopoyesis y en la respuesta inflamatoria. A este grupo pertenecen toda la gama de interleucinas, interferones, factores estimulantes de colonia, factores de necrosis tumoral y el factor de crecimiento. (30)

## **2.2. MECANISMOS DE INMUNIDAD ADQUIRIDA**

Estos mecanismos son más avanzados desde el punto de vista evolutivo. En este tipo de respuesta se ataca al agente extraño de manera específica para eliminarlo. Estos mecanismos se dividen en respuesta celular, la misma que es liderada por linfocitos y respuesta humoral mediada por anticuerpos. (30)

### **2.2.1. Respuesta inmune celular**

La respuesta inmune celular tiene como mediadores principales a los linfocitos, los mismos que se encargan básicamente de erradicar a los microorganismos intracelulares.

**2.2.1.1. Linfocitos:** Los linfocitos son leucocitos presentes en la sangre que se originan a partir de las células troncales hematopoyéticas.

**2.2.1.1.1. Linfocitos T:** Se originan a partir de células troncales hematopoyéticas, maduran en el timo y se instalan en los tejidos linfoides. Su función principalmente



es identificar antígenos específicos o un grupo de antígenos "sensibilizadores" para luego desencadenar la respuesta inmune celular.

**2.2.1.1.2. Linfocitos B:** Se originan a partir de células troncales hematopoyéticas y maduran en la médula ósea, para luego instalarse en el tejido linfoide, este grupo celular es el responsable de la producción de anticuerpos.

## **2.2.2. Respuesta inmune humoral**

La respuesta inmune humoral consiste principalmente en una serie de reacciones que median los anticuerpos y las proteínas del complemento, para eliminar al agente invasor. Cabe resaltar que la unión antígeno-anticuerpo no es suficiente para la eliminación del agente extraño contra el que se lucha, por lo que es muy importante la colaboración de otros elementos (sistema de complemento, células fagocitarias y células NK).

**2.2.2.1. Anticuerpos:** Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), son una familia de proteínas globulares producidas por los linfocitos B, participan en la defensa contra bacterias y parásitos mayores, circulan por la sangre y penetran en los fluidos corporales donde se unen específicamente al antígeno que provocó su formación.

(30)

## **CAPÍTULO 3**

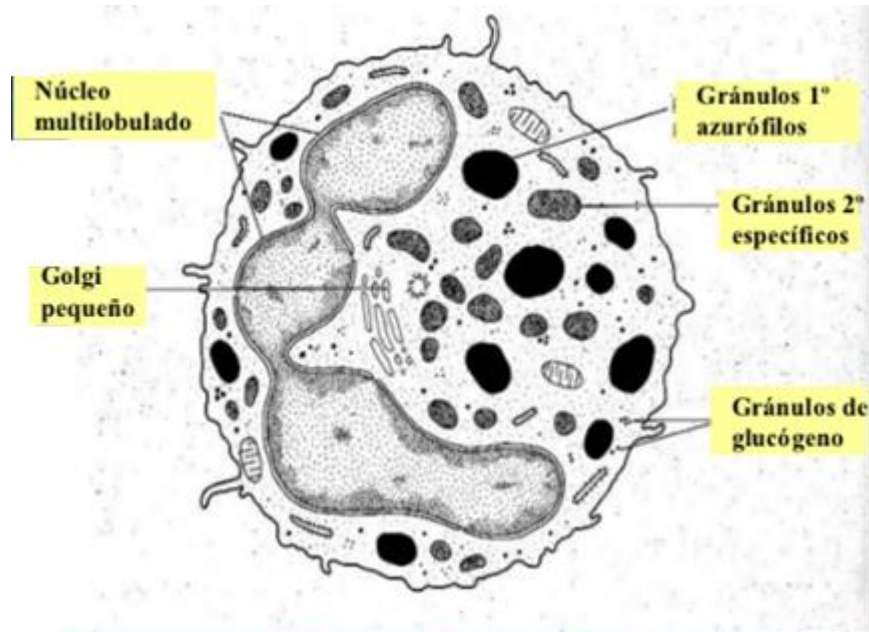
### **NEUTRÓFILOS**

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares esenciales, que forman parte de la primera línea de defensa del organismo contra infecciones bacterianas y fúngicas. Son las principales células fagocíticas que se encuentran en sangre periférica ocupando de un 50 a un 70% del total de células de la serie blanca. (27, 30)

Los neutrófilos se originan a partir de células troncales hematopoyéticas, maduran en la médula ósea y producen enzimas y proteínas antimicrobianas. Estas moléculas son almacenadas en diferentes gránulos en su citoplasma. Después de salir de la médula ósea, los neutrófilos circulan por el torrente sanguíneo durante 7 a 10 horas antes de migrar a los tejidos que han sufrido un daño o una infección, dirigidos por medio de señales químicas como la interleucina 8 (IL-8), en un proceso llamado quimiotaxis. (31)

Morfológicamente son células fagocíticas que miden aproximadamente de 10 a 12  $\mu\text{m}$ . Presentan un núcleo multilobulado con histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4), cromatina compacta y segmentada en 2 a 5 lóbulos cuando son maduros y únicamente un núcleo en banda cuando son inmaduros. Por otra parte, el citoplasma contiene un gran número de gránulos. (31-33) Se distinguen tres tipos de gránulos que pueden ser distinguidos por los distintos componentes que contienen. Nombrados por el orden de aparición en las células progenitoras de la médula ósea son los siguientes: primarios o azurófilos, secundarios o secretorios o específicos y terciarios. Los gránulos primarios o azurófilos son lisosomas que contienen las enzimas necesarias para la digestión intracelular y diversos compuestos con actividad bactericida como mieloperoxidasa, elastasa, catepsina G, los gránulos secundarios o específicos contienen lisozima, colagenasa y lactoferrina. Y por último los gránulos terciarios o de gelatinasa. (34) (Figura 12) El neutrófilo hace alusión a su nombre ya que, a excepción de sus gránulos, los cuales

se observan ligeramente púrpuras en presencia de tinción de Giemsa, este no se tiñe con colorantes ácidos ni básicos. (31-33)



**Figura 12. Neutrófilo.** Representación de la morfología de un neutrófilo donde se observa un núcleo multilobulado y gránulos citoplasmáticos. (35)

### 3.1. Mecanismo que sigue un neutrófilo para llegar al sitio de infección

La presencia de un microorganismo invasor en un tejido dispara la generación de señales de alerta. Entre estas señales se encuentran sustancias que activan al endotelio vascular local tornándolo apto para la migración de los leucocitos al tejido infectado a fin de acudir a erradicar la infección. En la diapédesis, la activación endotelial, por ejemplo, incrementa la expresión de moléculas de adhesión como son las selectinas (L- y P-selectinas), y las integrinas (CD11a/CD18) y Mac1 (CD11b/CD18), que facilitan la adherencia de neutrófilos al endotelio y su extravasación hacia el sitio de infección. En la quimiotaxis, la extravasación y correcta migración al sitio de infección requiere de sustancias quimioattractantes que

median el movimiento del neutrófilo dirigido por un gradiente de concentración. Dentro de estas sustancias son claves los componentes del complemento C5a y C3a, el PAF y quimiocinas como la IL-8. (36, 37)

Una vez en los sitios de infección, los neutrófilos reconocen directamente a los organismos invasores, ya sea a través de un conjunto de receptores conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (RRP), que reconocen moléculas características de los microorganismos ajenos al huésped, o, a través de receptores para componentes del complemento activado y de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G cuando los mismos se encuentran recubiertos (opsonizados) por ciertos componentes activados del sistema complemento o por anticuerpos, respectivamente. Este reconocimiento del microorganismo infectante a través de este conjunto de receptores, suele desencadenar su fagocitosis. (36, 38) (Figura 13)

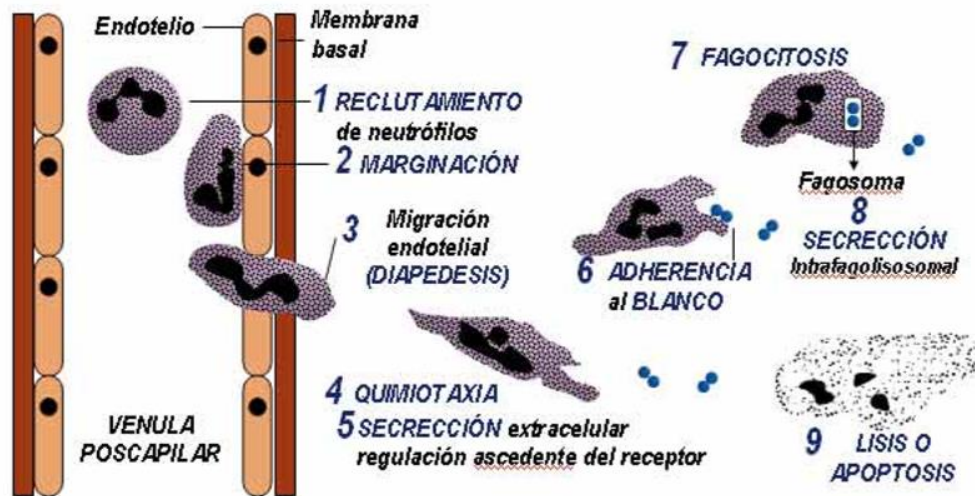


Figura 13. Proceso de diapédesis y fagocitosis del neutrófilo. (27)

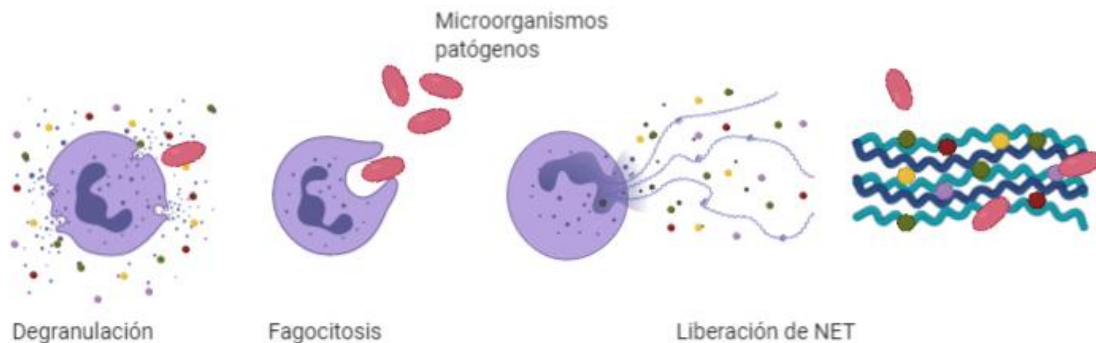
### 3.2. MECANISMO DE ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS

Los neutrófilos utilizan diferentes estrategias para eliminar microorganismos:

**3.2.1. Fagocitosis:** La fagocitosis se caracteriza porque el neutrófilo internaliza al patógeno exponiéndolo a un estallido oxidativo (ROS) y a compuestos antimicrobianos (elastasa, la catepsina G y la proteinasa 3) que son descargados en las vesículas fagocíticas por gránulos citoplasmáticos. (31, 36, 38, 39)

**3.2.2. Degranulación:** La degranulación implica la liberación de sustancias como pueden ser especies reactivas de oxígeno en el sitio de infección. (36)

**3.2.3. Trampas extracelulares de neutrófilos:** En este mecanismo, también conocido como NET (por sus siglas en inglés), el neutrófilo libera estructuras en forma de red de DNA y proteínas microbicidas al espacio extracelular. Estas trampas actúan como una barrera física que concentra toda la acción de los microbicidas como una estrategia de defensa para evitar la diseminación microbiana. (31, 36)(Figura 14)



**Figura 14. Esquema de los diferentes mecanismos de eliminación de microorganismos que llevan a cabo los neutrófilos.** Fuente directa. Creado con Biorender Lab.

### **3.3. NET (Trampas extracelulares de neutrófilos)**

#### **3.3.1. Formación y liberación de NET**

En 1958, Hirsch describió la capacidad bactericida de las histonas, la cual fue confirmada posteriormente por otros investigadores. El significado biológico de

este hallazgo no fue comprendido en su momento porque era difícil explicar en qué circunstancias las histonas, podrían tomar contacto con los microorganismos. Casi cincuenta años más tarde, en el año 2004, el grupo del Dr. Zychlinsky y sus colaboradores hallaron una respuesta a este interrogante. Ellos describieron que la activación del neutrófilo no sólo puede desencadenar la fagocitosis de los microorganismos sino también la liberación de estructuras extracelulares similares a una red llamadas “trampas extracelulares de neutrófilos” o NET. (33, 38)

Durante la formación de las NET el núcleo del neutrófilo pierde su forma lobulada característica. La eucromatina y la heterocromatina se homogenizan y existe ruptura de su membrana nuclear, tanto de la interna como de la externa y disgregación del contenido de los gránulos citoplásmicos. Esta reorganización permite que el DNA, histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) y las proteínas antimicrobianas de los gránulos (elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, lactoferrina y gelatinasas) se mezclen para finalmente producir ruptura de la membrana celular y poder ser liberados al medio extracelular. (33) Una vez que es liberado este material, actuará como una red de contención gracias a su alta concentración antimicrobiana que limita el radio de acción de las moléculas tóxicas, evitando la diseminación de los microorganismos y el daño al tejido. (31, 33, 38)

### **3.3.2. Agentes inductores de NET**

La producción de NET provenientes de sangre periférica una vez que se obtienen, puede presentarse entre 5 minutos y 4 horas después de activar a los neutrófilos con algún estímulo. Dentro de los activadores de NET tenemos agentes químicos y biológicos. Entre los agentes químicos están el Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA), la IL-8, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el factor activador de plaquetas y el óxido nítrico (NO). (31) También se ha demostrado que la adición de partículas de látex puede inducir la generación de redes en los neutrófilos. Entre los agentes biológicos, la lista de inductores de NET se incrementa rápidamente. A la fecha, se han descrito como inductores de NET las plaquetas activadas, diversas bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*,

*Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycobacterium tuberculosis*), hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*), parásitos (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis*, *Eimeria bovis*) y recientemente virus (virus de la leucemia felina). (31)

## **CAPÍTULO 4**

### **INMUNOLOGÍA EN EL ECOSISTEMA ORAL**

Los tejidos orales están constantemente expuestos a sufrir daño, debido a la presencia de microorganismos y al esfuerzo mecánico para comer. En los tejidos orales sanos existe un equilibrio entre la microbiota comensal y el sistema inmunológico. (40) Sin embargo, cuando este equilibrio se rompe, los tejidos presentan inflamación y las células del sistema inmunológico son reclutadas más ávidamente. (37)

La mucosa de la cavidad oral, debido a su característica de ser impermeable, a la continua descamación de su epitelio y la secreción constante de saliva, la cual, contiene el anticuerpo IgA de secreción que inhibe la adherencia de los microorganismos a los dientes y a la mucosa que recubre la cavidad bucal, constituye la primera barrera de protección contra diferentes sustancias y microorganismos.

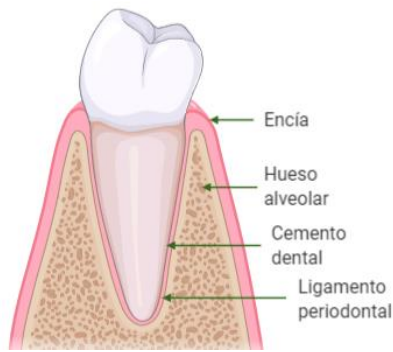
Por otro lado, la segunda línea de defensa de la cavidad oral está dada por la respuesta humoral y celular, donde participan fagocitos, linfocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos. (41)

El mantenimiento del estado de salud en la cavidad oral, directamente de neutrófilos que llegan al surco gingival eliminan el exceso de microorganismos y luego son removidos para no causar daño. (40)

#### **4.1. RESPUESTA INMUNE EN EL PERIODONTO**

El periodonto constituye una serie de tejidos (la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar) que dan soporte al diente. (Figura 15)

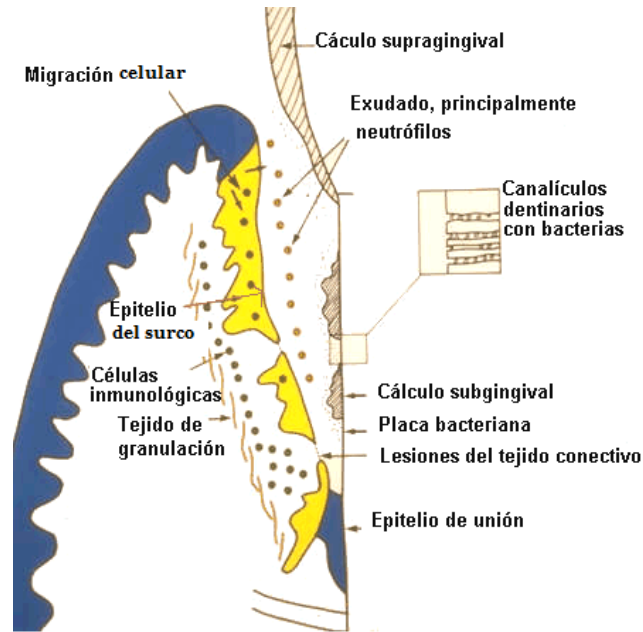




**Figura 15. Estructura básica del periodonto.** Fuente directa. Creada con Bio Render Lab.

Las enfermedades periodontales, en todas sus presentaciones clínicas, son el resultado de la acumulación de microorganismos alrededor del diente con la estimulación del sistema inmune. Es ampliamente aceptado que la placa bacteriana es el agente etiológico más importante de las enfermedades periodontales. Pero las bacterias son solamente el estímulo para el sistema inmune en el cual activan diversos mecanismos de defensa que, en el intento por detener la infección, cambia el metabolismo de los tejidos periodontales dando como consecuencia la pérdida de soporte periodontal. Adicionalmente otros factores como hábitos nocivos y condiciones sistémicas tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. (42)

Se ha descubierto, que la lesión periodontal inicial aparece a los 4 días de acumulación de placa. A pesar de que no se evidencia clínicamente, se caracteriza por un aumento del líquido gingival crevicular y migración de neutrófilos desde el plexo vascular hacia el epitelio de inserción y surco gingival. (Figura 16) (27)



**Figura 16. Migración celular al surco gingival.** Esquema modificado de (43)

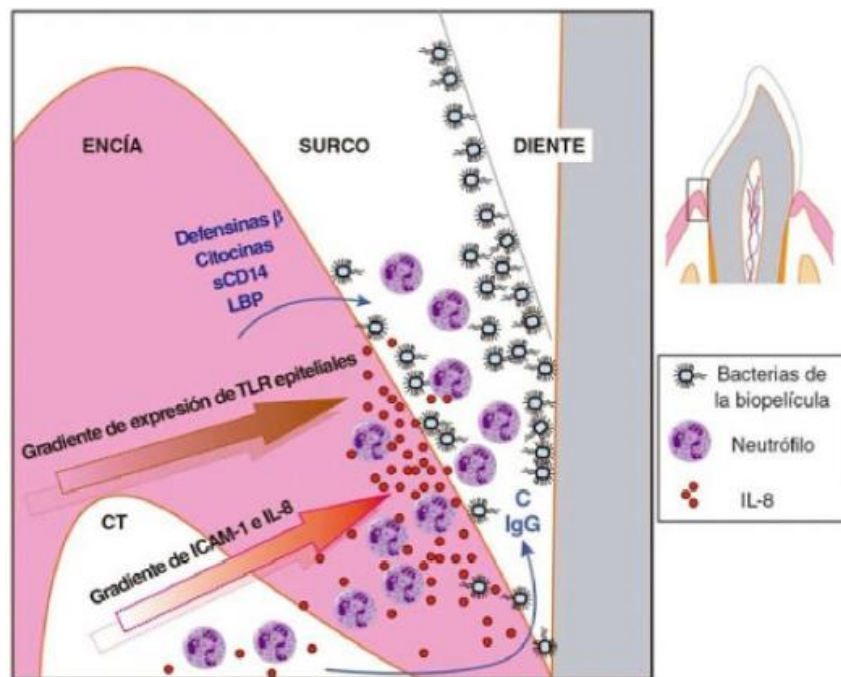
#### **4.1.1. Participación celular en el surco gingival**

El espacio que hay entre la unión de la encía y el diente se denomina surco gingival, generalmente, en condiciones de salud, mide entre 1 y 3 mm y representa un sitio donde se pueden acumular microorganismos, que de no ser mantenidos en concentraciones bajas pueden generar enfermedad periodontal. (42, 44)

En estudios clásicos, Page y Schroeder (1976) no solamente delinearon los principales eventos inflamatorios que ocurrían durante el desarrollo de enfermedades periodontales, sino que observaron que, aunque exista constante acumulación de microorganismos en el surco, este cuenta con mecanismos de protección que ayudan a mantener la salud de los tejidos periodontales. Casi inapreciable, un flujo de líquido intercelular aparece constante en el surco. Este fluido crevicular (FC), no solamente remueve mecánicamente bacterias y otros componentes, sino que contiene lisozimas, inmunoglobulinas (IgG, IgA) y neutrófilos polimorfonucleares. (42)

Otro componente detectado en este fluido crevicular es la IL8 (Interleucina 8) la cual, funciona como un factor quimiotáctico para los neutrófilos. Quiere decir que esta Interleucina participará mandando señales para llamar a los neutrófilos al sitio de inflamación. (45)

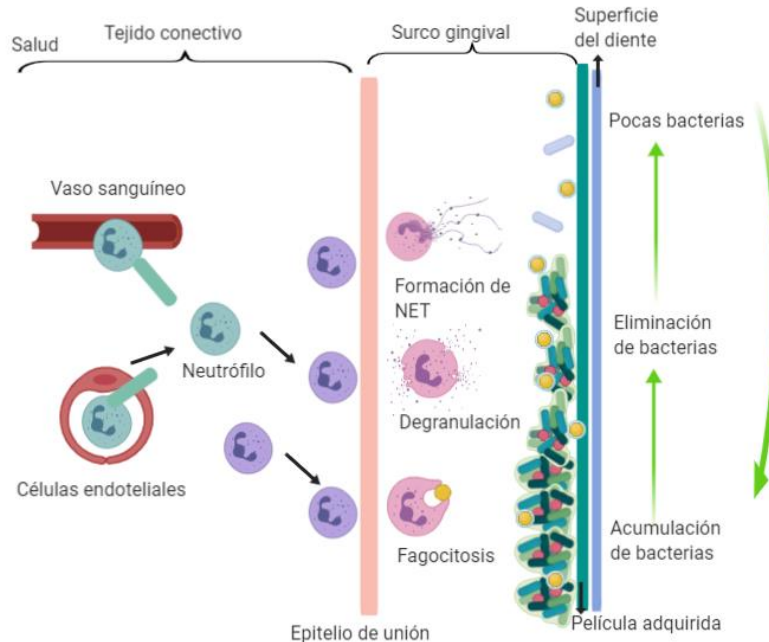
El fluido crevicular es una extravasación plasmática que se origina a partir del líquido intersticial y los vasos sanguíneos. Por eso cuando se desarrolla inflamación en la encía o en cualquier sitio anatómico, el resultado es el edema por el ensanchamiento de los vasos sanguíneos. (Figura 17)



**Figura 17. Reclutamiento de neutrófilos al surco gingival.** El reclutamiento de neutrófilos al surco gingival es facilitado por un gradiente de quimiocinas y moléculas de adhesión celular, como interleucina 8 (IL -8) e ICAM- 1, respectivamente, que dirige la migración de neutrófilos desde la vasculatura. El gradiente se hace más denso hacia las capas celulares epiteliales superiores, que están más cerca de la invasión bacteriana. El reclutamiento coordinado y regulado de neutrófilos es vital para la defensa de los tejidos periodontales. (46)

Una de las propiedades que presenta el fluido crevicular, es que cuando existe un exceso acumulado de este en la encía, aumenta su flujo y densidad, promoviendo la descamación y remoción celular de microorganismos que se

encuentran adheridos tanto del epitelio de unión como el epitelio del surco. (42)  
(Figura 18)



**Figura 18. Mantenimiento de la microbiota en homeostasis.** El epitelio de la encía produce interleucina 8 (IL- 8) y genera un gradiente hacia el tejido conectivo que se encuentra vascularizado. Este gradiente permite que los neutrófilos sean atraídos y lleguen hacia el surco gingival y favorecen la movilización de neutrófilos a esta zona. Los neutrófilos eliminan el exceso de bacterias por fagocitosis, degranulación o formación de NET. En consecuencia, los neutrófilos mantienen de forma constante la homeostasis de la microbiota de la cavidad oral. Esquema modificado de (40).

#### 4.1.2. Enfermedad periodontal por alteración en el número de neutrófilos

La literatura referente al papel del neutrófilo en la enfermedad periodontal contempla diferentes condiciones que determinan la relación que existe entre esta célula y la enfermedad periodontal. Por un lado, algunos autores hablan de “hipofunción” del neutrófilo, otros de “hiperfunción” y, por último, otros prefieren utilizar un término más general, “disfunción”. (Figura 19)

La “hipofunción” neutrofílica se refiere a aquellos casos en los que existe una disminución de la función de los neutrófilos, ya sea por disminución de su número total, o por ausencia o disminución de la destrucción intracelular tras la fagocitosis. Además, numerosos autores sugieren que algunos periodontopatógenos poseen factores de virulencia que pueden destruir los neutrófilos o disminuir su función. La leucotoxina producida por *Actinobacillus actinomycetemco-mitans* (*A.a*) y proteasas producidas por *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) son algunos ejemplos.

El término “hiperfunción” hace referencia al exceso de actividad y liberación de productos tóxicos por parte del neutrófilo; responsable, en parte, de la destrucción tisular en la enfermedad periodontal.

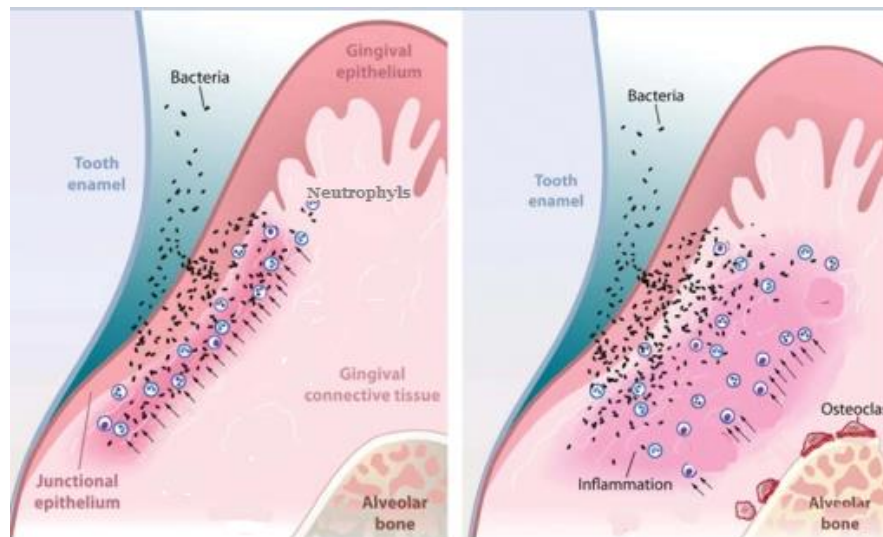


Figura 19. Respuesta inmunitaria inflamatoria en la periodontitis. Esquema modificado de (47).

#### 4.1.3. Daño tisular regulado por NETosis

Si bien cantidades fisiológicas de NET resultan importantes como agentes antiinfecciosos, valores altos en la circulación pueden resultar en una situación fisiopatológica opuesta a la buscada, generando, por ejemplo, daño tisular. (48)

Por lo tanto, la apoptosis de neutrófilos también llamada netosis (debido al proceso de muerte del neutrófilo) es un importante mecanismo que mantiene un número apropiado de células bajo condiciones fisiológicas. (38) Actualmente se sabe que la encargada del desmantelamiento de estas estructuras es la endonucleasa sérica DNasa 1. (31)

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El tratamiento de ortodoncia conlleva en la mayoría de los casos al uso de aparatología fija como los brackets. A pesar de los esfuerzos por generar aparatología más fácil de asear, estos dispositivos generan la retención de biopelícula dental y la dificultad para llevar a cabo una adecuada higiene oral. Si la higiene oral no se mejora, pueden producirse complicaciones como desarrollar gingivitis y en algunos casos periodontitis. En este escenario inflamatorio, los neutrófilos de la cavidad oral que llegan al surco gingival son parte del sistema que regula la cantidad de biopelícula dental. Con este trabajo se pretende conocer y comparar el papel que juegan los neutrófilos en la producción de NET en la cavidad oral de individuos con aparatología de ortodoncia de ligado convencional y de autoligado.

## **JUSTIFICACIÓN**

La acumulación de biopelícula dental por periodos cortos de tiempo no representa gran peligro para la salud oral. Sin embargo, en individuos con aparatología de ortodoncia fija que se encuentran en constante exposición a la acumulación de biopelícula dental y al riesgo de desarrollar enfermedad periodontal es importante entender los mecanismos que posee el sistema inmunológico para contenerlos.

El desarrollo de nuevos aparatos fijos como son los brackets de autoligado, presentan una nueva solución para disminuir la acumulación de biopelícula dental. Este estudio aportará información sobre la capacidad de formación de NET en individuos con aparatología ortodóncica. De esa manera, conocer el papel de NET nos permitirá entender mejor el proceso inflamatorio de los individuos con aparatología de ortodoncia de ligado convencional y de autoligado.

## **HIPÓTESIS**

Existe una mayor producción de NET en neutrófilos provenientes de enjuagues de pacientes con brackets de ligado convencional que de enjuagues de pacientes con brackets de autoligado.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comparar la producción de NET en neutrófilos provenientes de enjuagues de pacientes con brackets de ligado convencional y de pacientes con brackets de autoligado.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Medir la producción de NET, en neutrófilos de los cuatro grupos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El tipo de estudio es observacional analítico.

### **Donadores**

El estudio se conformó por cuatro grupos de donadores voluntarios de neutrófilos: sanguíneos, orales sin aparatología, orales con aparatología de ortodoncia de ligado convencional y orales con aparatología de autoligado. A cada uno de los donadores voluntarios de neutrófilos orales se les realizó un Control Personal de Placa (CPP) (anexo 1). De acuerdo con este control, únicamente se tomaron pacientes que tuvieran una adecuada higiene oral. Para iniciar la obtención de saliva, se le preguntó a cada uno de los participantes la hora de su última ingesta



de alimento, la hora de su último cepillado dental, si usó algún enjuague o colutorio bucal y si usó hilo dental (anexo 2).

Todos los voluntarios firmaron un consentimiento informado (anexo 3 y 4).

### **Criterios de inclusión donadores sanguíneos**

1. Voluntarios sanos sistémicamente.
2. Voluntarios que firmen el consentimiento informado (anexo 4).
3. Voluntarios del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### **Criterios de inclusión para donadores sin aparatología**

1. Voluntarios sanos periodontalmente.
2. Voluntarios que no presenten enfermedades sistémicas.
3. Voluntarios que se sometan a un Control Personal de Placa.
4. Voluntarios que firmen el consentimiento informado (anexo 3).
5. Voluntarios del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### **Criterios de inclusión para donadores con aparatología de ortodoncia**

1. Voluntarios sanos periodontalmente.
2. Ser pacientes con aparatología fija de la DEPeI de Ortodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Voluntarios que cuenten con un expediente en la Clínica de Ortodoncia de la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.
4. Voluntarios que se sometan a un Control Personal de Placa (CPP).
5. Voluntarios que no presenten enfermedades sistémicas.
6. Voluntarios con brackets metálicos slot 0.022" de ligado convencional.
7. Voluntarios con brackets metálicos slot 0.022" de autoligado.
8. Voluntarios que firmen el consentimiento informado (anexo 3).

## **Criterios de exclusión para donadores con aparatología de ortodoncia**

1. Voluntarios que presenten caries.
2. Voluntarios que presenten alguna entidad patológica bucal.
3. Voluntarios que presenten alguna afección sistémica.
4. Voluntarios que presenten aparatología fija solamente en una arcada.

## **Control Personal de Placa**

El índice de O'Leary de forma sencilla sirve para conocer el porcentaje de biopelícula dental en las superficies lisas de los dientes. Con ayuda de un microbrush (Vamasa 32-WMFP100), se coloca GC Tri Plaque ID Gel (GC 004273) sobre todas las superficies dentales. El paciente se enjuaga con agua y posteriormente puede visualizar la placa ante un espejo. Después de que el revelador muestra las zonas dónde se ha acumulado biopelícula dental, se procede a registrar en la hoja de registro del CPP (anexo 1) las caras lisas de cada diente (mesial, distal, vestibular y lingual o palatino) que estén teñidas. Las caras oclusales de premolares y molares no son incluidas. En cada registro se cuentan las caras teñidas y se calcula el porcentaje de CPP. El porcentaje se obtiene multiplicando el número de caras teñidas por el número de caras totales entre cien.

Si el índice de O'Leary es igual o inferior al 20 %, la higiene bucal se considera buena y no se está sometido a riesgos de padecer caries dental, gingivitis o enfermedad periodontal. (49, 50)

## **Obtención y purificación de neutrófilos sanguíneos**

La muestra de sangre se tomó por punción con una jeringa estéril y previa asepsia de la zona con una torunda de algodón con alcohol. La sangre fresca se adicionó a un tubo cónico con 0.25 ml de heparina (1000 U/ml) y 2 ml de una disolución de Dextran T500 6% en PBS, se mezcló el contenido del tubo por inversión y se dejó reposar 45 min. Pasado este tiempo, se tomó el suero rico en

plaquetas del primer tubo y se transfirió al tubo con Ficoll- Paque, evitando mezclar ambos componentes. El tubo con sangre fue desechado en una bolsa roja de residuos peligrosos biológico- infecciosos. La muestra se centrifugó a 516 g a 4°C por 20 minutos e inmediatamente, se succionó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en 10 ml de PBS frío. La pastilla celular se sometió a un choque osmótico para lisar los eritrocitos. 10 ml de disolución hipotónica se adicionó al tubo y se agitó suavemente por un minuto y posteriormente adicionando 10 ml de disolución hipertónica fría. Nuevamente el tubo se centrifugó a 516 g a 4°C por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante por succión y se resuspendió la pastilla celular en 10 ml de PBS frío.

### **Obtención y purificación de neutrófilos orales**

Se pidió a los voluntarios realizar 4 enjuagues de cavidad oral con 10 ml de disolución de 0.9% de NaCl durante 30 segundos cada uno, con intervalos de 3 minutos entre cada enjuague. Cada enjuague se depositó en un mismo tubo de 50 ml estéril que permaneció en hielo durante la recolección de los enjuagues. Posteriormente, los enjuagues se centrifugaron a 1400 rpm, durante 6 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó por succión y el botón se resuspendió en 10 ml de PBS. Para purificar los neutrófilos fue necesario retirar restos de alimentos y las células epiteliales orales, producto de la descamación. Para ello, la suspensión se filtró a través de una coladera de nylon de 100  $\mu\text{m}$  (Falcon 352360); después por una coladera de nylon de 40  $\mu\text{m}$  (Falcon 352340) por último, por un filtro de 11  $\mu\text{m}$  (NY1104700). El filtrado se centrifugó a 1400 rpm, durante 6 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por succión al vacío y el botón celular se resuspendió en PBS.

### **Tinción de neutrófilos por Wright-Giemsa**

Las células obtenidas de sangre y de enjuagues orales fueron teñidas con Wright-Giemsa para comprobar la presencia de neutrófilos. Primero se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células y se extendieron sobre un portaobjetos en forma de rectángulo. La suspensión se secó moviendo el portaobjetos vigorosamente para

después colocar 100  $\mu\text{L}$  de tinción Wright-Giemsa. El portaobjetos se incubó por 6 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  de PBS se colocaron sobre la tinción de Wright-Giemsa y se homogenizó el colorante. El portaobjetos se incubó por 12 minutos a temperatura ambiente para después eliminar el colorante aplicando agua bidestilada suavemente. Por último, se colocó el cubreobjetos antes de que se secase el portaobjetos y se observó al microscopio.

### **Cuantificación de neutrófilos**

Las células fueron mezcladas con azul de tripano y contadas en una cámara de Neubauer bajo un microscopio AmScope.

El número de neutrófilos por mililitro se calculó usando la siguiente fórmula:

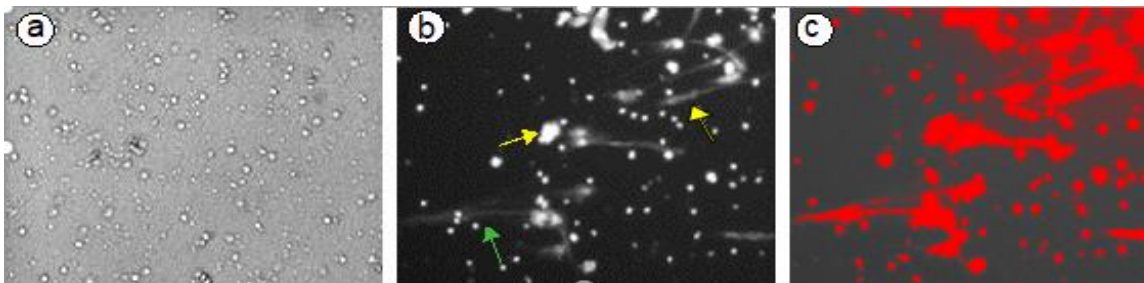
$$\text{Neutrófilos por mililitro} = (\text{promedio de cuadrantes}) (\text{factor de dilución}) (10^4)$$

### **Producción de trampas extracelulares de neutrófilos**

Un millón de neutrófilos fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5 ml (Axygen Union City, CA, USA). El tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se aspiró y el botón se resuspendió en 1 ml de RPMI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. Cat. R6504) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (By products, GDL, Jalisco, MX). La suspensión celular se transfirió a una placa de cultivo de 24 pozos (Corning Incorporated costar, NY, USA) colocando 250,000 neutrófilos por pozo y se incubó por 20 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a una concentración final de 20 nM. Los pozos sin PMA fueron incubados con PBS. La placa se incubó durante 4 horas a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, se agregó 2% de paraformaldehído fijando la placa toda la noche a 4°C. Al día siguiente, en cada pozo se agregó 4 ',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración final de 300 nM por pozo. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad para posteriormente comenzar con la captura de imágenes en el microscopio invertido de fluorescencia. (Olympus, modelo X170).

## Cuantificación de NET

Los neutrófilos de sangre y enjuagues fueron expuestos a PBS o a PMA en pozos de cajas de cultivo. Al azar, en cinco regiones de cada pozo se tomaron fotografías de los neutrófilos tanto en campo claro como en fluorescencia con el microscopio Olympus X170 a un aumento de 10X. (Figura 20)



**Figura 20. Fotografías de neutrófilos tratados con PMA.** a) Fotografía de neutrófilos en campo claro. b) Fotografía de los mismos neutrófilos teñidos con DAPI, en fluorescencia. Los núcleos condensados (flecha verde) y formación de redes extracelulares (flecha verde). c) Procesamiento de la imagen capturada con el programa ImageJ para medir el área de formación de NET (rojo).

Después de procesar la fotografía por medio del programa ImageJ, que convierte la fluorescencia en color rojo para ser más fácil detectable y medir el área de formación de redes, el área de NET por cada imagen fue capturada en una base de datos de Excel POI. El procedimiento se realizó de igual manera para todos los pozos. Los datos de estas cuantificaciones son el promedio  $\pm$  el error estándar.

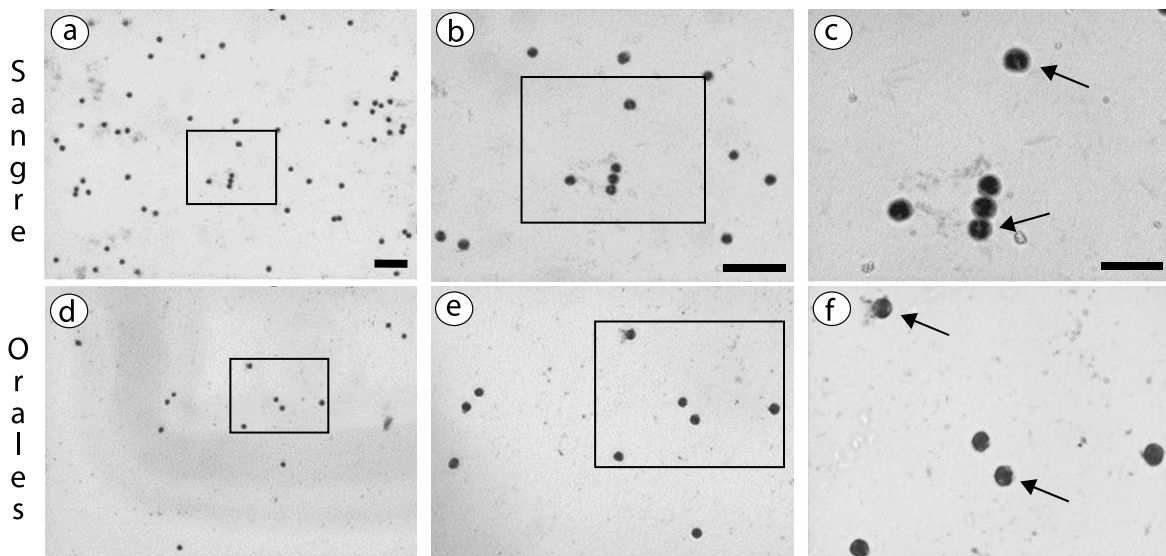
## Estadística

Las comparaciones entre los grupos se realizaron usando un análisis de varianza ANOVA de una vía con prueba posthoc de Dunnet, empleando el programa Kaleidagraph.

## RESULTADOS

### Los neutrófilos pueden ser purificados de cavidad oral de participantes sin y con aparatología de ortodoncia.

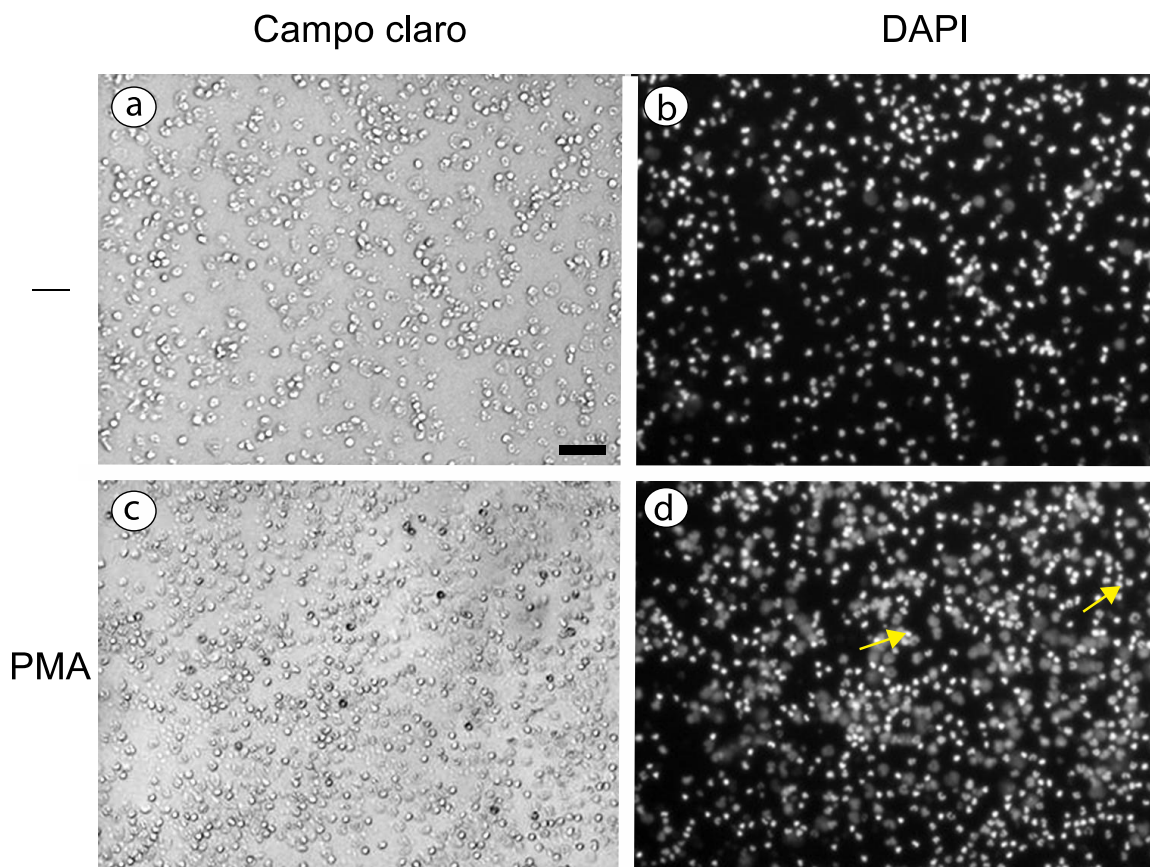
Con el propósito de obtener y purificar neutrófilos orales de participantes sin aparatología y con aparatología de ortodoncia fija con brackets de ligado convencional o autoligado, se pidió a los participantes que hicieran enjuagues con solución salina. Asimismo, neutrófilos de sangre de voluntarios independientes de voluntarios de neutrófilos orales, se obtuvieron y purificaron como controles de los experimentos. Después de purificar las células de los enjuagues y de la sangre se tiñeron con la tinción de Wright - Giemsa y su morfología fue observada al microscopio. Las células purificadas en ambos tipos de muestra son neutrófilos pues presentan un núcleo multilobulado (Figura 21).



**Figura 21. Purificación de neutrófilos de sangre y orales.** Microfotografías representativas de neutrófilos de sangre (a-c) y orales (d-f) a diferentes aumentos. Los recuadros indican la zona que se visualizó en el siguiente aumento. Las flechas indican el núcleo multilobulado de los neutrófilos. Escala 25  $\mu\text{m}$  para a y d, y 50  $\mu\text{m}$  para b, e, c y f.

## Los neutrófilos de sangre forman NET al ser expuestos a PMA.

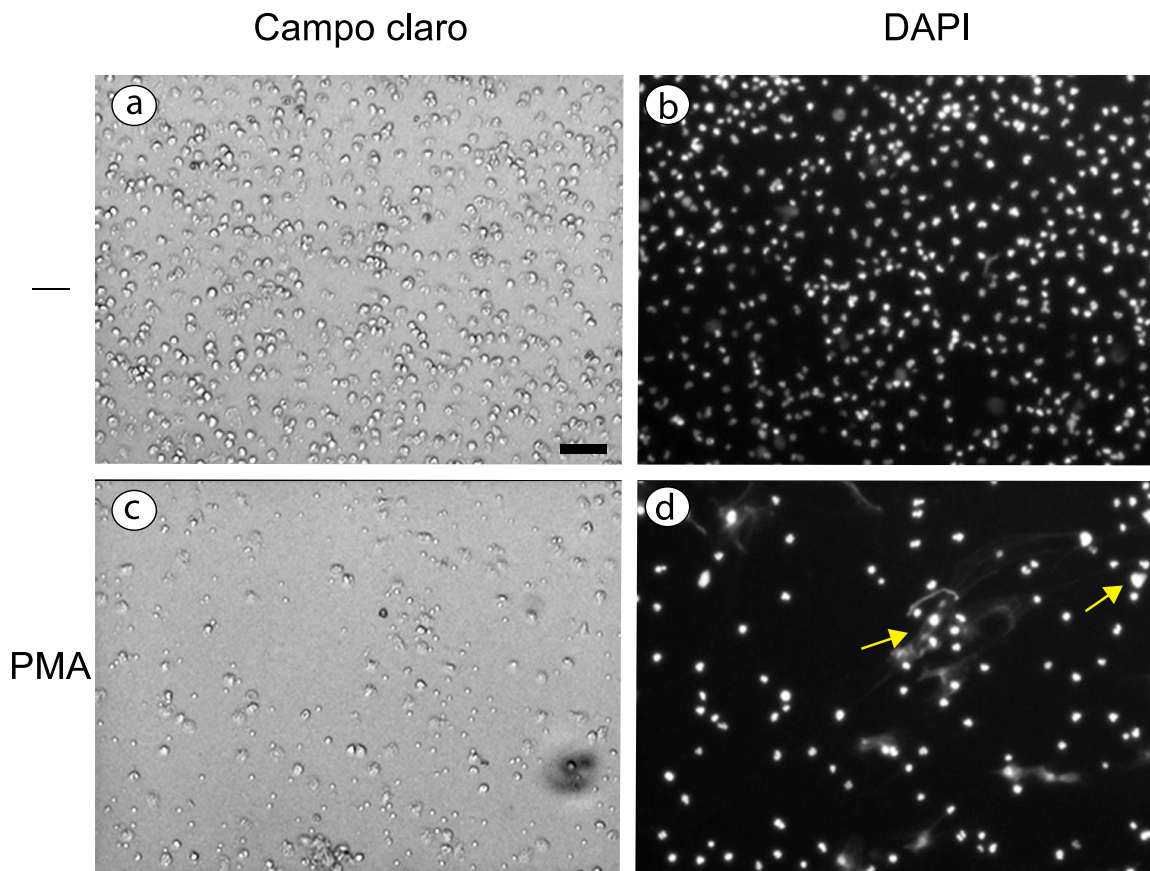
Con el propósito de determinar la formación de NET en neutrófilos de sangre, se incubaron con PMA, un activador de la vía de formación de trampas. Esto se realiza de forma rutinaria en el laboratorio y nos sirve como control de los experimentos. Como se esperaba, los neutrófilos de sangre incubados con PMA forman NET (Figura 22).



**Figura 22. NET de neutrófilos sanguíneos.** Fotografías representativas de neutrófilos en campo claro sin estímulo (a) e incubados con PMA (c) y de fluorescencia para la tinción de DNA con DAPI, sin estímulo (b) e incubados con PMA (d). Las flechas indican la descondensación del núcleo de los neutrófilos. Escala 25  $\mu\text{m}$ .

**Los neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores sin aparatología de ortodoncia forman NET al ser expuestos a PMA.**

Con el propósito de determinar la formación de NET en neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores sin aparatología de ortodoncia, los neutrófilos se incubaron con PMA. Los neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores sin aparatología de ortodoncia forman NET (Figura 23).

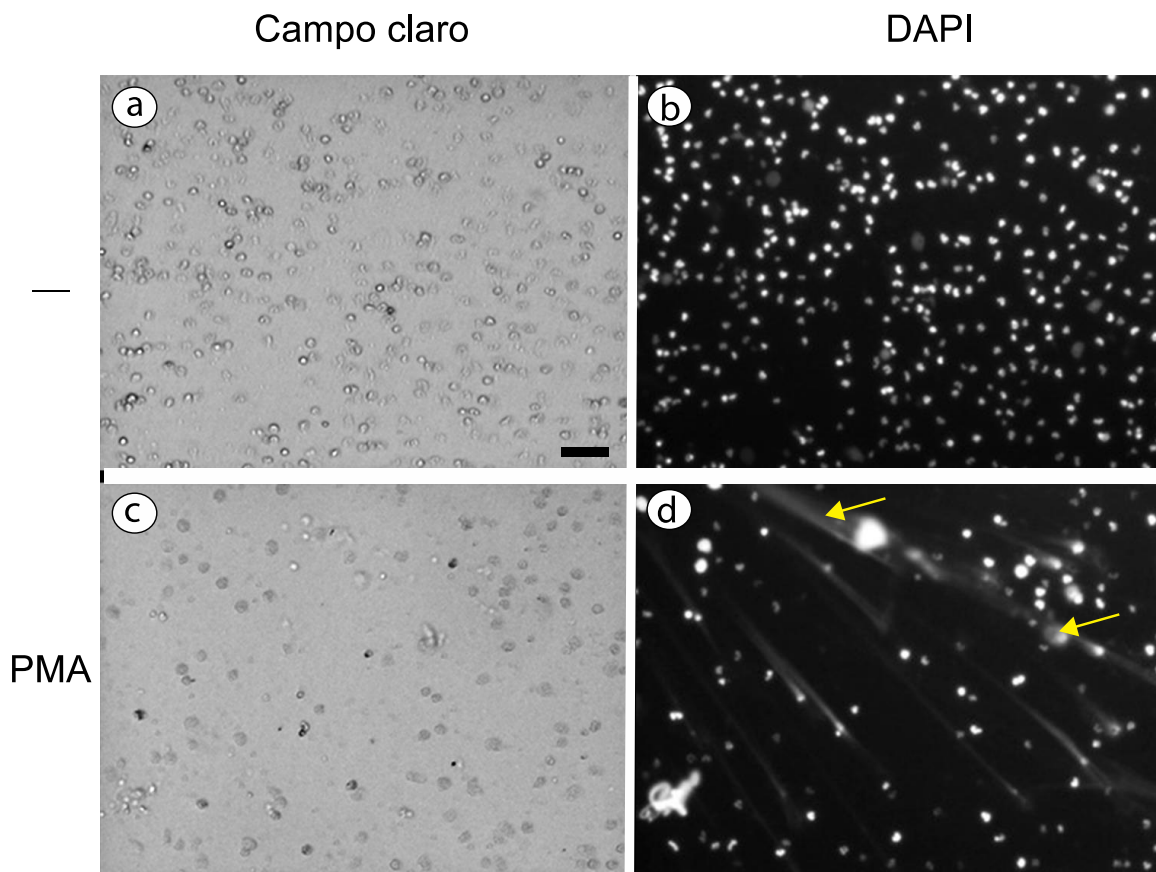


**Figura 23. NET de neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores sin aparatología de ortodoncia.** Fotografías representativas de neutrófilos en campo claro sin estímulo (a) e incubados con PMA (c) y de fluorescencia para la tinción de DNA con DAPI, sin estímulo (b) e incubados con PMA (d). Las flechas indican la descondensación del núcleo de los neutrófilos. Escala 25  $\mu\text{m}$ .



**Los neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de ligado convencional forman NET al ser expuestos a PMA.**

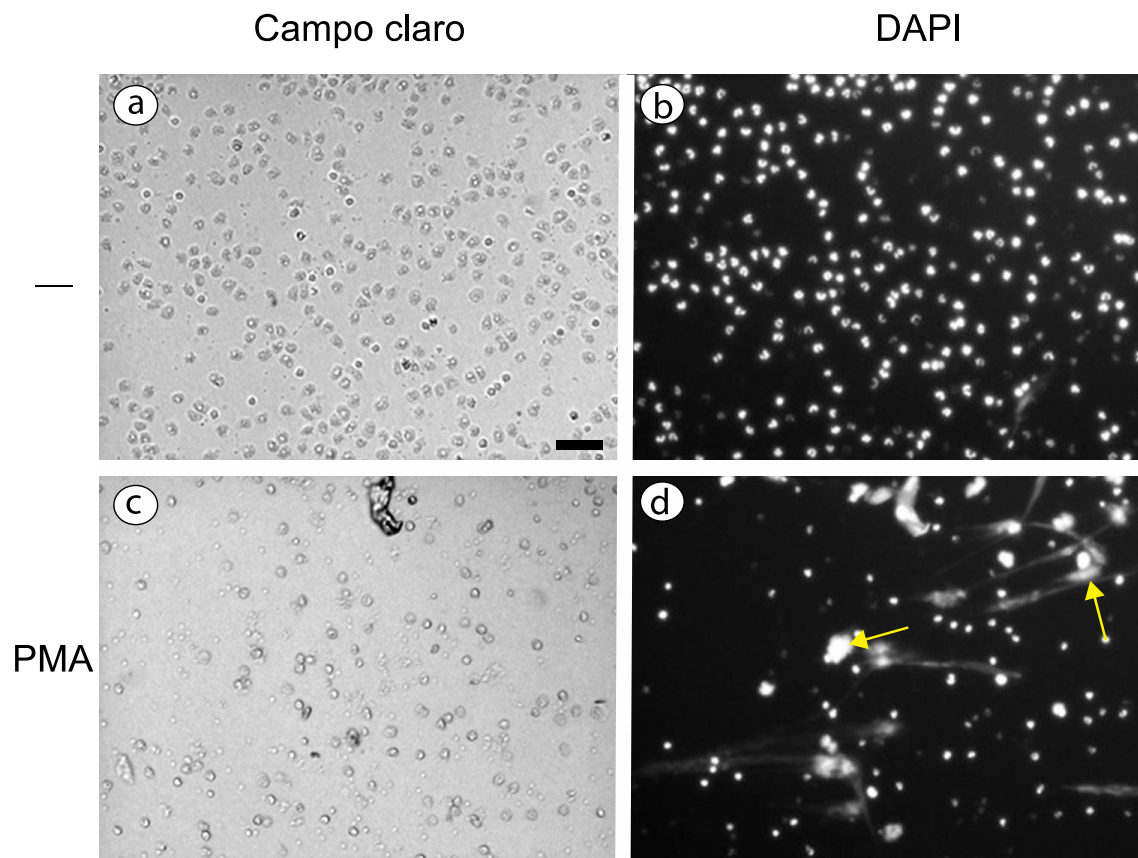
Con el propósito de determinar la formación de NET en neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de ligado convencional, estos se incubaron con PMA. Los neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de ligado convencional forman NET (Figura 24).



**Figura 24. NET de neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de ligado convencional.** Fotografías representativas de neutrófilos en campo claro sin estímulo (a) e incubados con PMA (c) y de fluorescencia para la tinción de DNA con DAPI, sin estímulo (b) e incubados con PMA (d). Las flechas indican la descondensación del núcleo de los neutrófilos. Escala 25  $\mu\text{m}$ .

**Los neutrófilos de orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de autoligado forman NET al ser expuestos a PMA.**

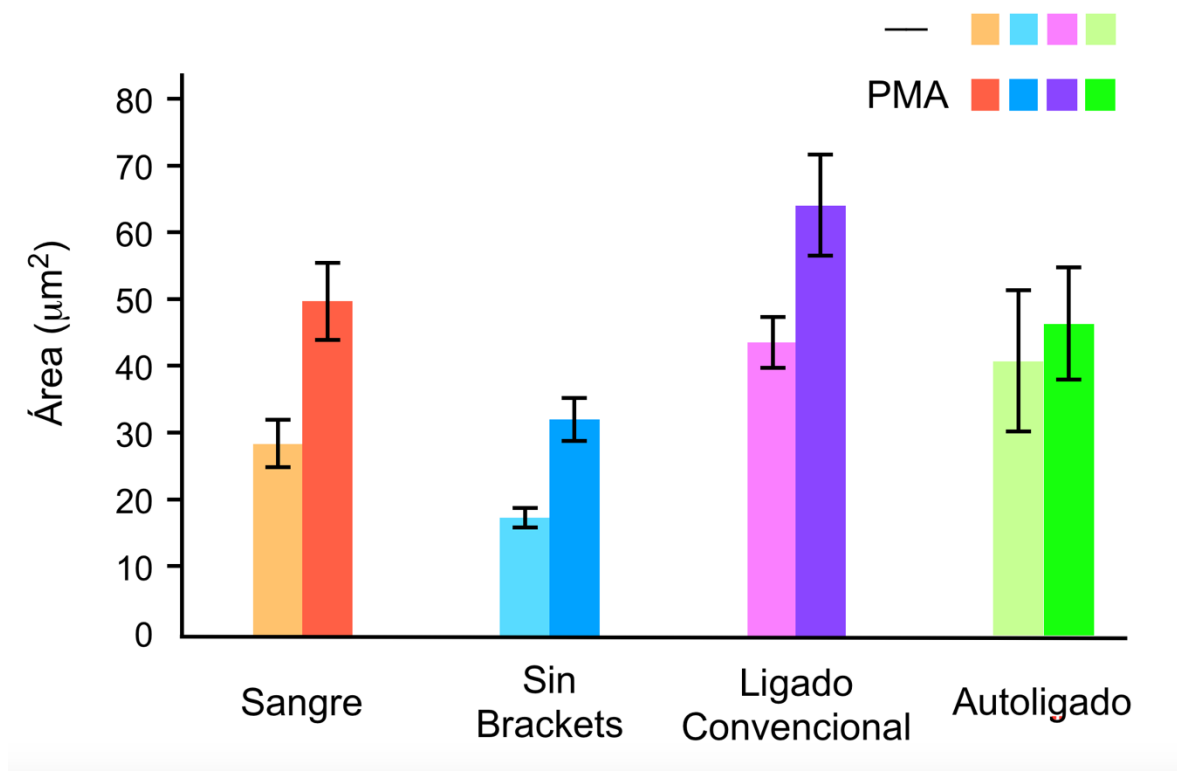
Con el propósito de determinar la formación de NET en neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de autoligado, éstos se incubaron con PMA. Los neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de autoligado forman NET (Figura 25).



**Figura 25. NET de neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de autoligado.** Fotografías representativas de neutrófilos en campo claro sin estímulo (a) e incubados con PMA (c) y de fluorescencia para la tinción de DNA con DAPI, sin estímulo (b) e incubados con PMA (d). Las flechas indican la descondensación del núcleo de los neutrófilos. Escala 25  $\mu$ m.

**Los neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de ligado convencional forman más NET que todos los demás grupos al ser expuestos a PMA.**

Para cuantificar la formación de NET se midió el área de los núcleos y las fibras de DNA teñidas con DAPI mediante una segmentación con el programa ImageJ. El área de los núcleos de los neutrófilos sin PMA es muy parecida en todos los grupos (Figura 26).



**Figura 26. Área de formación de NET.** Gráfica que muestra el área de producción de NET sin estímulo (barras de colores claros) o con PMA (barras de colores oscuros) de neutrófilos provenientes de sangre (barras naranja y roja), de voluntarios sin aparatología (barras azul claro y oscuro), con aparatología de ligado convencional (barras rosa y morado), con aparatología de autoligado (barras verde claro y oscuro) Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 5 experimentos independientes.

Todos los grupos de neutrófilos forman NET cuando son incubados con PMA. (Figura 26). Los neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores sin aparatología son los que menor NET forman.

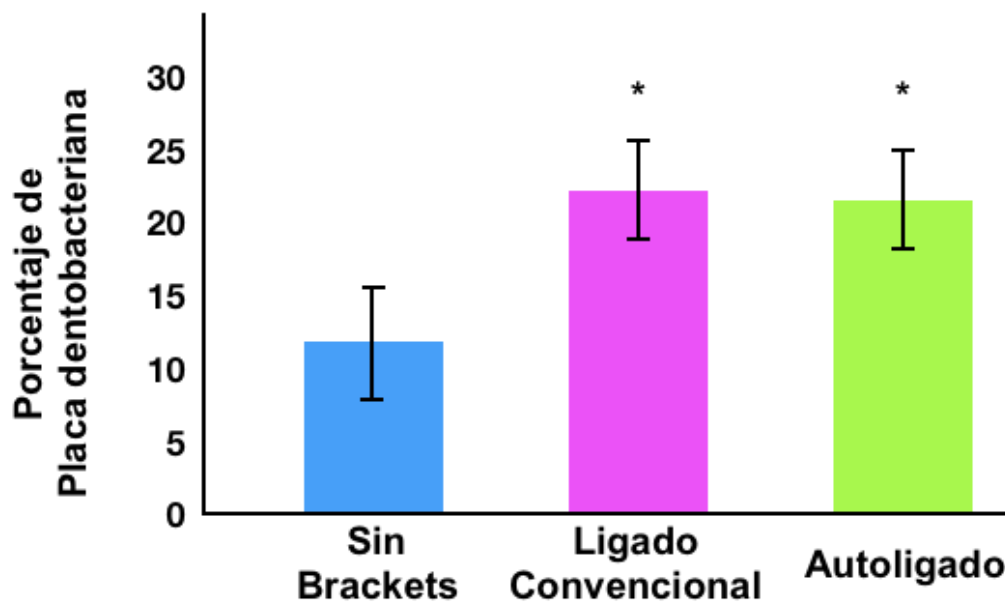
La cantidad de NET producidas por neutrófilos de sangre sin estímulo es mayor a la cantidad de NET producida por neutrófilos de cavidad oral (Figura 26). El área de producción de NET con estímulo PMA en voluntarios con aparatología oral es mayor que el área de producción de NET con estímulo PMA en voluntarios sin aparatología (Figura 26). El área de producción de NET con estímulo PMA en voluntarios con brackets de ligado convencional es mayor que en voluntarios con brackets de autoligado; al igual que en el resultado anterior. En los cuatro grupos de estudio se observa que aquellos neutrófilos que fueron estimulados con PMA presentan una mayor área de formación de NET que aquellos que no fueron estimulados. (Figura 26).

**El control personal de placa es muy parecido ante el uso de brackets de ligado convencional y de autoligado.**

El índice de O'Leary de forma sencilla sirve para conocer el porcentaje de biopelícula dental en las superficies lisas de los dientes. Este no solo sirve para obtener un registro del estado de la higiene bucal de forma numérica, sino que también resulta en una guía muy útil para probar el esfuerzo de los pacientes para lograr una higiene bucal efectiva. Este índice es uno de los más efectivos en cuanto a la fidelidad de registros en la evaluación de la higiene bucal.

Investigaciones recientes han contemplado que si el resultado del índice es igual o inferior al 20 %, la higiene bucal se considera buena y no se está sometido a riesgos de padecer caries dentales, gingivitis o enfermedad periodontal. (49, 50)

El control personal de placa es mayor en el grupo de voluntarios con aparatología de ligado convencional que en el grupo de voluntarios sin aparatología ( $P=0.002$ ), (Figura 27). Asimismo, el control personal de placa es mayor en el grupo de voluntarios con aparatología de autoligado que en el grupo de voluntarios sin aparatología ( $P=0.006$ ), (Figura 27). Sin embargo, no existe diferencia entre el control personal de placa del grupo de voluntarios con aparatología de ligado convencional y el grupo de voluntarios con aparatología de autoligado ( $P= 0.06$ ), (Figura 27).



**Figura 27. Porcentaje de placa dentobacteriana con base en el índice de O'Leary.** La gráfica muestra el porcentaje de placa dentobacteriana en la cavidad oral de voluntarios sin aparatología (barra azul), con aparatología de ligado convencional (barra rosa), con aparatología de autoligado (barra verde). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 5 voluntarios.

## DISCUSIÓN

Lo primero que se realizó en este trabajo fue purificar los neutrófilos tanto de sangre como de cavidad oral. La obtención de neutrófilos de sangre es un proceso que se realiza de manera cotidiana en el laboratorio (51) y el método utilizado para la purificación de neutrófilos en cavidad oral fue exitoso pues las características morfológicas de los neutrófilos son comparables a los neutrófilos que obtuvimos de sangre. Como ya se ha ampliamente documentado, los neutrófilos de sangre al ser expuestos a PMA producen NET (52, 53) este hecho también se ha reportado para neutrófilos obtenidos de la cavidad oral (54).

Nuestros resultados muestran que el PMA activa la formación de NET en neutrófilos derivados de sangre, como se ha documentado. El PMA también promueve la formación de NET en neutrófilos de cavidad oral sin aparatología, a diferencia de los resultados de otro grupo donde no vieron diferencia en la formación de NET (54). Esto puede deberse a la situación periodontal de los individuos de donde se obtuvieron los neutrófilos. En nuestro caso se realizaron controles de placa y la cantidad de placa no sobrepasó el 12%. El uso de aparatología muestra que los neutrófilos orales producen mayor NET en el caso del uso de brackets de ligado convencional a comparación del uso de brackets de autoligado. Los neutrófilos de cavidad oral se encuentran expuestos a las cargas masticatorias, la presencia de biopelícula dental, los alimentos, etc. que los estimulan constantemente, mucho antes de ser extraídos de boca. Entonces, esto explicaría que el PMA actúe en mayor proporción en neutrófilos de sangre que en la boca.

El área de producción de NET con estímulo PMA en voluntarios con aparatología oral, es mayor que el área de producción de NET con estímulo PMA en voluntarios sin aparatología. Esto podría deberse a que el uso de brackets conlleva a una mayor retención de biopelícula dental. Sin embargo, el porcentaje de placa fue de 21.54% para los voluntarios con brackets de autoligado y de 22.72% para los voluntarios con brackets de ligado convencional, porcentajes que no son diferentes, por lo que no es claro en este caso, si la cantidad de bacterias sea un

factor. Sería importante conocer qué tipo de bacterias están acumulándose y si esto es diferente con los diferentes tipos de brackets.

El área de producción de NET con estímulo PMA en voluntarios con brackets de ligado convencional es mayor que en voluntarios con brackets de autoligado al igual que en el resultado anterior, esto indica que los brackets de ligado convencional retienen mayor biopelícula dental, por lo tanto, mayor recaudación de neutrófilos y mayor producción de NET.

En los cuatro grupos de estudio se observa que aquellos neutrófilos que fueron estimulados con PMA presentan una mayor área de formación de NET que aquellos que no fueron estimulados. Este grupo de estudio de neutrófilos únicamente se hizo con el propósito de comprobar que el campo de trabajo estuviera en condiciones óptimas y que ningún otro factor influía en los resultados, activando o estimulando a los neutrófilos, además del PMA. Lo cual indica que sin PMA, el área que marca el programa ImageJ es únicamente el área que ocupan los núcleos de neutrófilos y cuando se estimulan con PMA el área es ocupada por la descondensación de los núcleos y la producción de NET.

Finalmente, el porcentaje de placa es mayor en los voluntarios que utilizan aparatología de ortodoncia, sin importar el tipo. Sin embargo, aunque este resultado es estadísticamente significativo, en la clínica tener un porcentaje de placa de 23% indica una buena higiene dental. Ese 3% es un indicador de que la presencia de brackets dificulta la adecuada higiene dental. Al parecer, los brackets de autoligado activan menos a los neutrófilos, pero la cantidad de biopelícula no parece ser el factor que participa. Quizás se deba al tipo de microorganismos de esa biopelícula.

## CONCLUSIONES

La cavidad oral es una estructura que siempre va a estar expuesta a diferentes estímulos y agresiones, ya sea por las cargas masticatorias, alimento, bacterias, aparatos intraorales, etc.

La biopelícula dental, causante de la inflamación periodontal, aunado a la presencia de estos aparatos fijos intraorales, representan un verdadero reto para los profesionales para mantener la salud periodontal.

Dadas las circunstancias de que no existe hasta la fecha más información sobre el papel que juegan los neutrófilos orales ante el uso de brackets de ligado convencional y autoligado, con este trabajo de investigación se espera ayudar a encaminar futuras investigaciones sobre estas dos alternativas de aparatología fija para poder mejorar el tratamiento ortodóncico fijo.

Los resultados que este trabajo de tesis arrojó, es que efectivamente se cumple la hipótesis planteada. El uso de brackets de ligado convencional presenta una mayor producción de trampas extracelulares de neutrófilos, en comparación con los brackets de autoligado, lo que nos sugiere que existe un mayor acúmulo de biopelícula dental, alrededor de los aparatos ortodóncicos, lo que ocasiona una mayor inflamación de tejidos periodontales.

El área de producción de NET con estímulo PMA en voluntarios con aparatología oral es mayor que en voluntarios sin aparatología.

En los cuatro grupos de estudio se observa que aquellos neutrófilos que fueron estimulados con PMA, presentan una mayor área de formación de NET que aquellos que no fueron estimulados.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Leal A, Hernández Y. Evolución de la odontología. Oral. 2016;17(55):1418- 26.
2. Higashida B. Odontología Preventiva. In: Hernández GR, editor. Odontología Preventiva. 1. México: The McGraw- Hill Companies, Inc; 2009. p. 1-4.
3. SEDO. ¿Qué es la Ortodoncia? España: Sociedad Española de Ortodoncia y Ortopedia dentofacial; 2015 [Available from: <http://www.sedo.es/que-es-la-ortodoncia/file.html>].
4. Quirós O. Página de Ortodoncia. Introducción a la Ortodoncia. Acta odontol venez [Internet]. 2004; 43(3):[230-1 pp.].
5. Sandoval P, Bizcar B. Beneficios de la implementación de ortodoncia interceptiva en la clínica infantil. Int J Odontostomat 2013;7(2):253-65.
6. Quirós O. Página de Ortodoncia. Introducción a la Ortodoncia. Acta odontol venez [Internet]. 2004; 43(3).
7. Pérez L, Reytor E. Soportes de autoligado en ortodoncia. Gac Med Espirit. 2013;15(1):110-20.
8. Tristán J, Sánchez W, Mariel J, González A, Gutiérrez F, Mariel M. Nota de carga bacteriana en paréntesis metálicos versus paréntesis cerámicos. Rev Mex Ortod. 2015;3(4):5.
9. Buenaño C. Comparación de índices de biofilm en pacientes con y sin aparatología ortodóncica fija que asiste a la facultad de Odontología de la Universidad de las Américas en el período de Septiembre- Octubre del 2017. Quito, Ecuador: Universidad de las Américas; 2018.
10. Lazo F, Alarcón R. Brackets autoligados vs convencionales: Una revisión basada en 15 años de evidencia Revista Evidencias en Odontología Clínica. 2015;1(1):47-50.
11. Deal DG. Bracket Bionic. Ortho Technology. EE.UU: Dental Good Deal; 2017. p. <https://www.dentalgooddeal.es/bracket-bionic.html>.
12. Mendoza F. Partes del Bracket. Brackets: Guía 2020 para elegirlos. Lima, Perú: Solución Dental; 2020. p. [www.ortodonciaestetica.pe/brackets/](http://www.ortodonciaestetica.pe/brackets/).
13. Cedillo P. Comparación de la durabilidad, deformación elástica y plástica de tres tipos de módulos elastoméricos en el postgrado de Ortodoncia de la Universidad de Cuenca periodo 2012-2013. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca; 2013.
14. México RMO. Ligaduras. EE.UU: Rocky Mountain Orthodontics México; 2017. p. <http://www.rmo.mx/catalogo/item/ligaduras>.
15. Nelson L. Ortodoncia con Brackets Autoligantes Interactivos In-Ovation® R y C Uruguay: Dentsplay GAC; 2010. p. <https://es.slideshare.net/DENTOSHOP/ortodoncia-con-brackets-autoligantes-interactivos>.
16. García G, Gurrola B, Casas A. Self-tie systems. Clinic case. Odontología Vita. 2017;27:10.
17. Nieto M, Barrera J, González E, Parra I, Rodríguez A. Comparación de la resistencia al deslizamiento en brackets de autoligado y brackets clásicos ligados con ligadura elastomérica convencional y ligaduras de baja fricción. Rev Fac Odontol Univ Antioq. 2012;23(2):192-206.
18. Durán J. Construyendo con LEGO Technic 3° Entrega. 2016. p. <http://www.lcp-rlug.com/2016/09/07/construyendo-con-lego-technic-3-entrega/>.
19. Arteche P, Oberti G, Aristizábal J, Sierra A, Rey D. Consideraciones importantes de la ortodoncia con brackets de autoligado versus ligado convencional. Rev Esp Ortod. 2015:93- 100.
20. Tortolini P, Fernández E. Orthodontics and periontics. Av Odontostomatol [Internet]. 2011; 27(4).
21. Guercio E. Biología del movimiento dentario ortodóncico. Revisión de conceptos. Acta odontol venez 2001;39(1):61-5.

22. Quintero J, Vivas G, Rey L, García R, Araque S, Zerpa Y. Alteraciones de los tejidos periodontales en pacientes con ortodoncia. Una revisión sistemática. *Rev Venez Invest Odon.* 2017;5(1):119-40.
23. Montes de Oca M. Placa Bacteriana. *Rev Costarric Cienc Med.* 2010;10(1):35- 41.
24. Sarduy L, González M. Biofilm: a new conception of dentobacterial plaque. *Medicentro Electrónica.* 2016;20(3).
25. Quintero A, García C. Control de la higiene oral en los pacientes con ortodoncia fija. *Rev Nac Odontol.* 2013:37-45.
26. Kolenbrander P, Andersen R, Blehert D, Eglund P, Foster J, Palmer R. Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002;66 (3):19.
27. Barbieri G, Flores J, Vignoletti F. El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol.* 2005;17(1):11- 6.
28. Pérez M, Castillo Y, de-Lara-García G, Palenque A. Temas de Inmunología para estomatólogos en formación. *Medisur.* 2016;14(55):614- 60.
29. Ballester J, Macías C. El sistema inmunológico: comentarios de interés básico. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2003;19 (2-3).
30. Hoyos M, Rojas M. Mecanismo de la inmunidad y Antiinfeccion. *Rev Act Clin Med.* 2014;44.
31. Yam J, García L, Sánchez L. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. *Gac Med Mex.* 2012;148:68- 75.
32. López D. Caracterización y clasificación de glóbulos blancos mediante descriptores locales de imágenes: Universitat Jaume I; 2017.
33. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
34. Borregaard NC, J. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood.* 2017;89(10):3503- 21.
35. Ortega J. Células del sistema inmunológico. LinkedIn; 2009. p. <https://pt.slideshare.net/legorretar/clulas-del-sistema-inmunolgico>.
36. Rosales C, Uribe- Querol E. Neutrophil activation by antibody receptors In: Khajah M, editor. *Neutrophils Rijeka, Croacia InTech Open* 2018 p. 1-87.
37. Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9042851.
38. Gabelloni M, Sabbione F, Iula L, Keitelman I, Jancic C, Giordano M, et al. Trampas extracelulares de neutrófilos: una novedosa estrategia antiinfecciosa empleando moléculas antimicrobianas largamente conocidas. *Química Viva.* 2013;12(1):3-13.
39. Uribe-Querol E, Rosales C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Front Immunol.* 2017;8:1368.
40. Almaguer A, Villagómez J. Participación del sistema inmunológico en el ecosistema oral. In: Saavedra. JLM, editor. *Ecología Oral. Ciudad de México, México: Manual Moderno; 2018.* p. 2
41. Acosta G, Frías M, Reyes M, Solís P, Acosta M. Inmunomoduladores y enfermedades bucodentales. *Rev Hosp Jua Mex.* 2011;78(2):107- 11.
42. Bótero J. Respuesta inmune en las enfermedades del periodonto: desde la salud hasta la enfermedad y sus implicaciones terapéuticas. *Rev Fac Odontol Univ Antioq.* 2009;21(1):122-8.
43. Attstrom R. Periodontología Básica. *Bolsa Periodontal (patológico).* Malmo, Suecia 1999. p. <https://www.sdpt.net/PER/peiodontitispatogenesis.htm>.
44. Delgado A, Inarejos P, Herrera M. Espacio biológico. Parte I: La inserción diente-encía. *Avances en Periodoncia.* 2001;13 (2).
45. Faria R, Belén A, Bascones A. Nuevos métodos de diagnóstico en Periodoncia. *Métodos bioquímicos. Av Periodon Implantol* 2001;13(1): 29-37

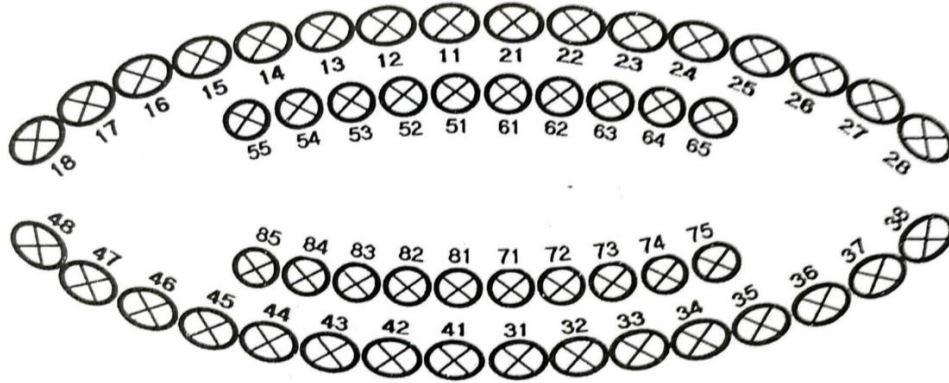
46. Lamont R, Hajishengallis G. Neutrófilos creviculares. Microbiología e inmunología oral. 2 ed: Manual Moderno; 2015.
47. Graves D, Oates T, Garlet G. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. Journal of Oral Microbiology [Internet]. 2011; 3(1). Available from: <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5304>.
48. Camicia G, de Larrañaga G. Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. Elsevier Doyma. 2013;140(2):70- 5.
49. Chaple A, Gispert E. "Amar" el índice de O'Leary. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2019 [cited 2020 28 de mayo]; 56(4).
50. Suárez S, Galindo B, Herrera L, Juárez I. Necesidad de tratamiento periodontal e higiene oral en pacientes Garantías Explícitas en Salud de 60 años de Punta Arenas. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral [Internet]. 2016; 9(1):[ 79-83 pp.].
51. García E, Uribe-Querol E, Rosales C. A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry. J Vis Exp. 2013(74).
52. Alemán OR, Mora N, Cortes-Vieyra R, Uribe-Querol E, Rosales C. Differential Use of Human Neutrophil Fcγ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. J Immunol Res. 2016;2016:2908034.
53. Alemán OR, Mora N, Cortes-Vieyra R, Uribe-Querol E, Rosales C. Transforming Growth Factor-β-Activated Kinase 1 Is Required for Human FcγRIIIb-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation. Front Immunol. 2016;7:277.
54. Moonen CGJ, Hirschfeld J, Cheng L, Chapple ILC, Loos BG, Nicu EA. Oral Neutrophils Characterized: Chemotactic, Phagocytic, and Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation Properties. Front Immunol. 2019;10:635.

# ANEXOS

## 1. Control Personal de Placa usando el Índice de O'Leary

PORCENTAJE: \_\_\_\_\_%

FECHA: \_\_\_\_\_



TOTAL DE DIENTES: \_\_\_\_\_

TOTAL DE CARAS: \_\_\_\_\_

TOTAL DE CARAS TEÑIDAS: \_\_\_\_\_

2. Ficha clínica

**PAPEL DE NEUTRÓFILOS ORALES**

**FICHA CLÍNICA**

NO. VOLUNTARIO: \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_

NOMBRE: \_\_\_\_\_

GÉNERO: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_ TELÉFONO: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL PADRE O TUTOR : \_\_\_\_\_

TELÉFONO: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL DOCTOR RESPONSABLE: \_\_\_\_\_

TELÉFONO: \_\_\_\_\_

HORA DE LA ÚLTIMA INGESTA DE ALIMENTO: \_\_\_\_\_

HORA DEL ÚLTIMO CEPILLADO DENTAL: \_\_\_\_\_

USO DE HILO DENTAL: \_\_\_\_\_ ENJUAGUE: \_\_\_\_\_

ENFERMEDADES SISTÉMICAS: \_\_\_\_\_ ¿CUÁL/ES? \_\_\_\_\_

ALERGIA/S: \_\_\_\_\_

¿SE ENCUENTRA TOMANDO ALGÚN MEDICAMENTO? \_\_\_\_\_

¿CUÁL/ES? \_\_\_\_\_

SISTEMA DE ORTODONCIA:

LIGADO CONVENCIONAL

AUTOLIGADO

**OBSERVACIONES:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### 3. Consentimiento informado para la toma de saliva

#### UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

#### INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La Ley General de Salud. Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I. Disposiciones Comunes Artículo 13 y 14. En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto en su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo o mayor acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los aspectos mencionados con el Artículo 21.

- I. Se me ha explicado que mi donación de saliva es para realizar estudios de investigación sobre el funcionamiento normal de los leucocitos (glóbulos blancos en sangre). Esta donación es completamente voluntaria de mi parte y no pone en riesgo mi salud ni integridad física de ninguna manera
- II. Se me ha informado que se tomarán 40 ml de saliva por medio de un enjuague, usando tubos para centrifuga nuevos. Estos serán destruidos y desechados inmediatamente después de su uso.
- III. Se me explicó que la toma de saliva es un procedimiento inofensivo y que es realizado en forma rutinaria en este laboratorio por personal altamente capacitado y con mucha experiencia.
- IV. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con mi donación de saliva y de cómo se usará mi saliva en este estudio.
- V. Por medio de este consentimiento también autorizo la publicación de los resultados que se obtengan con el uso de mi saliva en este estudio, a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o se revelará mi identidad.

Con fecha \_\_\_\_\_, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi donación de saliva para el proyecto acepto donar un poco de mi saliva para el estudio titulado:

#### **Papel de neutrófilos en la cavidad oral.**

Nombre y firma del donador voluntario \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre y firma del Testigo 1

\_\_\_\_\_

Nombre y firma del Testigo 2

Nombre y firma del Investigador Responsable 1: Dra. Eileen Uribe Querol

Nombre y firma del Investigador Responsable 2: Dr. Carlos Rosales Ledezma

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en el poder del sujeto de investigación o su representante legal y otro en el poder del investigador.

#### 4. Consentimiento informado para la toma de sangre

### UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

### INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La Ley General de Salud. Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I. Disposiciones Comunes Artículo 13 y 14. En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto en su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo o mayor acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los aspectos mencionados con el Artículo 21.

- I. Se me ha explicado que mi donación de sangre es para realizar estudios de investigación sobre el funcionamiento normal de los leucocitos (glóbulos blancos en sangre). Esta donación es completamente voluntaria de mi parte y no pone en riesgo mi salud ni integridad física de ninguna manera
- II. Se me ha informado que se tomarán 10 ml de sangre, usando jeringas nuevas y estériles y tubos para centrifuga nuevos. Estos serán destruidos y desechados inmediatamente después de su uso.
- III. Se me explicó que la toma de sangre es un procedimiento inofensivo y que es realizado en forma rutinaria en este laboratorio por personal altamente capacitado y con mucha experiencia.
- IV. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con mi donación de saliva y de cómo se usará mi saliva en este estudio.
- V. Por medio de este consentimiento también autorizo la publicación de los resultados que se obtengan con el uso de mi sangre en este estudio, a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o se revelará mi identidad.

Con fecha \_\_\_\_\_, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi donación de sangre para el proyecto acepto donar un poco de mi sangre para el estudio titulado:

#### **Papel de neutrófilos en la cavidad oral.**

Nombre y firma del donador voluntario \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre y firma del Testigo 1

\_\_\_\_\_

Nombre y firma del Testigo 2

Nombre y firma del Investigador Responsable 1: Dra. Eileen Uribe Querol

Nombre y firma del Investigador Responsable 2: Dr. Carlos Rosales Ledezma

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en el poder del sujeto de investigación o su representante legal y otro en el poder del investigador.