



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Producción de especies reactivas de oxígeno por
neutrófilos de cavidad oral de pacientes con aparatología
ortodóncica

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

GERARDO FUENTES PÉREZ

TUTOR: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

V.B.O.
Eileen Uribe Querol

ASESOR: Esp. DANIELA CARMONA RUIZ

V.B.O.
Daniela Carmona Ruiz



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de formarme académicamente.

A aquellos maestros de la Facultad de Odontología que me demostraron su pasión por la docencia, al preocuparse por el aprendizaje de los alumnos.

Al laboratorio de inmunología que forma parte del Instituto de Investigaciones Biomédicas, a cargo del Dr. Carlos Rosales, a su técnico académico la M. en IBB Nancy Mora Pérez, alumnos del servicio social y a los estudiantes de maestría y doctorado.

Al Dr. Francisco Marichi Rodríguez, al ex alumno y ahora especialista el Dr. Mario y a los Doctores de Patología que amablemente nos apoyaron con los pacientes de la clínica de ortodoncia.

A mi tutora de tesis, la Dra. Eileen Uribe Querol, por formar parte del grupo de académicos que me impartieron clases durante la carrera y por inspirarme a involucrarme en la investigación, así como guiarme durante el proceso de la elaboración de ésta tesis.

A mi madre por inculcarme el valor del estudio, por ser el pilar más fuerte en mi vida y por su apoyo y amor incondicional.

A mi padre porque sin su apoyo nunca hubiera llegado hasta éste día, ni ser la persona que soy.

A Fer Rosas, por ayudarme en las causas difíciles y por ser mi compañera, mentora, amiga y novia en toda mi etapa universitaria.

¡De todo corazón gracias!

Dedicatoria

A mis padres por el apoyo incondicional que me han otorgado en toda mi vida, porque siempre me han apoyado en las buenas y en las malas, de no ser por ustedes no hubiera podido hacer esto.

ÍNDICE

Contenido	Página
I INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1: Ortodoncia y aparatología ortodóncica	1
1 Ortodoncia	1
1.1 Aparatología fija en Ortodoncia	1
1.1.1 Elementos pasivos	2
1.1.1.1 Banda de anclaje	2
1.1.1.2 Bracket	2
1.1.1.3 Tubo molar	3
1.1.1.4 Ligadura y liga elastomérica	3
1.1.2 Elementos activos	4
1.1.2.1 Arcos de alambre	4
1.1.3 Elementos accesorios	5
1.2 Brackets de autoligado y brackets de ligado elastomérico.	6
Capítulo 2: Microbiota oral y biopelícula dental	8
2 Generalidades	8
2.1 Microbiota en mucosa oral	9
2.2 Microbiota en saliva	9
2.3 Microbiota en superficies dentales	10
2.4 Microbiota en surco gingival	10
2.5 Microbiota en lengua	10
2.6 Microbiota en materiales artificiales	11
2.7 Microbiota oral disbiótica	12
2.8 Microbiota oral en pacientes con ortodoncia	13
2.9 Determinantes ecológicos orales y su relación con aparatología ortodóncica	14
2.10 Biopelícula dental	16
2.11 Relación de la ortodoncia con la biopelícula dental	17
Capítulo 3: Cavidad oral y neutrófilos	18
3 Generalidades	18
3.1 Neutrófilos	18
3.1.1 Funciones	19
3.1.1.1 Producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET)	20
3.1.1.2 Degranulación	20
3.1.1.3 Fagocitosis	21
3.1.1.4 Estallido respiratorio por neutrófilos	21
3.1.1.4.1 Componentes de la enzima NADPH oxidasa	22
3.1.1.4.2 Activación de la enzima NADPH oxidasa	23
3.1.1.4.3 Mecanismo de acción	24
3.2 Especies reactivas de oxígeno	25
3.3 Medición de ROS en células	27
3.4 Sondas fluorescentes	27
3.5 DHE	27

II Planteamiento del problema	29
III Justificación del estudio	29
IV Hipótesis	29
A) Hipótesis alterna	30
V Objetivos	30
A) Objetivos específicos	30
VI Materiales y métodos	30
A) Grupos de estudio	30
I Criterios de inclusión para voluntarios sin aparatología	31
II Criterios de inclusión para voluntarios con aparatología	31
III Criterios de exclusión	31
IV Criterios de eliminación	31
B) Metodología	31
I Obtención y purificación de los neutrófilos sanguíneos	31
II Obtención y purificación de neutrófilos orales	32
III Tinción de células de cavidad oral con Wright-Giemsa	32
IV Conteo de neutrófilos orales con cámara de Neubauer	32
V Detección de especies reactivas de oxígeno	32
VI Cuantificación de especies reactivas de oxígeno	32
VI Método estadístico	33
VII Resultados	34
VIII Discusión	40
IX Conclusiones	41
X Referencias Bibliográficas	42
Anexo 1: Consentimiento informado para donación de enjuagues orales	45
Anexo 2: Ficha clínica	46

I. Introducción

Capítulo 1 Ortodoncia y aparatología ortodóncica

1. Ortodoncia

Etimológicamente, la palabra ortodoncia deriva de los términos griegos *ortos* (“rectos”) y *odontos* (“diente”). Es decir, que es la ciencia encargada de “enderezar” los dientes o de corregir las irregularidades en las posiciones dentarias. La introducción de este término en la literatura se atribuye al cirujano dentista Joachin Lefoulon, establecido en París, quien denomina *orthodontosie* u *ortodontosia* (1841) a “esa parte importante del arte dentario que se ocupa de las deformidades congénitas o accidentales de la cavidad oral”. Por lo tanto, la Ortodoncia es la especialidad de la Odontología que se ocupa del tratamiento del complejo cráneo-facial, del desarrollo de la dentición y la oclusión dentaria, así como del diagnóstico, prevención, intercepción y tratamiento de las anomalías de la oclusión (1).

1.1 Aparatología fija en Ortodoncia

La división de la aparatología ortodóncica en removible y fija no se basa en ningún criterio científico, sino en uno práctico, seguramente como reminiscencia de la época en que la ortodoncia se estudiaba junto con la prótesis. El uso de estos términos se popularizó por la distinción entre aparatos removibles (aquellos que el paciente podía poner y quitar a voluntad) y aparatos fijos (aquellos que por completo o una parte importante del aparato se encontraban fijos a los dientes por medio de cementos o adhesivos, y que el paciente no podía quitarlos por sí mismo, sin deteriorarlos) (1). Todos los aparatos de ortodoncia constan de elementos pasivos, activos y auxiliares (1).

1.1.1 Elementos pasivos

Los elementos pasivos también son llamados de anclaje. Estos elementos son todos aquellos que sirven para transmitir fuerza a los dientes del modo más homogéneo posible, pero que no generan fuerza por sí mismos. Entre ellos se encuentran las bandas, los brackets, los tubos molares, los cierres linguales y las ligaduras metálicas (1).

1.1.1.1 Banda de anclaje

La banda de anclaje es un anillo metálico que rodea la corona de un diente por vestibular, distal, lingual y mesial, sin abarcar la cara oclusal. Las bandas de anclaje se adaptan lo mejor posible a dicha corona (Figura 1) (1).



Figura 1. Banda de anclaje. Fotografía de un modelo dental donde se muestra una banda de anclaje rodeando la corona de un molar. Fuente directa.

1.1.1.2 Brackets

Los brackets son pequeñas piezas que se soldan a la banda de anclaje o se adhieren al esmalte, alojan el arco de alambre y transmiten la fuerza al diente que se quiere mover (Figura 2). El centro del bracket es el cuerpo y tiene seis caras. Las caras, con base en su orientación, se denominan: posterior, anterior, mesial, distal, gingival y oclusal. El bracket es el elemento que determina el aparato de ortodoncia y la técnica que se va a utilizar. Por lo tanto, su elección se condiciona a las preferencias personales del paciente (1).

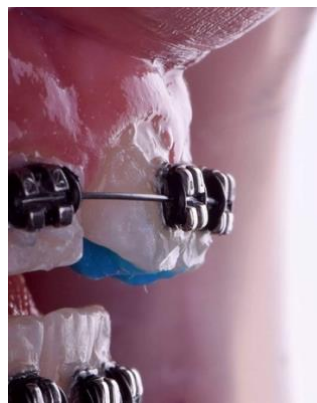


Figura 2. Brackets cementados. Fotografía intraoral lateral donde se muestran una serie de brackets cementados sobre el esmalte de dientes anteriores. Fuente directa.

1.1.1.3 Tubo molar

El tubo molar es de las mismas dimensiones interiores de un bracket, pero está cerrado por los cuatro lados y se suelda a la banda correspondiente (Figura 3). En el último diente de cada arcada incluido en el aparato de ortodoncia, generalmente el primer o segundo molar, no se utiliza un bracket, sino un tubo molar. (1).



Figura 3. Tubo molar. Fotografía de un tubo molar. Fuente directa.

1.1.1.4 Ligadura y liga elastomérica

La ligadura es el elemento que sirve para mantener el arco unido al bracket. Generalmente se utiliza alambre destemplado de acero inoxidable de 0.10" (0.25 mm) que, por medio de múltiples modos de ligar, cumple muy bien su función de ligar cada diente al arco, varios dientes entre sí, etc. Actualmente, en lugar de ligadura, se utilizan ligas elastoméricas (Figura 4). Estas ligas tienen la ventaja de que fácilmente se convierten en elementos activos si se estrían. Son muy útiles, sin embargo, se degradan fácilmente en la cavidad oral y tienen un mayor coeficiente de fricción (1).



Figura 4. Ligas elastoméricas. Fotografía intraoral donde se muestran dientes con ligaduras elastoméricas de color rosa, colocados sobre los brackets. Fuente directa

1.1.2 Elementos activos

Los elementos activos generan la fuerza encargada de mover los dientes. Esta fuerza se transmite a través de los elementos pasivos. Los elementos activos por excelencia son los arcos de alambre, las asas incorporadas a ellos, las ligaduras elásticas o elastoméricas, los elásticos intermaxilares, los muelles y los resortes (1).

1.1.2.1 Arcos de alambre

Los arcos de alambre son pequeñas barras o hilos metálicos, utilizados en aparatos de ortodoncia, tanto fija como removible (Figura 5). Por sus características físicas y mecánicas, los alambres son los elementos más adecuados para producir el tipo de fuerza que se requiere en el tratamiento de ortodoncia. Los alambres se pueden clasificar de muchas maneras. Por ejemplo, por sección, dimensiones y aleación (1).



Figura 5. Arco de alambre. Fotografía intraoral donde se observa el alambre de ortodoncia metálico. Fuente directa.

1.1.3 Elementos accesorios

Los elementos accesorios son independientes de los otros elementos. Si el tratamiento de ortodoncia requiere, en un determinado momento de este tipo de elementos, se añaden al aparato de ortodoncia. Los elementos accesorios pueden ser elementos activos o pasivos. Entre ellos están los botones, los ganchos linguales y los resortes (Figura 6) (1).



Figura 6. Resorte. Fotografía intraoral donde observa un resorte colocado en la cara palatina de un molar y un premolar. Fuente directa.

1.1 Brackets de autoligado y brackets de ligado elastomérico

Para conectar el arco de alambre al bracket se pueden usar tres métodos. El primero es unir la ligadura con los arcos de alambre de acero inoxidable, el segundo es unir los arcos de alambre al bracket con las ligaduras elastoméricas y el tercero es unir el arco del alambre al bracket con los soportes auto-ligantes. Los dos primeros métodos se denominan de ligado convencional y el tercer método se denomina de autoligado. Todos estos métodos tienen ventajas y desventajas. (2).

En los brackets de ligado convencional, es decir el ligado elastomérico, las ligas se utilizan como anclaje entre el bracket y el alambre, estos aditamentos utilizan ligas de elastómero como medio para conectar el alambre de acero inoxidable al bracket y produzcan la función de desplazar al diente (Figura 7). Las ligaduras elastoméricas actuales están fabricadas con polímeros amorfos de alto peso molecular que tienen propiedades físicas como la fluencia de la visco-elasticidad y la relajación por estrés. Se ha estudiado el suministro y degradación de fuerza de estos elastómeros, así como la colonización microbiana que se presenta una vez colocados sobre los brackets (3-5)



Figura 7. Brackets de ligado elastomérico. Fotografía intraoral donde se observa un bracket de ligado convencional, acompañada de una liga de elastómero color gris. Fuente directa.

Los brackets de autoligado son aditamentos que por sí solos son capaces de sujetar el arco de alambre dentro de la cavidad oral. Surgieron en la década de 1930 pero no fue hasta los últimos 20 años que han tenido su gran auge (Figura 8). Los brackets de autoligado se pueden dividir en tres categorías de acuerdo con su mecanismo de cierre: activas, pasivas e interactivas. Los pacientes con este tipo de brackets retienen menos biopelícula dental que los pacientes con brackets de ligado convencional (3-6).



Figura 8. Brackets de autoligado. Fotografía intraoral donde se muestran brackets de autoligado. En estos brackets no se presentan ligas de elastómero. Fuente directa.

Un aparato fijo va unido a los dientes de una manera diferente a la de un aparato removible. Un aparato fijo permite tratar una maloclusión más rápidamente que un

aparato removible. La mayor desventaja de un aparato fijo con múltiples brackets por ejemplo, es la dificultad que algunos pacientes experimentan para mantener la higiene oral. Por lo tanto, la higiene oral tiende a ser pobre y aunado a esto, si el paciente prefiere dietas cariogénicas, desarrolla lesiones de manchas blancas en el esmalte durante el tratamiento de ortodoncia. La acumulación de biopelícula dental puede ser un problema en pacientes con aparatología de ortodoncia.

Capítulo 2

Microbiota oral y biopelícula dental

2 Generalidades

El descubrimiento de la existencia de bacterias en la biopelícula dental es uno de los trabajos pioneros en el campo de la microbiología tradicional realizado por Antonie van Leeuwenhoek. Este descubrimiento fue seguido del aislamiento de la primera bacteria *Streptococcus mutans* de una cavidad oral sana, por Clarke, durante 1924 (7). Desde entonces, se han aislado una gran cantidad de microorganismos y se han caracterizado ampliamente en varios hábitats de la cavidad oral.

En un cuerpo humano sano existen aproximadamente 3.8×10^{13} microorganismos, que colectivamente se conocen como microbioma humano (8). Sorprendentemente, los microorganismos contribuyen con más de doscientos gramos del peso corporal total de un cuerpo humano promedio de 70 kg. Esto representa un orden similar al del número de células humanas totales en un individuo (9)

La cavidad oral humana contiene más de 600 especies bacterianas, conocidas colectivamente como microbiota oral o más recientemente microbioma oral (10). El término microbioma fue acuñado por Joshua Lederberg para referirse a la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que ocupan nuestro espacio corporal (11). La cavidad oral contiene diferentes microambientes (mucosa yugal, paladar, lengua, dientes, encía y saliva) cada uno con su propia microbiota. Por lo tanto, la composición de la microbiota oral varía en las distintas superficies (por ejemplo, dientes o mucosa), y en lugares sobre una superficie específica (por ejemplo, fisuras o surco gingival), lo que demuestra que las pequeñas diferencias en el hábitat pueden afectar a la capacidad de especies individuales para colonizar y dominar. La cavidad oral humana es un hábitat de microbios en constante transformación, existen cambios fisiológicos que permiten esta variación en los organismos comensales orales a lo largo de la vida (12).

Durante el nacimiento natural de un individuo, que involucra su contacto con el canal vaginal y poco después, comienza la colonización bacteriana de la superficie del epitelio oral, previamente libre de gérmenes. En cada etapa de desarrollo postnatal, los cambios fisiológicos drásticos, como la erupción de los dientes primarios y el reemplazo de la dentición primaria con dentición permanente, alteran en gran medida los hábitats microbianos, lo que puede llevar a cambios ecológicos de la microbiota oral (12).

2.1 Microbiota en mucosa oral

La microbiota de la mucosa oral está constituida casi exclusivamente por cocos Gram positivos anaerobios facultativos y en especial, por *Streptococcus viridans*. Los labios, al representar una zona de transición de piel a mucosas, estarán colonizados por una microbiota cutánea como *Staphylococcus epidermidis* y por especies de los géneros *Kocuria* y *Micrococcus* además de la presencia de *Streptococcus viridans*, procedente de la saliva y el dorso de la lengua. En la mucosa yugal predomina también *Streptococcus viridans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus salivarius*. En el paladar duro existe una microbiota estreptocócica similar a la de la mucosa yugal (Figura 9) (10, 13)

En el paladar blando aparecen bacterias propias de las vías respiratorias altas como especies de *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus viridans*. La microbiota de la encía está íntimamente relacionada con la de la biopelícula dental coronal lisa en la unión dentogingival y con la de localización subgingival. En la mucosa oral predominan las familias, *Firmicutes* (sobre todo los géneros *Streptococcus* y *Veillonellas*), proteobacterias (en su mayoría de *Neisseria*), bacteroides (*Prevotella*) y *Actinobacteria* (*Micrococcineae*). Una correcta higiene oral de las superficies de las mucosas previene la colonización por *Treponema denticola* y *Fusobacterium nucleatum* (13).

2.2 Microbiota en saliva

La microbiota salival está compuesta por bacterias que son específicas para cada persona exhibiendo estabilidad a largo plazo. Sin embargo, cambios estructurales en la cavidad oral, como la pérdida dental, la gingivitis, la alveolitis y la periodontitis pueden producir cambios ecológicos que afecten la microbiota de la saliva. La cavidad oral está expuesta al entorno externo, por lo tanto, la microbiota también puede estar influenciada por factores externos como el fumar (14).

La diversidad de bacterias en la cavidad oral condiciones de salud fue analizada usando el gen del rRNA 16S. Las secuencias encontradas correspondientes a bacterias como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Granulicatella adiacens*, *Neisseria flavescens*, *Rothia mucilaginosa* y *Prevotella melaninogenica*, en personas sanas; *Fusobacterium nucleatum* en la biopelícula dental; periodontopatógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* y *Filifactoralocis*; así como patógenos cariogénicos como el *Streptococcus mutans* (Figura 9) (14).

2.3 Microbiota en superficies dentales

A diferencia de las superficies de desprendimiento del epitelio oral, las superficies de los dientes son las únicas superficies que no se descaman en la cavidad oral. Las superficies dentarias facilitan un lugar de anclaje estable para el desarrollo de biopelícula a largo plazo. Como un sustrato para la formación de biopelícula, las superficies de los dientes son más complejas, el esmalte de los dientes en la cavidad oral se recubre con una película salival (película adquirida), mientras que las raíces pueden estar recubiertas con proteínas salivales. La película salival es rica en proteínas y permitirá la adhesión inicial de los microorganismos colonizadores (14).

Géneros como *Campylobacter*, *Granulicatella*, *Kingella*, *Leptotrichia* y *Streptococcus* (especialmente, *Streptococcus sanguinis*) se han asociado con dientes libres de caries en preescolares y escolares (Figura 9) (15). Sin embargo, las comparaciones con otros estudios, es compleja por el hecho de que se los estudios nos son comparables pues la población pertenece a condiciones socioeconómicas diferentes y de diferentes edades. Héller y colaboradores caracterizaron los cambios temporales y la diversidad de los microorganismos cultivables y no cultivables en la formación inicial de la biopelícula dental en sujetos sanos (16). Esto condujo a la identificación de al menos 92 especies, siendo los *Streptococcus* los más abundantes en todos los puntos de tiempo en todos los sujetos. También se detectó alta frecuencia de *Haemophilus parainfluenza*, *Gemella haemolysans*, *Slackia exigua*, y las especies *Rothia* (16).

2.4 Microbiota en surco gingival

En los surcos gingivales sanos (menos de 4 mm de profundidad), predominan *Proteobacterias*, en particular el gammaproteobacteriae de género *Acinetobacter*, *Haemophilus* y *Moraxella*. Dentro del filo *Firmicutes*, la clase bacilos que comprende el género *Streptococcus*, *Granulicatella* y *Gemella* son asociados a estados de salud. Estos géneros se pueden considerar simbioses, que también regresan a las bolsas periodontales en alta proporción después de los tratamientos periodontales (Figura 9) (10).

2.5 Microbiota en lengua

La biopelícula que se forma en la superficie de la lengua es una estructura dinámica compuesta por bacterias, células epiteliales de la mucosa oral, los leucocitos de las bolsas periodontales, metabolitos de la sangre y diferentes nutrientes (17). Por sus criptas y papilas, la lengua ofrece amplias posibilidades para la colonización bacteriana. Aproximadamente el 45 % son cocos Gram positivos anaerobios facultativos, destacando sobre los demás *Streptococcus salivarius*, seguido de *Streptococcus mitis*, los cocos Gram negativos anaerobios estrictos (aproximadamente el 16 % de diversas especies de *Veillonella*) y bacilos grampositivos anaerobios facultativos (en torno al 12 %, fundamentalmente

Actinomyces spp.), en menor proporción pueden detectarse diversas especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Fusobacterium* y *Haemophilus* (17).

2.6 Microbiota en materiales artificiales

La composición de la biopelícula dental en las personas con prótesis no es constante y depende del sitio de donde se tome la muestra. (18) La biopelícula dental es más diversa en dientes que en la dentadura y la mucosa. Por eso, la presencia de dientes naturales tiene un impacto significativo en la composición microbiana, en general, de la cavidad oral. La biopelícula dental de la dentadura tiene *Prevotella* y *Veionella*, especies que se encuentran en los pacientes con estomatitis protésica. La enfermedad relacionada con la dentadura casi siempre se atribuye a la infección con *Candida albicans*. Sin embargo, dada la amplia gama de especies bacterianas identificadas en las dentaduras y la mucosa circundante, es poco probable que una infección puede atribuirse únicamente a *Candida* spp. (18).

Los implantes pueden albergar poblaciones microbianas que incluyen algunos microorganismos asociados a periodontitis debido a la influencia de la estructura de la superficie de los implantes (19). Además, los microorganismos presentes en la biopelícula dental subgingival de pacientes con periodontitis también pueden sobrevivir en la zona de implantes (20). En respuesta a los implantes aumentan la cantidad de *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguis*, lo que sugiere que los implantes promueven la proliferación de varias especies de *Streptococcus* realizan con diferentes funciones en la cavidad oral. Las enfermedades alrededor del implante pueden ser de etiología polimicrobiana, causado por un cambio en la comunidad microbiana, en lugar de un solo patógeno (19).

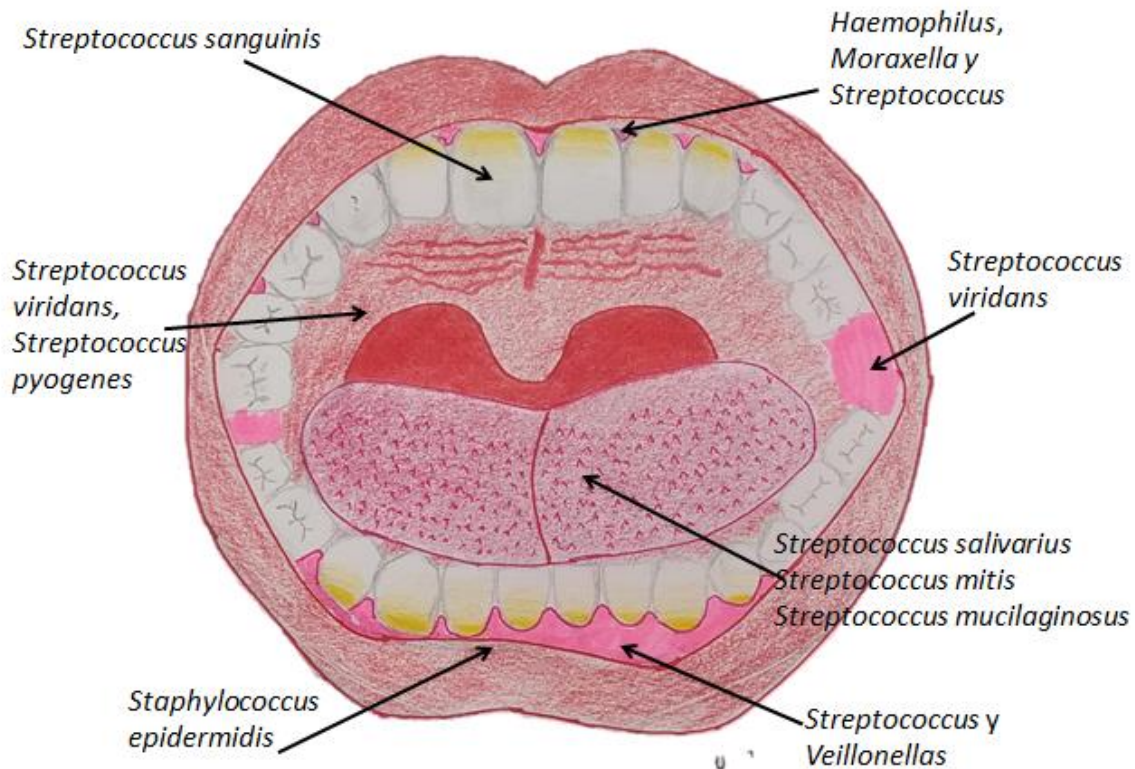


Figura 9. Esquema de la distribución de las principales especies de bacterias presentes en la cavidad oral sana de un adulto. Fuente directa.

2.7 Microbiota oral disbiótica

Los hábitos alimentarios saludables y la buena higiene mantienen constante el equilibrio oral. Los microorganismos comensales, principalmente las bacterias, mantienen el equilibrio para mantener un ecosistema oral saludable y cada individuo sano alberga una microbiota personalizada. (20).

Diversos factores como los hábitos alimentarios no saludables, el consumo de tabaco y alcohol, el estrés, el desequilibrio hormonal, la pubertad, la higiene oral deficiente, la diabetes y la inflamación gingival perturban a la comunidad bacteriana comensal y alteran el ecosistema oral (7).

La evolución de un periodonto sano a uno con periodontitis se asocia a un cambio en la microbiota oral de bacterias simbióticas a microorganismos anaeróbicos disbióticos, que se han adaptado para prosperar en un entorno inflamatorio. Las bacterias, como *Porphyromonas gingivalis*, inducen cambios en la microbiota normal del líquido crevicular gingival, lo que lleva a un aumento de la deposición de biopelícula dental en el surco gingival y una inflamación moderada (17).

En casos severos, se establece un estado inflamatorio crónico que resulta en la formación de bolsas periodontales con destrucción extensa de tejido periodontal

que incluye la pérdida ósea (17). Se cree que una alteración del equilibrio, disbiosis, de la microbiota oral de las bacterias es el desencadenante inicial de la periodontitis (21). La acumulación de bacterias conduce a un aumento en el infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente por neutrófilos, hacia los tejidos orales. Ahí, los neutrófilos forman una barrera que evita que las bacterias invadan los tejidos periodontales más profundos (17).

2.8 Microbiota oral en pacientes con ortodoncia

La preservación de la integridad de los tejidos periodontales es una de las principales preocupaciones de los especialistas en ortodoncia, que ha llevado a la definición de protocolos de higiene específicos para pacientes de ortodoncia.

Algunos autores han observado que los aparatos fijos pueden obstaculizar una higiene oral efectiva. Además, debido a la dificultad de mantener la higiene oral, la microbiota subgingival también puede verse afectada por los aparatos de ortodoncia ya que los accesorios que se utilizan favorecen la retención de la biopelícula dental.

Se han realizado estudios microbiológicos para determinar la estirpe bacteriana que normalmente se presenta en los aparatos de ortodoncia fija (22). Kim y colaboradores coincidieron que algunas bacterias patógenas como *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *T. forsythia* disminuyeron drásticamente inmediatamente después de la eliminación de brackets de ligado convencional. Sin embargo, *A. actinomycetemcomitans* se mantuvo sin cambios (Figura 10) (23).

Otros microorganismos como *T. forsythia*, *C. rectus* y *P. nigrescens* tienden a aumentar su población en la región subgingival después de la colocación de aparatos de ortodoncia. Otro hallazgo interesante es que *C. rectus* y *P. nigrescens* parecen colonizar inmediatamente después de la colocación de los aparatos de ortodoncia, mientras que *T. forsythia* requiere más tiempo para colonizar. Esto supone que *T. forsythia* puede establecerse más efectivamente en sitios colonizados por *C. rectus* y *P. nigrescens*, que pueden proporcionar los requisitos nutricionales y/o sitios de unión para *T. forsythia* al alterar el entorno fisicoquímico para la interacción microbiana (Figura 10) (24).

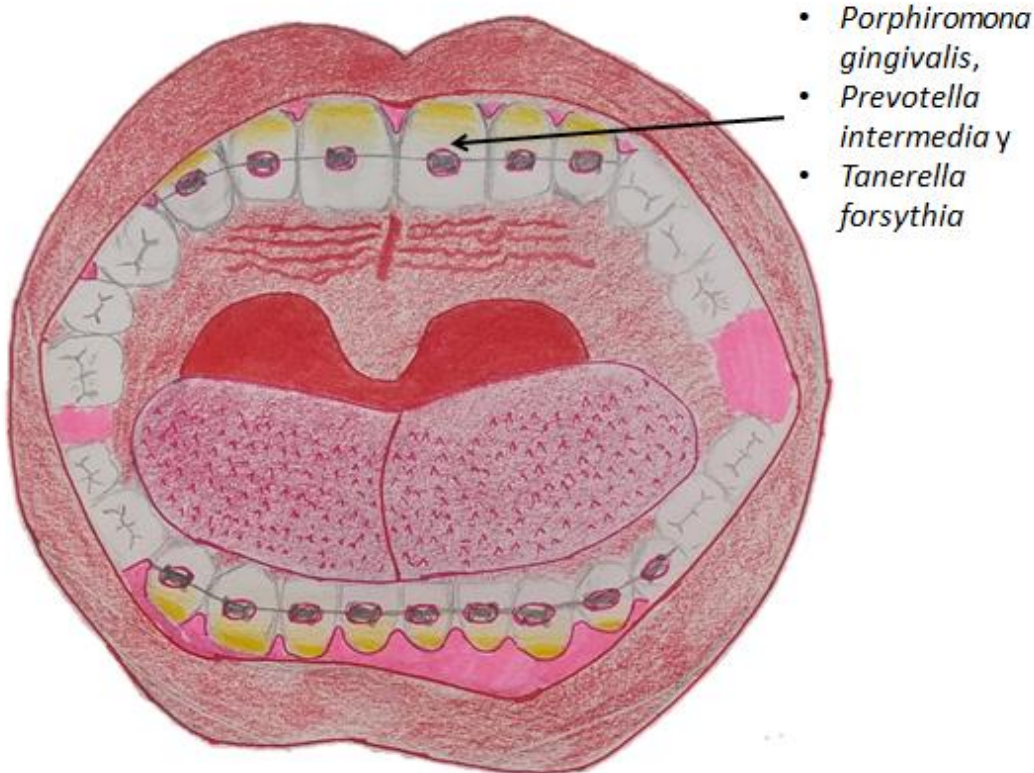


Figura 10. Esquema que muestra las principales especies de bacterias presentes en la cavidad oral sana de un adulto, con aparatología ortodóncica. Fuente directa.

2.9 Determinantes ecológicos orales y su relación con aparatología ortodóncica

En el ámbito odontológico, la sustitución del tejido dentario por un material restaurador o la colocación de aparatología ortodóncica en la cavidad oral, establece las condiciones para que estas superficies al estar sumergidas en un fluido, sean colonizadas por microorganismos. La superficie del material y su composición pueden influir en la capacidad de adhesión de los microorganismos y en la formación más o menos rápida de la biopelícula dental bacteriana (25).

La adhesión bacteriana depende de factores inespecíficos de índole físico-químicos, eléctricos, etc. y factores específicos, de carácter adhesina-receptor, fimbrias, etc. (25).

Los determinantes ecológicos orales, son los factores que regulan la composición cualitativa y cuantitativa, el desarrollo y la distribución de la microbiota normal que se localiza en los diferentes ecosistemas de la cavidad oral. Los factores

fisicoquímicos constituyen las condiciones de temperatura, humedad, pH, y potencial de óxido-reducción de los ecosistemas de la cavidad oral (25).

La temperatura de la cavidad oral es ligeramente más baja que la temperatura normal del cuerpo, entre 35 y 36 °C, y el pH de la cavidad oral está regulado por la saliva y oscila entre 6,5 y 7,5. Sin embargo, este factor también está sujeto a variaciones, ya sea por la ingestión de alimentos, por el metabolismo microbiano principalmente en los ecosistemas asociados a la biopelícula dental, donde el pH después del consumo de azúcares puede bajar por debajo de 5 por la producción de ácidos. Sin embargo se ha estudiado que el nivel de pH salival en pacientes con aparatos ortodóncicos fijos, no es significativamente distinto al pH salival de pacientes sin aparatología ortopédica (26).

Entre los mecanismos que permiten la supervivencia microbiana en la cavidad oral se encuentran la adhesión, la agregación y la coagregación. El transporte de la bacteria se produce por tres mecanismos: difusión; dinámica del fluido y por actividad propia de la bacteria. No existe ninguna interacción entre la superficie sólida y el microorganismo hasta una distancia de 50 nm donde interactúan las fuerzas de Van der Waals, que son debidas a un efecto dipolo entre átomos o moléculas. A medida que se va acercando a la superficie y a una distancia más corta que la interacción por las Fuerzas de Van der Waals, aparece una fuerza de repulsión debida a la carga negativa de la bacteria y del material que suelen ser del mismo signo. A esta fuerza se le denomina "Z potencial", de la interacción de estas dos fuerzas es de lo que depende el mayor o menor acercamiento del microorganismo a la superficie del material (27).

Existen superficies como el acero inoxidable, el cromo y el cobalto (aleación metálica con la que se fabrican los brackets metálicos) con una alta energía superficial, y otras como las resinas con más baja energía superficial, lo que podría modificar la adhesión bacteriana. De forma general, mientras las bacterias tengan mayor energía superficial existirá mayor adhesión, dado que la saliva tiene baja energía superficial. También, las bacterias con mayor energía superficial tendrán mayor afinidad por sustratos con mayor energía superficial y viceversa. Así, la baja energía superficial de los biomateriales reduce la adhesión y retarda por tanto la maduración de la biopelícula dental (27).

En las uniones tipo proteína-proteína, intervienen principalmente proteínas de la película adquirida ricas en prolina, que se une a proteínas microbianas como las que forma parte de las fimbrias. Además de participar en la adhesión estas uniones son importantes en los fenómenos de coagregación en bacterias periodontales (25).

En la unión física por retención, muchos microorganismos quedan retenidos en la cavidad oral en fosas, en fisuras, en áreas interproximales de los dientes, alrededor de prótesis, en el surco gingival, en bolsas periodontales, en lesiones producidas por la caries o en aparatología ortodóncica fija (3, 5, 7).

2.10 Biopelícula dental

Las biopelículas son estructuras heterogéneas que contienen microcolonias de bacterias encapsuladas en una matriz de sustancia polimérica extracelular. La unidad estructural básica de las biopelículas son las microcolonias (9, 28).

La formación de las biopelículas son procesos altamente organizados. La adhesión a una superficie es el primer paso esencial para el desarrollo de una biopelícula. La primera fase es la de la adhesión de los microorganismos en estado planctónico a la superficie. Esta fase es reversible y está controlada por diversas variables fisicoquímicas que determinan la interacción entre la superficie de las bacterias y la superficie acondicionada. La segunda fase comienza una vez que las bacterias están firmemente adheridas a la superficie y empiezan a producir matriz extracelular. Esta matriz dará la arquitectura heterogénea y particular de la biopelícula. La tercera fase comprende la maduración de la biopelícula y el establecimiento de la morfología particular de las microcolonias. La cuarta fase y última se identifica cuando las bacterias presentes en una microcolonia madura se desprenden para colonizar nuevas áreas (Figura 11) (9).

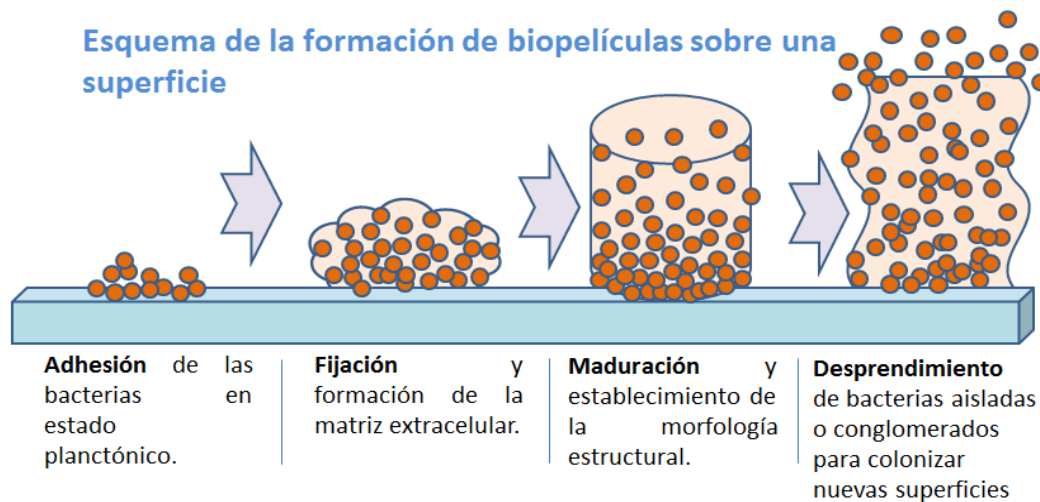


Figura 11 Esquema que muestra las cuatro fases de la formación de una biopelícula en una superficie adhesión, fijación, maduración y desprendimiento. Fuente directa.

2.11 Relación de la ortodoncia con la biopelícula dental

Actualmente, el tratamiento para corregir maloclusiones se puede realizar mediante la colocación de aditamentos que se utilizan en Ortodoncia y Ortopedia cráneo-facial. La composición, forma y ubicación dentro de la cavidad oral de dichos componentes pueden ser perjudiciales para el ecosistema oral. Esto es en parte, debido a que se dificulta la higiene de los aditamentos y se favorece la retención de agentes potencialmente nocivos para los dientes y el periodonto, tales como la biopelícula dental. Existen ciertos dispositivos que van unidos al esmalte dental por medio de cementos, como los brackets, los tubos molares, los botones linguales y aquellos que se colocan de manera física sobre estos dispositivos, como los alambres, los resortes o las ligas, que por simple presencia pueden retener biopelícula dental (1).

El tratamiento de ortodoncia con aparatos fijos y removibles se ha asociado con un aumento en la acumulación de biopelícula dental y la descalcificación del esmalte. Esto se debe principalmente a que los brackets dificultan la buena higiene oral porque crean nuevas áreas de retención de biopelícula (Figura 12). La colonización bacteriana se debe a incrementos en la cantidad de *Streptococcus mutans* y *Lactobacilli* (28, 29).

En general, se ha afirmado que los dispositivos de ortodoncia reducen la eficacia del cepillado dental y la autoclisis. Por ende, cambian la composición de la microbiota oral y aumentan la cantidad de biopelícula dental facilitando la colonización de las superficies orales por bacterias cariogénicas y periodontales.

Los brackets por simple presencia podrían alterar la anatomía coronal del diente, lo que provocaría un aumento en el número de superficies retentivas y dificultaría el control de la formación y adhesión de la biopelícula dental (9).

Esto significa que cuando las condiciones biológicas son buenas para que la proliferación bacteriana aumente, el ecosistema oral sufre cambios y los sistemas de defensa activan una serie de eventos celulares y moleculares para frenar el avance de una enfermedad, como una respuesta biológica a la disbiosis. (21).



Figura 12. Fotografías intraorales de paciente femenino de 25 años de edad. La paciente tomó una pastilla reveladora de biopelícula y ésta se tiñó de rosa. La tinción se puede apreciar en los dientes y alrededor de los brackets de ligado convencional. Fuente directa.

Capítulo 3

Cavidad oral y neutrófilos

3 Generalidades

Durante mucho tiempo se ha apreciado que existe una comunicación continua entre el sistema inmunológico y la microbiota. El sistema inmunológico puede intervenir en la composición de la microbiota, viceversa, la microbiota puede influir en el desarrollo y la función del sistema inmunológico. En esta interacción participan tanto el sistema inmunológico innato como el adaptativo en relación con la homeostasis y la coexistencia huésped-microorganismo (30). 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 el microbiota comensal y el sistema inmunológico (21). Aunque la cavidad oral está fuertemente colonizada por microorganismos, las infecciones se manifiestan muy rara vez, y estas no ocurren mientras se mantenga un equilibrio activo entre la microbiota oral y las respuesta inmunológica del huésped (31).

Para mantener el equilibrio entre el huésped y los microorganismos se inicia una respuesta inflamatoria aguda como respuesta fisiológica. Esto se caracteriza por el reclutamiento de células inmunes innatas, como los neutrófilos, dentro de los tejidos del hospedador en un sitio expuesto (31).

3.1 Neutrófilos

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son los leucocitos más abundantes en sangre, representan del 50 al 70 % del total de células del torrente sanguíneo. Los neutrófilos son considerados la primera línea de defensa contra una infección y son uno de los principales tipos de células involucrados en el inicio de la inflamación aguda (31-33). Los neutrófilos tienen un tamaño de aproximadamente 10 a 12 μm , son células fagocíticas que no se tiñen con colorantes ácidos ni básicos. Morfológicamente, se caracterizan por presentar un núcleo con cromatina compacta y segmentada de 2 a 5 lóbulos (31).

Los neutrófilos son producidos en la médula ósea a partir de células troncales mieloides, por medio del proceso denominado “granulopoyesis”. Los neutrófilos se concentran en dos reservorios de tamaño similar: el circulante y el marginal. Después de 6 a 7 horas en circulación, una fracción de los neutrófilos abandona el lecho vascular y accede a los tejidos periféricos en respuesta a la producción de estímulos quimiotácticos (33). El reclutamiento en los sitios de inflamación se realiza por medio de una serie de eventos celulares y moleculares denominada cascada de adhesión leucocitaria. Este proceso inicia con la activación de las células

endoteliales que expresan receptores de selectinas tipo E y P. Los neutrófilos reconocen estas selectinas y comienzan a rodar sobre el endotelio. Posteriormente, las quimiocinas inducen la expresión de integrinas hasta llegar a detenerse sobre el endotelio. Por último, los neutrófilos, transmigran al sitio de inflamación mediante diapédesis. Los neutrófilos que se reclutan en los sitios de inflamación siguen gradientes quimiotácticos como componentes del sistema de complemento (C5a) y componentes bacterianos. Después de la trans migración hacia el sitio de infección, los neutrófilos destruyen a los microorganismos por fagocitosis, degranulación o formación de trampas extracelulares de neutrófilos. Posteriormente, sufren apoptosis y son fagocitados por macrófagos (21).

3.1.1 Funciones

Los neutrófilos poseen cuatro funciones para combatir las infecciones: formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés), degranulación, fagocitosis y estallido respiratorio con producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), que dan como resultado la eliminación de agentes patógenos. (Figura 13) (33, 34).

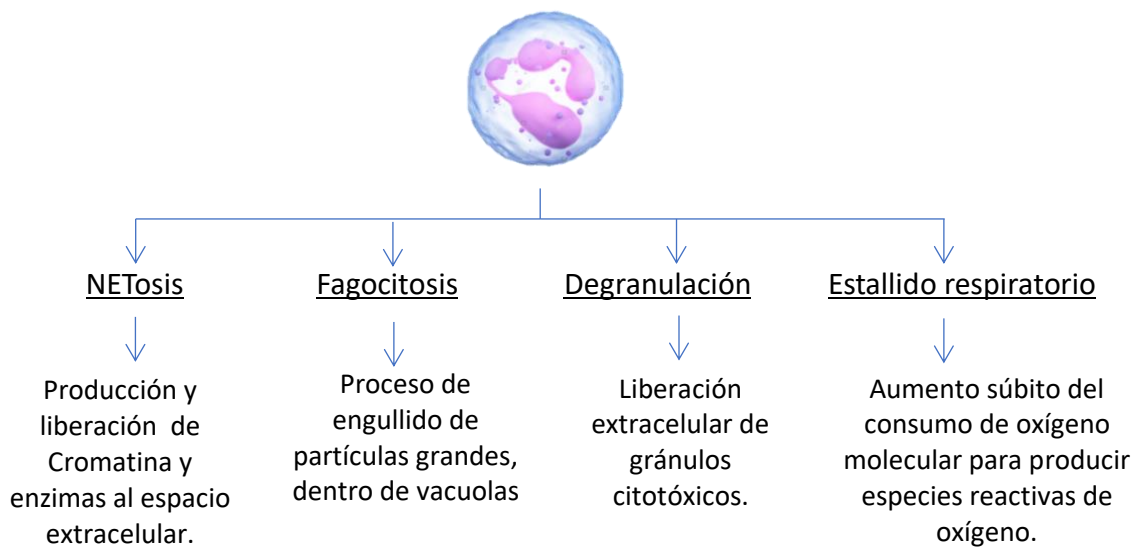


Figura 13. Esquema de las funciones de los neutrófilos. Fuente directa.

3.1.1.1 Producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET)

La NETosis es una forma específica de muerte celular realizada por los neutrófilos que se caracteriza por la liberación de NET. Las NET se forman en respuesta a una variedad de estímulos proinflamatorios, y sirven para atrapar y matar microorganismos. (35, 36). Las NET están formadas por filamentos de cromatina (DNA e histonas) que se combina con proteínas de los gránulos primarios, secundarios y terciarios de neutrófilos (37).

Hoy en día, se conocen tres tipos de NETosis. La NETosis suicida es el tipo bien caracterizado y más observado. Este proceso depende del oxidante e incluye la ruptura de la membrana celular y el desarrollo de la lisis celular, lo que indica la muerte de neutrófilos. En contraste, en NETosis vital, los neutrófilos liberan DNA sin una pérdida de membrana nuclear y de plasma. Eso significa que después de la NETosis, los neutrófilos permanecen vivos y son capaces de fagocitar. La NETosis vital se divide en los dos grupos dependiendo de la formación de oxidante y el origen del DNA en las NET (38).

La captura de los patógenos es importante para la limitación de su extensión desde el sitio inicial de la infección. El mecanismo clave, mediante el cual las bacterias quedan atrapadas por las NET, son las interacciones electrostáticas entre la membrana bacteriana cargada positivamente y el ADN cargado negativamente de las fibrillas de cromatina (35). Sin embargo, algunos tipos de bacterias que tienen una cápsula en su superficie o que pueden cambiar su carga de superficie, están protegidas contra la captura (39).

3.1.1.2 Degranulación

Los neutrófilos almacenan proteasas y péptidos antimicrobianos en gránulos que se fusionan con el fagosoma durante la captación de patógenos. La fusión de gránulos con la membrana plasmática, causando la liberación extracelular de contenidos, también ocurre durante la activación de los neutrófilos. En general, la liberación extracelular de vesículas secretoras y vesículas terciarias ocurre con una activación moderada, mientras que la liberación de gránulos secundarios y primarios se produce principalmente a través de fugas inadvertidas del fagosoma, más comúnmente durante la fagocitosis frustrada. La fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática da como resultado la presentación de receptores quimiotácticos y de adhesión que promueven el reclutamiento de neutrófilos. La movilización de gránulos terciarios y secundarios durante la transmigración puede facilitar la degradación del colágeno en la membrana basal y, por lo tanto, la eliminación de una barrera física para el egreso de los neutrófilos (33).

3.1.1.3 Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso de engullido de partículas grandes (>0.5 μm de diámetro). El reconocimiento del microbio opsonizado depende de la participación de los receptores opsónicos, como los Fc γ R y los receptores de lectina de tipo C, que encierran el patógeno dentro de una vacuola definida denominada fagosoma. Los fagocitos también tienen receptores de afinidad alta para ciertas opsoninas, como las moléculas de anticuerpo, las proteínas del complemento y las lectinas plasmáticas; estos receptores son fundamentales para la fagocitosis de muchos microbios diferentes que están cubiertos con anticuerpos.(33)

El fagosoma se fusiona con los lisosomas, donde se destruyen las partículas ingeridas en una vesícula llamada fagolisosoma. El fagolisosoma aísla del resto de la célula los mecanismos de lisis, que podrían dañar al fagocito. Los neutrófilos expresan receptores que reconocen de forma específica microbios, y la unión de los microbios a estos receptores es el primer paso en la fagocitosis (40)

La fagocitosis de neutrófilos es muy rápida. La captación de partículas opsonizadas con IgG se produce en menos de 20 s. Dicha captación es seguida por la fusión de la vacuola fagocítica con gránulos preformados dentro de la célula para formar el fagosoma, en un proceso denominado maduración fagosómica. Estos gránulos contienen enzimas hidrolíticas y subunidades de la NADPH oxidasa que inician los mecanismos de destrucción. La fagocitosis en los neutrófilos difiere de la de otros fagocitos profesionales, como los macrófagos, en que, tanto la captación de partículas, como la maduración del fagosoma, son mucho más lentas. Además, el fagosoma de neutrófilos completamente maduro tiene un pH neutro, mientras que en los macrófagos el fagosoma es altamente ácido. Esta diferencia puede reflejar los efectos del estallido respiratorio, que es masivo en los neutrófilos y no así, en los macrófagos (33, 41, 42).

3.1.1.4 Estallido respiratorio de los neutrófilos

Es un proceso que algunas células son capaces de realizar para liberar especies reactivas de oxígeno, por medio de la reducción univalente del oxígeno molecular, lo que produce un aumento súbito del consumo de oxígeno.

Los neutrófilos adquieren la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno cuando experimentan activación. Este fenómeno se caracteriza por el aumento en el consumo súbito de oxígeno, no asociado al transporte electrónico mitocondrial. Este fenómeno es catalizado por el sistema NADPH oxidasa, enzima responsable de la oxidación del NADPH con la simultánea producción de anión superóxido. Este radical es utilizado por las células profesionales para destruir bacterias (41).

3.1.1.4.1 Componentes de la enzima NADPH oxidasa

La NADPH oxidasa es una enzima transmembranal que se encuentra en la membrana plasmática de los neutrófilos y en la membrana de los gránulos específicos, está formada por la glucoproteína gp91^{phox} y los polipéptidos p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}, todos ellos codificados por el gen "*phox*" (phagocyte oxidase) en el cromosoma X. El flavocitocromo b558 es el componente redox de la NADPH oxidasa, un sistema de transferencia electrónica que genera anión superóxido. Es un heterodímero que se localiza en la membrana de los gránulos específicos (90%) y la membrana plasmática (10%) cuando el neutrófilo está en reposo. Después de la activación, el flavocitocromo b558 migra desde la membrana

de los gránulos específicos hacia la membrana plasmática de los fagosomas. Está formada por 2 subunidades diferentes: una glucoproteína de 91 kDa y otra proteína no glucosilada de 22 kDa. Los tres complejos proteicos restantes se encuentran libres en el citosol del neutrófilo ($p67^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p40^{phox}$) (Figura 14) (43).

Componentes de la NADPH oxidasa

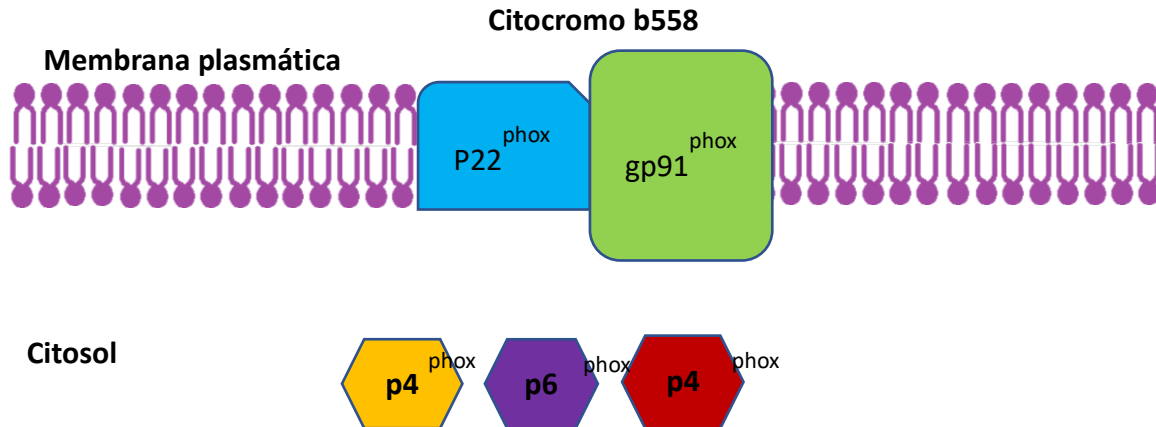


Figura 14. Esquema de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa. El citocromo b558 es una flavohemoproteína transmembranal compuesta por una proteína de 22 kDa ($p22^{phox}$), y una glucoproteína de 91 kDa ($gp91^{phox}$). También existen tres complejos proteicos presentes en el citosol del neutrófilo denominados $p40^{phox}$, $p67^{phox}$ y $p47^{phox}$. Fuente directa.

3.1.1.4.2 Activación de la enzima NADPH oxidasa

Durante la activación de la NADPH oxidasa diversas proteínas citosólicas se traslocan a la membrana plasmática que rodea al fagosoma. Este proceso se encuentra estrictamente regulado e implica fosforilaciones, traslocación y múltiples cambios conformacionales (Figura 15 B) (44). La NADPH oxidasa es actualmente la única familia de enzimas que se sabe que produce especies reactivas de oxígeno como única función. La enzima NADPH oxidasa es inactiva en neutrófilos en reposo. Consta de cinco componentes: $p22^{phox}$, $p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$ y $gp91^{phox}$. En el neutrófilo en reposo, los componentes $p40^{phox}$, $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ se presentan como un complejo citosólico. Los otros dos componentes, $p22^{phox}$ y $gp91^{phox}$, se localizan en las membranas de las vesículas secretoras y de los gránulos específicos, bajo la forma de una flavohemoproteína denominada b558 (Figura 15 A). Esta separación física de los componentes de la NADPH oxidasa hace que sea inactiva en el neutrófilo en reposo. Al activarse el neutrófilo (Figura 15 B), los

componentes citosólicos migran a la membrana, se asocian con el citocromo b558 y generan la forma activa de NADPH oxidasa (Figura 15) (44).

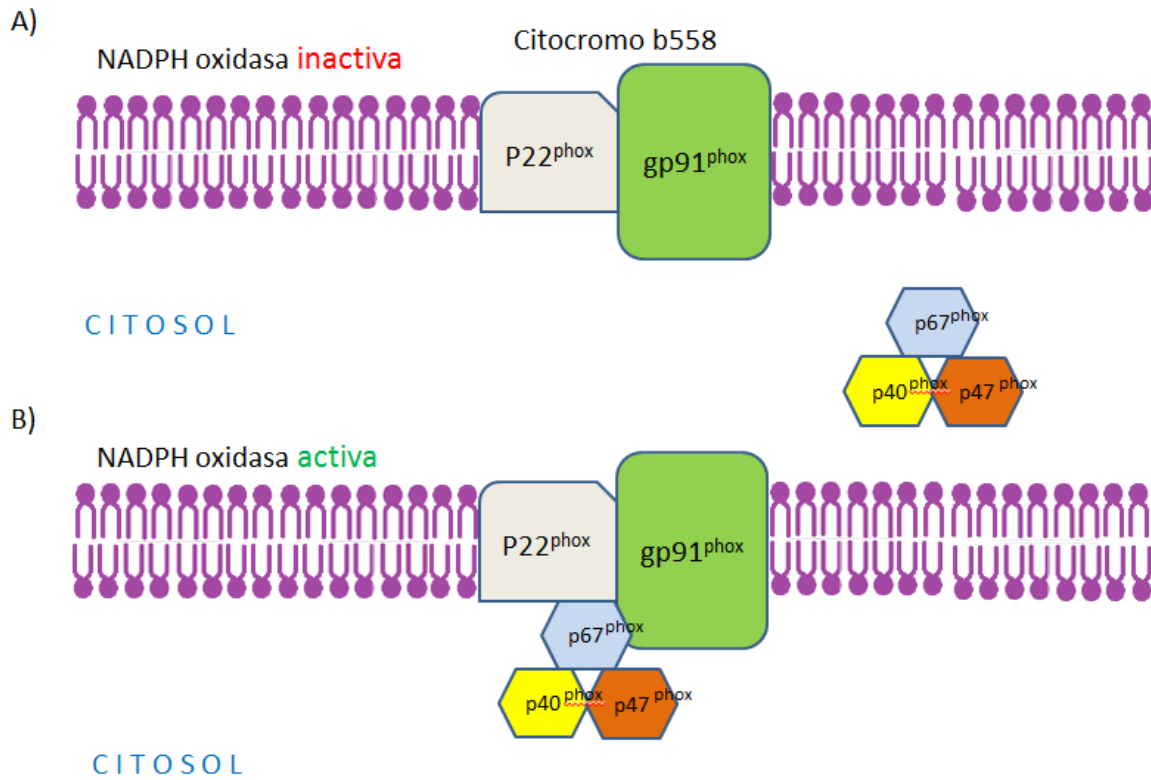
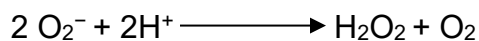


Fig. 15 Esquema de los estados de reposo y activación de la NADPH oxidasa. En el estado inactivo de la enzima NADPH oxidasa A) el citocromo b558 se encuentra separado del complejo proteico p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} que se ubican al interior de las vesículas secretoras del neutrófilo, cuando el neutrófilo produce el estallido respiratorio B) el complejo proteico se une al citocromo b558 creando la forma activa de la enzima NADPH oxidasa. Fuente directa.

3.1.1.4.3 Mecanismo de acción

El anión superóxido, puede reaccionar con una amplia variedad de sustratos biológicos. Sin embargo, no es relevante como agente oxidativo debido a su escaso potencial antioxidante y a su alta tasa de dismutación (43). La mayor parte del anión superóxido dismuta rápidamente en una reacción espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno, de acuerdo con la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un oxidante muy estable que ejerce efectos tóxicos sobre diferentes componentes microbianos. Las células fagocíticas producen intermediarios reactivos de oxígeno (IRO) con mayor potencial oxidante, entre ellos, los oxidantes halogenados, generados por la acción de la enzima

mieloperoxidasa presente en altas concentraciones en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Esta enzima cataliza la oxidación de haluros (cloruro, bromuro y yoduro) por el H_2O_2 y genera aniones hipohalitos de acuerdo con la siguiente reacción:



Debido a las altas concentraciones plasmáticas de aniones Cl^-

El principal producto de la reacción es el hipoclorito. Gracias a su alta capacidad reactiva, el hipoclorito oxida una amplia variedad de moléculas, como aminas, aminoácidos etc. Se estima que, a pH 7.3 (pH neutro), un millón de neutrófilos genera 2×10^{-7} moles de hipoclorito, cantidad suficiente para destruir 150 millones de bacterias *E. coli* en milisegundos. El anión hipoclorito puede también reaccionar con aminas primarias o secundarias en el propio neutrófilo y dar lugar a la formación de otras especies oxidantes de alta vida media, denominadas cloraminas, también importantes para la acción microbicida de los neutrófilos (Figura 16) (43).

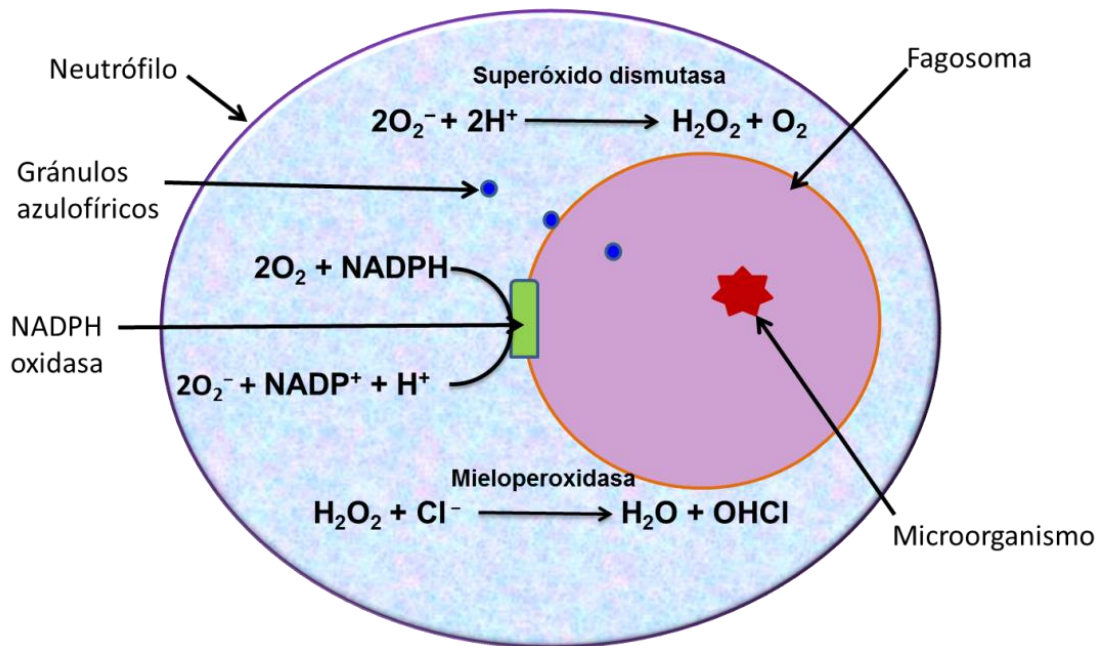


Figura 16. Esquema del estallido respiratorio del neutrófilo para eliminar a un microorganismo fagocitado. En la reacción A), dos moléculas de oxígeno presentes en la célula, son reducidas por acción de la enzima NADPH oxidasa utilizando al NADPH como sustrato, dando como resultado dos moléculas de anión superóxido (2O_2^-), una molécula de ion hidrógeno (H^+) así como el ion NADP^+ , una vez presente el O_2^- en la célula, este dismuta por una reacción espontánea a peróxido de

hidrógeno (H_2O_2), o por acción de la enzima superóxido dismutasa como se ejemplifica en el inciso B), el H_2O_2 es utilizado por la enzima mieloperoxidasa (presente en los gránulos azulofíricos del neutrófilo), así como el anión cloro (Cl^-) utilizado como cofactor, para generar agua y ácido hipocloroso, este último con la capacidad de eliminar bacterias. Fuente directa.

En fagocitos quiescentes (en reposo), la NADPH oxidasa no es activa, pero adquiere actividad catalítica cuando las células se estimulan con agentes apropiados. El estímulo fisiológico de la NADPH oxidasa en fagocitos incluye la fagocitosis de bacterias u otras partículas opsonizadas, complejos inmunes, citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la linfotoxina, el interferón, péptidos quimiotácticos como el producto C5a de la rotura del complemento y los péptidos N-formilados derivados de bacterias. Estímulos poderosos no fisiológicos son el éster de forbol 12 miristato 13 acetato (PMA), activador de la proteína quinasa C y el agente activador de las proteínas G (Tabla 1) (43).

Tabla 1. Principales estímulos fisiológicos y no fisiológicos de los neutrófilos para la producción de ROS.

Estímulos fisiológicos	Estímulos no fisiológicos
Partículas opsonizadas	Forbol 12 miristato 13 acetato (PMA)
Citosinas (TNF)	Activador de la proteína quinasa C
Interferón	Activador de la proteína G
Péptidos quimiotácticos (C5a)	
Linfotoxinas	

3.2 Especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son radicales que contienen oxígeno que pueden tener una existencia independiente con uno o más electrones no apareados. Las ROS se forman a partir de la reducción del oxígeno molecular o por oxidación del agua para producir productos como: el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^-) y el oxígeno singulete (1O_2) (45).

Este grupo de moléculas tiene muchas funciones, incluida la actividad antimicrobiana. Su producción puede ser inhibida por los glucocorticoides y sus

efectos reducidos por eliminadores específicos, como la superóxido dismutasa (SOD), el glutatión y el dimetilsulfóxido (43, 45).

En los organismos, las ROS se forman como un subproducto natural de numerosos procesos enzimáticos y biológicos endógenos. A un nivel adecuado, las ROS tienen importantes funciones beneficiosas en la condición fisiológica, ya que inducen la muerte de células efímeras o defectuosas y la destrucción de microorganismos y células cancerosas por macrófagos y linfocitos citotóxicos. Sin embargo, un exceso de ROS puede causar daños al alterar adversamente los lípidos, las proteínas y el DNA, lo que conducirá a la pérdida de la actividad de la enzima y a la mutagénesis y la carcinogénesis. Cuando el sistema antioxidante no desintoxica los productos intermedios reactivos o repara el daño resultante, se induce el estrés oxidativo (Tabla 2) (45).

Tabla 2. Principales especies reactivas de oxígeno producidas por el estallido respiratorio de neutrófilos.

ROS
O_2^-
H_2O_2
OH^-
1O_2

3.3 Medición de las ROS en células

La medición de la generación de ROS se realiza con mayor frecuencia en células intactas. Rutinariamente se utilizan tres metodologías distintas para ello: 1) medición de microbiopelícula dentales con luminómetro, espectrofotómetro o fluorómetro, 2) evaluación por citometría de flujo y 3) observación directa por microscopía. El uso de la citometría de flujo para el análisis es posible con varias sondas fluorescentes y proporciona cierto grado de información cuantitativa sobre las ROS intracelulares solamente (46).

Dependiendo de la distribución de la sonda seleccionada, este método puede o no proporcionar información específica sobre la generación endosomal de ROS, ya que muchas de las sondas son permeables a la membrana y son libremente difusibles en la célula (46).

3.4 Sondas fluorescentes

Las sondas fluorescentes pueden ser sensores de las ROS muy sofisticados basados en resolución espacial y alta sensibilidad. Las propiedades de difusión y la especificidad de cada sonda fluorescente varían significativamente (46).

Una propiedad común de muchas de las sondas actualmente en uso es que son estables (y no fluorescentes) en su forma reducida, pero están sujetas a oxidación por una o más de las ROS, lo que resulta en un cambio en el patrón de enlace lo que promueve la fluorescencia. Muchas sondas son sensibles al pH (particularmente DCFH y OxyBURST), de modo que la fluorescencia disminuye con la acidificación del endosoma.

Los dos subgrupos más comúnmente empleados de sondas fluorescentes (colorantes a base de fluoresceína y rodamina) no reaccionan directamente ni con el anión superóxido ni con el peróxido de hidrógeno (47). Una mayor comprensión de las limitaciones de esta química redox ha llevado al desarrollo más reciente de nuevas tecnologías que incluyen sensores de moléculas pequeñas y sondas redox basadas en proteínas. Estas tecnologías emergentes permiten no solo una mayor especificidad y localización de moléculas de señalización de las ROS específicas, sino también un potencial mucho mayor para estudiar células vivas a medida que reaccionan a estímulos específicos (47).

3.5 Dihidroetidio (DHE)

El dihidroetidio también llamado hidroetidina es permeable a las células y sirve como sondas fluorescentes específica para la detección del radical superóxido (Figura 19).

Hasta hace poco, la suposición en el uso de esta sonda era que se generaba etidio (E^+) en la reacción entre el dihidroetidio y el radical superóxido. El etidio, posteriormente, se unía al DNA generando una fluorescencia de color rojo. Sin embargo, se ha demostrado que el producto de reacción fluorescente del DHE y el superóxido es 2-hidroietidio ($2-OH-E^+$; cuya excitación es a los 520 nm y emisión a los 567nm). La concentración de DHE varía de 2 a 5 μM (stock a 10mM) para ensayos *in vitro* (46).

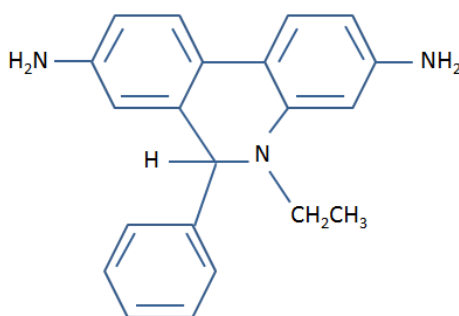


Figura 19. Estructura química del dihidroetidio. Fuente directa.

II Planteamiento del problema

El uso de aparatología ortodóncica conlleva dificultad para mantener una higiene oral adecuada por lo que muchos de los pacientes que están en un tratamiento de ortodoncia desarrollan gingivitis por la acumulación de biopelícula dental. En la actualidad existen tratamientos de ortodoncia con brackets de autoligado que permiten una mejor higiene oral de los pacientes que por ende desarrolla una inflamación menor. La gingivitis es una inflamación de la encía que puede evolucionar a periodontitis y es regulada en gran medida por los neutrófilos de la cavidad oral que llegan al surco gingival. Una de las funciones del sistema inmunológico en la cavidad oral es mantener el equilibrio de la cantidad de microorganismos presentes. A la fecha, no se conoce el papel de los neutrófilos en la cavidad oral de pacientes con diversos tipos de aparatología de ortodoncia. En esta tesis estudiamos una de las funciones de los neutrófilos para conocer los cambios en la formación de especies reactivas de oxígeno cuando se usan brackets de convencionales y de autoligado.

III Justificación del estudio

Los tratamientos de ortodoncia son largos pueden durar de meses y hasta años. La mayor parte de los pacientes con aparatología ortodóncica desarrollan gingivitis ya que se crean áreas de retención que predisponen a la mayor acumulación de biopelícula dental supragingival y subgingival. Esta biopelícula altera las condiciones normales del medio oral cambiando la composición de la flora bacteriana. El conocer la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de los neutrófilos nos permitirá entender mejor el proceso inflamatorio los pacientes en condiciones ortodóncicas de ligado convencional y de autoligado. Asimismo, nos permitirá entender un poco mejor el mecanismo de resolución de la inflamación en pacientes con aparatología ortodóncica.

IV Hipótesis

Los neutrófilos orales de individuos con aparatología ortodóncica de ligado convencional presentan mayor producción de especies reactivas de oxígeno que los neutrófilos orales de individuos con aparatología ortodóncica de autoligado.

A) Hipótesis alterna:

Los neutrófilos orales de individuos con aparatología ortodóncica de ligado convencional presentan menor producción de especies reactivas de oxígeno que los neutrófilos orales de individuos con aparatología de autoligado.

V Objetivos

Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno en neutrófilos orales de individuos sin aparatología ortodóncica, con aparatología ortodóncica convencional y en individuos con aparatología ortodóncica de autoligado.

A) Objetivos específicos:

- Purificar neutrófilos orales a partir de enjuagues orales de voluntarios sin aparatología, con aparatología ortodóncica de ligado convencional y con aparatología de autoligado.
- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno de los neutrófilos provenientes de voluntarios sin aparatología, con aparatología ortodóncica de ligado convencional y con aparatología de autoligado. Los neutrófilos sanguíneos se usaron como control.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A) Grupos de estudio

El estudio comprendió cuatro grupos de cuatro donadores voluntarios de neutrófilos. Un grupo de donadores voluntarios de neutrófilos sanguíneos y tres grupos de donadores voluntarios de enjuagues orales: sin aparatología, con aparatología ortodóncica de ligado convencional y con aparatología de autoligado. Los neutrófilos sanguíneos fueron purificados y donados por el laboratorio del Dr. Carlos Rosales del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Todos los voluntarios de enjuagues orales firmaron un consentimiento informado (anexo 1). Los voluntarios con aparatología de ortodoncia fueron seleccionados por el Dr. Francisco Marichi de la Clínica de Ortodoncia para que cumplieran con los criterios de inclusión del estudio. De cada voluntario se llenó una ficha clínica (anexo 2).

I Criterios de inclusión para voluntarios sin aparatología.

1. Voluntarios que no presenten enfermedades sistémicas.
2. Voluntarios que firmen el consentimiento informado (anexo 1) y la ficha clínica (anexo 2).

II Criterios de inclusión para voluntarios con aparatología.

1. Voluntarios que cuenten con un expediente en la Clínica de Ortodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación.
2. Voluntarios que no presenten enfermedades sistémicas.
3. Voluntarios con brackets metálicos slot 0.022" de ligado convencional.
4. Voluntarios con brackets metálicos slot 0.022" de autoligado.
5. Voluntarios que firmen el consentimiento informado y la ficha clínica.

III Criterios de Exclusión.

1. Voluntarios que presenten caries.
2. Voluntarios con gingivitis o enfermedad periodontal.
3. Voluntarios con alguna enfermedad sistémica.
4. Voluntarios que estén bajo tratamiento médico.
5. Voluntarios que presenten alguna entidad patológica oral.
6. Voluntarios que presenten la aparatología fija solamente en una arcada.

IV Criterios de eliminación.

1. Voluntarios que no consientan su participación en el estudio.

B) Metodología

I Obtención y purificación de neutrófilos sanguíneos

Los neutrófilos sanguíneos fueron donados por el laboratorio del Dr. Carlos Rosales del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El método que usaron para obtener los neutrófilos fue el siguiente. Después de limpiar la zona de punción venosa con una torunda con alcohol al 70%, 10 mL de sangre se tomaron por punción venosa con una jeringa nueva y estéril. La sangre se colocó en un tubo de centrifuga de 15 mL con 0.25 mL de heparina (1000 U/mL) y 2 mL de una disolución de Dextran T500 6% en PBS. La sangre se mezcló con el contenido del tubo por inversión y se dejó reposar 45 min. Pasado este tiempo, se tomó el suero rico en plaquetas 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. El plasma con ficoll se centrifugó a 516 g a 4°C por 20 minutos e inmediatamente, el sobrenadante se eliminó por succión al vacío y la pastilla celular se resuspendió 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, el sobrenadante se eliminó por succión al vacío y la pastilla celular se resuspendió en 10 mL de PBS frío.

II Obtención y purificación de neutrófilos orales.

Los neutrófilos orales se obtuvieron a partir de enjuagues orales de 3 grupos de personas: voluntarios sin aparatología fija, voluntarios con brackets de autoligado y voluntarios con brackets de ligado convencional. Para la obtención de neutrófilos de la cavidad oral, el voluntario realizó cuatro enjuagues consecutivos, un mes antes de que se le modificaran arcos, ligas, ligaduras o cualquier cambio en cuanto a movimientos o materiales se refiera, para evitar sesgos de información. Los enjuagues se realizaron con 10 mL de una disolución de NaCl 0.9% durante 30 segundos cada uno, con intervalos de 3 minutos entre enjuagues. Se obtuvieron 40 mL totales. Cada enjuague se depositó en un tubo de centrifuga de 50 mL. Cada enjuague oral se filtró por la coladera de 100 µm. Posteriormente, se filtró por la coladera de 40 µm y por último por el filtro de 11 µm. Este último paso requiere de un porta-filtro. Una vez que la muestra ha pasado por todos los filtros, se centrifugó a 1400 rpm, durante seis minutos a cuatro grados Celsius. El sobrenadante se eliminó por succión al vacío, se disgregó el pellet celular y se resuspendió en 1 mL de PBS.

III Tinción de células de cavidad oral con Wright-Giemsa.

50 μ l de la muestra filtrada se tomaron con una micropipeta y se colocaron en un portaobjetos, posteriormente se adicionaron 100 μ l de tinción Wright-Giemsa sobre la muestra y el portaobjetos se incubó a temperatura ambiente durante seis minutos. Se añadieron 200 μ l de PBS sobre la tinción y se incubó por doce minutos. El portaobjetos se enjuagó con agua bidestilada y se colocó el cubreobjetos para después observar la muestra en el microscopio. Se tomaron fotografías con los objetivos de 4, 10 y 40 X.

IV Conteo de neutrófilos orales con cámara de Neubauer.

Se tomaron volúmenes iguales de neutrófilos y de azul tripano. Se tomaron 10 μ L y se colocaron sobre cada región de la cámara de Neubauer para proceder a contar los cuatro cuadrantes y conocer el número total de neutrófilos por mL.

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

V Detección de especies reactivas de oxígeno.

1 x 10⁶ neutrófilos se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 4000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415 C) durante 1 min. Posteriormente, se retiró el PBS por succión al vacío, se disgregó el botón celular y se resuspendió en 100 μ L del colorante Dihidroetidio (15 μ M) disuelto en PBS. La muestra se incubó durante 30 min a 37 °C en oscuridad.

Posteriormente, se añadió 1mL de PBS al tubo y se centrifugó a 4000 rpm en microcentrífuga durante 1 min, se retiró el sobrenadante por succión al vacío, se disgregó el botón celular y se resuspendió en 500 μ L de PBS.

En una biopelícula dental de cultivo de 48 pozos se colocaron 250 μ L de la suspensión celular por pozo y se incubaron por 20 min a 37 °C y 5% CO₂. Pasado este tiempo, a la mitad de los pozos se adicionaron 50 μ L de una disolución de PMA (120 nM) disuelto en PBS y a la otra mitad sólo PBS. La biopelícula dental se incubó durante una hora a 37°C y 5% de CO₂.

Los neutrófilos de la biopelícula dental se fijaron con 300 μ L de paraformaldehído al 2% y se observaron al microscopio de fluorescencia usando el filtro rojo (UV/Vis.: λ_{max} : 224, 271, 354 nm). Se tomaron fotografías de cada condición para evaluar la formación de ROS

VI Cuantificación de especies reactivas de oxígeno

Las expresión de ROS en las fotografías fue cuantificada mediante el programa de procesamiento de imagen digital Image J (NIH, USA) y se pueden desarrollar aditamentos de escaneo personalizado, análisis y procesamiento. Para el punto de

interés de este trabajo se midió la intensidad promedio de la fluorescencia de los neutrófilos. Primeramente se calibró la imagen de fluorescencia a 8 bits, después para generar un contraste entre la fluorescencia de los neutrófilos y todo el resto de la imagen se generó una máscara de filtrado duplicando la imagen, consiguiendo una imagen gris con intervalos mínimo y máximo, después con el objetivo de conocer la intensidad total, aplicamos los comandos Analyse/ Set Measurements y seleccionamos las opciones Área, Min & max gray value, Integrated density, Mean gray value y presionamos la opción OK, finalmente seleccionamos toda la imagen con el cursor y aplicamos el comando Analyse/Measure y en seguida aparecen los resultados de intensidad media y área mínima y máxima, estos datos se recopilaron en una tabla de Excel y se calculó el promedio, la desviación estándar y el error para poder graficar los resultados.

VII Método estadístico

Las comparaciones entre los grupos se realizaron usando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba posthoc de Tukey, empleando el programa KaleidaGraph (versión 4.5.4).

VII RESULTADOS

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

Nuestro primer objetivo fue el de purificar neutrófilos de cavidad oral de pacientes sin y con aparatología de ortodoncia fija con brackets de ligado convencional o autoligado. Para ello se pidió a los voluntarios que hicieran enjuagues con solución salina. Asimismo, los neutrófilos sanguíneos de voluntarios se usaron como controles en todos los experimentos.

La metodología utilizada nos permitió obtener y purificar células de los enjuagues orales. Para poder observar su morfología, las células se tiñeron con la tinción de Wright - Giemsa. Las células purificadas tanto de sangre como de cavidad oral son neutrófilos pues presentan un núcleo multilobulado. (Figura 20).

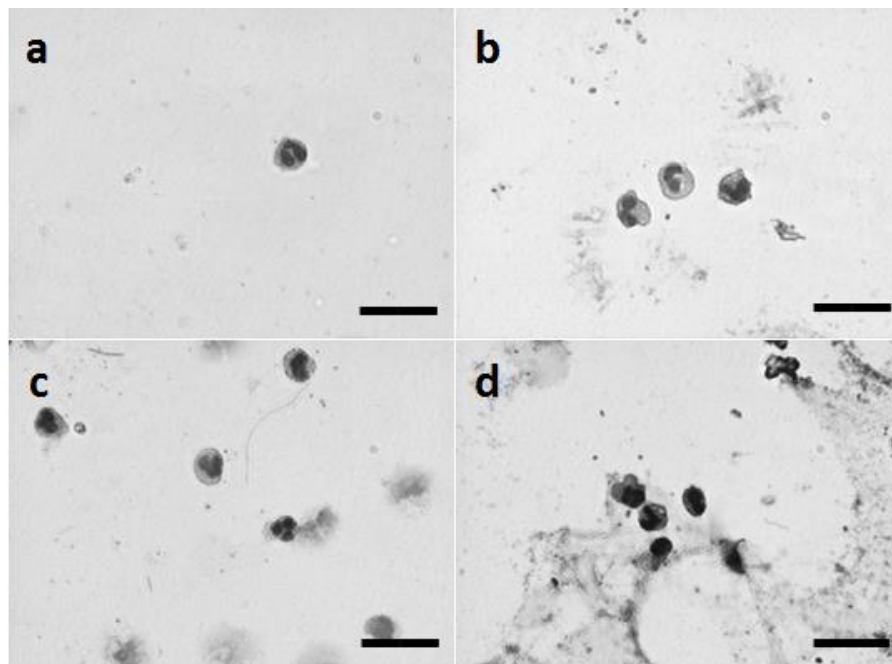


Figura 20. **Neutrófilos orales teñidos de Wright – Giemsa.** Fotografías representativas de: a) neutrófilos sanguíneos teñidos con Wright – Giemsa. b) neutrófilos orales de voluntarios sin aparatología ortodóncica c) neutrófilos orales de voluntarios con brackets de autoligado y d) neutrófilos orales de voluntarios con brackets de ligado convencional. Escala 25 µm.

Los neutrófilos de sangre producen especies reactivas de oxígeno (ROS) al exponerlos a PMA.

Con el propósito de determinar la formación de especies reactivas de oxígeno en neutrófilos de sangre, los neutrófilos se incubaron con PMA, un activador de la vía de formación de estas especies reactivas de oxígeno. Esta activación 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 ROS. Los neutrófilos sin estímulo no presentan producción de ROS. (Figura 21).

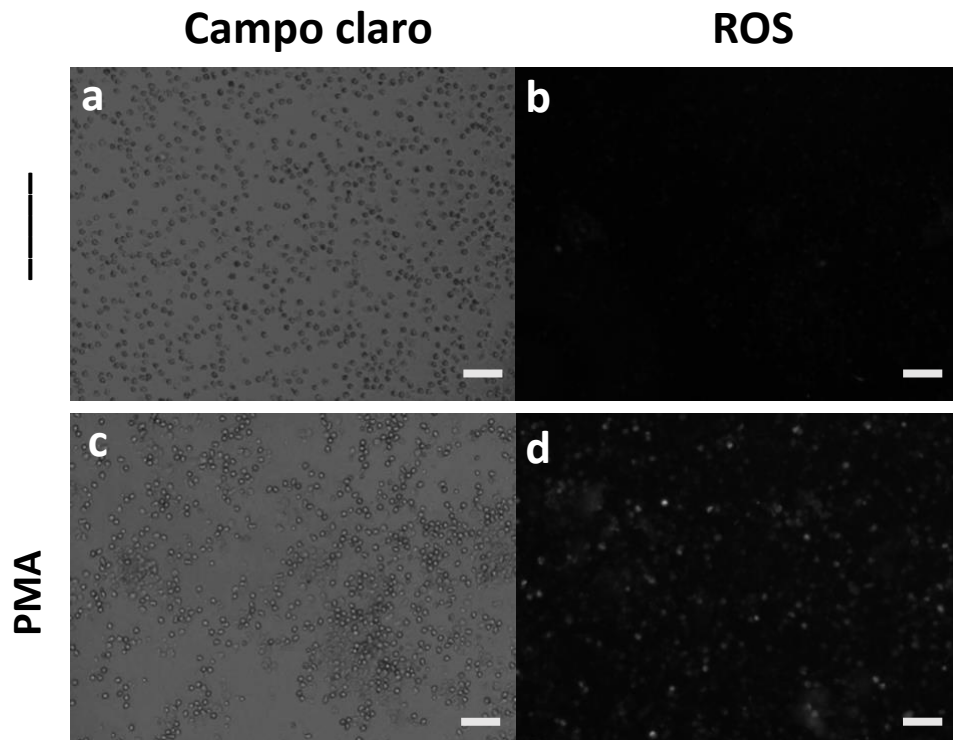


Figura 21. **ROS de neutrófilos sanguíneos.** Fotografías representativas de: Neutrófilos sin estímulo a) en campo claro b) producción de ROS (incubadas con dihidroetidio) y neutrófilos estimulados con PMA sin estímulo c) en campo claro d) producción de ROS (incubadas con dihidroetidio). Los puntos blancos indican la fluorescencia producida de la oxidación del dihidroetidio por el anión superóxido en los neutrófilos. Escala 50 μm .

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

Con el propósito de determinar la formación de ROS 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 ROS (Figura 22).

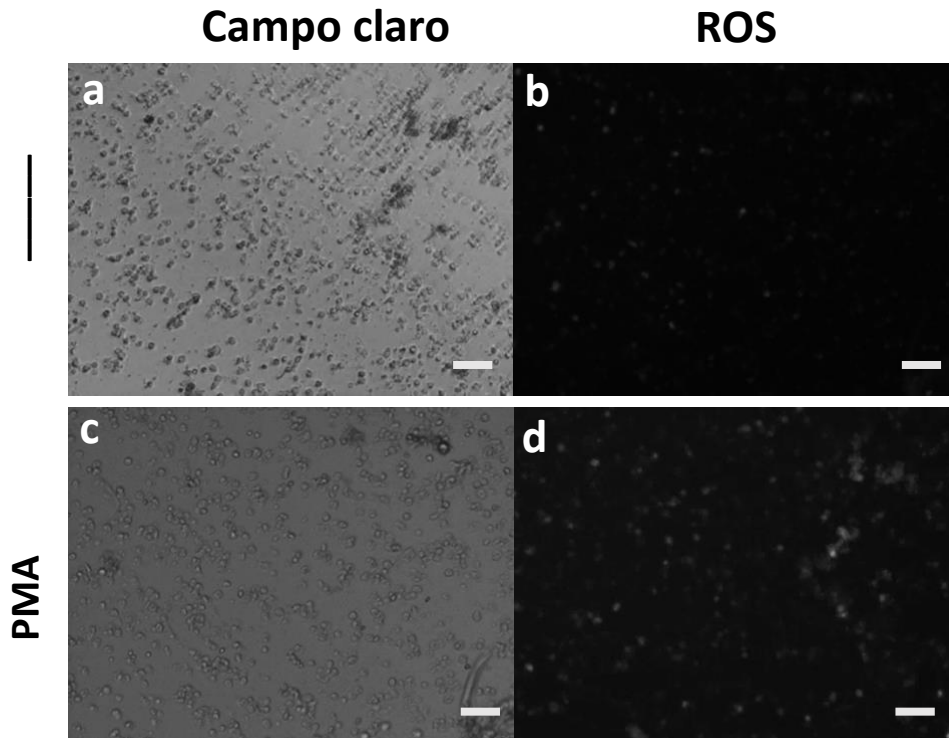


Figura 22. ROS de neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores sin aparatología de ortodoncia. Fotografías representativas de: Neutrófilos sin estímulo a) en campo claro b) producción de ROS (incubadas con dihiroetidio) y neutrófilos estimulados con PMA sin estímulo c) en campo claro d) producción de ROS (incubadas con dihiroetidio). Los puntos blancos indican la fluorescencia producida de la oxidación del dihiroetidio por el anión superóxido en los neutrófilos. Escala 50 μ m.

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

Con el propósito de determinar la formación de ROS 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 ROS (Figura 23).

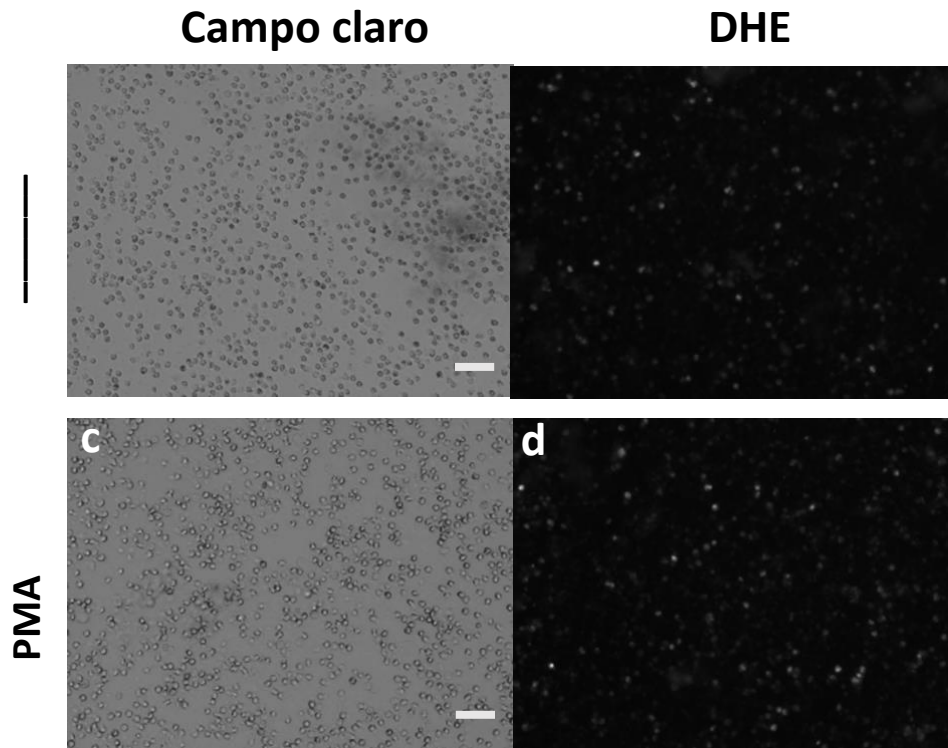


Figura 23. ROS de neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de ligado convencional. Fotografías representativas de: Neutrófilos sin estímulo a) en campo claro b) producción de ROS (incubadas con dihidroetidio) y neutrófilos estimulados con PMA sin estímulo c) en campo claro d) producción de ROS (incubadas con dihidroetidio). Los puntos blancos indican la fluorescencia producida de la oxidación del dihidroetidio por el anión superóxido en los neutrófilos. Escala 50 μm .

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

Con el propósito de determinar la formación de ROS 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 ROS (Figura 24).

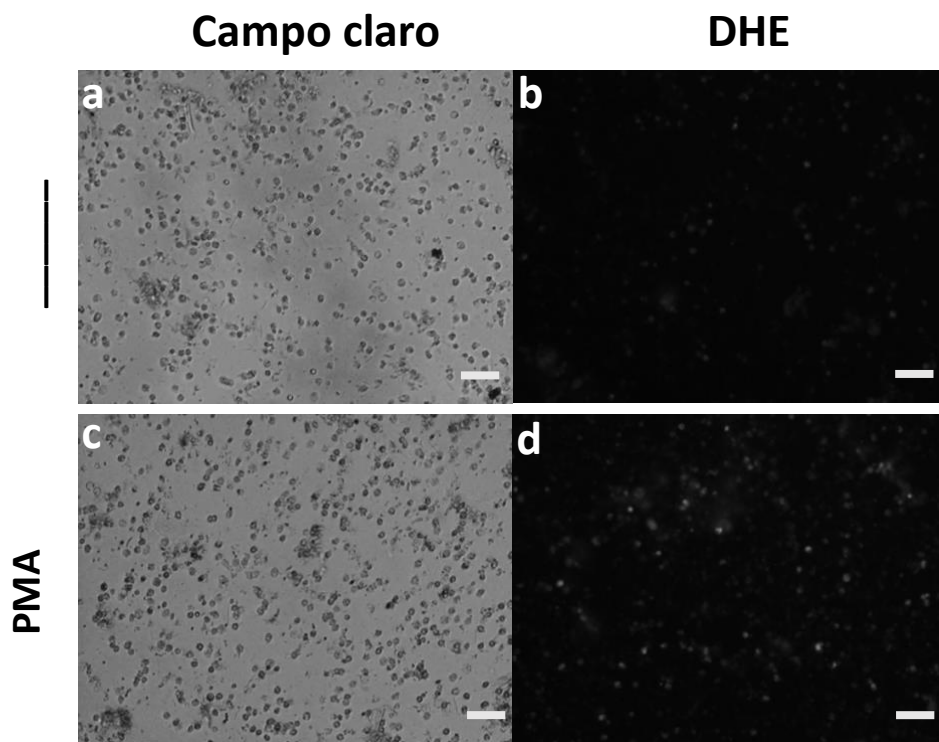


Figura 24. ROS de neutrófilos orales derivados de enjuagues de donadores con aparatología de autoligado. Fotografías representativas de: Neutrófilos sin estímulo a) en campo claro b) producción de ROS (incubadas con dihidroetidio) y neutrófilos estimulados con PMA sin estímulo c) en campo claro d) producción de ROS (incubadas con dihidroetidio). Los puntos blancos indican la fluorescencia producida de la oxidación del dihidroetidio por el anión superóxido en los neutrófilos. Escala 50 μ m.

Los neutrófilos de cavidad oral de voluntarios con aparatología de ligado convencional producen más ROS al ser expuestos a PMA, que cualquier otro grupo de neutrófilos.

En los cuatro grupos de neutrófilos aquellos expuestos con PMA fueron los que tuvieron produjeron mayor cantidad de ROS. Sin embargo, la activación con PMA de neutrófilos de ligado convencional fue la que más especies reactivas de oxígeno produjo ($p < .0001$). Los neutrófilos de sangre tuvieron son los que menos producción de especies reactivas produjeron. Los neutrófilos activados con PMA tanto de cavidad oral sin aparatología como los que estuvieron expuestos a aparatología de autoligado mostraron una producción de ROS muy similar. (Figura 25).

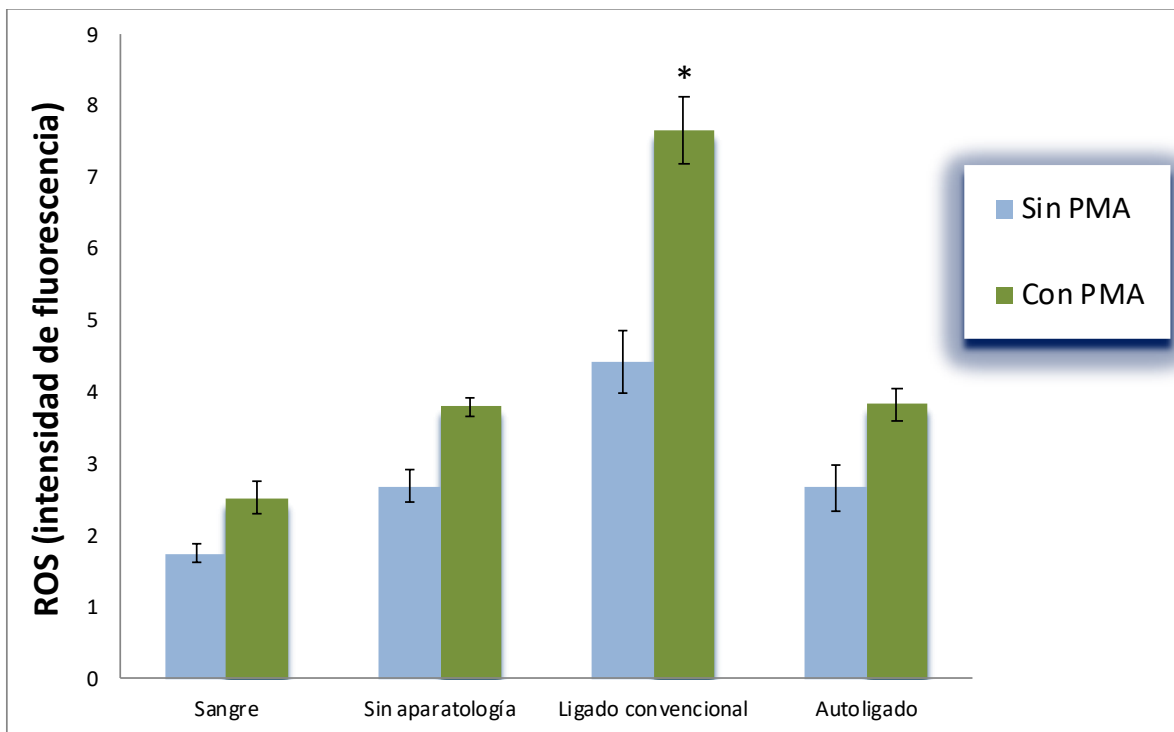


Figura 25. Formación de ROS por neutrófilos sanguíneos y orales. Las barras representan el promedio \pm ES de la cantidad de fluorescencia emitida por grupo sin estímulo y con PMA de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

VIII DISCUSIÓN

Es bien sabido que la ortodoncia cumple la función de ofrecer un diagnóstico prevenir alteraciones y dar tratamientos a oclusiones anómalas a la ideal. La ortodoncia utiliza para su fin, una serie de aditamentos ajenos al aparato estomatognático, que bien se pueden clasificar en aparatos fijos y removibles (1). Cuando los aparatos van unidos al diente por medio de cementos, se consideran aparatología fija, estos se colocan sobre el esmalte dental, con la finalidad de generar movimientos de manera directa o indirecta (7).

Estos aditamentos crean nuevas áreas de superficie que retienen microorganismos, detritos celulares, proteínas etc., que pueden derivar en la formación de una biopelícula dental. La biopelícula puede acumularse en el surco gingival, y entrar en contacto con el sistema inmunológico innato (5, 7, 21). Los neutrófilos, que son las primeras células en hacerle frente a la biopelícula y desencadenan una serie de eventos celulares y moleculares orientados a eliminar al agresor como por ejemplo la formación de NET, la fagocitosis, la degranulación y la formación de ROS (48, 49).

El estudio de Maija Raeste sobre la migración de leucocitos orales (50), utilizó una serie de 12 enjuagues orales para cuantificar los neutrófilos orales, y este enfoque proporcionó información sobre la gravedad de la inflamación periodontal (32). Según estos hallazgos, suponemos que la caracterización de la cantidad de neutrófilos orales en pacientes con ortodoncia fija podría ser útil para evaluar la carga inflamatoria oral y el estado de salud periodontal en pacientes con dos tipos de aparatología ortodóncica, de la misma manera que los médicos utilizan un recuento de neutrófilos circulantes para ayudar a detectar pacientes con infección en sitios no orales dentro del cuerpo.

Actualmente no existen estudios relacionados con la participación de los neutrófilos en la resolución de la inflamación causada por el uso de aparatología ortodóncica y de qué funciones microbicidas usan los neutrófilos orales en personas con aparatología ortodóncica. En esta tesis estudiamos el papel de la producción de ROS de neutrófilos provenientes del torrente sanguíneo, de cavidad oral sin aparatología y de cavidad oral con aparatología de ligado convencional y de autoligado. Nuestros resultados muestran que los neutrófilos de los voluntarios que utilizan brackets de ligado convencional producen la mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno. Esto puede deberse a una mayor actividad de los neutrófilos que actúan en presencia de aumento en la biopelícula dental. Sería importante hacer seguimiento de los pacientes a lo largo de su tratamiento de ortodoncia haciendo controles personales de placa cada que se tome un enjuague y una vez que la fuerza de ortodoncia haya se haya ejercido. Esto, para conocer si la biopelícula dental está afectando la producción de ROS. Además, se podría buscar

que tipo de bacterias se favorecen con el uso de brackets de ligado convencional o de autoligado.

Observamos que los neutrófilos de voluntarios con brackets de ligado convencional y sin brackets producen una cantidad basal de ROS que no se observa en los neutrófilos de sangre. Este hecho es muy interesante, pues nos muestra que los neutrófilos, una vez que se encuentran en la cavidad oral pueden pasar a un estado preactivo.

Hay muchas publicaciones que demuestran que en pacientes con brackets de ligado convencional se genera una mayor cantidad de biopelícula dental, en comparación con pacientes de autoligado, es decir, existe una mayor población de bacterias patógenas en brackets de ligado elastomérico debido a la presencia de superficies mayormente retentivas, lo que indica que la actividad de los neutrófilos aumenta debido a la acumulación de biopelícula dental presente en los brackets de ligado elastomérico (2, 3, 5, 7). Sin embargo, nosotros no realizamos un control personal de biopelícula dental en estos pacientes por lo que no podemos atribuir completamente que el aumento de la actividad de ROS se haya debido al aumento en la acumulación de biopelícula, esto sigue siendo una posibilidad.

IX CONCLUSIONES

Los neutrófilos orales se pueden aislar de enjuagues orales mediante técnicas de filtrado secuencial y centrifugación.

Tanto los neutrófilos sanguíneos como los de cavidad oral al ser estimulados con PMA producen ROS.

Los neutrófilos orales producen mayor cantidad de ROS que los neutrófilos sanguíneos en condiciones basales.

Los neutrófilos orales de voluntarios con brackets de autoligado, producen una cantidad similar de ROS que los neutrófilos orales de voluntarios sin aparatología.

Los neutrófilos de los voluntarios que utilizan brackets de ligado convencional, producen mayor cantidad de ROS que aquellos neutrófilos de voluntarios con brackets de autoligado. Esto puede deberse a una mayor actividad de los neutrófilos que actúan en presencia de aumento en la biopelícula dental.

X Referencias bibliográficas:

1. Bravo Gonzalez LA. Manual de Ortodoncia. Málaga, España: Síntesis editorial.; 2003.
2. Anand M, Turpin DL, Jumani KS, Spiekerman CF, Huang GJ. Retrospective investigation of the effects and efficiency of self-ligating and conventional brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015;148(1):67-75.
3. Garcez AS, Suzuki SS, Ribeiro MS, Mada EY, Freitas AZ, Suzuki H. Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets: a microbiologic and optical coherence tomography analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(4):e193-8.
4. Kim DY, Lim BS, Baek SH. Frictional property comparisons of conventional and self-ligating lingual brackets according to tooth displacement during initial leveling and alignment: an in vitro mechanical study. *Korean J Orthod.* 2016;46(2):87-95.
5. Pellegrini P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell DA, Maier T, et al. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135(4):426.e1-9; discussion -7.
6. Turpin DL. In-vivo studies offer best measure of self-ligation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136(2):141-2.
7. Cerroni S, Pasquantonio G, Condò R, Cerroni L. Aparato fijo de ortodoncia y estado periodontal: una revisión sistemática actualizada. *Open Dent J.* 2018;12:614-22.
8. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol.* 2018;200(4):525-40.
9. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;100(1):35-7.
10. El J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol (Praha).* 2015;60(1):69-80.
11. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
12. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *Plos Biol.* 2016;14(8):e1002533.
13. Xu X, He J, Xue J, Wang Y, Li K, Zhang K, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol.* 2015;17(3):699-710.
14. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Sci Rep.* 2016;6:22164.
15. Lif Holgerson P, Öhman C, Rönnlund A, Johansson I. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. *Plos One.* 2015;10(5):e0128534.
16. Heller D, Helmerhorst EJ, Gower AC, Siqueira WL, Paster BJ, Oppenheim FG. Microbial Diversity in the Early In Vivo-Formed Dental Biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(6):1881-8.
17. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* 2017;23(3):276-86.
18. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. *Plos One.* 2015;10(9):e0137717.

19. Yamanaka W, Takeshita T, Shibata Y, Matsuo K, Eshima N, Yokoyama T, et al. Compositional stability of a salivary bacterial population against supragingival microbiota shift following periodontal therapy. *Plos One*. 2012;7(8):e42806.
20. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol*. 2012;39(5):425-33.
21. Cortés-Vieyra R, Rosales C, Uribe-Querol E. Neutrophil Functions in Periodontal Homeostasis. *J Immunol Res*. 2016;2016:1396106.
22. Jongsma MA, Pelsers FD, van der Mei HC, Atema-Smit J, van de Belt-Gritter B, Busscher HJ, et al. Biofilm formation on stainless steel and gold wires for bonded retainers in vitro and in vivo and their susceptibility to oral antimicrobials. *Clin Oral Investig*. 2013;17(4):1209-18.
23. Kim K, Jung WS, Cho S, Ahn SJ. Changes in salivary periodontal pathogens after orthodontic treatment: An in vivo prospective study. *Angle Orthod*. 2016;86(6):998-1003.
24. Kim SH, Choi DS, Jang I, Cha BK, Jost-Brinkmann PG, Song JS. Microbiologic changes in subgingival plaque before and during the early period of orthodontic treatment. *Angle Orthod*. 2012;82(2):254-60.
25. Antonio CJJ. Principales determinantes ecológicos fisicoquímicos orales 2011; 8:[16-7 pp.].
26. Romero HM HY. Modificaciones del pH y flujo salival con el uso de aparatología funcional tipo bimler 2009.
27. C. Á. Adhesión bacteriana a biomateriales 2005.
28. Sawhney R, Sharma R, Sharma K. Microbial Colonization on Elastomeric Ligatures during Orthodontic Therapeutics: An Overview. *Turk J Orthod*. 2018;31(1):21-5.
29. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:92.
30. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012;336(6086):1268-73.
31. Rijkschroeff P, Loos BG, Nicu EA. Oral Polymorphonuclear Neutrophil Contributes to Oral Health. *Curr Oral Health Rep*. 2018;5(4):211-20.
32. Landzberg M, Doering H, Aboodi GM, Tenenbaum HC, Glogauer M. Quantifying oral inflammatory load: oral neutrophil counts in periodontal health and disease. *J Periodontal Res*. 2015;50(3):330-6.
33. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181-218.
34. Rosales C. Fcy Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Front Immunol*. 2017;8:280.
35. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make nets. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(8):577-82.
36. 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.
37. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *Plos Pathog*. 2009;5(10):e1000639.
38. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009;16(11):1438-44.
39. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(1):52-6.
40. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223.

41. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92(9):3007-17.
42. Heckmann BL, Green DR. LC3-associated phagocytosis at a glance. *J Cell Sci*. 2019;132(5).
43. María CA. Estallido respiratorio de los fagocitos 2005.
44. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:765-92.
45. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*. 2004;52:794-804.
46. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(7):995-1022.
47. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):1-6.
48. Rosales C, Demarex N, Lowell CA, Uribe-Querol E. Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol Res*. 2016;2016:1469780.
49. Uribe-Querol E, Rosales C. Participación del sistema inmunológico en el ecosistema oral. In: Flores AA, Olea JGV, editors. Ciudad de México, México.: El Manual Moderno S.A. de C.V.; 2018. P. 117-33.
50. Raeste AM, Aura A. Rate of migration of oral leukocytes in patients with periodontitis. *Scand J Dent Res*. 1978;86(1):43-51.

Anexo 1: Consentimiento informado para donación de enjuagues orales

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

Anexo 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: _____
