



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

**Caracterización de Células Dendríticas de Mucosa
Gingival en Individuos con Enfermedad Periodontal**

T E S I S

que presenta

Q.F.B. Erik René Lizárraga Verdugo

como requisito para obtener el grado de

**Maestría en Ciencias con Orientación en
Biotecnología de Salud**

Directores de tesis

Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina

Dr. José Leopoldo Flores Romo

La presente investigación titulada *Caracterización de Células Dendríticas de Mucosa Gingival en Individuos con Enfermedad Periodontal e Individuos Sanos*, se llevó a cabo en los laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Fungieron como directores de tesis la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina (FCQB UAS) y el Dr. José Leopoldo Flores Romo (CINVESTAV IPN, México) y como asesores los Dres. Rosalío Ramos Payán y José Geovanni Romero Quintana (FCQB UAS).

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina y el Dr. José Leopoldo Flores Romo por haberme formado como maestro, guiándome por el buen camino de la investigación.

A los Dres. Rosalío Ramos Payán y José Geovanni Romero Quintana por la asesoría, enseñanzas y consejos que me han brindado a lo largo de mi formación.

Al equipo de estudiantes y auxiliares del Laboratorio de Inmunología en el CINVESTAV Zacatenco, Ciudad de México, especialmente a la Maestra Juana Calderón por haberme auxiliado con tanta paciencia.

A mis compañeros y amigos y familia académica de los Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la FCQB. Geraldine, Mariana, Nayeli, Raquel, Aida, Selene, Fernando, Carlos, Germán, Ruy, Emilo, Nora y Marimar. Especialmente por haber tolerado mis regaños y disparates a lo largo de todo este tiempo.

Un agradecimiento especial a los Dres. Erika Silva, Eduardo Soto, Alfredo Ayala por habernos brindado tiempo, esfuerzo, dedicación y sobre todo mucha paciencia a lo largo del proyecto, sin ellos esta investigación no se habría logrado.

A mis amigos/hermanos que siempre están cuando los necesito, Erick Gutiérrez, Alejandro López, Manuel León.

A mi familia por apoyarme durante todo el tiempo, por ausencias y por impulsarme siempre hacia adelante sin importa lo que pudiese obstaculizarse. Los Amo.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas por permitirme fortalecer mi formación académica.

Al CONACyT por la beca otorgada para facilitarnos a todos los estudiantes de posgrado a llevar a cabo nuestros objetivos.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	6
III REVISIÓN DE LITERATURA	12
A TEJIDO PERIODONTAL	12
B ENFERMEDADES PERIODONTALES	13
1 Factores de Riesgo	16
2 Prevalencia	16
3 Etiopatogenia	20
1 Periodonto Sano	21
2 Gingivitis	23
3 Periodontitis Crónica	23
C ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES	24
D INMUNOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES	26
1 Inmunidad Innata	28
2 Células y Mediadores de la Inflamación Periodontal	32
a Queratinocitos	33
b Células Epiteliales	33
c Fagocitos	34
d Complemento	35
3 Inmunidad Adaptativa	36

a	Presentación Antigénica y Activación de la Inmunidad Adquirida	37
E	CÉLULAS DENDRÍTICAS	38
1	Células Dendríticas de la Mucosa Oral	40
2	Células Dendríticas en Enfermedad Periodontal	42
F	ANTECEDENTES	42
IV	JUSTIFICACIÓN	44
V	HIPÓTESIS	45
VI	OBJETIVOS	46
A	OBJETIVO GENERAL	46
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	47
A	MATERIALES	47
1	Características del Estudio	47
a	Muestras Biológicas	47
b	Criterios de inclusión	47
c	Criterios de exclusión	47
d	Criterios de eliminación	48
2	Diagnóstico de los sujetos de estudio	48
a	Enfermedad periodontal	48
3	Obtención de las muestras	49
a	Expedientes	49
4	Consideraciones éticas	49
B	METODOLOGÍA	50

1	Preparación de las Muestras	50
2	Procesamiento de las Muestras	50
3	Tinción Hematoxilina y Eosina (H&E)	50
4	Inmunofluorescencia (IF)	51
5	Microscopía	52
6	Análisis Estadístico	52
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
A	HISTOPATOLOGÍA	53
B	MARCAJE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CD1A ⁺	56
C	DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	61
IX	CONCLUSIONES	64
X	PERSPECTIVAS	65
XI	BIBLIOGRAFÍA	66
XII	ANEXOS	79
	A Anexo 1. Cuestionario, consentimiento informado y periodontograma aplicados al sujeto de estudio.	79
	B Anexo 2. Carta de aceptación del protocolo aprobado por el comité de ética.	83
	C Anexo 3. Soluciones para inmunofluorescencia.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1.	Anatomía del periodonto	14
2.	Distribución epidemiológica de las enfermedades periodontales en México	18
3.	Prevalencia de Enfermedades periodontales en México	19
4.	Cambios en la microbiota oral en enfermedad periodontal	22
5.	La respuesta inflamatoria en periodontitis en un proceso muy complejo que involucra tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa..	30
6.	Inmunidad innata y adaptativa del periodonto	31
7.	Esquema del origen de las células dendríticas humanas a partir de sus progenitores linfoides y mieloides	41
8.	Tinción H&E de tejido gingival de sujetos sanos	54
9.	Tinción H&E de tejido gingival de pacientes con periodontitis	55
10.	Micrografías de Células Dendríticas CD1a+	59
11.	Frecuencia de Células CD1a+ por diferentes áreas del tejido gingival.	60
12.	Micrografías de medición de la distancia de ubicación de DCs CD1a+ desde el estrato córneo del tejido gingival	62
13.	Gráfica de la medición de la posición del agrupamiento de las células dendríticas a partir de estrato córneo del tejido.	63

I RESUMEN

El periodonto es un tejido complejo, constituido por tejido epitelial y tejido conectivo suave y mineralizado que dan soporte a la posición del diente e incluyen a la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar.

Las enfermedades periodontales son patologías inflamatorias que afectan la integridad de los tejidos periodontales, las más comunes son la gingivitis y la periodontitis, las cuales son principalmente causados por la microbiota que conforma el "biofilm" subgingival o placa dentobacteriana. Las enfermedades periodontales son de las patologías orales más comunes en el humano y sin un tratamiento adecuado, pueden finalmente llevar a la pérdida de las piezas dentales, lo cual podría, entre otras cosas, afectar la nutrición del individuo.

Las enfermedades periodontales son condiciones multifactoriales, los microorganismos de la placa dental y sus productos microbianos son los principales factores implicados en la iniciación de la reacción inflamatoria que caracteriza esta patología y la progresión hasta la pérdida ósea. La prevalencia y la severidad de la pérdida de inserción incrementan junto con la edad.

En México hasta abril del presente año se han reportado 355,419 casos de enfermedades periodontales, lo que equivale al 30% de la población nacional. El 19% lo comprende el género femenino y 11% el masculino. El primer lugar a nivel nacional es de Distrito Federal con 2.63% de los casos, seguido por el Estado de México, Jalisco y Veracruz. Sinaloa ocupa el quinto lugar a nivel nacional en prevalencia de algún tipo de enfermedad periodontal con 1.45% de los casos. En Sinaloa existen reportados 17,300 casos de enfermedades periodontales en el presente año, afectando a 58% de los habitantes, del cuales 33% son mujeres y el 20% son hombres.

La interacción entre el hospedero y estos microorganismos determina la severidad de la enfermedad. Las enfermedades periodontales son una de las enfermedades inflamatorias más comunes y pueden ser de origen inflamatorio, traumatológico, metabólico o genético.

Los colonizadores iniciales en la superficie de los dientes son principalmente especies no patogénicas Gram positivos, incluyendo a especies de *Streptococcus gordonii*, *S. sanguis* y *S. oralis*. Estos colonizadores iniciales se adhieren al esmalte dental dando lugar a la colonización

sucesiva de microorganismos anaerobios Gram negativos como *Fusobacterium nucleatum* y finalmente patógenos como *Porphyromonas gingivalis*

Las células dendríticas (DCs) desempeñan múltiples funciones, que involucran la presentación de los antígenos. Una de ellas es la activación los linfocitos T mediada por dicha presentación antigénica. Otra de sus funciones no está bien definida pues se ha sugerido que distintas clases de DCs inducen y mantienen la inmunotolerancia.

Es bien conocido que mientras la placa bacteriana lleva a cabo la iniciación y progresión hacia la periodontitis crónica, el daño tisular está mediado principalmente por la respuesta inmunológica que el hospedero desarrolla ante estas bacterias. Las DCs o células de Langerhans están estrechamente relacionadas en la transición de patogénesis de la enfermedad periodontal, asociándose al mismo tiempo a respuestas de protección y de destrucción.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar *in situ* tanto la frecuencia y la distribución de las células dendríticas en individuos sanos y pacientes con enfermedad periodontal.

En el estudio se incluyeron un total de 30 sujetos (15 sujetos sanos y 15 pacientes con enfermedad periodontal). El análisis de frecuencia y distribución se realizó mediante Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Los resultados mostraron que las personas sanas tienen un mayor número de células dendríticas CD1a⁺ (35.03 ± 30.38 células/mm²) en comparación a los pacientes con enfermedad periodontal (23.92 ± 18.74 células/mm²) en tejido epitelial. No obstante, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio ($p = 0.250$). En tejido conectivo, se observó lo contrario, una menor proporción de células en individuos sanos (1.63 ± 1.50 células/mm²) que en pacientes con enfermedad periodontal (1.66 ± 2.20 células/mm²) sin diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.365$). En lo que respecta al tejido total, la frecuencia también fue mayor en personas sanas (12.89 ± 8.78 células/mm²), mientras que en pacientes se encontraron en menor proporción con (9.43 ± 5.99 células/mm²), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.230$).

Las DCs se observaron con tendencias de agrupamiento diferentes entre los grupos de estudio, siendo adyacentes al estrato córneo en personas sanas pero las DCs se encontraron más cercanas

al estrato basal en pacientes con periodontitis. Se observó una distancia media de 61.34 ± 24.85 μm en tejido sano desde el borde del tejido, mientras que en los pacientes la distancia media fue de 124.35 ± 32.56 μm . En éste sentido, se observó una marcada diferencia estadísticamente significativa en estos parámetros ($p = 2.885E^{-06}$)

Se realizó la comparación histológica de tejido gingival de personas sanas y personas con enfermedad periodontal, en las cuales se pueden observar diferencias en el tipo de infiltrado inflamatorio, arreglo de los desmosomas y crestas epiteliales.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las frecuencias de las DCs en personas con enfermedad periodontal presentan disminución por acción del proceso infeccioso; aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, pudiera ser que a nivel biológico existan deficiencias en la funcionalidad de estas células, debido a la tendencia de posicionamiento diferente que mostraron en los dos grupos. Ambas tendencias nos sugieren que el comportamiento de las DCs se ve alterado en la enfermedad periodontal, aunque esto debe ser ampliamente estudiado.

ABSTRACT

Periodontium is a complex tissue, it is constituted by epithelial, and connective smooth and mineralized tissue, which supports the tooth position including the gums, periodontal ligament, cement and alveolar bone.

Periodontal diseases are inflammatory pathologies that affect the periodontal tissues integrity commonly known as gingivitis and periodontitis, and are regularly caused by the subgingival biofilm microbiota. The periodontal diseases are the most common human oral pathologies and without appropriate treatment they could finally lead to tooth loss, which affect the patient's nutrition.

Periodontal diseases are multifactorial condition, where the dental plaque microorganisms and their moieties are the main factors involved in the beginning of the inflammatory reaction, a characteristic of these pathologies and its progression to bone loss. The prevalence and severity of the attachment loss increases with age. Additionally, the interaction between host and microorganisms are related to the severity of the disease

Currently in Mexico, there are 355,419 periodontal diseases cases, this is equivalent to 30% of the national population, 19% female and 11% male. Mexico City takes the first place followed by Mexico State, Jalisco and Veracruz. Sinaloa takes the fifth place with 1.45% prevalence of periodontal diseases, as there are 17,300 case reports to present year, with a 58% of the total state population which 33% are female and 20% are male.

The early tooth surface colonizers are mainly nonpathogenic species, such as facultative Gram positive bacteria, including *Streptococcus gordonii*, *S. sanguis* and *S. oralis*. These early colonizers are attached to enamel, followed by anaerobic Gram negative colonizers like *Fusobacterium nucleatum* and finally pathogenic like *Porphyromonas gingivalis*. In this sense, dendritic cells (DCs) are among the host' defenses to fight these microorganisms.

Dendritic cells (DCs) have many functions which mainly involve antigen presentation. One of them is T lymphocyte activation throughout antigen presentation. It has been suggested that another function of DCs is to induce and maintain immunological tolerance.

It is well known that whilst the bacterial plaque starts and progress towards chronic periodontitis, tissue damage is promoted by host's immunological response against bacteria. Dendritic cells are closely related with the periodontal disease pathological transition, as well as protection and destruction response.

The aim of this investigation was to evaluate the *in situ* frequency and distribution of dendritic cells in healthy subject and periodontal disease patients. To achieve this, a total of 30 human biopsies (15 healthy and 15 patients) was used. Dendritic cell detection was performed by immunofluorescence method using laser scanning confocal microscopy.

Our results showed a higher count of CD1a⁺ dendritic cell in healthy subjects (35.03 ± 30.38 cells/mm²) in comparison of periodontal disease patients (23.92 ± 18.74 cells/mm²). However, non-statistical difference was shown ($p = 0.250$) among groups on epithelial tissue. On the other hand, connective tissue, had lower count of cells in healthy subjects (1.63 ± 1.50 cells/mm²) in comparison to periodontal disease patients (1.66 ± 2.20 cells/mm²), nonetheless, without statistical significance ($p = 0.365$). Moreover, the total tissue frequency was higher in healthy subjects (12.89 ± 8.78 cells/mm²), while patients were in lower proportion (9.43 ± 5.99 cells/mm²) without statistical significance ($p = 0.230$).

Dendritic cells tend to crowd together differently among studied groups, adjacent to stratum corneum in healthy subjects or closer to basal stratus in patients. A mean distance of 61.34 ± 24.85 μ m from the edge of the healthy tissue was observed, while in the tissue of the patients the mean distance was 124.35 ± 32.56 μ m. In these matter there was statistical difference on this parameter ($p = 2.885E^{-06}$).

In addition, a histological comparison of gingival tissue was performed among healthy subjects and periodontal disease patients, in which differences were observed on the infiltrate type, desmosome arrangement and epithelial crests.

In conclusion the dendritic cell frequency on periodontal disease patients is lower because the infectious process, in a biological level the cell functionality could be deficient, this could be related to the arrangement tendency of the dendritic cells. Bough tendencies suggest a modification of the DCs behavior in the periodontal disease, tough this is yet to be studied.

II INTRODUCCIÓN

El periodonto es el órgano que se encarga de dar estructura y soporte al diente, es un conjunto de tejidos especializados que principalmente comprende tejido epitelial y tejido conectivo suave y mineralizado que mantienen la integridad y composición de la dentadura, mismas que pueden ser comprometidas severamente por traumas o patologías que amenazan la funcionalidad o destruyen al tejido. La encía pertenece tanto a la membrana de la mucosa oral como al periodonto, es una combinación de tejido epitelial y conectivo que se comporta como un sujetador de los dientes; de esta forma confiere un soporte permanente para los dientes y el hueso alveolar. El ligamento periodontal es tejido conectivo suave que se encuentra interpuesto entre la raíz de los dientes y la pared interna del socket alveolar. Sus fibras conforman una pasta que se entrama entre el cemento y el hueso, de esta manera es sujetado firmemente con la ayuda de las fibras de Sharpey. El cemento es tejido conectivo mineralizado no uniforme que abriga las raíces de los dientes y sirve como el principal mecanismo de soporte de éstos con las fibras de los ligamentos periodontales. El hueso alveolar es la fracción especializada de los huesos mandibulares y maxilares que conforman la estructura del soporte del diente. Comparándolo con otro tejido de cualquier parte del cuerpo, el hueso alveolar está sujeto a un rápido y continuo remodelamiento debido a la erupción dental. Existen patologías que pueden afectar la integridad de estos tejidos, como el Síndrome de Papillon-Lefèvre, Chediak-Higashi, Síndrome de Down, condiciones metabólicas como la Diabetes Mellitus e incluso condiciones temporales como el embarazo. Las enfermedades que afectan directamente la integridad del periodonto se denominan enfermedades periodontales.

Las enfermedades periodontales son desórdenes inflamatorios que se caracterizan por inflamación local o crónica con destrucción del tejido gingival, reabsorción ósea y pérdida del diente. Estas características son causadas por factores bacterianos y sus metabolitos, los cuales estimulan las reacciones inflamatorias locales y activan al sistema inmunológico innato.

La placa dental es un biofilm compuesto por un conjunto de microorganismos que conforman una densidad celular muy elevada en la cavidad oral debido a la acumulación sucesiva de miles de diferentes especies bacterianas. El sistema inmunológico del hospedero, así como los factores bacterianos se involucran en la progresión del estado de salud a enfermedad.

Las células epiteliales en la gingiva son las primeras en el hospedero que, ante la presencia de bacterias, elaboran una red de señalizaciones, produciendo péptidos antimicrobianos y citocinas, dando así lugar a la respuesta innata del hospedero. En las enfermedades periodontales la función de las células epiteliales presentes en la encía depende de la secreción de citocinas y quimiocinas. Cuando bacterias entran al epitelio comúnmente inducen la producción de citocinas, generando entonces respuestas inflamatorias por la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-8, las cuales reclutan a los fagocitos al sitio de infección.

Las mucosas contienen diversos tipos de fagocitos mononucleares incluyendo monocitos, macrófagos residentes y subpoblaciones de células dendríticas convencionales que colectivamente se considera que juegan un importante papel en la homeostasis de la mucosa, así como en la inmunidad e inflamación.

La formación de placa dental está asociada a patologías orales tales como caries y periodontitis. En la mayoría de los casos, la presencia de los microorganismos patógenos provoca la reacción inflamatoria en el periodonto.

Los colonizadores iniciales en la superficie de los dientes son principalmente especies no patogénicas Gram positivos facultativos, la presencia y desarrollo de éstos, aunado a la pobre higiene que pudiera tener el hospedero permite el desarrollo de nichos favorable para las bacterias Gram negativas que son los principales agentes causales de la enfermedad por sus componentes moleculares, así mismo por los metabolitos que generan al tener contacto con las células del periodonto, tales como las células epiteliales, mastocitos, y queratinocitos entre otros.

A diferencia de muchas condiciones infecciosas, las enfermedades periodontales aparentemente dependen de la sobrepoblación de comensales bacterianos en vez de la adquisición de patógenos exógenos. La rápida evolución de los microorganismos en los hospederos afectados se debe a que los mecanismos inmunológicos que determinan el balance ecológico de los microorganismos comensales también se requieren para mantener la homeostasis.

Las enfermedades periodontales se clasifican en dos entidades; gingivitis, la cual se define como inflamación de la encía, pero el tejido conectivo de unión al diente conserva su nivel original.

Esta forma de la enfermedad se limita únicamente a los compartimientos de tejido blando del epitelio gingival y el tejido conectivo; puede permanecer estable por años sin afectar la vida de la pieza dental. Cuando ésta avanza y destruye el tejido periodontal provocando la pérdida de los dientes es entonces denominada periodontitis. La periodontitis se sub-clasifica en dos subgrupos; periodontitis agresiva y crónica, cuyos criterios de clasificación están basados en la severidad clínica observada, así como el tiempo de evolución y el grado de pérdida del tejido y hueso alveolar. La periodontitis agresiva se caracteriza por la destrucción rápida y severa del tejido periodontal en sujetos jóvenes sistemáticamente sanos, a su vez, puede ser subdividida en sus formas localizada y generalizada según el área de tejido afectado. Por otro lado, la periodontitis crónica se caracteriza por la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes, incluyendo el ligamento periodontal y el hueso alveolar, además, involucra un proceso inflamatorio que se mantiene por largos periodos debido a la placa dentobacteriana y a los metabolitos inducidos que generan infiltración local de células inflamatorias.

Ambas formas de la enfermedad periodontal y sus síntomas son muy comunes en la población mundial. En Estados Unidos el 82% de los adolescentes tienen gingivitis y presentan sangrado gingival. El 37% de los adultos en ese país sufren periodontitis severa. En México se ha reportado una prevalencia de periodontitis en adultos que va del 31.8% al 62.7%. La periodontitis agresiva varía en cuanto a prevalencia entre diferentes grupos étnicos, regiones y países, su rango oscila entre 0.1% a 15%.

En ambos casos, la enfermedad está asociada con la acumulación de bacterias a nivel dento-encía, sin embargo, la relación causal de los microorganismos específicos no está aun completamente clara. El hospedero responde ante la colonización bacteriana por la manifestación de un infiltrado de células inflamatorias en el tejido subyacente a la bolsa periodontal.

La lesión inicial se da en respuesta a la interacción de los leucocitos residentes y a las células epiteliales contra el biofilm. En esta etapa, no existen signos clínicos de inflamación, pero los cambios en el tejido pueden ser observados histológicamente. Los metabolitos producidos por las bacterias repercuten directamente en las células epiteliales haciendo que estas produzcan citocinas y estimulen la producción de neuropéptidos, a consecuencia de ello se favorece la

dilatación de los vasos sanguíneos locales. Los neutrófilos comienzan a migrar al sitio de la inflamación en respuesta a las quimiocinas. La lesión inicial continúa evolucionando, de tal manera que el número de neutrófilos en el tejido conectivo incrementa e inicia la presencia de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y mastocitos. La cascada del complemento se activa. El epitelio aumenta su proliferación haciendo que las crestas epidérmicas se vean más alargadas histológicamente y los signos clínicos como la inflamación y sangrado de las encías puede ser observados. Los fluidos provenientes del surco gingival incrementan gradualmente.

La siguiente etapa presenta una lesión establecida. Esta puede ser considerada como el periodo de transición de la respuesta inmunológica innata a la adaptativa. Los macrófagos, células plasmáticas, linfocitos T y B son predominantes, también existe la presencia de inmunoglobulinas IgG1 e IgG3. El flujo sanguíneo es irregular y la actividad colagenolítica incrementa. Existe también un incremento en la producción de colágeno por los fibroblastos. Clínicamente, en esta etapa la gingivitis moderada pasa a severa con presencia de sangrado y cambios en el color y contorno gingival. La etapa final es la transición a la periodontitis: lesión avanzada. Existe una pérdida irreversible de la inserción de la encía al diente y la pérdida ósea es visible histológica y clínicamente. La lesión se extiende más profundamente afectando el hueso alveolar.

En este sentido, el sistema inmunológico del hospedero actúa a través de mecanismos innatos, como células epiteliales y otras células presentes en la gingiva y el ligamento periodontal, como fibroblastos, osteoblastos y células dendríticas (DCs). Estas últimas activan la respuesta inmunológica adaptativa, actuando como células captadoras y transportadoras de antígenos y posteriormente como presentadoras de antígeno profesionales (CPAs) produciendo varias citocinas importantes para la respuesta inmunológica. Las DCs migran de los epitelios o mucosas de exposición antigénica hacia los ganglios linfáticos más cercanos donde activan a linfocitos T y B induciendo su diferenciación en linfocitos T efectores y células plasmáticas secretoras de anticuerpos respectivamente, todo esto también conlleva a la secreción de citocinas proinflamatorias. Como resultado de ello, el tejido afectado por la periodontitis es altamente colonizado por ambas poblaciones linfocitarias, finalmente este escenario deriva en la destrucción del tejido conectivo y el hueso alveolar.

El exacerbado infiltrado que caracteriza a la periodontitis está principalmente constituido por neutrófilos, éstos se encuentran distribuidos en el tejido conectivo y principalmente en el surco gingival. Se sabe también que éstas células polimorfonucleares tienen una relación directa con la evolución de las enfermedades crónicas, tal es el caso de la periodontitis que se considera como una enfermedad de orden inflamatorio crónico. Los neutrófilos son capaces de causar lesiones importantes en el tejido periodontal por la acción de enzimas que liberan, las células degradan los componentes del mismo, como metaloproteinasas de matriz y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Los neutrófilos están estrechamente relacionados con la reabsorción del tejido óseo en el periodonto debido a que pueden expresar el ligando del receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) en su membrana, dicha molécula corresponde a la familia del TNF y es el ligando directo de osteoprotegerina (OPG) o RANK.

Las DCs tienen múltiples funciones las cuales involucran la presentación de los antígenos, como la activación los linfocitos T mediada por presentación antigénica. Se ha sugerido que distintas clases de DCs inducen y mantienen la inmunotolerancia, sin embargo, esta función de las DCs no está muy bien fundamentada.

En el humano existen tres subtipos de DCs, dos de ellas se encuentran de manera común en la piel, las células de Langerhans (LCs) y las DCs intersticiales, éstas derivan de células progenitoras hematopoyéticas que son CD34⁺ presentes en médula ósea y de precursores monocíticos CD11c⁺ en sangre periférica por acción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-4 o TNF- α . Las DCs de precursores monocíticos CD11c⁺ expresan marcadores mieloides, incluyendo CD13 y CD33. No es hasta la activación mediada por la interacción de CD40-CD40L que las DCs mieloides maduran y producen IL-12. A diferencia las células dendríticas intersticiales, las células de Langerhans (LCs) requieren de TGF- β y ambas deben originarse a partir de un precursor monocítico CD11c⁺, CD14⁺, adicionalmente las LCs pueden originarse de un precursor monocítico CD11c⁺, CD14⁻.

Además de ser el puente de la inmunidad innata a adaptativa e inducir inmunotolerancia en mucosas, las DCs inmaduras pueden transdiferenciarse en otra estirpe celular con funciones completamente diferentes, los osteoclastos.

Los osteoclastos se forman a partir de la fusión de precursores hematopoyéticos mononucleares en presencia de RANKL y M-CSF en un proceso denominado osteoclastogénesis.

Diversos estudios establecen que los osteoclastos pueden generarse a partir de DCs derivadas de monocitos, muchos subtipos de las últimas se pueden hallar en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide, las cuales pueden contribuir a la exacerbada osteoclastogénesis

III REVISIÓN DE LITERATURA

A TEJIDO PERIODONTAL

El periodonto es un órgano topográficamente complejo que consiste de tejido epitelial y tejido conectivo suave y mineralizado cuya función es dar soporte al diente. La integridad y composición de los tejidos periodontales puede verse afectada por traumas y diversas enfermedades; consecuentemente, estas condiciones pueden llevar a la destrucción de la matriz de tejido conectivo, células y el soporte dental (Lekic PC y col., 2001). El periodonto está compuesto de varias estructuras y tejidos que dan soporte a la posición del diente, incluyendo a la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar (Figura 1) (Armitage GC, 1999; Yan X-Z y col., 2014).

Los tejidos que constituyen la gingiva pertenecen tanto a la membrana de la mucosa oral como al periodonto. Clínicamente la gingiva se considera una combinación de tejido epitelial y conectivo que forma una especie de collar de mucosa masticatoria alrededor de los dientes, proporcionando un soporte permanente que está unido al diente y al hueso alveolar. Histológicamente la estructura de la gingiva se compone de tejido estratificado y de lámina de colágeno denso que incluyen a la fibra supra alveolar, vasos sanguíneos y linfáticos y nervios (Schroeder HE y Listgarten MA, 1997; Schroeder HE, 1986).

El ligamento periodontal es tejido conectivo suave que se encuentra interpuesto entre la raíz de los dientes y la pared interna del socket alveolar. Sus fibras conforman una pasta que se adhiere entre el cemento y el hueso, de esta manera es sujetado firmemente con la ayuda de las fibras de Sharpey (Beertsen W y col., 1997). Éste se compone principalmente de elementos vasculares y un compartimiento de proteínas y glucosaminoglucanos de matriz extracelular, las cuales en conjunto confieren el soporte biofísico para el soporte del diente (Lekic P y McCulloch CAG, 1996). El tejido de un sujeto sano se compone de varias poblaciones celulares y comprende fibroblastos, células endoteliales, restos epiteliales de Malassez (células agrupadas en malla alrededor de la raíz dental), células asociadas al sistema sensorial, células asociadas al hueso y células que desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo del hueso (McKee MD y col., 1993).

El cemento es tejido conectivo mineralizado no uniforme que abriga las raíces de los dientes y sirve como el principal mecanismo de soporte de éstos junto con las fibras de los ligamentos periodontales. Básicamente existen dos variedades de cemento, el cemento secundario o adaptativo, que pueden ser distinguidos por la presencia o ausencia de células dentro de éste y el origen de fibras de colágeno (Nanci A y Bosshardt DD, 2006; Bosshardt DD y Selvig KA, 1997).

El hueso alveolar es la fracción especializada de los huesos mandibulares y maxilares que conforman la estructura del soporte del diente. Comparándolo con otro tejido de cualquier parte del cuerpo, el hueso alveolar está sujeto a un rápido y continuo remodelamiento debido a la erupción dental, además de que recibe de manera indirecta (a través del ligamento periodontal) la fuerza ejercida sobre el diente durante el proceso de masticación (Sodek J y McKee MD, 2000; Mavropoulos A y col., 2010)

Las funciones fisiológicas del tejido periodontal sólo se pueden alcanzar a través del mantenimiento de la integridad estructural, aunado a las funciones estructurales que emplean en conjunto los cuatro elementos que lo componen (Mark-Bartold P, 2006). En las personas que presentan anomalías periodontales, por ejemplo una mala integridad o defectos de la función del tejido, se observa una variedad de fenotipos, los cuales están definidos por diversos signos y síntomas, constituyendo el síndrome periodontal (Dentino A y col., 2013).

B ENFERMEDADES PERIODONTALES

La enfermedad periodontal es una patología inflamatoria que se caracteriza por afectar la integridad de los tejidos periodontales tales como la gingiva, el hueso alveolar y el ligamento periodontal (Michael G. Newman HT, Perry R. Klokkevold, and Fermin A. Carranza, 2006; Lin P-H y col., 2013). Típicamente se refiere a desórdenes inflamatorios comunes denominados gingivitis y periodontitis, los cuales son principalmente causados por la microbiota que conforma el biofilm subgingival. Una característica de estas infecciones es que son causadas por un complejo de comunidades microbianas constituidas por alrededor de 500 especies bacterianas (Silva N y col., 2015).

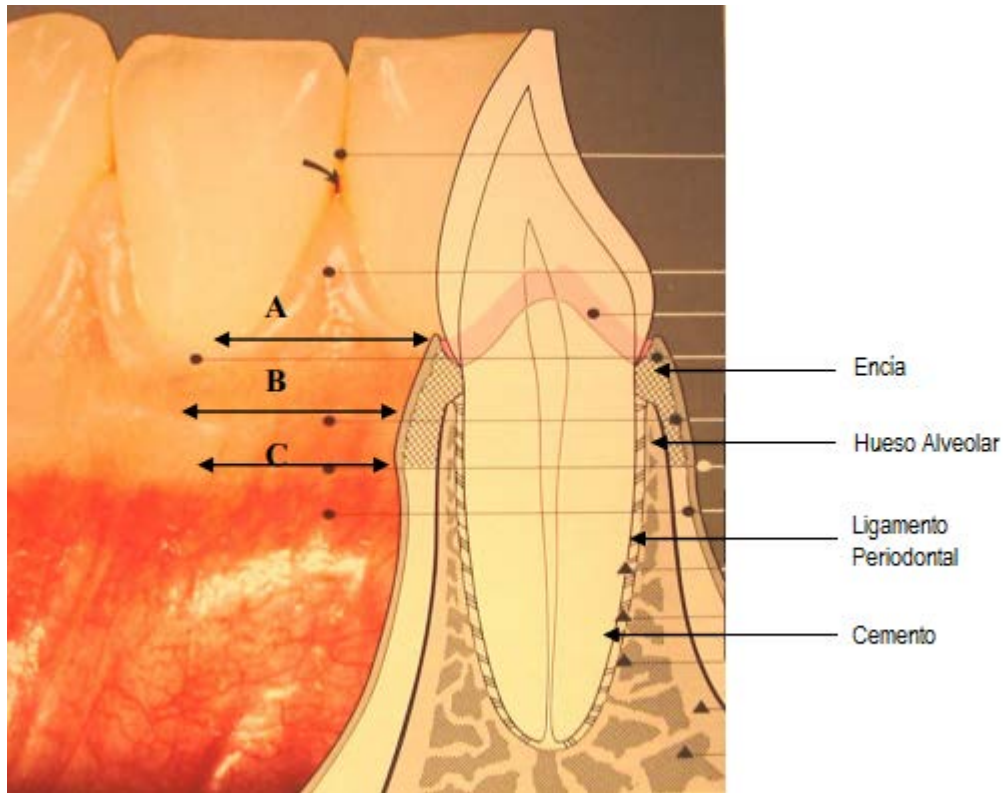


Figura 1. Anatomía del periodonto. A) Margen gingival de la encía libre, B) Encía adherida, C) Unión mucogingival. Modificada de Newman T, Klokkevold, Carranza (2006).

Las enfermedades periodontales son de las patologías orales más comunes en el humano y sin un tratamiento adecuado, pueden finalmente llevar a la pérdida de las piezas dentales, lo cual podría afectar la nutrición del afectado (Yan X-Z y col., 2014). Ciertos tratamientos han logrado ser exitosos en cuanto a la prevención de la enfermedad activa, pero la regeneración del tejido afectado mediante procesos citoterapéuticos continúa siendo difícil de lograr (Chen FM y Jin Y, 2010; Yu N y col., 2013).

Las enfermedades periodontales se clasifican en dos entidades; la gingivitis, la cual puede permanecer estable por años sin afectar la vida de la pieza dental y cuando ésta destruye el tejido periodontal provocando la pérdida de los dientes es entonces denominada periodontitis (Gemmell E y col., 2002a).

La periodontitis se clasifica en dos subgrupos; periodontitis agresiva y periodontitis crónica, cuyos criterios de clasificación están basados en la severidad clínica observada así como en el tiempo de evolución y el grado de pérdida del tejido y hueso alveolar (Enwonwu CO y Salako N, 2012). La periodontitis agresiva se caracteriza por la destrucción rápida y severa del tejido periodontal en sujetos jóvenes sistemáticamente sanos, a su vez, puede ser subdividida en sus formas localizada y generalizada según el área de tejido afectado (Carvalho FM y col., 2010). Por otro lado, la periodontitis crónica se caracteriza por la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes, incluyendo el ligamento periodontal y el hueso alveolar, además involucra un proceso inflamatorio el cual se mantiene por largos periodos debido a la placa dentobacteriana y los metabolitos generados que generan infiltración local de células inflamatorias (Bodineau A y col., 2009).

La periodontitis resulta de interacciones complejas entre las bacterias odontopatógenicas, el sistema inmunológico del hospedero y factores ambientales (Padmavati P y col., 2013). La placa dental se comporta como un complejo microbiano que se desarrolla como biofilm sobre la superficie del esmalte dental. Está bien establecido que la placa dentobacteriana es el principal factor etiológico en la patogénesis de las enfermedades periodontales. Debido a la pobre higiene bucal la placa es capaz de acumularse formando un cálculo dental. Los cálculos supra y subgingival difieren en sus grados de mineralización, pero están típicamente recubiertos por una capa de placa

dentobacteriana (Lai P-C y Walters JD, 2014). La microbiología de las enfermedades periodontales se ha enfocado en una intensa investigación para determinar la razón por la cual las bacterias son los agentes responsables de dicha patología (Li J y col., 2004; Teles R y col., 2013).

1 Factores de Riesgo

Las enfermedades periodontales son enfermedades multifactoriales. Los microorganismos y los productos microbianos de la placa dental son los principales factores implicados en la iniciación de la reacción inflamatoria que caracteriza la enfermedad hasta la progresión hacia la pérdida ósea. Existen diversos factores locales y sistémicos que influyen de manera importante en el incremento de la inflamación o efecto de destrucción de los microorganismos.

La relevancia de estos factores de riesgo para la patogénesis y la pérdida ósea depende de las distintas formas de la enfermedad periodontal. Ciertos factores locales pueden aumentar la acumulación de placa dental, o bien, influenciar la composición de la placa y en este sentido, causar daños potenciales a causa de los efectos de la placa. Además, la respuesta inflamatoria de la encía a la acumulación de placa parece tener comportamientos distintos entre los individuos.

La prevalencia y la severidad de la pérdida de inserción incrementan junto con la edad. Es incierto, debido a que, aunque este incremento se atribuya al factor de edad, puede deberse al efecto acumulativo a través del tiempo. Además de la edad, los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad son el género, el nivel socioeconómico y la raza. Otros factores implicados en el desarrollo y severidad son los hábitos tales como la higiene oral, tabaquismo, e incluso enfermedades sistémicas tales como la osteopenia, osteoporosis y artritis, el SIDA y el síndrome de Down también son factores de riesgos significantes (Albandar JM, 2005).

2 Prevalencia

Las enfermedades periodontales afectan al menos a 35% de los adultos entre 30 y 90 años de edad en los Estados Unidos y a más del 90% de la población global (Zeng X-T y col., 2013). En México se ha reportado una prevalencia de periodontitis en adultos que va del 31.8% al 62.7%; por sí misma, la periodontitis agresiva varía en cuanto a prevalencia entre diferentes grupos étnicos, regiones y países, su rango oscila entre 0.1% a 15%. La raza africana y sus grupos descendientes

presentan una mayor prevalencia que los caucásicos y los hispanos (Rojo NRB y col., 2011; Carvalho FM y col., 2010).

La gingivitis es una condición ubicua en población infantil y adulta a nivel global. Se estima que más del 82% de los adolescentes en los Estados Unidos padecen de gingivitis y presentan sangrado gingival. Una prevalencia similar o mayor se ha reportado en niños y adolescentes en otras partes del mundo. La alta prevalencia también se observa en adultos. Más del 75% de los adultos Americanos presentan sangrado gingival y alto porcentaje de cálculo dental, revelando de esta manera la pobre higiene (Albandar JM, 2005).

Las formas no agresivas de periodontitis (periodontitis crónica) son comunes alrededor del mundo. Se estima que la periodontitis crónica en distintas poblaciones varía de manera significativa, esto en parte por las diferencias demográficas y niveles de exposición a los riesgos del desarrollo de la patología. La periodontitis crónica en niños y adolescentes con un rango de frecuencia amplio en varias regiones geográficas y grupos raciales/étnicos. La frecuencia se mantiene baja en caucásicos jóvenes en el oeste de Europa y en Norte América y frecuencias relativamente altas en África y América Latina. En los grupos de edad entre los 11 y 25 años, existe un estimado de afectados de 1 al 3% en el oeste de Europa, 2 a 5% en Norte América, de 4 a 8% en Sudamérica, 5 a 8% en Asia, y del 10 al 20% en África. Las estimaciones por grupos raciales y étnicos se conforma prevalencias de 1 a 3% en caucásicos, 5 a 8% en Asiáticos, 5 a 10% en Hispánicos y Latinos y del 8 al 20% de Africanos y Afroamericanos (Albandar JM, 2005).

En México se han reportado 355,419 casos de gingivitis y enfermedades periodontales hasta abril de 2016, lo que significa que el 30% de la población nacional padece de algún tipo de enfermedad periodontal. El 18% lo comprende el género femenino y 11% el masculino. El primero lugar a nivel nacional es del Distrito Federal con 2.63% de los casos, seguido por el Estado de México, Jalisco y Veracruz. Sinaloa ocupa el quinto lugar a nivel nacional en prevalencia de algún tipo de enfermedad periodontal con 1.45% de los casos (Figura 2). En Sinaloa existen 17,300 casos reportados de enfermedades periodontales, teniendo un total de 58% de los habitantes del cuales 33% son mujeres y el 20% son hombres (Figura 3) (SSA, 2016).

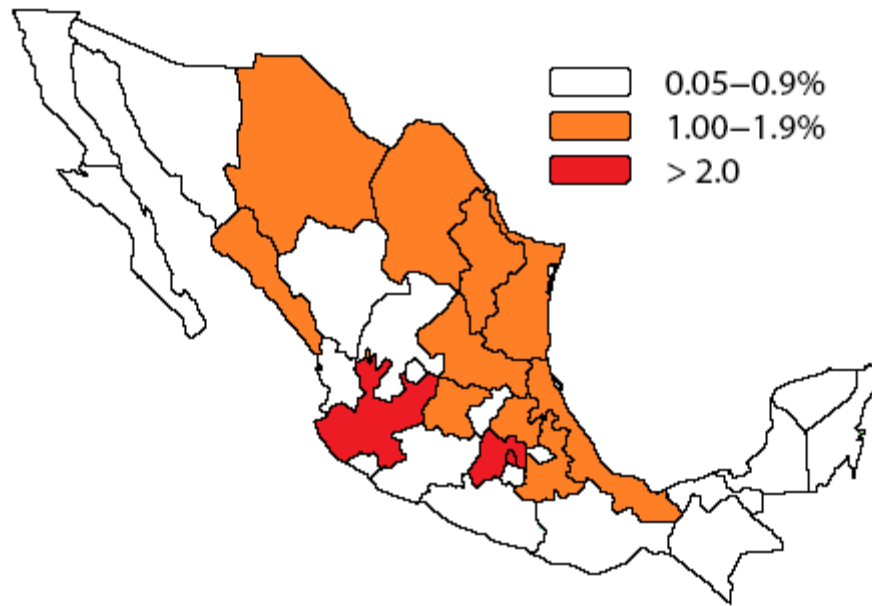


Figura 2. Distribución epidemiológica de las enfermedades periodontales en México. Datos SSA (2016). (Elaboración propia).

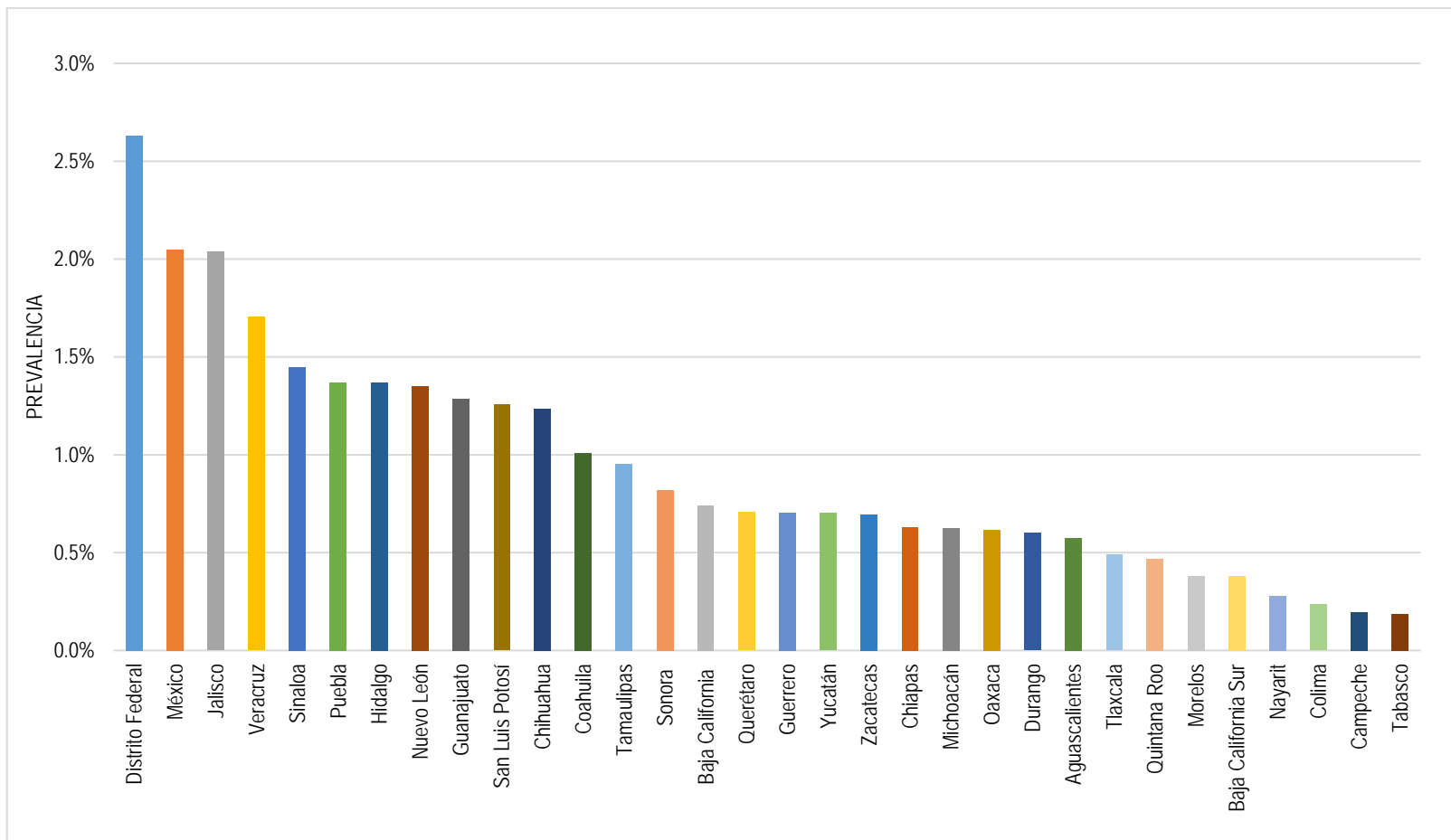


Figura 3. Prevalencia de Enfermedades periodontales en México. Datos SSA (2016) (Elaboración propia).

3 Etiopatogenia

La etiología de las enfermedades periodontales es bacteriana. La cavidad oral humana alberga una sustancial y constante carga evolutiva de especies microbianas. La interacción entre el hospedero y estos microorganismos determina la severidad de la enfermedad. Las enfermedades periodontales son una de las enfermedades inflamatorias más comunes y pueden ser de origen inflamatorio, traumatológico, metabólico o genético (Kolenbrander PE y col., 2002). Los colonizadores iniciales en la superficie de los dientes son principalmente por especies no patogénicas Gram positivos facultativos, incluyendo a especies de *Streptococcus gordonii*, *S. sanguis* y *S. oralis*. Estos colonizadores iniciales se adhieren al esmalte dental dando lugar a la colonización sucesiva de microorganismos anaerobios Gram negativos como *Fusobacterium nucleatum* y finalmente patógenos como *Porphyromonas gingivalis* (Socransky SS y col., 2002; Socransky SS y Haffajee AD, 2005). La formación de placa dental está asociada a patologías orales tales como caries y periodontitis. En la mayoría de los casos, la presencia de los microorganismos patógenos provoca la reacción inflamatoria en el periodonto. El biofilm formado en la cavidad oral está compuesto de varias especies de microorganismos, mismos que se acumulan en la superficie adyacente a la encía, las bacterias anaerobias Gram negativas *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* se han asociado fuertemente con el desarrollo de la enfermedad periodontal (Armitage GC, 1999; Socransky SS y col., 1998).

Las bacterias primeramente forman un biofilm supragingival unido a la superficie dental, posteriormente logran posicionarse en el epitelio de unión, allí las bacterias son capaces de entrar al surco gingival generando un biofilm subgingival, en este sentido, se genera un ambiente óptimo para que bacterias anaerobias logren colonizar y reproducirse. El número de bacterias anaerobias Gram negativas incrementa el desarrollo y crecimiento del biofilm dental. El sistema inmunológico del hospedero y los factores bacterianos están involucrados en la progresión del estado de salud a enfermedad, de esta manera, la enfermedad periodontal es el resultado del desbalance entre el potencial patogénico del biofilm y las propiedades inmunológicas del hospedero (Michalowicz BS y col., 2000; Loos BG y col., 2005).

A diferencia de muchas condiciones infecciosas, las enfermedades periodontales aparentemente dependen de la sobrepoblación de comensales bacterianos en vez de la adquisición de patógenos exógenos. La rápida evolución de los microorganismos en los hospederos afectados se debe a que los mecanismos inmunológicos que determinan el balance ecológico de los microorganismos comensales también se requieren para mantener la homeostasis del tejido (Cekici A y col., 2014; Gemmell E y col., 1997).

La microbiota está estrechamente relacionada con la salud periodontal y al mismo tiempo está involucrada en el desarrollo de patologías periodónticas. Más allá de la clasificación de las enfermedades periodontales, diferentes tipos de componentes microbianos se asocian a los distintos tipos de la patología (Listgarten MA y Hellden L, 1978; Socransky SS y col., 1963). Las bacterias aisladas a partir de un tejido sano son comúnmente bacilos y cocos Gram positivos aerobios facultativos (~75%), éstos disminuyen su población en condiciones de gingivitis y también se observa una disminución de 10 a 13% en periodontitis. Estas características son simultáneas al incremento en la colonización de bacilos Gram negativos anaerobios estimándose un 40% en gingivitis y 74% en periodontitis (Figura 4) (Slots J, 1979; Glickman I y Carranza FA, 1990).

4 Periodonto Sano

La microbiota normal en el periodonto sano, en comparación al tejido en estado patológico incluye bacterias Gram positivas como colonizadores normales, principalmente miembros del género *Streptococcus* y *Actinomyces* (*Streptococcus sanguis*, *S. mitis*, *Actinomyces viscosus*, y *A. naeslundii*, entre otros). También se presentan bacterias Gram negativas en menos proporción, dentro de las cuales las más comunes son *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga* spp, *Neisseria* spp y *Veinollena* spp.

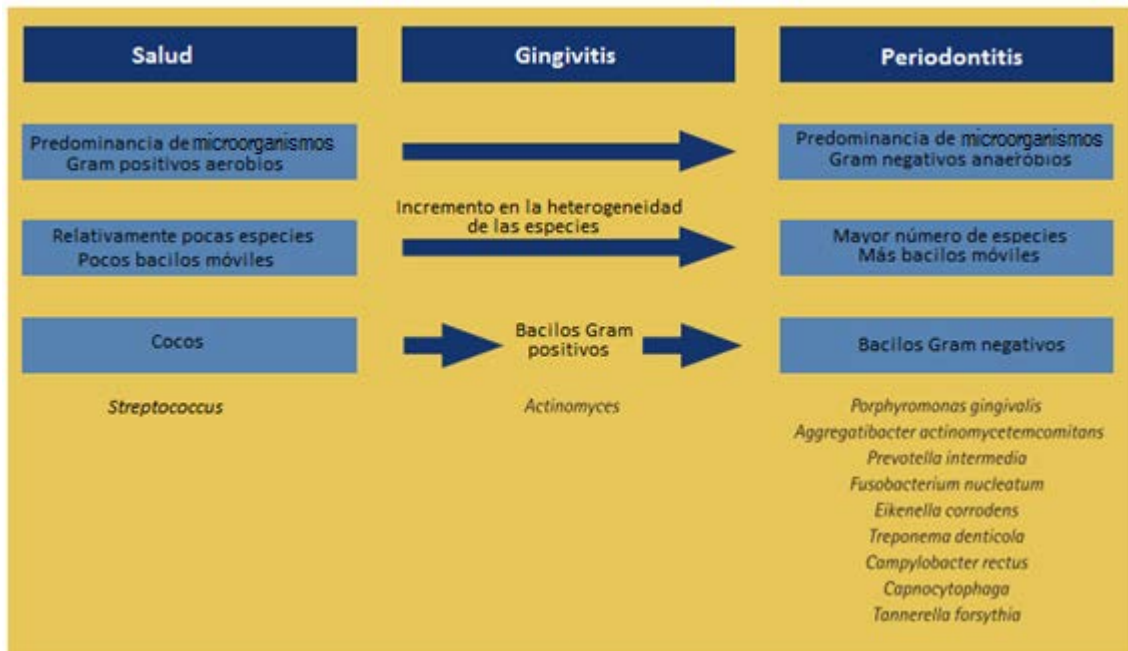


Figura 4. Cambios en la microbiota oral en enfermedad periodontal. Modificado de Hasan A y Palmer RM (2014).

Se ha reportado que algunas bacterias poseen una función benéfica ya que son microbiota normal de la cavidad oral inhibiendo la formación de caries y colonizando las superficies del diente evitando la formación de placa por bacterias patógenas para el hospedero (Yamaguchi M y col., 2006), dentro de éstas se encuentran *S. sanguis*, *Veillonella párvula*, y *Capnocytophaga ochracea*. Éstas se pueden encontrar típicamente en altas concentraciones en sitios inactivos en el periodonto, pero son escasas cuando la destrucción del periodonto ocurre (Glickman I y Carranza FA, 1990).

5 Gingivitis

La microbiota inicial en presencia de gingivitis, comprende 56% cocos y bacilos Gram positivos, así como 44% cocos Gram negativos (Slots J, 1979). Dentro de las bacterias predominantes Gram positivas se identifican *Streptococcus sanguis*, *S. mitis*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii*, y *Peotostreptococcus micros*. Mientras que del tipo Gram negativo se encuentran como principales bacterias colonizadoras a *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella párvula*, así como *Hemophilus*, *Capnocytophaga* y *Campilobacter* spp (Mombelli A y col., 1990; Moore WE y Moore LV, 1994).

6 Periodontitis Crónica

Microscópicamente la placa en este nivel de la enfermedad demuestra que la periodontitis se asocia a una fuerte presencia de espiroquetas (Listgarten MA y Hellden L, 1978; Loesche WJ, 1968). La destrucción del tejido en la periodontitis crónica sólo afecta a los dientes del sitio donde se encuentra la inflamación, siendo éstos los que se pierden a causa de la patología mientras que otros dientes están prácticamente libres de signos de daño y pérdida (Lindhe J y col., 2009). Además, los cultivos de los sitios afectados revelan un alto porcentaje de bacterias anaeróbicas (90%) de las cuales el 75% son Gram negativas (Slots J, 1979).

En la periodontitis crónica las bacterias más frecuentes encontradas son *Porphyromonas gingivalis*, *Bacterioides forsythus*, *P. intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. micros*, así como *Treponema* y *Eubacterium* spp (Glickman I y Carranza FA, 1990).

P. gingivalis es un patógeno agresivo y considerado el principal agente etiológico de la periodontitis en adultos. La colonización de *P. gingivalis* en la cavidad oral es facilitada por la adherencia a varias superficies orales incluyendo células epiteliales, la película salivaria que recubre la superficie dental y, otras bacterias orales que comprenden la placa dental (Socransky SS y Haffajee AD, 1992). Sin embargo, *P. gingivalis* es considerado un colonizador secundario de la placa y rara vez se encuentra en la superficie dental hasta que colonizadores iniciales, como *S. gordonii*, establece un ambiente adecuado. La adhesión entre estos dos microorganismos está mediada por la proteína de superficie Ssp8 de *S. gordonii* y la fimbria menor de *P. gingivalis* (Chung WO y col., 2000). En la cavidad oral, las células epiteliales de la encía son de las primeras células en el hospedero en tener contacto con estos colonizadores. Como consecuencia de esto, las células epiteliales responden a su presencia. Esta comunicación bacteria-hospedero toma lugar por las vías de traducción de señales, no obstante, diferentes bacterias inducen distintas señales en el hospedero. Por el contrario, varias respuestas en el hospedero pueden interferir en la forma en cómo los comensales y los patógenos se comunican para la formación del biofilm, lo cual significa que la información sobre los mecanismos de defensa carece aún de un buen entendimiento.

C ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES

Una de las características puntuales de la periodontitis es la acumulación masiva de neutrófilos, los cuales se hallan distribuidos en el tejido conectivo y principalmente en el surco periodontal (Darveau RP, 2010). La manera en que los neutrófilos son involucrados en la patogénesis de enfermedades crónicas tales como la periodontitis podría parecer sorprendente debido a que están asociadas a la respuesta del hospedero hacia las infecciones. Sin embargo, los neutrófilos se involucran estrechamente en enfermedades con inflamación crónica, como la artritis reumatoide y la psoriasis (Kolaczowska E y Kubes P). Los neutrófilos son capaces de causar la destrucción del tejido periodontal a través de la liberación de enzimas degradativas como las metaloproteinasas de matriz o a partir de sustancias citotóxicas como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NOS).

La molécula RANKL pertenece a la superfamilia de factor de necrosis tumoral (TNF). RANKL es ligando de osteoprotegerina (OPG) y tiene una función como factor de diferenciación y activación de osteoclastos, es codificado por el gen *tnfsf11* que se localiza en 13q14; es expresado por células de origen mesenquimal y en tejido óseo es un regulador directo de la generación de osteoclastos. Su receptor RANK se expresa en la membrana de las DCs, esta proteína es codificada por el gen *tnfrsf11a*; es un receptor que puede interactuar con varias proteínas de la familia de factor de receptores asociados a TNF (TRAF), a través del cual se puede inducir la activación del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Este receptor y su ligando son importantes reguladores en la interacción entre linfocitos T y DCs; además, es un mediador esencial para desarrollo de osteoclastos (Anderson DM y col., 1997).

Las DCs son células presentadoras de antígeno (CPAs) profesionales, especializadas capaces de inducir respuestas inmunológicas y también de inducir tolerancia. Las DCs pueden ser diferenciadas a partir del linaje monocito-macrófago, pero a su vez estos últimos pueden dar lugar a osteoclastos (OCs) dependiendo del ambiente extracelular en que se encuentren. Las DCs y OCs comparten la habilidad de fagocitosis, pero a la vez presentan características morfológicas y propiedades funcionales totalmente diferentes (Rivollier A y col., 2004).

La osteoclastogénesis es la generación de osteoclastos, diversos estudios establecen que los OCs pueden generarse a partir de DCs, muchos subtipos de estas últimas se pueden encontrar en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide (AR), las cuales pueden contribuir a la exacerbada osteoclastogénesis (Santiago-Schwarz F y col., 2001). De la misma manera se reporta que las articulaciones inflamadas en pacientes con AR pueden ser reservorios de DCs, mismas que conducen a la respuesta inflamatoria. En este sentido, se establece que la contribución de las DCs en la osteoclastogénesis es indirecta y se debe a su habilidad de activar linfocitos T vírgenes, los cuales son capaces de producir RANKL y estimular la diferenciación en OCs (Anderson DM y col., 1997).

Los OCs se encuentran en vecindad con los huesos y tienen como característica principal la habilidad de reabsorber apatita de calcio mineralizada o sustratos de carbonato, tales como hueso y dentina; en condiciones normales la reabsorción va acompañada de la regeneración de hueso

por medio de los osteoblastos (OBs), los cuales tienen la función de regenerar hueso con la ayuda de la proteína OPG que funge como regulador negativo de la reabsorción; esta proteína es codificada por el gen *tnfrsf11b* expresada en los OBs (Saltel F y col., 2008; Simonet WS y col., 1997). Los OCs se forman a partir de la fusión de precursores hematopoyéticos mononucleares en presencia de RANKL y M-CSF; ésta última es una citocina codificada por el gen *cdf1* con la función de controlar la producción, diferenciación y función de los macrófagos (Saltman DL y col., 1992). A lo largo del proceso de diferenciación, los osteoclastos expresan una serie de marcadores como fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), codificada por el gen *acp5* cuya función es catalizar la conversión de monoéster ortofosfórico en alcohol y ortofosfato, dichos metabolitos están asociados a la actividad de reabsorción de los OCs.

D INMUNOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

En condiciones de salud, el surco gingival está mayormente colonizado por bacterias aeróbicas y no móviles. Este sitio se encuentra sobre un continuo flujo de plasma que pasa a través del tejido de unión. El fluido contiene neutrófilos, los cuales llegan al sitio por acción de factores quimiotácticos del hospedero y de las bacterias, tales como leucotrienos B4 y fMLP (Offenbacher S y col., 1987). Una vez en el surco, los neutrófilos atacan a las bacterias por medio de fagocitosis y por degranulación. Dentro del fluido crevicular se pueden encontrar varias moléculas inflamatorias, incluyendo prostaglandina E₂, IL-1 β , TNF- α e IgGs (Lamster IB y Ahlo JK, 2007; Stefanovic G y col., 2006).

Los buenos hábitos de higiene oral mantienen el control bacteriano de manera mecánica, permitiendo así únicamente la colonización de flora normal (Haffajee AD y col., 2006). Clínicamente este control bacteriano se puede evidenciar por la ausencia de inflamación visible y surcos sanos con profundidades de 1 – 3 mm (Newman T, Klokkevold, Carranza, 2006). Sin embargo, los signos característicos de las enfermedades periodontales están mediados principalmente por los OCs y son atribuidos a prostaglandina E₂ (PGE₂) (Choi BK y col., 2005). En ese momento, la unión del ligamento periodontal al diente se va perdiendo, en consecuencia la unión epitelial se mueve hacia el espacio que ocupaba el ligamento periodontal y como resultado la profundidad del surco gingival aumenta más allá de 3 mm. Una profundidad mayor de 3 mm es denominada como bolsa

periodontal e indica la transición de salud a enfermedad, clínicamente esto se relaciona con sangrado cuando las bolsas son medidas por procesos mecánicos realizados por los odontólogos (Lamster IB y Ahlo JK, 2007).

Los desórdenes periodontales resultan de la destrucción del ligamento periodontal y del hueso alveolar, como consecuencia de una exagerada respuesta inmunológica inflamatoria generada por el hospedero contra el biofilm periodontal o la placa dentobacteriana (Enwonwu CO y Salako N, 2012). La comprensión de la inmunología del padecimiento continúa evolucionando, los primeros hallazgos se basan fundamentalmente en estudios microbiológicos que estimulan el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, algunos estudios revelan la complejidad de las respuestas inflamatorias en humanos (Ebersole JL y col., 2013). A pesar que se conoce que la patogénesis en las enfermedades periodontales está mediada por la respuesta inflamatoria provocada por bacterias en el biofilm dental, la identificación de los patógenos responsables no se encuentra completamente definida. Existen evidencias de que hay microorganismos específicos que están asociados a la progresión y distintas formas de la enfermedad, sin embargo, se cree que la progresión de la enfermedad se debe a la respuesta inmunológica del hospedero, ya que pueden observarse estos microorganismos sin que exista respuesta inflamatoria en los individuos (Seymour GJ, 1991).

Cuando la periodontitis genera la pérdida de la pieza dental, el proceso es acompañado de un cambio en la población de linfocitos, siendo los linfocitos T los de mayor infiltración en el tejido con periodontitis, mientras que el número de linfocitos B y células plasmáticas domina en tejidos que únicamente están inflamados (Offenbacher S, 1996; Seymour GJ y Greenspan JS, 1979).

En las enfermedades periodontales los neutrófilos juegan un importante papel en el mantenimiento de la salud periodontal (Page RC y col., 1997). Estas células están presentes en el tejido de unión en gran concentración y se presentan en la pared epitelial manteniéndola resguardada del biofilm bacteriano. La presencia de neutrófilos se debe a la existencia de factores quimiotácticos en el tejido gingival (Bascones-Martinez A y col., 2009). Las infecciones extraorales y las periodontitis de inicio temprano frecuentemente afectan a pacientes con adhesión leucocitaria defectuosa. El epitelio periodontal funge como barrera física contra las infecciones y tiene un papel

activo como defensa innata en el hospedero, debido a que las células epiteliales están en contacto constante con las bacterias presentes. En presencia de la patología, la migración de células inflamatorias al epitelio afectado provoca el desarrollo de una cavidad donde existe presencia bacteriana, inflamación y destrucción del tejido conectivo. Bajo estas condiciones, se genera una respuesta inmunológica innata y adaptativa. Las células epiteliales pueden también aumentar su grado de proliferación y/o muerte celular alterando la homeostasis del tejido (Darveau RP y col., 1997; Dunsche A y col., 2002).

Por otro lado, la respuesta inmunológica adaptativa es activada cuando péptidos antimicrobianos y componentes de la inmunidad innata del tejido epitelial son superados. Las citocinas son integradas a esta respuesta y actúan como mensajeros celulares (Seymour GJ y Taylor JJ, 2004; Fisman EZ y col., 2008). La respuesta inmunológica ante la infección es regulada por el balance de las citocinas producidas por los linfocitos T cooperadores de tipo Th1 (“respuesta celular”) y los de tipo Th2 (“respuesta humoral”) (Gemmell E y Seymour GJ, 2004; Ohlrich EJ y col., 2009). La diferenciación de los linfocitos T cooperadores está íntimamente relacionada con factores tales como la presencia de antígenos, la concentración de los mismos, la vía de administración, la naturaleza de las células presentadoras de antígeno (CPAs), las moléculas coestimuladoras y las citocinas secretadas. No obstante, algunos estudios han demostrado que existe un dominio de la respuesta de linfocitos Th1 sobre los Th2, otros estudios han demostrado la alta presencia de linfocitos T reguladores y Th17 en condiciones de periodontitis (Figura 5) (Ohlrich EJ y col., 2009; Sigusch B y col., 1998).

1 Inmunidad Innata

La placa dental es un biofilm compuesto por un conjunto de microorganismos que constituyen una alta densidad celular en la cavidad oral debido a la acumulación sucesiva de miles de diferentes especies bacterianas. El sistema inmunológico del hospedero así como los factores bacterianos se involucran en la progresión del estado de salud al estado de enfermedad (Kolenbrander PE y col., 2002). Las células epiteliales en la gingiva son las primeras en el hospedero que ante de la presencia de bacterias elaboran una red de señalizaciones, produciendo péptidos antimicrobianos (Figura 6) y citocinas, dando así lugar a la respuesta innata del hospedero. Debido a que las

enfermedades periodontales son consecuencia del desbalance entre el potencial patogénico del biofilm y el estado inmunológico del hospedero se produce una reacción inflamatoria en el periodonto. Las células epiteliales secretan serín-proteasas endógenas para prevenir el daño que se produce por la excesiva actividad proteolítica debido a la inflamación (Lehrer RI y Ganz T, 2002; Premratanachai P y col., 2004).

Los mecanismos innatos incluyen un número considerable de factores inespecíficos, incluyendo el efecto físico de barrera del epitelio intacto. La mucosa oral está recubierta de saliva que contiene diversos elementos de protección. Las bacterias presentes son reconocidas por receptores no clonales como los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Éstos reconocen sustancias como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas y peptidoglicanos de Gram positivas. Las respuestas innatas son relativamente inespecíficas y quizás por ello se presenta un mayor daño hacia los tejidos.

Los neutrófilos son cruciales en el mantenimiento de la salud periodontal, conforme la severidad de las enfermedades aumenta se presenta la neutropenia, agranulocitosis y mal funcionamiento celular como la deficiencia en adhesión leucocitaria en casos patológicos como el Síndrome de Papillon-Lefèvre, Chediak-Higashi, Síndrome de Down y Diabetes Mellitus (Fig. 4) (Hasan A y Palmer RM, 2014).

Como se mencionó con anterioridad, en la gingivitis crónica y la periodontitis se observan lesiones inflamatorias crónicas, como resultado de ello la inflamación y el proceso de recuperación se prolonga. Los signos cardinales de la enfermedad son identificados por el grado de inflamación y reparación. No todos los signos deben de presentarse para evidenciar la inflamación. Por ejemplo, el dolor y la pérdida de la función no precisamente se observan en condiciones patológicas.

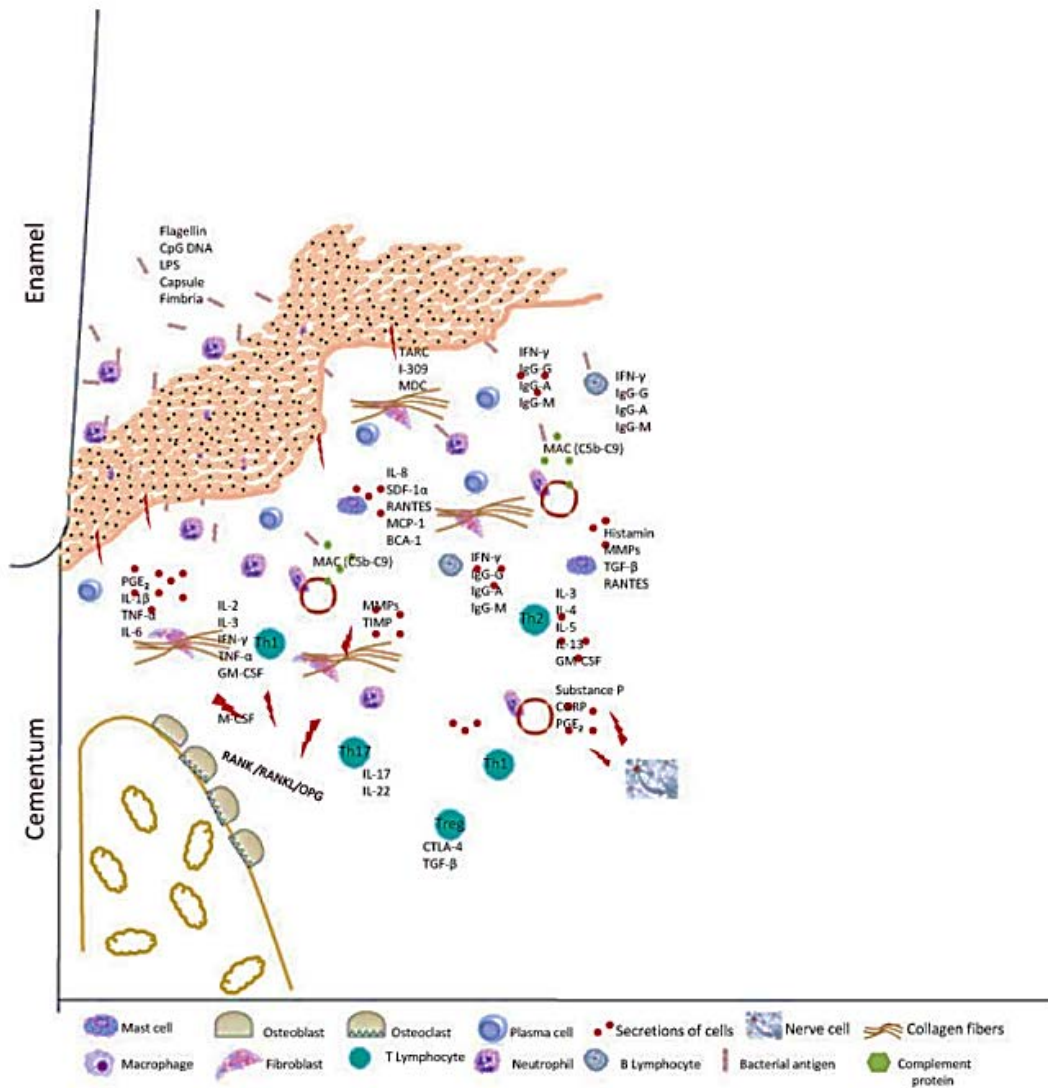


Figura 5. La respuesta inflamatoria en periodontitis en un proceso muy complejo que involucra tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa. Tomada de Ohlrich EJ y col. (2009).

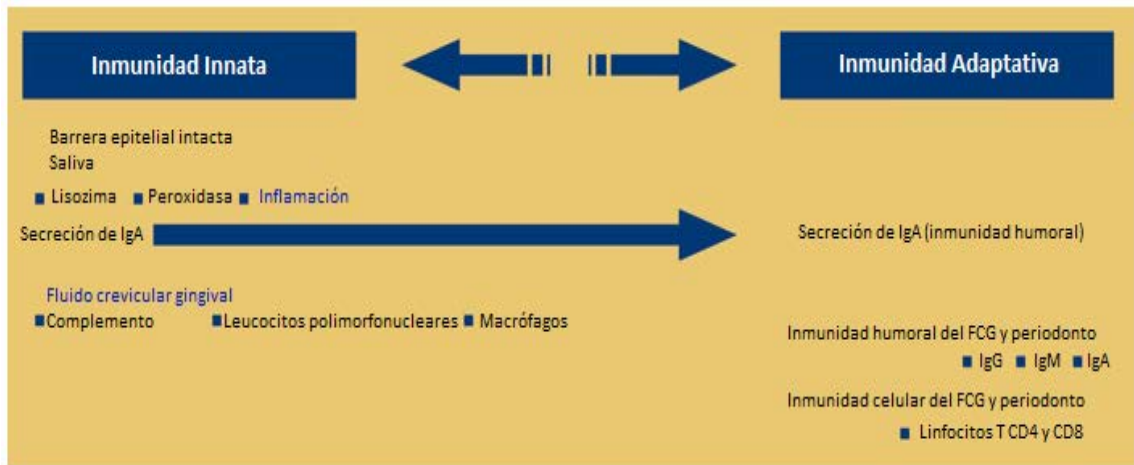


Figura 6. Inmunidad innata y adaptativa del periodonto. Modificado de Hasan A y Palmer RM (2014).

2 Células y Mediadores de la Inflamación Periodontal

Dentro del tejido periodontal, a nivel celular podemos encontrar neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, y osteoclastos, a nivel molecular se presentan las proteínas de complemento, LTB₄, IL-1, e IL-6, metaloproteinasas de matriz, prostaglandinas, TNF- α e inmunoglobulinas, que son comúnmente considerados como agentes proinflamatorios. Estas células y moléculas están presentes con mayor frecuencia en enfermedad (Taubman MA y col., 2007; Newman T, Klokkevold, Carranza, 2006).

El sistema inmunológico innato incluye células de origen no hematopoyético, especialmente células epiteliales, células de origen mieloide o hematopoyéticas como los fagocitos y la defensa humoral innata, la cascada del complemento. Los péptidos antimicrobianos contribuyen desde el inicio, para una inmediata respuesta ante los microorganismos. La inflamación es la respuesta fisiológica inicial hacia los patógenos reclutando las células adecuadas hacia el sitio de infección a través de la producción de citocinas y quimiocinas (Seymour GJ, 1991). Si el proceso de inflamación falla, se generan las lesiones crónicas a partir de las lesiones tempranas. Las vías de la respuesta innata son estimuladas para luego activar la respuesta adaptativa. La inmunidad innata se genera de manera inespecífica, se caracteriza principalmente por fagocitosis y la degradación de microorganismos y componentes extraños por macrófagos y neutrófilos. Los fagocitos residentes poseen receptores de superficie que reconocen y se unen a la superficie de moléculas bacterianas. Estos receptores de reconocimiento, incluyendo a los receptores tipo Toll (TLR) son capaces de distinguir entre el hospedero y las bacterias (Medzhitov R y Janeway CA, Jr., 1997). Después del reconocimiento de microorganismos y de componentes extraños, las quimiocinas son secretadas para atraer a los fagocitos circulantes hasta el sitio de infección. El sistema de complemento también genera proteínas biológicamente activas, incluyendo a las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a que atraen a diferentes células inmunológicas del hospedero como los monocitos, linfocitos y neutrófilos, respectivamente. Las proteínas del complemento pueden también eliminar a ciertas bacterias. La vasodilatación inducida por la histamina producida por mastocitos incrementa el flujo sanguíneo y el reclutamiento de los fagocitos (Gemmell E y col., 1997).

a Queratinocitos

Los queratinocitos expresan varias familias de PRRs, incluyendo entre éstos al TLR2, TLR4, NOD1, y NOD2, los cuales son activados por las estructuras moleculares de bacterias extra e intracelulares. El TLR2 actúa como un receptor para peptidoglicanos, zymosan, lipoproteínas, y mananas fúngicas; el TLR4 funge como receptor de LPS; mientras que NOD1 y 2 son receptores de bacterias intracelulares (Uehara A y col., 2005).

Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento y la subsecuente activación de las células por acción de estructuras microbianas se generan varias quimiocinas y citocinas específicas, con ello se promueven respuestas adaptativas no inflamatorias específicas para cada estructura molecular (Uehara A y col., 2005; Miller LS y Modlin RL, 2007). Independientemente a las vías de los TLRs y en respuesta a la estimulación por microorganismos, los queratinocitos son capaces de generar péptidos antimicrobianos, tales como IL-37 y β -defensinas, los cuales pueden eliminar directamente a los microorganismos. También son capaces de generar especies reactivas tales como H₂O₂, NO, OH, y O₂ y componentes del complemento como el caso de C3b y C5a, mismos que inician y median las respuestas inmunoinflamatorias, además de que dichos componentes son indispensables para la supervivencia, regulación y reparación del tejido epitelial (Shaykhiev R y col., 2008; Pivarcsi A y col., 2003).

b Células Epiteliales

Las células epiteliales forman una capa que funciona primero como una barrera física para evitar el ataque contra varios estímulos incluyendo a la microbiota. Las bacterias que provocan las enfermedades periodontales se adhieren directamente a la superficie interna de la capa epitelial que se encuentran en la bolsa periodontal, esto provoca que en el hospedero responda ante el estímulo bacteriano. En las enfermedades periodontales la función de las células epiteliales de la encía depende de la secreción de citocinas y quimiocinas. Cuando bacterias entran al epitelio, el hospedero comúnmente responde con la producción de citocinas, generando entonces respuestas inflamatorias por la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-8, las cuales reclutan a los fagocitos al sitio de infección (Kusumoto Y y col., 2004).

La infección de las células epiteliales por *P. gingivalis* disminuye la producción de IL-1 β . Lo cual sugiere que la supresión de este mediador de la inflamación puede resultar en defectos quimiotácticos, lo cual repercute en la acción adecuada de otras células de la inmunidad (Kusumoto Y y col., 2004; Holt SC y col., 1999).

c Fagocitos

Las mucosas contienen diversos tipos de fagocitos mononucleares incluyendo monocitos, macrófagos residentes y subpoblaciones de células dendríticas convencionales que colectivamente se cree que juegan un importante papel en la homeostasis de la mucosa, así como en la inmunidad e inflamación.

En los sujetos que padecen enfermedades periodontales en etapas crónicas, la expresión de TLR2 y TLR4 en los monocitos y macrófagos, así como en fibroblastos gingivales y células dendríticas mieloides se incrementa en respuesta a la presencia de bacterias periodontopatogénicas, haciendo que la estimulación vía TLR favorezca propiamente la producción exagerada de citocinas proinflamatorias que median la destrucción tisular (Feller L y col., 2013).

Los neutrófilos en saliva son parte importante de los mecanismos inmunológicos locales de la cavidad oral, éstos están involucrados en la defensa en contra de enfermedades orales y periodontales, dichos sucesos no están muy bien estudiados ya que éstos hallazgos están basados en función a la respuesta en sangre periférica (Fumarulo R y col., 1993). En este sentido se ha comprobado que los PMN tienen una habilidad fagocítica reducida en comparación a los encontrados en periferia en individuos sanos (Lukac J y col., 2003).

Los macrófagos son mediadores importantes de los procesos inflamatorios en el infiltrado del tejido conectivo, donde producen varias citocinas y pueden también presentar antígenos a linfocitos T. Los macrófagos activados son esenciales para la resistencia a infecciones intracelulares puesto que producen citocinas proinflamatorias que potencian la fagocitosis y en la mayoría de los casos ello es exitoso para la eliminación de patógenos. Patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* activan a los monocitos y macrófagos estimulando la

producción de citocinas proinflamatorias, así como mediadores que destruyen al tejido (Gemell E y col., 2002b).

d Complemento

La cascada del complemento puede ser activada por tres vías: la vía clásica, la de las lectinas; y la alternativa.

La vía clásica es activada por inmunoglobulinas (IgG o IgM unidas a un antígeno). El complejo antígeno-anticuerpo se une a la primera proteína del complemento C1, la cual es un complejo proteínico multimérico conformado por C1q, C1r y C1s. C1q es un dominio que se une a los anticuerpos mientras que C1r y C1s funcionan como proteasas. La activación de la vía clásica ocurre cuando C1q, en complejo con C1r y C1s se une a la fracción Fc inmovilizando al antígeno unido a la superficie del patógeno. C1s y C1r son activados, C1s escinde a la proteína C4, dejando libres en su fracción larga C4b y la corta C4a. C1r actúa sobre C2, lo escinde en la fracción larga C2a y la corta C2b. Los fragmentos grandes que se generaron se unen en la superficie del patógeno formando el complejo C4bC2a (C3 convertasa), dicho complejo tiene acción de convertasa, el cual escinde a la proteína C3, la misma C3 se divide en una toxina anafiláctica C3a y en una opsonina C3b. Esta última se puede unir a C3 convertasa y la convierte en C5 convertasa (C4bC2aC3b) En este punto es donde la cascada del complemento converge con la vía alternativa. Esta actividad sustenta el sistema del complemento permitiendo marcar específicamente a los microorganismos por opsonización y finalizando con la producción de toxinas anafilácticas y la formación de MAC (Dunkelberger JR y Song WC, 2010; Abbas AKLAHPS, 2012).

En la vía de las lectinas participa una lectina de unión a manosa que se une a los carbohidratos en la pared celular bacteriana para la formación de serina proteasa-2 asociada a manosa. Esta molécula tiene la capacidad de escindir las proteínas C4 y C2 del complemento, formar la C3 convertasa que a su vez rompen a C3 en C3a y C3b, de igual manera en la vía clásica, sólo que esta vía es independiente de inmunoglobulinas (Sarma JV y Ward PA, 2011).

La vía alternativa se encuentra activa a bajos niveles y es controlada por la hidrólisis líquida en suero iniciando con la escisión de C3, Cuando finalmente C3 se escinde en C3b expone un enlace tioéster que le permite la unión covalente en los grupos hidroxilo de carbohidratos y proteínas, la

unión covalente de C3b a la superficie microbiana de polisacáridos bacterianos, como el zymosan, lipopolisacáridos. Esta vía se inicia con la posterior unión y rompimiento del factor B y formación de la C3 convertasa de esta vía (C3bBd). La adición de un segundo fragmento de C3b a la C3 convertasa modifica su especificidad transformándola en C5 convertasa. La cascada continua hasta completarse (Thurman JM y Holers VM, 2006).

La hidrólisis de C5 por acción de su convertasa produce a C5a que es una proteína anafiláctica y a C5b que tiene la habilidad de unirse a la membrana bacteriana, reclutando a C6, C7 y C8 que forman un complejo facilitando la polimerización de C9 a través de la pared y membrana bacteriana formando un pro denominado complejo de ataque a la membrana (MAC) (Abbas AKLAHPS, 2012).

En las enfermedades periodontales, tanto gingivitis como periodontitis, se ha observado activación del complemento por vía alternativa. Esto es interesante desde el punto de vista del desarrollo de la enfermedad debido a que sugiere que incluso en presencia de anticuerpos específicos para patógenos formados en periodontitis, la mayor parte de la activación del complemento en esta enfermedad se da por la vía alternativa al contacto con *P. gingivalis* debido a que ésta es capaz de atraer factores quimiotácticos de la sangre, incluyendo a la cascada del complemento, además, un alto acarreamiento de leucocitos hacia el sitio de la lesión. Una vez ahí la lesión inicial hecha en el tejido conectivo gingival da acceso al plasma y cuando éste hace contacto con la gingipaina-1 promueve la activación del complemento y factores quimiotácticos activos (p.e. C5a) son generados (Wingrove JA y col., 1992).

3 Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa se caracteriza por su especificidad, memoria y la amplia diversidad para el reconocimiento antigénico. La respuesta adaptativa se clasifica en inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral. La inmunidad humoral es el mecanismo principal de defensa contra patógenos extracelulares y está mediada por anticuerpos específicos. Estas características son, en la mayoría de los casos, controladas por células de la inmunidad celular (Mathur A y Michalowicz BS, 1997; Hasan A y Palmer RM, 2014).

La naturaleza de la inmunidad adaptativa depende de un complejo que se desarrolla dentro de una red de interacciones moleculares y celulares. Los linfocitos T juegan un papel esencial

orquestando estos mecanismos inmunológicos y en este contexto, el balance entre las células Th1 y Th2 es crucial (Ohlrich EJ y col., 2009)

a Presentación Antigénica y Activación de la Inmunidad Adquirida

Cuando la lesión inicial es persistente y no se observa recuperación, los antígenos bacterianos son procesados y presentados por linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. Después de la presentación antigénica, dos estirpes linfocitarias han evolucionado con el propósito de eliminar patógenos extracelulares e intracelulares después de que la inmunidad innata fue rebasada. Los linfocitos B (LB) cuentan con inmunoglobulinas en su superficie, éstas funcionan como receptores antigénicos. Los anticuerpos, que son la forma soluble de las inmunoglobulinas, son secretados después de la activación de LB que tuvieron contacto con patógenos y material extraño en los espacios extracelulares. Los linfocitos T (LT) son los efectores en la inmunidad celular. El receptor antigénico presente en los LT (TCR), es capaz de reconocer fragmentos proteicos de patógenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Varios subtipos de LT eliminan a células infectadas, activan macrófagos, LB e incluso a otros LT. Así, los LT son esenciales para la regulación de las respuestas humoral y celular.

Clásicamente, los LT se han clasificado en dos subtipos basados en la expresión de las moléculas de superficie CD4 y CD8. Los LT CD4⁺ (LT cooperadores) son a su vez subdivididos en dos grupos, denominados Th1 y Th2, basados en el patrón de citocinas que producen (Murphy KM y Reiner SL, 2002). Los Th1 secretan interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ), mientras que las Th2 producen IL-4, 5, 6, 10 y 13. Ambos son capaces de producir IL-3, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF). El papel principal de la IL-2 e IFN- γ producidas por los linfocitos Th1, es potenciar la respuesta celular. Por otro lado, la IL-4 producida por los Th2, suprime la respuesta celular (Kindle L y col., 2006; Zadeh HH y col., 1999). Estos linfocitos, tanto Th1 y Th2, juegan un papel importante en el desempeño de los LB. Por ejemplo, las Th1 dirigen la secreción de IgG2 de los LB, mientras que las Th2 aumentan la secreción de IgG1 (Modlin RL y Nutman TB, 1993). Los LT CD8 (linfocitos T citotóxicos) son células efectores de la inmunidad que también secretan citocinas que son características de Th1 o de Th2 (Zadeh HH y col., 1999).

Recientemente se han descrito dos subgrupos nuevos de linfocitos CD4, Th17 (nombradas así por la característica de producir IL-17) y LT reguladores (LT regs), los cuales juegan un papel antagonista al de las células efectoras y supresoras respectivamente (Appay V y col., 2008; Sallusto F y Lanzavecchia A, 2009). Se sabe que los linfocitos Th17 tienen una función estimuladora en el proceso de osteoclastogénesis, se ha demostrado su presencia en sitios de periodontitis crónica y se han detectado las citocinas que producen en las lesiones periodontales (Ohyama H y col., 2009).

Los LT regs tienen un papel protector en el daño del tejido periodontal, éstos expresan CD4 y CD25 y específicamente regulan activación, proliferación y funciones efectoras de los LT convencionales (Cardoso CR y col., 2008). Los LT regs se han observado en enfermedad periodontal, las citocinas producidas por éstas son el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la molécula 4 asociada a linfocitos T (CTLA-4) que cesan la inflamación. Se ha reportado que la IL-10 el TGF- β y el CTLA-4 disminuyen la progresión de las enfermedades periodontales (Ohyama H y col., 2009; Appay V y col., 2008).

Los macrófagos ($M\phi$) son células fagocíticas de linaje mielóide, éstas capturan antígenos particulados y expresan moléculas MHC II para presentar antígenos a los LT. Los $M\phi$ son células ampliamente distribuidas que son indispensables para la homeostasis y la defensa, su fenotipo es dependiente del microambiente en el que se encuentren. Los macrófagos inflamatorios clásicos (M1) son activados por IFN- γ y LPS. Los macrófagos activamente activados (M2) son células importantes en la resolución de inflamación debido a que cuentan con una capacidad reducida para producir citocinas proinflamatorias (Bhatavadekar NB y Williams RC, 2009).

E CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las DCs son el puente principal entre la inmunidad innata y adaptativa. Las DCs inmaduras son residentes de tejidos periféricos, donde activamente muestrean su microambiente por medio de endocitosis y macropinocitosis hasta encontrarse con algún patógeno que logre activarlas, luego pasan a un proceso denominado maduración de DCs. Dicho proceso incluye la inducción de actividad coestimuladora, procesamiento antigénico, aumento en la expresión de moléculas MHC y migración a los ganglios linfáticos, es allí donde estimulan a los LT vírgenes. En este sentido, la

activación de la inmunidad adaptativa primaria ocurre sólo por reconocimiento antigénico mediado por las DCs (Banchereau J y Steinman RM, 1998).

Algunos estudios han demostrado la presencia de DCs inmaduras en mucosa oral. Las LCs son un tipo de DCs que se encuentran principalmente localizadas en el epitelio de la mucosa y se caracterizan por presentar un fenotipo con menor expresión de moléculas MHC clase II, niveles intermedios de CD11c y niveles muy altos de CD207; las DCs intersticiales (iDCs; equivalentes a las DCs dérmicas en la piel) se localizan en el subepitelio (Le Borgne M y col., 2006).

Las LCs y las iDCs se encuentran normalmente en la piel (Caux C y col., 1996); derivan de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ en médula ósea, y de precursores monocíticos CD11c⁺ en sangre periférica, en presencia de GM-CSF, así como de IL-4 o TNF- α (Romani N y col., 1994; Sallusto F y Lanzavecchia A, 1994). Las DCs de precursores monocíticos CD11c⁺ expresan marcadores mieloides, incluyendo CD13 y CD33. No es hasta la activación mediada por la interacción de CD40-CD40L que las DCs mieloides maduran y producen IL-12 (Cella M y col., 1996). A diferencia las DCs intersticiales, las LCs requieren de TGF- β y ambas deben originarse a partir de un precursor monocítico CD11c⁺ CD14⁺, adicionalmente las LCs puede originarse de un precursor monocítico CD11c⁺ CD14⁻ (Figura 7) (Ito T y col., 1999).

Las LCs y las iDCs comparten varios marcadores de población, pero las LCs con las únicas que expresan CD1a, gránulos de Birbeck, langerina y la molécula de adhesión E-cadherina, en contraste, las iDCs expresan el factor de coagulación XIIIa. Ambos subtipos también comparten la capacidad de activar a los LT vírgenes CD4⁺ y CD8⁺ y secretar IL-12 (Caux C y col., 1996; Dubois B y col., 1999).

Las DCs plasmacitoides son el tercer subtipo de DCs y reciben este nombre debido a su ultraestructura similar a las células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Estas DCs se encuentran en zonas de LT de los órganos linfoides, en el timo y en el torrente sanguíneo. Las DCs plasmacitoides se caracterizan por presentar un fenotipo único, CD11c⁻ CD4⁺ CD123⁺ CD45RA⁺ HLA-DR⁺, además de poseer una habilidad única de secretar rápidamente altas concentraciones de IFN- α/β ante infecciones virales (Kohrgruber N y col., 1999; Grouard G y col., 1996; Facchetti F y col., 1999).

1 Células Dendríticas de la Mucosa Oral

Varios subgrupos de DCs pueden ser identificados por su ubicación anatómica, función y expresión de distintos marcadores celulares. Debido a que existen distintos microambientes en la cavidad oral, puede encontrarse una amplia diversidad de DCs en diferentes sitios de la boca. Sin embargo, esto puede extrapolarse a la epidermis de la piel pues el epitelio oral consiste de células de Langerhans, únicas que expresan la lectina Langerina de tipo C CD207 (Allam JP y col., 2008). En ratón, las células de Langerhans pueden ser fácilmente identificadas por la expresión de CD11c, MHC-II y Ep-CAM además de langerina (Chalermarp N y Azuma M, 2009). En humanos la expresión de langerina y CD1a es característico para su identificación. Otros tipos de DCs se localizan en el tejido conectivo y lámina propia que es equivalente a la dermis en la piel. Basados en la expresión de CD11c, MHC-II, CD11b, CD103 y Langerina, las DCs en la lámina propia de ratón pueden clasificarse en 4 subclases importantes: una mayor población de DCs intersticiales que expresan MHCII, CD11c y CD11b. Dentro de esta población, una proporción más pequeña puede separarse en las DCs que expresan CD103 y Langerina. La cuarta, pertenece al grupo de CPAs que expresan MHC-II, CD11b pero son CD11c; además de que expresan F4/80 (Mascarell L y col., 2008). Por otra parte, en humanos se cuenta con limitada información de la distribución y tipos de DCs que se localizan en lámina propia, los cuales se han logrado por la identificación de DC-SIGN/ CD209 (Jotwani R y col., 2003).

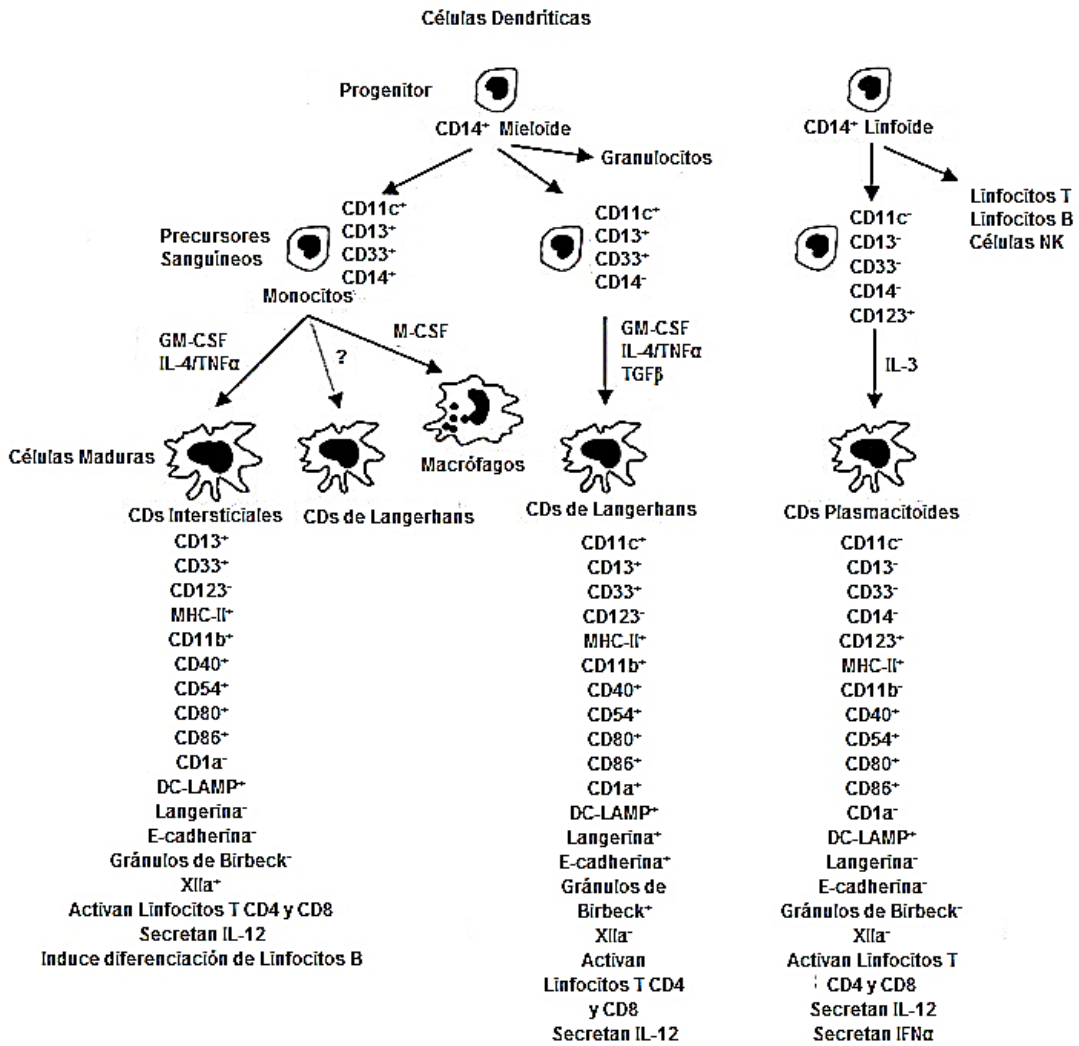


Figura 7. Esquema del origen de las células dendríticas humanas a partir de sus progenitores linfoides y mieloides. Modificada de Lipscomb MF y Masten BJ (2002).

2 Células Dendríticas en Enfermedad Periodontal

Se sabe que mientras la placa bacteriana está llevando a cabo la iniciación y progresión hacia la periodontitis crónica, el daño tisular está mediado principalmente por la respuesta inmunológica que el hospedero desarrolla ante estas bacterias. Los linfocitos T cooperadores tienen un papel crítico en la destrucción del hueso alveolar, que es el signo característico de la enfermedad. Particularmente, la expresión de RANKL que tiene una influencia crítica en la reabsorción ósea. Las DCs y LCs están estrechamente relacionadas en la transición de patogénesis de la enfermedad periodontal, asociándose al mismo tiempo a respuestas de protección y de destrucción. En este contexto, la ubicación de las células de Langerhans es un factor muy importante a considerar, puesto que si se encuentran en el epitelio de la encía están en posición para el encuentro con la colonización bacteriana. Aunado el número de células de Langerhans en la encía incrementa conforme la placa dentobacteriana se acumula y su número disminuye cuando la placa es removida. Estas observaciones sugieren que las células de Langerhans responden directamente a los cambios en la microbiota oral en conjunto al estado inflamatorio del sitio (Hovav AH, 2014).

F ANTECEDENTES

Gemmell E y col. (2002a), llevaron a cabo un estudio por medio de la técnica de inmunoperoxidasa para investigar la presencia de células dendríticas CD1a⁺, CMRF-44⁺, CMRF-58⁺, para identificarlas en estado de maduración emplearon CD83; CPAs CD14⁺ y linfocitos B CD19⁺ en biopsias de tejido gingival de 21 personas sanas en comparación con el de 25 personas con enfermedad periodontal. Se observó la presencia de numerosas células CD1a⁺ en el epitelio sin diferencias entre los grupos estudiados. El porcentaje de CD83⁺ fue mayor en relación al de CD1a⁺, CMRF-44⁺ y CMRF-59⁺. Las células CD83⁺ fueron localizadas primordialmente en áreas adyacentes a los infiltrados celulares. El porcentaje de CD14⁺ fue similar en ambos grupos, a diferencia de lo observado en CD83⁺ y el porcentaje de los linfocitos T fue mayor en el tejido enfermo.

Gemmell E y col. (2002b), llevaron a cabo un análisis en grupos con periodontitis destructiva en el que se evaluó la presencia de diferentes células presentadoras de antígeno en estos tejidos. Encontraron que no hubo diferencias en cuanto la concentración de células de Langerhans CD1a⁺

entre los grupos. En los infiltrados, la concentración de células dendríticas CD83⁺ eran las predominantes en el epitelio marginal.

Sahaya Stelin HR, Avaneendra Talwar, K. V. Arun, and T. S. S. Kumar (2009), hizo un estudio comparativo, con un análisis inmunohistológico de células de Langerhans CD1a⁺ y células NK en tejido gingival de sujetos sanos y con periodontitis. Los resultados mostraron una relación inversa entre CD1a⁺ y NK, observándose una baja concentración de las células CD1a⁺ y un incremento significativo en las células NK en presencia de la enfermedad.

Figueiras Morales ER y col. (2010), realizó un estudio en células dendríticas de pulpa dental sana y en pulpa dental inflamada en grado irreversible. Con el propósito de cuantificar y observar la distribución de CD HLA-DR⁺ por inmunohistoquímica. Los resultados demostraron que las pulpas clínicamente sanas poseen una distribución muy marcada en la zona odontoblástica. Por otra parte, en las pulpas con inflamación irreversible se encontró una distribución y un número irregular por todo el tejido, sugiriendo su actividad en la pulpa dental.

Anjana R y col. (2012), analizaron la localización de células CD1a⁺ y S100⁺ en gingiva de individuos sanos y con periodontitis crónica. Se observó que la distribución del marcador CD1a⁺ se encuentra solamente en el epitelio gingival, las S100⁺ fueron encontradas en mayor concentración en el tejido conectivo. Sin embargo, la presencia de ambas se encontró aumentada en tejidos con periodontitis en comparación con el tejido sano. Por esto, se cree que la transición de células CD1a⁺ a S100⁺ del epitelio al tejido conectivo se debe a la respuesta ante los antígenos que se observa en la patología.

IV JUSTIFICACIÓN

Es evidente que se ha avanzado en cuanto al entendimiento de la inmunología en enfermedad periodontal, sin embargo, la respuesta inmunológica en esta patología es muy compleja y se requiere de investigaciones adicionales.

Debido a que las células dendríticas tienen distintas funciones esenciales como iniciación de respuesta inmunológica, inmunotolerancia o modelación ósea, resulta importante el estudio del papel de éstas en la enfermedad periodontal. Por ello, se propone el análisis del fenotipo, la frecuencia y distribución de las células dendríticas del tejido periodontal en sujetos sanos y en sujetos que presenten enfermedades periodontales.

V HIPÓTESIS

La frecuencia, distribución o migración de las células dendríticas en el tejido gingival están afectadas por la enfermedad periodontal.

VI OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Caracterizar *in situ* la frecuencia y distribución de las células dendríticas de mucosa gingival en individuos con periodontitis crónica.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el estado histopatológico de las personas con periodontitis crónica en comparación con personas sanas.
- Determinar la frecuencia de células dendríticas de pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos.
- Determinar la ubicación de las células dendríticas en tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos.
- Comparar la distribución y número de células dendríticas en pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

1 Características del Estudio

Las muestras fueron recolectadas en la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa, posteriormente fueron procesadas en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

a Muestras Biológicas

Se tomaron muestras de tejido periodontal de aproximadamente 5 mm, el cual fue dividido para evaluación inmunofenotípica y la evaluación de la localización *in situ* de las células dendríticas que fueron clasificadas en los distintos grupos de estudio. El grupo 1 consta de muestras de personas sin enfermedad periodontal. El grupo 2 está formado por biopsias de pacientes con enfermedad periodontal. Se tomaron 15 muestras por cada grupo por medio de un muestreo no probabilístico consecutivo cuyos criterios de análisis fueron los siguientes.

b Criterios de inclusión

En el estudio fueron incluidas las muestras de individuos mexicanos sin importar el género con un rango de edad de 18 a 60 años, que hayan firmado la carta de consentimiento informado y que cumplieron con los siguientes criterios: 1) Sano (sujeto libre de enfermedad periodontal que haya acudido a realizarse alargamiento de corona o extracción molar); 2) Paciente con enfermedad periodontal (sujeto diagnosticado con enfermedad periodontal por un periodoncista).

c Criterios de exclusión

Se excluyeron las muestras de personas con diabetes, condiciones autoinmunes, tabaquismo, alcoholismo, anomalías de la glándula tiroides, enfermedades cardiovasculares, ciclo menstrual presente o embarazo; también fueron excluidos del estudio aquellas personas que tuvieron tratamiento antibiótico y/o antiinflamatorio tres días previos a la toma de la muestra, que hayan consumido alimentos 2 horas antes de la toma de muestra y los que no firmaron la carta de consentimiento informado.

d Criterios de eliminación

Fueron omitidas las muestras insuficientes, mal tomadas o con error en el procedimiento de laboratorio.

2 Diagnóstico de los sujetos de estudio

El diagnóstico fue realizado por expertos certificados adscritos a la Clínica de la Facultad de Odontología, con base a la exploración oral y sondeo y profundidad de bolsa periodontal.

a Enfermedad periodontal

La enfermedad fue diagnosticada con base en el índice gingival siguiendo los criterios de Lobene RR (1986): 0, ausencia de inflamación; 1, Inflamación leve (leve cambio de coloración, poco cambio en la textura de alguna porción pero no de toda la encía marginal y papilas gingivales); 2, Inflamación leve general (criterios como los anteriores pero abarca toda la encía marginal y papilas gingivales); 3, Inflamación moderada (encía brillante, con enrojecimiento, edema o hipertrofia de la encía marginal y papilas gingivales); 4, Inflamación severa (marcado enrojecimiento, edema, hipertrofia de la encía marginal y papilas gingivales, sangrado espontáneo, congestión y/o ulceración).

La salud gingival fue medida en 6 órganos dentales índices (16, 12, 24, 36, 32 y 44) usando el índice modificado de gingivitis se evaluaron 6 superficies de cada órgano dental (distal, centro y mesial de cara vestibular/bucal y distal, centro y mesial de la cara palatina/lingual), el cual se obtuvo sumando las escalas y dividiendo por el número de dientes examinados.

Los casos más severos fueron determinados por los índices de profundidad de bolsa periodontal y por el índice de pérdida de inserción (Armitage GC, 1999) con profundidad del surco >3 mm. Se clasificó con base en su extensión y severidad (Mittal V, Bhullar, R. P., Bansal, R., Singh, K., Bhalodi, A., Khinda, P. K., 2013): extensión incidental (un diente afectado), localizada (2-7 dientes afectados) y generalizada (más de 7 dientes afectados). Severidad media (pérdida ósea <1/3 de superficie radicular), moderada (pérdida ósea >1/3 y < 2/3 de superficie radicular) y severo (pérdida ósea > 2/3 de superficie radicular).

La profundidad de la bolsa se evaluó con una sonda periodontal de Michigan graduada en milímetros (0 a 10). Se insertó la sonda de forma paralela al eje axial del diente desplazándola por toda la circunferencia de la superficie de los dientes midiendo la profundidad desde el borde marginal libre de la encía hasta el fondo del surco gingival. La pérdida de inserción clínica se obtuvo midiendo la distancia a partir de la unión epitelial hasta la unión cemento-esmalte. La cantidad de hueso alveolar reabsorbido se evaluó con radiografías.

3 Obtención de las muestras

Las biopsias de tejido gingival de 5 mm fueron obtenidas de pacientes con gingivitis y periodontitis crónica (restos de tejido derivados de cirugías periodontales) y de individuos sanos (restos de tejidos derivados de tratamientos de alargamiento coronario y de extracción de molares). Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf 1.7 mL con PBS 1X estéril y transportadas al laboratorio para posteriormente ser procesadas.

a Expedientes

Fueron elaborados expedientes de los sujetos de estudio, se realizó un cuestionario que contiene datos generales del paciente, por ejemplo, si padecen o no de enfermedades sistémicas o si tienen algún tipo de tratamiento farmacéutico. La historia clínica detalla el estado de las piezas dentales, tratamiento odontológico previo, sangrado gingival, frecuencia de higiene oral y uso de auxiliares de la misma. Se realizaron exámenes bucales a los sujetos, los cuales constan de exploración de labios, piso de la boca, paladar, mucosa vestibular, glándulas salivales y lengua. También se efectuaron otras pruebas como el odontograma y el periodontograma (Anexo 1. Cuestionario, consentimiento informado y periodontograma aplicados al sujeto de estudio.).

4 Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el Comité de ética del Posgrado en Endodoncia de Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en diciembre del 2013 (Anexo 2. Carta de aceptación del protocolo aprobado por el comité de ética.).

Se dio información y explicación de forma verbal y por escrita a los pacientes, acerca del propósito, las ventajas y desventajas del estudio, y se pidió que firmen la Carta de Consentimiento Informado si están de acuerdo a procedimiento.

Las evaluaciones periodontales, así como la toma de muestras de placa dentobacteriana y biopsia gingival se realizaron respetando las normas del Comité de Investigación y de acuerdo a las medidas de control de infecciones de la NOM-013-SSA2.

El historial clínico de los pacientes y los resultados obtenidos son confidenciales.

El desecho de las muestras se realizó por medio de una compañía especializada, contratada permanentemente por la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

B METODOLOGÍA

1 Preparación de las Muestras

Los tejidos se colocaron en PBS 1X pH 7.4 estéril y fueron transportados en frío al laboratorio. Las muestras se cortaron, fueron incluidas y orientadas en PolyFreeze (Sigma-Aldrich) para posteriormente congelarlas en nitrógeno líquido y ser almacenados hasta el momento de ser procesados.

2 Procesamiento de las Muestras

Las muestras fueron cortadas en un crióstato (Leica CM1860 UV) realizando cortes seriados de 7 μm de grosor, los cortes fueron recuperados en portaobjetos previamente desgrasados y tratados con 10% de Poly-L-Lisina (Sigma-Aldrich) para evitar el desprendimiento del tejido. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos horas y después fueron fijados con acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez fijados se dejaron secar a temperatura ambiente y las laminillas fueron guardadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

3 Tinción Hematoxilina y Eosina (H&E)

Se realizó tinción de Hematoxilina y Eosina sobre las muestras para la interpretación histológica de los tejidos.

Para la tinción fueron colocados dos secciones de tejido gingival en un portaobjetos, fueron cubiertos con hematoxilina de Harris durante un minuto para la coloración nuclear, se lavaron con agua tridestilada y posteriormente cubiertos con bicarbonato de sodio 0.02% como solución mordiente y nuevamente lavados, finalmente se cubrieron con eosina durante diez segundos para generar contraste. Al finalizar la tinción, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente fueron montadas con Entellan New (Merck Millipore) para su preservación y evaluación por microscopía de campo claro y análisis histológico. Se tomaron imágenes de la preparación completa por escaneo con el microscopio

4 Inmunofluorescencia (IF)

Se realizaron secciones dobles de tejido gingival (teniendo cuatro pocillos de reacción con dos secciones cada uno), fueron rodeados con una barrera hidrofóbica para evitar la pérdida de las soluciones con la ayuda de una pluma hidrofóbica (NovoPen Novocastra – Leica Biosystem) dejándolo secar por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente los tejidos se incubaron con solución de bloqueo (Anexo 3. Soluciones para inmunofluorescencia.) durante 30 minutos a temperatura ambiente, al cabo de la incubación fue retirado el exceso de líquido. Los pocillos fueron incubados a 4 °C durante toda la noche con el anticuerpo primario [IgG1 Mouse Anti-Human CD1a (Abcam)] a una dilución de 1:100 en buffer de bloqueo, Al cabo de la incubación las laminillas fueron lavadas 3 veces en buffer de lavado (Anexo 3. Soluciones para inmunofluorescencia.) durante 3 minutos y se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo secundario [Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)] a una dilución de 1:800 en buffer de dilución (Anexo 3. Soluciones para inmunofluorescencia.). Las laminillas se lavaron nuevamente. Una vez finalizada la hibridación las laminillas fueron montadas con Fluoroshield con DAPI (Sigma Aldrich) para proteger la fluorescencia y al mismo tiempo generar fluorescencia de contraste.

Al mismo tiempo se realizaron los controles necesarios para la validación de la técnica. Para ellos se utilizó uno de los pocillos para el control de isotipo, se incubó el anticuerpo primario (IgG1 Mouse Anti-Human Pepsinogen I) a una dilución 1:100. Al control negativo se le agregó buffer de bloqueo sin anticuerpo; ambos controles fueron también incubados toda la noche a 4 °C,

relocalizaron los lavados y se incubaron también con Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) dilución 1:800.

5 Microscopía

Se realizó microscopía de campo claro para la observación de las preparaciones teñidas con H&E con un microscopio (Leica DMI8, Leica Biosystems) con el objetivo de 63X con la función Stage Map para obtener el tejido completo en una sola imagen con el software LAS (Leica Mycosystem).

Las muestras fueron adquiridas en un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Leica Biosystems) observadas en el objetivo de 10X utilizando microscopía de confocal con el láser diodo de estado sólido a 488 nm para la visualización del marcaje CD1a positivo y 405 UV para la visualización de los núcleos teñidos con DAPI.

Se midió el área total, área epitelial y área de tejido conectivo a las muestras y el marcaje positivo fue contado con ayuda del software ImageJ 1.50i e interpretadas en células/mm².

6 Análisis Estadístico

Los datos de las variables cuantitativas fueron reportados como su media \pm SD y las diferencias entre los grupos serán evaluadas mediante *t* student y ANOVA con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para los datos categóricos, los porcentajes se tabularán y graficarán y las diferencias se evaluarán mediante la prueba χ^2 o la exacta de Fisher (Aguilar-Medina M y col., 2010). Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como significativo para todas las pruebas. Para todos los análisis se utilizaron los softwares Office Excel 2013 y IBM SPSS v20.0 (IBM SPSS inc., Chicago, IL).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A HISTOPATOLOGÍA

Los individuos sanos mostraron morfologías comunes, el epitelio se encontraba normal sin alteraciones morfológicas y ausencia de hiperchromatismo en los núcleos. El tejido epitelial mostró características normales paraqueratinizados, en algunas ocasiones con presencia de acantosis focal e hiperplasia pseudonematosa, lo cual suele ser causado por factores traumatológicos como técnicas de cepillado dental, tipo de alimentos o masticación.

El grupo de pacientes con periodontitis se observó acantosis y/o hiperplasia epitelial. No se observó presencia de hiperchromatismo nuclear, lo cual descarta defectos de mitosis. Se observó la presencia de malformaciones celulares en algunos de los casos y en la mayoría vacuolización afoplasmática causada por exocitosis de infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario haciendo visibles a los desmosomas intercelulares.

En el tejido conectivo de los sujetos sanos se observó la presencia de infiltrado leucocitario de tipo linfocitario con presencia de algunas células plasmáticas, que en ninguno de los casos invadió al tejido epitelial. El colágeno se observó condensado sin alteraciones en la morfología de los fibroblastos (Figura 8).

En el tejido conectivo de los pacientes con periodontitis se observó predominante infiltrado inflamatorio leucocitario y linfoplasmocitario. En algunos casos se trataba de infiltrado en parches o difuso a lo largo del tejido conectivo (Figura 9).

Durante el análisis de los tejidos de individuos sanos y de pacientes con periodontitis se observaron diferencias histológicas que en el caso de los pacientes pueden ser atribuidas a la enfermedad periodontal, ya que se observó infiltrado linfocitario y la presencia de células plasmáticas por su morfología típica, lo cual denota un proceso crónico. El infiltrado logró penetrar el estrato basal invadiendo la región del epitelio de unión (región adyacente al tejido de unión con el diente, donde se produce la bolsa periodontal), provocando una alteración en el arreglo de las células y forzando a los desmosomas a estirarse hasta provocar su ruptura, que fue evidente al analizar las muestras de los pacientes.

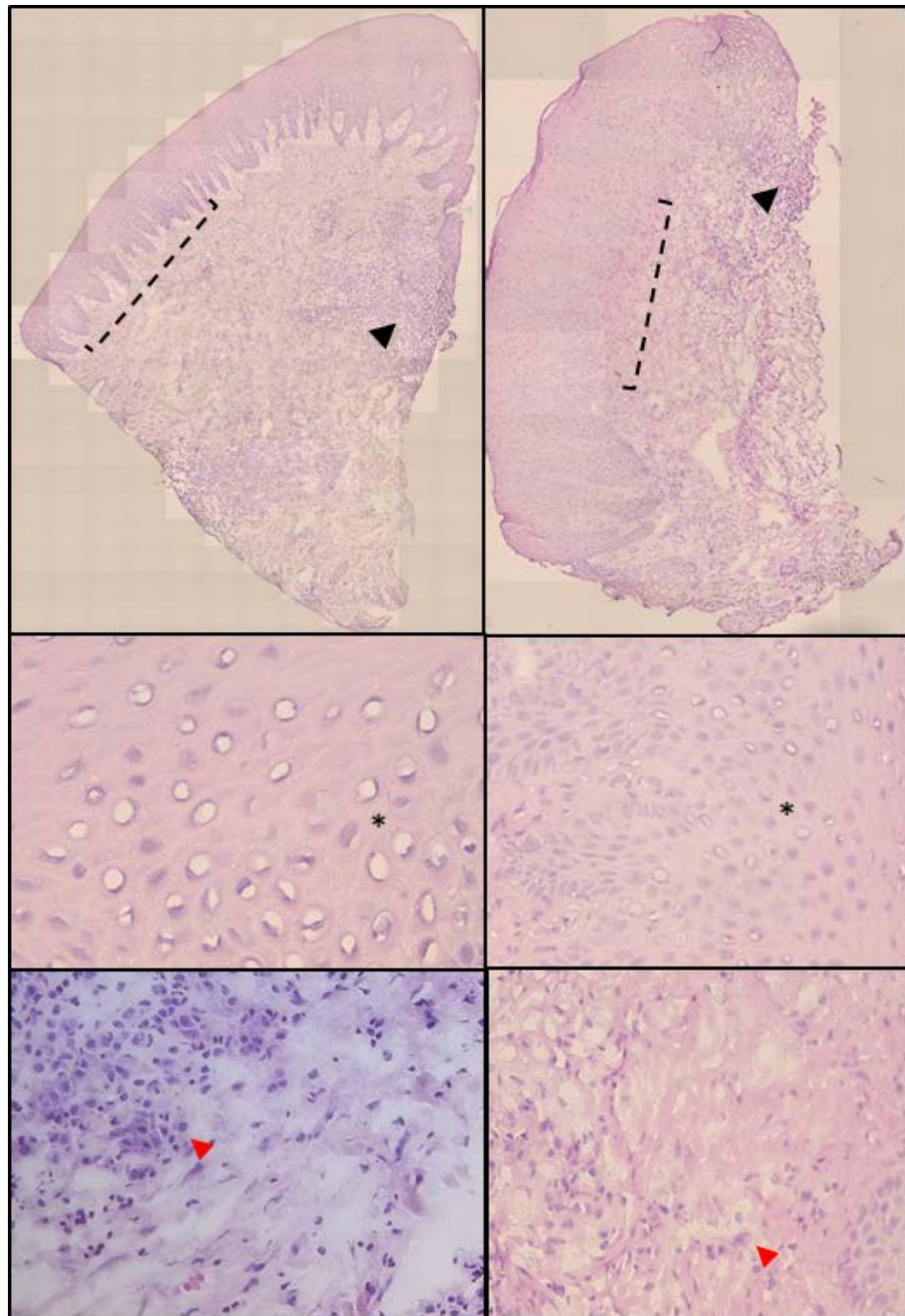


Figura 8. Tinción H&E de tejido gingival de sujetos sanos. (- - -) crestas epidermicas regulares que carecen de hiperplasia y/o acantosis (▼) Se muestra infiltrado leucocitario normal que no compromete el epitelio. (*) uniones intercelulares regulares, desmosomas normales. (▼) Acercamiento al infiltrado con presencia de escasas células plasmáticas.

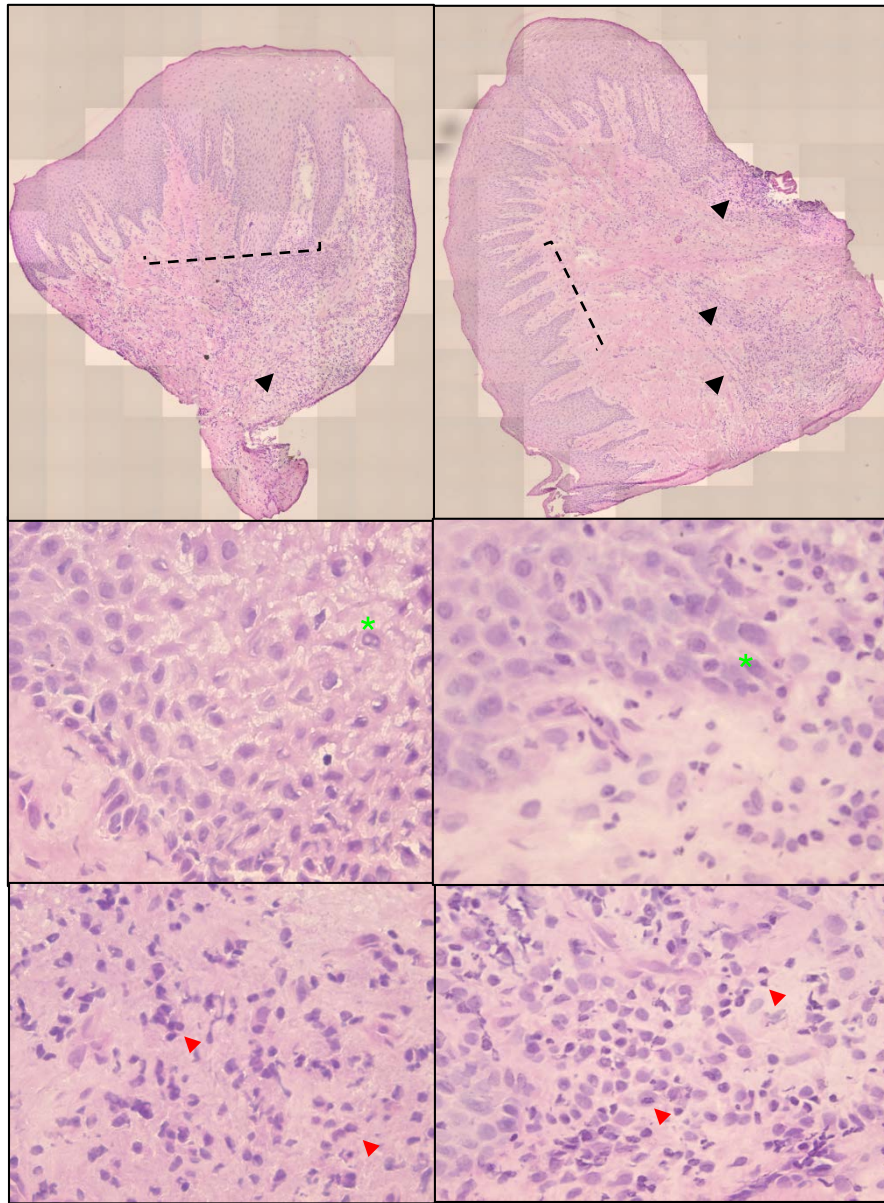


Figura 9. Tinción H&E de tejido gingival de pacientes con periodontitis. (- - -) crestas epidermicas irregulares con hiperplasia y/o acantosis (▼). Se muestra infiltrado linfocitario abundante en parches con exocitosis que invade al epitelio (*). uniones intercelulares irregulares, los desmosomas se aprecian estirados por la presencia de infiltrado (▼). Acercamiento al infiltrado con presencia de células plasmáticas y algunos PMN.

Los cambios histopatológicos causado por la enfermedad periodontal han sido estudiados extensamente en humanos adultos y en modelo animal. El tejido sano se caracteriza principalmente por tejido conectivo y colágeno denso, y la ausencia o escasa presencia de agrupaciones de células inflamatorias. En lesiones iniciales en el epitelio de unión se observa la presencia de neutrófilos y la existencia de vasos sanguíneos que favorecen la permeabilidad para que haya infiltrado inflamatorio en las lesiones con mayor cronicidad. Las lesiones establecidas en adultos persisten por largos periodos con un infiltrado inflamatorio exacerbado las cuales se vuelven “agresivas” progresando hasta las lesiones avanzadas (Ranney RR y col., 1981). Esto coincide con nuestros resultados puesto que el infiltrado en las personas sanas se mantenía escaso, el colágeno se encontró estable, así mismo, se presentó ausencia de lesiones. Mientras que las muestras con una lesión establecida se caracterizaron por la alta presencia de infiltrados inflamatorios de tipo linfoplasmocitario lo cuál se debe a la cronicidad y severidad de las enfermedades periodontales.

B MARCAJE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CD1A⁺

CD1a es un marcador de DCs inmaduras presentes en tejidos periféricos de exposición (por ej piel, mucosas), las cuales, dependiendo al microambiente en el cual estén sometidas pueden activarse y expresar otros marcadores de superficie que les permiten migrar y madurar. Los monocitos presentes en el sitio pueden diferenciarse en células dendríticas inmaduras que expresan CD1a, las DCs provenientes de monocitos por estímulo bacteriano se activan y posteriormente maduran y cumplen funciones inmunológicas como activación y presentación de antígeno. No obstante, las DCs inmaduras de linaje monocítico expresan al mismo tiempo el receptor de membrana RANK que por estimulación antigénica o por interacción con linfocitos T CD4⁺ vía RANK/RANKL dan lugar a osteoclastos derivados de células dendríticas (Alnaeeli M y col., 2007).

Se investigó la presencia células dendríticas mediante la técnica de Inmunofluorescencia usando el marcador CD1a. Se observó la presencia de células dendríticas con su morfología típica mayoritariamente en el área correspondiente al tejido epitelial de las encías y con menor frecuencia en el tejido conectivo en ambos grupos de estudio (Figura 10). El número de células con marcaje positivo para CD1a fue contado por área de tejido epitelial, área de tejido conectivo y área de tejido

total. En el área del epitelio se encontró mayor frecuencia células positivas para CD1a en los individuos sanos con una media de 35.03 ± 30.38 células/mm², mientras que en los pacientes con periodontitis se obtuvo una media de 23.92 ± 18.74 células/mm², sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.250$).

En la región correspondiente al tejido conectivo se encontraron frecuencias inversas. Se encontró menor proporción de células CD1a⁺ en sujetos sanos (1.63 ± 1.50 células/mm²) que en los pacientes (1.66 ± 2.20 células/mm²) sin diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.365$).

En lo que respecta al tejido total la frecuencia también fue mayor en el grupo de sujetos sanos (12.89 ± 8.78 células/mm²), que en el grupo de los pacientes (9.43 ± 5.99 células/mm²) y no se mostraron diferencias significativas ($p = 0.230$) (Figura 11).

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Stelin S y col. (2009), los cuales también observaron una mayor proporción de células CD1a⁺ en personas sanas en comparación de las personas con enfermedades periodontales aunque ellos sí encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$). Cabe mencionar que en esta investigación se analizaron 25 muestras mientras que en la nuestra sólo fueron 15. Así mismo, cabe mencionar que hubo diferencias en ciertos parámetros de inclusión en el grupo de pacientes en ambos estudios, como la profundidad de bolsa.

En nuestro estudio fueron incluidas las biopsias de cuyas personas tenían una bolsa periodontal con profundidades a partir de 3 mm, mientras que otros estudios los incluyen de profundidades superiores a 5 mm. Es bien conocido que la profundidad de bolsa está directamente relacionada con la cronicidad y la severidad de la enfermedad, lo cual explica el menor número de DCs en la frecuencia en el sitio debido a que existen otros factores de la inmunidad del hospedero como células plasmáticas y linfocitos. Además, cuan más avanzada esté la enfermedad se puede encontrar daños más exacerbados en el tejido y procesos como la destrucción (reabsorción) del hueso alveolar se encuentra en proceso. Esto compromete a las células dendríticas a cambiar su función e incluso su estirpe, ya que se ha demostrado que las DCs pueden transdiferenciarse en osteoclastos por la presencia de RANKL, GM-CSF e IL-4, por lo que la presencia de la molécula CD1a tiende a disminuir (Rivollier A y col., 2004).

Contrariamente, Anjana R y col. (2012) observaron una mayor cantidad de DCs en pacientes con periodontitis, además, no detectaron marcaje positivo para CD1a en el área del tejido conectivo en sanos y enfermos. En dicho estudio los grupos fueron conformados por sólo diez individuos cada uno y para la toma de muestra, los pacientes tenían que mostrar una profundidad de bolsa a partir de 2 mm, lo cual se observa en condiciones sin enfermedad. La tendencia que observaron en estos pacientes con periodontitis puede ser debida a que los criterios o condiciones que fueron tomadas en cuenta para el grupo no cumplen las características de la enfermedad periodontal. Basándose entonces en otros criterios de enfermedad periodontal, debieron ser personas con inflamación aguda, lo que se traduce en una presencia elevada de células presentadoras en antígeno en el sitio, tal es el caso de las células dendríticas. La ausencia de células en la lámina propia podría atribuirse principalmente a que se trata de una respuesta inflamatoria relativamente reciente y por ello todo el marcaje se vio inclinado hacia el epitelio de la encía. Además, la población de estudio analizada por Anjana R y col. (2012) fue de origen Hindú, por lo que el fondo genético podría ser un factor a favor del desarrollo de la enfermedad.

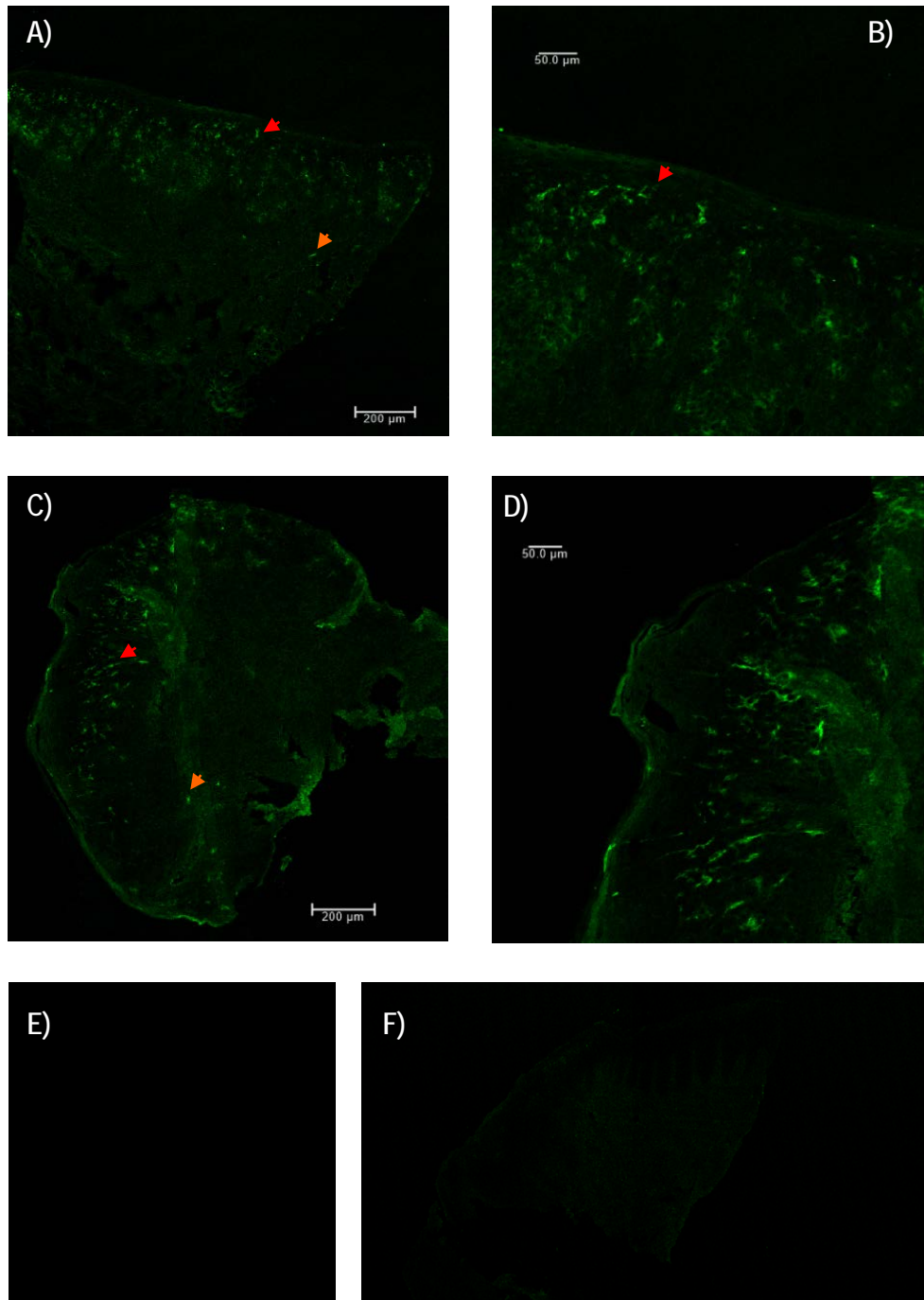


Figura 10. Micrografías de Células Dendríticas CD1a⁺. A) Sujeto sano, inmunomarcaje de CD1a. B) Magnificación. C) Detección de células CD1a⁺ en paciente con periodontitis. D) Magnificación de paciente con periodontitis. E) Control de isotipo. F) control de anticuerpo secundario (▼) Células CD1a⁺ en epitelio (▼) Células CD1a⁺ en tejido conectivo.

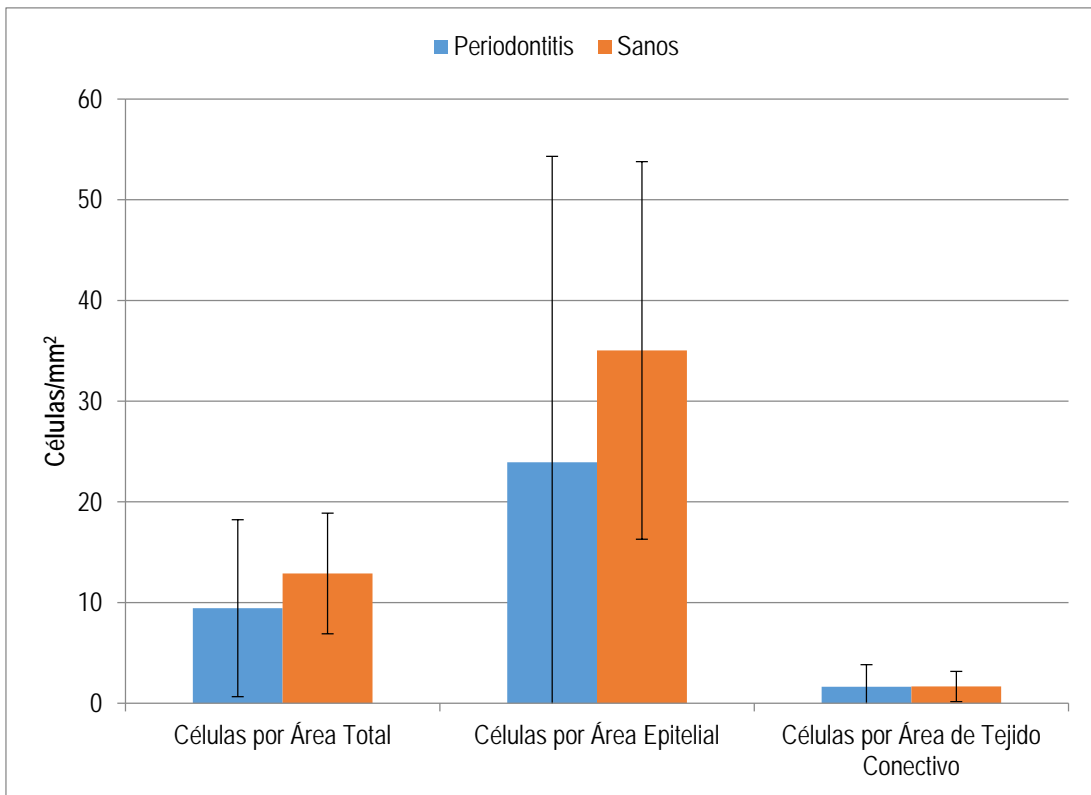


Figura 11. Frecuencia de Células CD1a⁺ por diferentes áreas del tejido gingival.

C DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Se observó que el posicionamiento de las DCs en el grupo de los sujetos sanos fue más cercano al estrato córneo del tejido epitelial (hacia al exterior del tejido) por lo que se decidió realizar tres mediciones al azar en cada tejido con la ayuda del software LAS X de Leica. Los resultados mostraron una distancia media de $61.34 \pm 24.85 \mu\text{m}$ en el tejido sano. Por otra parte, en el grupo de pacientes con periodontitis se observó una tendencia diferente, en este caso las células se ubicaron con mayor frecuencia hacia el estrato basal del tejido (más alejadas del exterior) con una distancia media de $124.35 \pm 32.56 \mu\text{m}$ (Figura 12). En este sentido, se observó una marcada diferencia estadísticamente significativa en estos parámetros ($p=2.885E^{-06}$) (Figura 13).

Stelin S y col. (2009), observó un comportamiento similar, las células con marcaje positivo a CD1a se localizaron en la parte superior del tejido epitelial, mientras que en sujetos con enfermedades periodontales la localización en la mitad del mismo. En este estudio no se realizó la medición de la distancia a la que se encontraban las DCs en el tejido epitelial, esta diferencia en la distribución de las DCs en ambos grupos puede deberse a que las células se encuentran en contacto con los antígenos bacterianos, entrando en proceso de activación para llevar a cabo la migración hacia los ganglios linfáticos. No obstante, en esta investigación no encontraron marcaje en la región del tejido conectivo.

No se ha encontrado estudios que expliquen la tendencia que tomaron la DCs por su posicionamiento en condiciones de enfermedad periodontal. Por ello, nos tomamos a la tarea de cuantificar la distancia y realizar la comparación entre la salud y enfermedad.

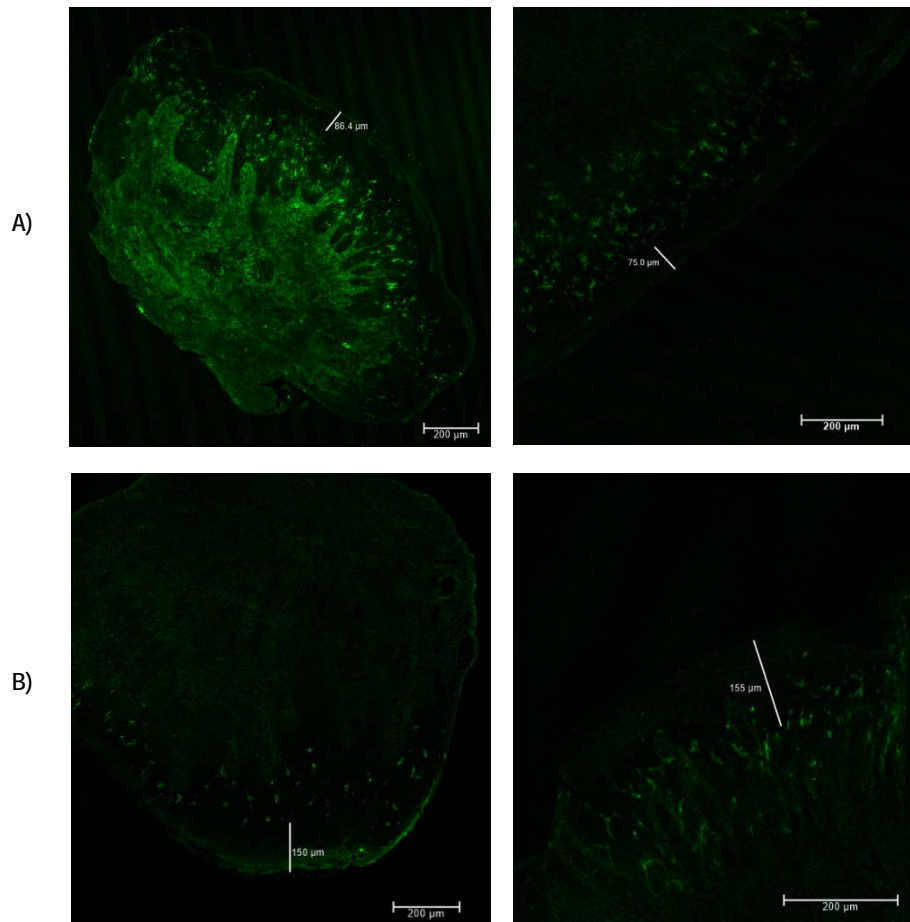


Figura 12. Micrografías de medición de la distancia de ubicación de DCs CD1a⁺ desde el estrato córneo del tejido gingival. A) Muestras de sujetos sanos. B) muestra de pacientes con periodontitis.

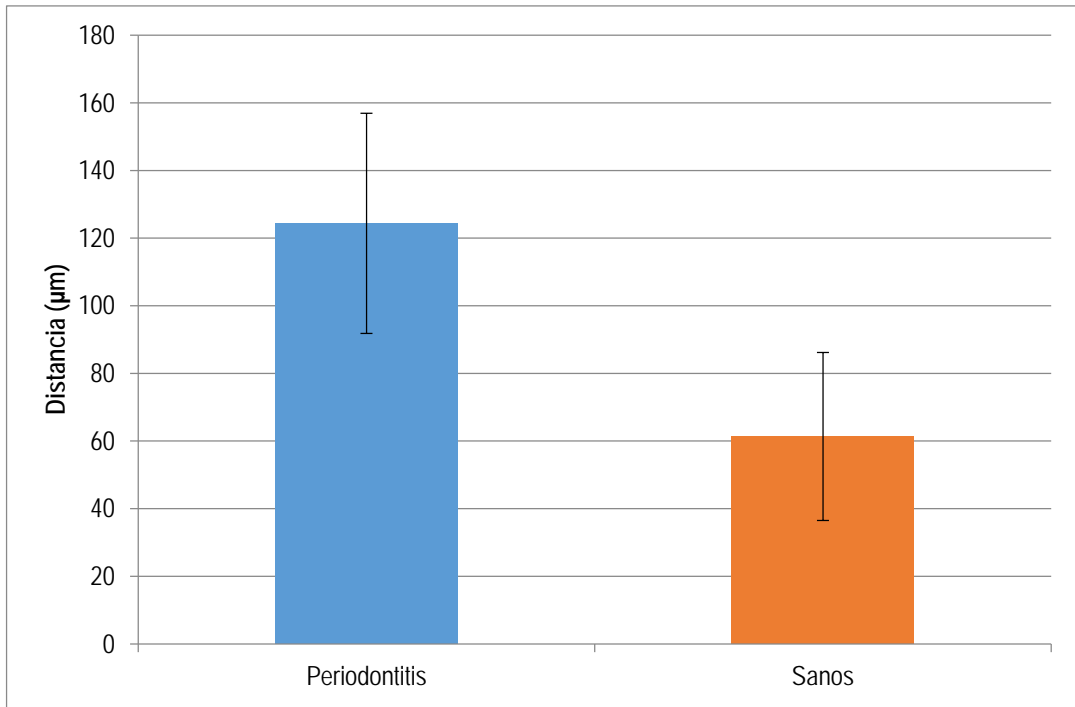


Figura 13. Gráfica de la medición de la posición del agrupamiento de las células dendríticas a partir de estrato córneo del tejido.

IX CONCLUSIONES

Se realizó la comparación histológica de tejido gingival entre personas sanas y personas con periodontitis crónica, observándose diferencias en el tipo de infiltrado celular, en el arreglo de los desmosomas y las crestas epiteliales.

Se estableció que en las personas sanas el infiltrado se mantuvo escaso con característica focal en el cual predominaban poblaciones linfocitarias y que dicho infiltrado no invade al tejido epitelial, permitiendo su morfología normal.

Por otra parte, pudo identificarse de manera visual que el infiltrado en los sujetos con enfermedad periodontal es más abundante y con características focales en el cual predominan linfocitos y algunos polimorfonucleares, también existe la presencia de células plasmáticas. Se pudo observar que los linfocitos invaden el tejido epitelial modificando su morfología, que los desmosomas se deformen.

Se logró identificar la presencia de células dendríticas CD1a⁺ en tejido gingival de personas sanas y con periodontitis crónica por medio de la técnica de Inmunofluorescencia.

la presencia de células dendríticas en personas con enfermedad periodontal fue menos abundante que en sujetos sanos. Sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa en la presente investigación

Las células dendríticas en personas enfermas presentan una tendencia por ubicarse más cercanas al estrato basal del tejido (sitio adyacente a vasos sanguíneos y linfáticos) lo que puede ser indicativo de un posible proceso de activación y migración de dichas células.

X PERSPECTIVAS

Caracterizar las células *in situ* que conforman el infiltrado con marcadores distintivos para linfocitos T (CD4, CD8, $\gamma\delta$) y linfocitos B (CD19).

Analizar el estado de activación y maduración de las células dendríticas empleando ensayos de doble marcaje (CD86 y CD83 respectivamente)

Mediante ensayos de colocalización por microscopía confocal evaluar si las células dendríticas expresan marcadores simultáneos de activación y maduración en personas con enfermedad periodontal.

XI BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AKLAHPS. 2012. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Aguilar-Medina M, Ramos-Payan R, Arambula-Meraz E, Sanchez-Torres L, Favila-Castillo L. 2010. Parasitaemia Levels in Plasmodium Chabaudi Infected-Mice Modify Ifn-Gamma and Il-10 Expression after a Homologous or Heterologous Challenge. *Parasite Immunology*, 32(4):267-74.
- Albandar JM. 2005. Epidemiology and Risk Factors of Periodontal Diseases. *Dental Clinics of North America*, 49(3):517-32, v-vi.
- Alnaeeli M, Park J, Mahamed D, Penninger JM, Teng YT. 2007. Dendritic Cells at the Osteo-Immune Interface: Implications for Inflammation-Induced Bone Loss. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal Of The American Society For Bone And Mineral Research*, 22(6):775-80.
- Allam JP, Stojanovski G, Friedrichs N, Peng W, Bieber T, Wenzel J, Novak N. 2008. Distribution of Langerhans Cells and Mast Cells within the Human Oral Mucosa: New Application Sites of Allergens in Sublingual Immunotherapy? *Allergy*, 63(6):720-7.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. 1997. A Homologue of the Tnf Receptor and Its Ligand Enhance T-Cell Growth and Dendritic-Cell Function. *Nature*, 390(6656):175-9.
- Anjana R, Joseph L, Suresh R. 2012. Immunohistochemical Localization of Cd1a and S100 in Gingival Tissues of Healthy and Chronic Periodontitis Subjects. *Oral Diseases*, 18(8):778-85.
- Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. 2008. Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(11):975-83.
- Armitage GC. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, 4(1):1-6.

- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature*, 392(6673):245-52.
- Bascones-Martinez A, Munoz-Corcuera M, Noronha S, Mota P, Bascones-Ilundain C, Campo-Trapero J. 2009. Host Defence Mechanisms against Bacterial Aggression in Periodontal Disease: Basic Mechanisms. *Medicina Oral, Patologia Oal y Cirugia Bucal*, 14(12):e680-5.
- Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. 1997. The Periodontal Ligament: A Unique, Multifunctional Connective Tissue. 13(1):20-40.
- Bhatavadekar NB, Williams RC. 2009. Modulation of the Host Inflammatory Response in Periodontal Disease Management: Exciting New Directions. *International Dental Journal*, 59(5):305-8.
- Bodineau A, Coulomb B, Tedesco AC, Segulier S. 2009. Increase of Gingival Matured Dendritic Cells Number in Elderly Patients with Chronic Periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 54(1):12-6.
- Bosshardt DD, Selvig KA. 1997. Dental Cementum: The Dynamic Tissue Covering of the Root. 13(1):41-75.
- Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Junior WM, Rossi MA, Silva JS. 2008. Characterization of Cd4+Cd25+ Natural Regulatory T Cells in the Inflammatory Infiltrate of Human Chronic Periodontitis. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(1):311-8.
- Carvalho FM, Tinoco EMB, Deeley K, Duarte PM, Faveri M, Marques MR, Mendonça AC, Wang X, Cuenco K, Menezes R, Garlet GP, Vieira AR. 2010. *Fam5c* Contributes to Aggressive Periodontitis. 5(4):e10053.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. 1996. Cd34+ Hematopoietic Progenitors from Human Cord Blood Differentiate Along Two Independent Dendritic Cell Pathways in Response to Gm-Csf+Tnf Alpha.
- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. 2014. Inflammatory and Immune Pathways in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Periodontology 2000*, 64(1):57-80.

- Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. 1996. Ligation of Cd40 on Dendritic Cells Triggers Production of High Levels of Interleukin-12 and Enhances T Cell Stimulatory Capacity: T-T Help Via Apc Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(2):747-52.
- Chalermarp N, Azuma M. 2009. Identification of Three Distinct Subsets of Migrating Dendritic Cells from Oral Mucosa within the Regional Lymph Nodes. *Immunology*, 127(4):558-66.
- Chen FM, Jin Y. 2010. Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(2):219-55.
- Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. 2005. Prostaglandin E(2) Is a Main Mediator in Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand-Dependent Osteoclastogenesis Induced by Porphyromonas Gingivalis, Treponema Denticola, and Treponema Socranskii. *Journal of Periodontology*, 76(5):813-20.
- Chung WO, Demuth DR, Lamont RJ. 2000. Identification of a Porphyromonas Gingivalis Receptor for the Streptococcus Gordonii SspB Protein. *Infection and Immunity*, 68(12):6758-62.
- Darveau RP. 2010. Periodontitis: A Polymicrobial Disruption of Host Homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7):481-90.
- Darveau RP, Tanner A, Page RC. 1997. The Microbial Challenge in Periodontitis. *Periodontology 2000*, 14:12-32.
- Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. 2013. Principles of Periodontology. *Periodontology 2000*, 61(1):16-53.
- Dubois B, Barthelemy C, Durand I, Liu YJ, Caux C, Briere F. 1999. Toward a Role of Dendritic Cells in the Germinal Center Reaction: Triggering of B Cell Proliferation and Isotype Switching. *Journal of Immunology*, 162(6):3428-36.
- Dunkelberger JR, Song WC. 2010. Complement and Its Role in Innate and Adaptive Immune Responses. *Cell Research*, 20(1):34-50.

- Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. 2002. The Novel Human Beta-Defensin-3 Is Widely Expressed in Oral Tissues. *European Journal of Oral Sciences*, 110(2):121-4.
- Ebersole JL, Dawson DR, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, González OA. 2013. Periodontal Disease Immunology: 'Double Indemnity' in Protecting the Host. 62(1):163-202.
- Enwonwu CO, Salako N. 2012. The Periodontal Disease–Systemic Health–Infectious Disease Axis in Developing Countries. 60(1):64-77.
- Facchetti F, Candiago E, Vermi W. 1999. Plasmacytoid Monocytes Express IL3-Receptor Alpha and Differentiate into Dendritic Cells. *Histopathology*, 35(1):88-9.
- Feller L, Altini M, Khammissa RA, Chandran R, Bouckaert M, Lemmer J. 2013. Oral Mucosal Immunity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 116(5):576-83.
- Figueiras Morales ER, Cardiel Nieves M, Jacinto Alemán LF, Ballesteros Vizcarra A, Chávez Bolado E, García Aranda LR, Hernández Guerrero JC. 2010. Inmunoexpresión De Células Dendríticas En Pulpas Clínicamente Sanas E Inflamadas En Grado Irreversible. 14(2):85-90.
- Fisman EZ, Adler Y, Tenenbaum A. 2008. Biomarkers in Cardiovascular Diabetology: Interleukins and Matrixins. *Advances in Cardiology*, 45:44-64.
- Fumarulo R, Giordano D, Laforgia A, Larocca A, Quarto M. 1993. Salivary Effects on Polymorphonuclear Leukocyte Functions. *Oral Microbiology and Immunology*, 8(2):125-7.
- Gemmell E, Carter CL, Hart DN, Drysdale KE, Seymour GJ. 2002a. Antigen-Presenting Cells in Human Periodontal Disease Tissues. *Oral Microbiology and Immunology*, 17(6):388-93.
- Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. 1997. Cytokines and Prostaglandins in Immune Homeostasis and Tissue Destruction in Periodontal Disease. *Periodontology 2000*, 14:112-43.
- Gemmell E, Seymour GJ. 2004. Immunoregulatory Control of Th1/Th2 Cytokine Profiles in Periodontal Disease. *Periodontology 2000*, 35:21-41.

- Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. 2002b. Destructive Periodontitis Lesions Are Determined by the Nature of the Lymphocytic Response. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 13(1):17-34.
- Glickman I, Carranza FA. 1990. Glickman's Clinical Periodontology: Saunders.
- Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu YJ. 1996. Dendritic Cells Capable of Stimulating T Cells in Germinal Centres. *Nature*, 384(6607):364-7.
- Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. 2006. The Effect of Periodontal Therapy on the Composition of the Subgingival Microbiota. *Periodontology 2000*, 42:219-58.
- Hasan A, Palmer RM. 2014. A Clinical Guide to Periodontology: Pathology of Periodontal Disease. *British Dental Journal*, 216(8):457-61.
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. 1999. Virulence Factors of Porphyromonas Gingivalis. *Periodontology 2000*, 20:168-238.
- Hovav AH. 2014. Dendritic Cells of the Oral Mucosa. 7(1):27-37.
- Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J, Saeland S, Fukuhara S, Ikehara S. 1999. A Cd1a+/Cd11c+ Subset of Human Blood Dendritic Cells Is a Direct Precursor of Langerhans Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(3):1409-19.
- Jotwani R, Pulendran B, Agrawal S, Cutler CW. 2003. Human Dendritic Cells Respond to Porphyromonas Gingivalis Lps by Promoting a Th2 Effector Response in Vitro. *European Journal of Immunology*, 33(11):2980-6.
- Kindle L, Rothe L, Kriss M, Osdoby P, Collin-Osdoby P. 2006. Human Microvascular Endothelial Cell Activation by Il-1 and Tnf-Alpha Stimulates the Adhesion and Transendothelial Migration of Circulating Human Cd14+ Monocytes That Develop with Rankl into Functional Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21(2):193-206.

- Kohrgruber N, Halanek N, Groger M, Winter D, Rappersberger K, Schmitt-Egenolf M, Stingl G, Maurer D. 1999. Survival, Maturation, and Function of Cd11c- and Cd11c+ Peripheral Blood Dendritic Cells Are Differentially Regulated by Cytokines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(6):3250-9.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. 2002. Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 66(3):486-505, table of contents.
- Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T, Ozawa Y, Nakahira Y, Saho T, Ogo H, Shimabukuro Y, Okada H, Murakami S. 2004. Human Gingival Epithelial Cells Produce Chemotactic Factors Interleukin-8 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 after Stimulation with *Porphyromonas Gingivalis* Via Toll-Like Receptor 2. *Journal of Periodontology*, 75(3):370-9.
- Lai P-C, Walters JD. 2014. Resolution of Localized Chronic Periodontitis Associated with Longstanding Calculus Deposits. 2014:6.
- Lamster IB, Ahlo JK. 2007. Analysis of Gingival Crevicular Fluid as Applied to the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098:216-29.
- Le Borgne M, Etchart N, Goubier A, Lira SA, Sirard JC, van Rooijen N, Caux C, Ait-Yahia S, Vicari A, Kaiserlian D, Dubois B. 2006. Dendritic Cells Rapidly Recruited into Epithelial Tissues Via Ccr6/Ccl20 Are Responsible for Cd8+ T Cell Crosspriming in Vivo. *Immunity*, 24(2):191-201.
- Lehrer RI, Ganz T. 2002. Defensins of Vertebrate Animals. *Current Opinion in Immunology*, 14(1):96-102.
- Lekic P, McCulloch CAG. 1996. Periodontal Ligament Cell Populations: The Central Role of Fibroblasts in Creating a Unique Tissue. 245(2):327-41.
- Lekic PC, Rajshankar D, Chen H, Tenenbaum H, McCulloch CAG. 2001. Transplantation of Labeled Periodontal Ligament Cells Promotes Regeneration of Alveolar Bone. 262(2):193-202.

- Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. 2004. Identification of Early Microbial Colonizers in Human Dental Biofilm. 97(6):1311-8.
- Lin P-H, Yeh S-K, Huang W-C, Chen H-Y, Chen C-H, Sheu J-R, Lin C-T, Huang Y-K. 2013. Research Performance of Biomarkers from Biofluids in Periodontal Disease Publications.
- Lindhe J, Lang NP, Karring T. 2009. Clinical Periodontology and Implant Dentistry: Wiley.
- Lipscomb MF, Masten BJ. 2002. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 82(1):97-130.
- Listgarten MA, Hellden L. 1978. Relative Distribution of Bacteria at Clinically Healthy and Periodontally Diseased Sites in Humans. *Journal of Clinical Periodontology*, 5(2):115-32.
- Lobene RR. 1986. A Modified Gingival Index for Use in Clinical Trials. *Clinical Preventive Dentistry*, 8(1):3-6.
- Loesche WJ. 1968. Importance of Nutrition in Gingival Crevice Microbial Ecology. *Periodontics*, 6(6):245-9.
- Loos BG, John RP, Laine ML. 2005. Identification of Genetic Risk Factors for Periodontitis and Possible Mechanisms of Action. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 Suppl 6:159-79.
- Lukac J, Mravak-Stipetic M, Knezevic M, Vrcek J, Sistig S, Ledinsky M, Kusic Z. 2003. Phagocytic Functions of Salivary Neutrophils in Oral Mucous Membrane Diseases. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 32(5):271-4.
- Mark-Bartold P. 2006. Periodontal Tissues in Health and Disease: Introduction. 40:7 - 10.
- Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, Betbeder D, Balazuc AM, Van Overtvelt L, Moingeon P. 2008. Oral Dendritic Cells Mediate Antigen-Specific Tolerance by Stimulating Th1 and Regulatory Cd4+ T Cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(3):603-9.e5.
- Mathur A, Michalowicz BS. 1997. Cell-Mediated Immune System Regulation in Periodontal Diseases. 8(1):76-89.

- Mavropoulos A, Odman A, Ammann P, Kiliaridis S. 2010. Rehabilitation of Masticatory Function Improves the Alveolar Bone Architecture of the Mandible in Adult Rats. *Bone*, 47(3):687-92.
- McKee MD, Farach-Carson MC, Butler WT, Hauschka PV, Nanci A. 1993. Ultrastructural Immunolocalization of Noncollagenous (Osteopontin and Osteocalcin) and Plasma (Albumin and Alpha 2hs-Glycoprotein) Proteins in Rat Bone. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 8(4):485-96.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. 1997. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell*, 91(3):295-8.
- Michael G. Newman HT, Perry R. Klokkevold, and Fermin A. Carranza. 2006. Carranza's Clinical Periodontology, 11th edition ed. St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. 2000. Evidence of a Substantial Genetic Basis for Risk of Adult Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71(11):1699-707.
- Miller LS, Modlin RL. 2007. Human Keratinocyte Toll-Like Receptors Promote Distinct Immune Responses. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(2):262-3.
- Mittal V, Bhullar, R. P., Bansal, R., Singh, K., Bhalodi, A., Khinda, P. K. 2013. A Practicable Approach for Periodontal Classification. *Dental Research Journal*, 10(6):697-703.
- Modlin RL, Nutman TB. 1993. Type 2 Cytokines and Negative Immune Regulation in Human Infections. *Current Opinion in Immunology*, 5(4):511-7.
- Mombelli A, Lang NP, Burgin WB, Gusberti FA. 1990. Microbial Changes Associated with the Development of Puberty Gingivitis. *Journal of Periodontal Research*, 25(6):331-8.
- Moore WE, Moore LV. 1994. The Bacteria of Periodontal Diseases. *Periodontology 2000*, 5:66-77.
- Murphy KM, Reiner SL. 2002. The Lineage Decisions of Helper T Cells. *Nature Reviews. Immunology*, 2(12):933-44.
- Nanci A, Bosshardt DD. 2006. Structure of Periodontal Tissues in Health and Disease*. 40(1):11-28.

- Newman T, Klokkevold, Carranza. 2006. Carranza's Clinical Periodontology, 10th Edition: Elsevier.
- Offenbacher S. 1996. Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Annals of Periodontology / the American Academy of Periodontology*, 1(1):821-78.
- Offenbacher S, Scott SS, Odle BM, Wilson-Burrows C, Van Dyke TE. 1987. Depressed Leukotriene B4 Chemotactic Response of Neutrophils from Localized Juvenile Periodontitis Patients. *Journal of Periodontology*, 58(9):602-6.
- Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. 2009. The Immunopathogenesis of Periodontal Disease. *Australian Dental Journal*, 54 Suppl 1:S2-10.
- Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N. 2009. The Involvement of Il-23 and the Th17 Pathway in Periodontitis. *Journal of Dental Research*, 88(7):633-8.
- Padmavati P, Savita S, Shivaprasad BM, Kripal K, Rithesh K. 2013. Mrna Expression of Mmp-28 (Epilysin) in Gingival Tissues of Chronic and Aggressive Periodontitis Patients: A Reverse Transcriptase Pcr Study. 35(2):6.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. 1997. Advances in the Pathogenesis of Periodontitis: Summary of Developments, Clinical Implications and Future Directions. *Periodontology 2000*, 14:216-48.
- Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Szell M, Beer Z, Bata-Csorgoo Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozy A, Kemeny L. 2003. Expression and Function of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Human Keratinocytes. *International Immunology*, 15(6):721-30.
- Premratanachai P, Joly S, Johnson GK, McCray PB, Jr., Jia HP, Guthmiller JM. 2004. Expression and Regulation of Novel Human Beta-Defensins in Gingival Keratinocytes. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(2):111-7.
- Ranney RR, Debski BF, Tew JG. 1981. Pathogenesis of Gingivitis and Periodontal Disease in Children and Young Adult. 3(sp):89-100.

- Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdin-Combe C, Jurdic P, Servet-Delprat C. 2004. Immature Dendritic Cell Transdifferentiation into Osteoclasts: A Novel Pathway Sustained by the Rheumatoid Arthritis Microenvironment. *Blood*, 104(13):4029-37.
- Rojo NRB, Espinoza AR, Castro MA. 2011. Prevalencia, Severidad Y Extensión De Periodontitis Crónica. 15(1):31-9.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. 1994. Proliferating Dendritic Cell Progenitors in Human Blood. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(1):83-93.
- Sahaya Stelin HR, Avaneendra Talwar, K. V. Arun, and T. S. S. Kumar. 2009. Immunohistological Analysis of Cd1a+ Langerhans Cells and Cd57+ Natural Killer Cells in Healthy and Diseased Human Gingival Tissue: A Comparative Study. 13:150-4.
- Saltel F, Chabadel A, Bonnelye E, Jurdic P. 2008. Actin Cytoskeletal Organisation in Osteoclasts: A Model to Decipher Transmigration and Matrix Degradation. *European Journal of Cell Biology*, 87(8-9):459-68.
- Saltman DL, Dolganov GM, Hinton LM, Lovett M. 1992. Reassignment of the Human Macrophage Colony Stimulating Factor Gene to Chromosome 1p13-21. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 182(3):1139-43.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor Alpha. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(4):1109-18.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 2009. Heterogeneity of Cd4+ Memory T Cells: Functional Modules for Tailored Immunity. *European Journal of Immunology*, 39(8):2076-82.
- Santiago-Schwarz F, Anand P, Liu S, Carsons SE. 2001. Dendritic Cells (Dcs) in Rheumatoid Arthritis (Ra): Progenitor Cells and Soluble Factors Contained in Ra Synovial Fluid Yield a Subset of Myeloid Dcs That Preferentially Activate Th1 Inflammatory-Type Responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(3):1758-68.

- Sarma JV, Ward PA. 2011. The Complement System. 343(1):227-35.
- Schroeder HE. 1986. Schroeder, Hubert E.
- Schroeder HE, Listgarten MA. 1997. The Gingival Tissues: The Architecture of Periodontal Protection. 13(1):91-120.
- Seymour GJ. 1991. Importance of the Host Response in the Periodontium. *Journal of Clinical Periodontology*, 18(6):421-6.
- Seymour GJ, Greenspan JS. 1979. The Phenotypic Characterization of Lymphocyte Subpopulations in Established Human Periodontal Disease. *Journal of Periodontal Research*, 14(1):39-46.
- Seymour GJ, Taylor JJ. 2004. Shouts and Whispers: An Introduction to Immunoregulation in Periodontal Disease. *Periodontology 2000*, 35:9-13.
- Shaykhiev R, Behr J, Bals R. 2008. Microbial Patterns Signaling Via Toll-Like Receptors 2 and 5 Contribute to Epithelial Repair, Growth and Survival. 3(1):e1393.
- Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. 1998. Early-Onset and Adult Periodontitis Associated with Abnormal Cytokine Production by Activated T Lymphocytes. *Journal of Periodontology*, 69(10):1098-104.
- Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernandez M, Gamonal J. 2015. Host Response Mechanisms in Periodontal Diseases. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 23(3):329-55.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. 1997. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*, 89(2):309-19.
- Slots J. 1979. Subgingival Microflora and Periodontal Disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 6(5):351-82.

- Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, Macdonald JB. 1963. The Microbiota of the Gingival Crevice Area of Man. I. Total Microscopic and Viable Counts and Counts of Specific Organisms. *Archives of Oral Biology*, 8:275-80.
- Socransky SS, Haffajee AD. 1992. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *Journal of Periodontology*, 63(4 Suppl):322-31.
- Socransky SS, Haffajee AD. 2005. Periodontal Microbial Ecology. *Periodontology 2000*, 38:135-87.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. 1998. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2):134-44.
- Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. 2002. Subgingival Microbial Profiles in Refractory Periodontal Disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(3):260-8.
- Sodek J, McKee MD. 2000. Molecular and Cellular Biology of Alveolar Bone. 24(1):99-126.
- Boletín Epidemiológico Ssa. México; 2016 [Accessed 2016 14 de mayo] Available from: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE17.pdf>.
- Stefanovic G, Markovic D, Ilic V, Brajovic G, Petrovic S, Milosevic-Jovcic N. 2006. Hypogalactosylation of Salivary and Gingival Fluid Immunoglobulin G in Patients with Advanced Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 77(11):1887-93.
- Stelin S, Ramakrishan H, Talwar A, Arun KV, Kumar TS. 2009. Immunohistological Analysis of Cd1a Langerhans Cells and Cd57 Natural Killer Cells in Healthy and Diseased Human Gingival Tissue: A Comparative Study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 13(3):150-4.
- Taubman MA, Kawai T, Han X. 2007. The New Concept of Periodontal Disease Pathogenesis Requires New and Novel Therapeutic Strategies. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(5):367-9.
- Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. 2013. Lessons Learned and Unlearned in Periodontal Microbiology. 62(1):95-162.

- Thurman JM, Holers VM. 2006. The Central Role of the Alternative Complement Pathway in Human Disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(3):1305-10.
- Uehara A, Sugawara Y, Kurata S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Satta Y, Sasano T, Sugawara S, Takada H. 2005. Chemically Synthesized Pathogen-Associated Molecular Patterns Increase the Expression of Peptidoglycan Recognition Proteins Via Toll-Like Receptors, Nod1 and Nod2 in Human Oral Epithelial Cells. *Cellular Microbiology*, 7(5):675-86.
- Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. 1992. Activation of Complement Components C3 and C5 by a Cysteine Proteinase (Gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(26):18902-7.
- Yamaguchi M, Terao Y, Ogawa T, Takahashi T, Hamada S, Kawabata S. 2006. Role of *Streptococcus Sanguinis* Sortase a in Bacterial Colonization. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 8(12-13):2791-6.
- Yan X-Z, Both SK, Yang P-S, Jansen JA, van den Beucken JJJP, Yang F. 2014. Human Periodontal Ligament Derived Progenitor Cells: Effect of Stro-1 Cell Sorting and Wnt3a Treatment on Cell Behavior. 2014:10.
- Yu N, Oortgiesen DA, Bronckers AL, Yang F, Walboomers XF, Jansen JA. 2013. Enhanced Periodontal Tissue Regeneration by Periodontal Cell Implantation. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(7):698-706.
- Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. 1999. The Role of the Cell-Mediated Immune Response to *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas Gingivalis* in Periodontitis. 20(1):239-88.
- Zeng X-T, Deng A-P, Li C, Xia L-Y, Niu Y-M, Leng W-D. 2013. Periodontal Disease and Risk of Head and Neck Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. 8(10):e79017.

XII ANEXOS

A Anexo 1. Cuestionario, consentimiento informado y periodontograma aplicados al sujeto de estudio.



Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa Instrumento de recolección de datos

Protocolo "Caracterización del estado de activación y maduración de células dendríticas de tejido gingival sano y con enfermedades periodontales".

Estimado PACIENTE, favor de leer cuidadosamente y proporcionar la siguiente información:

1. Nombre completo _____
2. Fecha de nacimiento _____
3. Edad _____
4. Sexo _____
5. Estado civil _____
6. Domicilio _____
7. Ciudad y Estado _____
8. Teléfonos _____
9. Nivel de estudios _____
10. Ocupación _____
11. ¿Cuál es su nivel socio económico? Alto _____ Medio _____ Bajo _____
12. ¿Suele visitar al odontólogo para realizarse una limpieza dental? Sí _____ No _____
13. ¿Cuántas veces al día cepilla sus dientes? _____
14. ¿Usa hilo dental? Sí _____ No _____
15. ¿Usa enjuague bucal? Sí _____ No _____
16. ¿Ha recibido terapia periodontal en los últimos tres meses? Sí _____ No _____
17. ¿Ha padecido o padece Artritis reumatoide? Sí _____ No _____
18. ¿Ha padecido o padece Diabetes? Sí _____ No _____
19. ¿Ha padecido o padece Enfermedades cardiovasculares? Sí _____ No _____
20. ¿Ha tomado antiinflamatorios por lo menos durante los últimos tres meses? Sí _____ No _____
21. ¿Ha tomado antibióticos por lo menos durante los últimos tres meses? Sí _____ No _____
22. ¿Toma bebidas alcohólicas o fuma en forma frecuente? Sí _____ No _____
23. ¿Se encuentra en su periodo menstrual? Sí _____ No _____ No Aplica _____
24. ¿Está embarazada? Sí _____ No _____ No Aplica _____

"Las respuestas dadas a estas preguntas son para nuestro archivo y serán consideradas confidenciales".

Estimado INVESTIGADOR, favor de proporcionar la siguiente información:

Consentimiento informado: Sí _____ No _____
Diagnóstico: Sano _____ Gingivitis _____ periodontitis _____
Clasificación de la lesión: _____
Cumple con los criterios de inclusión: Sí _____ No _____
Fecha: _____
Código: _____

Este formulario de consentimiento informado está dirigido a hombres y mujeres que son atendidos en la Clínica de Odontología de la Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Sinaloa y que se les invita a participar en la investigación titulada "Caracterización del Estado de Activación y Maduración de Células Dendríticas de Tejido Gingival Sano y con Enfermedades Periodontales".

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no, continuarán todos los servicios que reciba en esta clínica y nada cambiará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes. Aclaremos que no habrá beneficio para usted, pero es probable que su participación nos ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación. Puede que no haya beneficio para la sociedad en el presente estado de la investigación, pero es probable que generaciones futuras se beneficien. Si usted decide participar en esta investigación le aseguramos que no compartiremos la identidad de aquellos que participen en la investigación. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. La información acerca de usted que se recogerá durante la investigación será puesta fuera de alcance y nadie sino los investigadores tendrán acceso a verla. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en vez de su nombre.

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por H. Comité Ética de la Facultad de Odontología, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted desea averiguar más sobre este comité, contacte responsable de la investigación: Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina (Laboratorio de Inmunología), Facultad de Ciencias Químico Biológicas y Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Sinaloa de la Clínica. Ciudad Universitaria, Avenida de las Américas y Universitarios, CP 80010. Teléfono 667-7137860 ext. 116. Culiacán, Sinaloa, México.

Yo soy _____, estudio en la Universidad Autónoma de Sinaloa en programa _____. Estamos investigando sobre las enfermedades periodontales, gingivitis y periodontitis, las cuales son muy comunes en el mundo y en nuestro país. Le voy a dar información e invitarle a participar de esta investigación. No tiene que decidir hoy si participar o no en esta investigación. Antes de decidirse, puede hablar con alguien que se sienta cómodo sobre la investigación. Puede que haya algunas palabras que no entienda. Por favor, me para según le informo para darme tiempo a explicarle. Si tiene preguntas más tarde, puede preguntarme a mí, al doctor que investiga o a miembros del equipo.

Se cree que la gingivitis y periodontitis se desarrollan por malos hábitos de higiene, pero principalmente a las bacterias que se adhieren a los dientes y de ahí pasan a la encía e invaden células que nos protegen alterando su comportamiento, y así evitando ser eliminados por estas. Lo anterior no solo repercute en la salud bucal sino también se cree que tener enfermedad periodontal puede desencadenar otros padecimientos como: artritis reumatoide, enfermedades cardio-vasculares y diabetes. Debido a esto nuestro equipo de investigación pretende conocer algunas de las alteraciones que sufren estas células para entender mejor estos padecimientos y abordarlos desde un nuevo punto de vista.

En esta investigación se tomaran una sola muestra de encía derivada de su tratamiento odontológico por el cual asistió a esta clínica. Cabe mencionar que el procedimiento lo hará un odontólogo y este procedimiento se llevara de manera habitual.



Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa
Consentimiento informado

Nombre: _____
Fecha: _____ Código: _____

He aceptado participar en el proyecto de investigación titulado “Caracterización del estado de activación y maduración de células dendríticas de tejido gingival sano y con enfermedades periodontales”, el cual, ha sido revisado y aprobado por el H. Comité Ética de la Facultad de Odontología. El objetivo de esta investigación pretende conocer algunas de las alteraciones que sufren estas células para entender mejor estos padecimientos y abordarlos desde un nuevo punto de vista.

Planeamos obtener tejido inflamado que rodea al diente (encia), en los cuales esté indicada su extracción debido al grado de enfermedad periodontal. Se le está solicitando donar su tejido periodontal porque usted cumple con los criterios de inclusión de este estudio, y de aceptar, no se afectará de manera absoluta el procedimiento para la extracción, el tratamiento médico post extracción que se le indique o la elección del Odontólogo que usted escogió. Si está de acuerdo, nosotros obtendremos de usted la siguiente información y la siguiente muestra biológica:

- Historia Clínica – Se le solicitará la siguiente información: Nombre completo, fecha y lugar de nacimiento, estado civil, ocupación, domicilio actual, padecimiento actual, antecedentes patológicos heredofamiliares y personales, toxicomanías (tabaco, alcohol, alguna otra droga), si está tomando algún medicamento actualmente, alergias, en caso de ser mujer si se encuentra embarazada.
- Muestra Biológica – Se recolectará el tejido periodontal inmediatamente después de tratamiento periodontal por el que acude esta clínica. La muestra se colocará en un medio de transporte para evitar contaminación o infección y se llevará al laboratorio para su análisis correspondiente.

Cualquier cosa que sepamos de usted en este estudio se mantendrá de manera estrictamente confidencial así como los datos de su historia clínica (archivos encriptados). Si publicamos los resultados del estudio en un artículo de una revista médica o en un libro, nosotros no lo identificaremos a usted de ninguna manera.

Sé que no habrá beneficios para mi persona y que no se me recompensará. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado usando el nombre y la dirección que se me ha dado de esa persona.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Su firma indica que usted ha decidido tomar parte en este proyecto y que ha leído y entendido la información proporcionada y explicada personalmente.

Firma de/la donador(a)

Firma del testigo

Nombre y firma de la persona que obtuvo el consentimiento informado.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre: _____
 Sexo: _____ Edad: _____ Ocupación: _____ Dirección: _____
 Teléfono: _____ Alumno que lo atendió: _____

Vestibular	M																		M
	CPO																		CPO
	IG																		IG
	II																		II
	PB																		PB
	OD	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28		OD

Palatino	OD	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	OD	
	PB																		PB
	II																		II
	IG																		IG
	CPO																		CPO
	M																		M

Vestibular	M																		M
	CPO																		CPO
	IG																		IG
	II																		II
	PB																		PB
	OD	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		OD

Lingual	OD	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	OD	
	PB																		PB
	II																		II
	IG																		IG
	CPO																		CPO
	M																		M

INDICE GINGIVAL

OD 16 12 24 44 42 36 si no estan 17 11 25 45 31 37

Se revisan cuatro zonas por OD: papila DV, margen vestibular, papila MV y margen palatino o lingual.

CPO

ELEMENTOS	CONDICIÓN
1	Cebado
2	Obturado
3	Perdido por caries
4	Extracción fallida
5	Imo
6	No aplicable

CÓDIGOS

0	Encía normal rosa pálido y textura de cilantro de vaca
1	Inflamación leve con ligero enrojecimiento gingival sin hemorragia al sondar
2	Inflamación moderada, color rojo con hemorragia al sondar
3	Inflamación severa, con enrojecimiento y sangrado espontáneo

B Anexo 2. Carta de aceptación del protocolo aprobado por el comité de ética.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



COMITÉ DE ÉTICA

Facultad de Odontología.

Con fecha del 04 de Febrero del 2015, se reunió el Comité de Ética de la Facultad de Odontología, para evaluar el protocolo de investigación "Estudio de células dendríticas y microbiota en individuos con enfermedad periodontal y establecimiento de un modelo experimental", el cual fue presentado por la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina con anterioridad a todos los integrantes del comité, y en la reunión se discutieron los aspectos éticos sobre confidencialidad, respeto a los derechos de los pacientes, posibles riesgos y la aportación del presente estudio al cuerpo del conocimiento de esta enfermedad.

El dictamen del comité fue: **APROBADO**

Presidente.

Dra. Anabell Cárdenas Valdéz

Secretario.

Dra. Carmen Flores Grajeda

Vocales

Dra. María de Lourdes Verdugo Barraza

Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar

Dr. Alfredo Uriarte Munguía



Culiacán, Sinaloa, México, a 05 de Febrero del 2015.

C Anexo 3. Soluciones para inmunofluorescencia.

Buffer de Bloqueo
PBS 1X pH 7.2 - 7.4
1% BSA
10% BFS

Solución de Lavado
PBS 1X pH 7.2 - 7.4
0.02% Tween 20

Buffer de Dilución
PBS 1X
1% BSA