



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE**

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**BIOMARCADORES SALIVALES ASOCIADOS A LA
FISIOPATOLOGÍA Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD
PERIODONTAL**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

RAQUEL JUÁREZ TREJO

2192034532

ASESORES

Asesor interno

Dra. Patricia Castilla Hernández, UAM-X (30606)

Asesor externo

Dra. Esmeralda Juárez Carvajal, Investigador en Ciencias Médicas “D”

Departamento de Investigación en Microbiología. INER

Ciudad de México, marzo de 2024.

INDICE

1. Introducción	3
2. Objetivos generales y específicos	14
3. Metodología utilizada	15
4. Actividades realizadas	23
5. Metas alcanzadas	23
6. Resultados y conclusiones	23
7. Recomendaciones	27
8. Referencias bibliográficas	28
9. Anexos	33

Introducción

La enfermedad periodontal es una enfermedad crónica inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes que es causada por bacterias, principalmente bacilos gram negativos anaerobios y espiroquetas, que se extienden en biofilms alrededor del diente (Quesada-Chaves, 2018). La enfermedad periodontal se clasifica en gingivitis y periodontitis (Sánchez et al., 2021). La periodontitis ocurre cuando la gingivitis o infección gingival no es tratada adecuadamente afectando los tejidos de soporte del diente, que finalmente va a producir la caída de la pieza dental (Sánchez et al., 2021 y Flores-Reyna y Martínez-Fernández, 2022). Uno de los principales determinantes del desarrollo de la enfermedad periodontal es el incremento de bacterias patógenas dentro de la placa dental que activa una fuerte respuesta inmune innata y adaptativa (Liccardo et al., 2019).

Las enfermedades periodontales comúnmente cursan sin dolor en las primeras etapas, y su progresión es lenta; esto hace que dicha enfermedad sea subtratada. Algunos estudios demuestran que en Estados Unidos el 90% de los pacientes valorados necesitaban tratamiento para enfermedad periodontal y de estos, aproximadamente el 50% tenían una afección de moderada a severa (Quesada-Chaves, 2018). Estas enfermedades son las condiciones inflamatorias crónicas más comunes en todo el mundo que alcanzan tasas del 90% en algunos países latinoamericanos, además de que la prevalencia de periodontitis en Estados Unidos se estima en un 47% en adultos mayores de 30 años (Sánchez et al., 2021).

Las enfermedades bucales son consideradas problemas de salud pública por su alta prevalencia en casi todas las partes del mundo; éstas representan una carga de salud para la población y afectan sobre todo a las comunidades más vulnerables. Alteraciones como las

caries y enfermedades periodontales son consideradas eventos de mayor peso en la morbilidad bucal a nivel mundial (Taboada-Aranza et al., 2018).

Las enfermedades periodontales al ser estudiadas por su enorme relación con la salud han demostrado que se pueden presentar como una manifestación de trastornos sistémicos e influyen en la etiología de diversas enfermedades generales; compartiendo factores de riesgo con algunas enfermedades crónicas importantes de la actualidad, como enfermedades cardiovasculares, reumáticas, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes, etc. (Villa, 2015). Por lo tanto, esta patología es considerada según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como uno de los dos principales problemas de salud bucal a nivel mundial; además de considerar otros factores para la distribución de estas enfermedades crónicas como asociarlas con desigualdades sociales, ya que afectan en mayor proporción a los grupos con desventajas sociales y económicas (Pardo y Hernández, 2018). Sin embargo, la prevención y vigilancia de las enfermedades periodontales se torna complicada debido a dificultades en la implementación y el mantenimiento, debido en gran medida a las diferentes definiciones operacionales y los recursos que se necesitan para ello (Secretaría de Salud, 2019). Potencialmente las medidas de auto reporte podrían utilizarse como herramienta para la vigilancia de los distintos segmentos de la población debido a que es una alternativa viable al ser práctica y accesible (Russell et al., 2021).

Gingivitis y Periodontitis

Indudablemente en la última década ha aumentado la evidencia que considera a las enfermedades periodontales como un problema de salud pública a nivel mundial y del cual los sistemas de salud deben hacerse cargo (Carvajal, 2016). Para la OMS, la salud bucal va más allá de tener los dientes sanos. La OMS resalta que la salud bucal es una parte de la salud

general esencial para el bienestar de las personas, e implica estar libre de dolor orofacial crónico, de cáncer de boca y faringe, de alteraciones en los tejidos blandos de la boca (lengua, encías y mucosa oral), de defectos congénitos como lesiones y fisuras del labio y/o paladar, y de otras enfermedades que afecten el complejo craneofacial (Pardo y Hernández, 2018).

La gingivitis y la periodontitis son enfermedades periodontales, la primera inducida por placa bacteriana. Mientras que la periodontitis puede causar la pérdida de dientes; sin embargo, toda periodontitis se inicia con la presencia inicial de una gingivitis, y esta puede ser reversible con las medidas de prevención y tratamiento adecuadas (Carvajal, 2016). Las dos principales asociaciones científicas mundiales en periodoncia, la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP), se unieron para desarrollar un nuevo sistema de clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales (Caton et al., 2018), que se adaptó a los conocimientos científicos actuales e intentó solucionar algunas de las limitaciones y los problemas de aplicación del sistema de clasificación anterior. En cuanto a la gingivitis, la mayoría de los cambios con respecto a la clasificación anterior estaban asociados a la inflamación gingival inducida por placa bacteriana y sobre todo, a la adición de una definición específica de salud periodontal; la nueva clasificación usa definiciones diferentes, como: gingivitis asociada únicamente al biofilm, gingivitis mediada por factores de riesgo sistémicos o locales e hipertrofia gingival inducida por fármacos (Caton et al., 2018 y Herrera et al., 2018). En relación con la periodontitis, se discutió la clasificación y las definiciones de periodontitis, trastornos periodontales agudos (enfermedades periodontales necrosantes, abscesos periodontales) y lesiones endodóntico-periodontales (Herrera et al., 2018 y Papapanou et al., 2018). Hablando específicamente de la periodontitis agresiva, se cambió el enfoque, juntando la periodontitis

agresiva y la crónica en una misma categoría y caracterizándola con un sistema de calificación por estadios y grados, donde la estadificación depende de la gravedad de la enfermedad y la complejidad del tratamiento, mientras que los grados dan a conocer el riesgo de progresión de la enfermedad y de obtención de malos resultados en el tratamiento, junto con los posibles efectos negativos sobre la salud sistémica (Herrera et al., 2018 y Fine et al., 2018). A su vez, un caso de periodontitis debería presentar pérdida de inserción clínica interdientaria en dos o más dientes no adyacentes, o bien, CAL vestibular ≥ 3 mm con bolsas de > 3 mm en dos o más dientes (Herrera et al., 2018 y Tonetti et al., 2018).

Saliva

La saliva es un fluido ácido mixto debido a su $\text{pH} \approx 6-7$ que cumple un rol en distintas funciones biológicas como la percepción de sensaciones orales (sabor, temperatura y tacto), así como lubricación, masticación, deglución y digestión. La saliva también permite una mejor mineralización del esmalte dental y a su vez la previene debido a su efecto tampón. Además, protege la mucosa oral, de factores químicos, mecánicos, biológicos, de microorganismos y posibles infecciones por virus, bacterias u hongos, manteniendo un equilibrio en la flora oral compuesta por hormonas, anticuerpos, proteínas, enzimas y citoquinas que engloba la parte orgánica, además de una parte inorgánica y agua que son secretadas por las glándulas salivales mayores y menores, al mismo tiempo, fluido gingival crevicular, células epiteliales descamadas de la mucosa oral y microorganismos (Kaczor-Urbanowicz et al., 2016).

Debido a las características bioquímicas de la saliva, es un biofluido útil para el diagnóstico de algunas enfermedades, entre ellas, la enfermedad periodontal; algunas de sus ventajas reportadas (Feng et al., 2019, Acuña y Juárez, 2021 y Combina et al., 2020) son:

- Su extracción, transportación, manipulación y almacenamiento es un proceso simple debido a que no son métodos invasivos y tienen un coste eficiente.
- La extracción puede realizarse sin ayuda de personal sanitario, incluso si la muestra se ocupa para estudios epidemiológicos.
- A la hora de recolectar la muestra, el paciente no experimenta ningún tipo de sensación incomoda o ansiedad porque no se necesita ningún tipo de herramienta con agujas.
- Es un valioso fluido biológico porque puede ser utilizado como fuente de biomarcadores de la enfermedad periodontal.

El desarrollo inicial en el conocimiento de este campo da lugar al término “salivaomics”, que en el año 2008 fue introducido para el desarrollo del conocimiento de varias ciencias “ómicas” para el diagnóstico a partir de la saliva, en donde se puede observar la presencia de componentes denominados biomarcadores y estar relacionados con el estado de salud y cambiar cuando las enfermedades están presentes, lo que permite su uso como indicadores de determinadas patologías (Camacho-Sánchez et al., 2023 y Pereira et al., 2021).

Biomarcadores salivales

En las enfermedades bucales como la periodontitis, la saliva se considera una herramienta potencial para su diagnóstico y el de algunas enfermedades sistémicas, por lo mismo, los biomarcadores específicos utilizados en enfermedades específicas también sirven para determinar riesgos, en la planificación del tratamiento y la progresión de la enfermedad (Pereira et al., 2021).

Los National Institutes Health (NIH) establecieron la definición de biomarcador que, de acuerdo con lo anterior, son características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc., objetivamente mesurables capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Torres y Pérez, 2016).

Los biomarcadores también incluyen alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Ruano, 2018). Utilizar biomarcadores clínicos tiene ventajas debido a que es más fácil y menos costoso si se compara con la medición directa del criterio de valoración final, ya que los biomarcadores se miden en un periodo más corto de tiempo. Se pueden utilizar en la detección, el diagnóstico, la caracterización y el seguimiento de las enfermedades (Aronson y Ferner, 2017).

Dichos marcadores se clasifican en marcadores de exposición y marcadores de enfermedad; los de exposición se utilizan para conocer o detectar factores de riesgo, mientras que los de enfermedad se usan para diagnósticos y monitorear la enfermedad (Ruano, 2018). Un gran número de proteínas, péptidos, genes, enzimas u hormonas, pueden ser usados como biomarcadores; dichas moléculas existen en baja concentración en la saliva; aunque su presencia es fundamental por sus funciones múltiples y complejas, en el caso de las proteínas, se presentan en una concentración de aproximadamente 300 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ según la cantidad de saliva (Barembaum y Azcurra, 2019 y Kaczor-Urbanowicz, 2016).

Estos biomarcadores pueden reflejar un espectro completo de una enfermedad desde su aparición temprana hasta sus etapas finales (Kaczor-Urbanowicz et al., 2017). Las

metaloproteinasas de matriz 8 y 9, las interleucinas 1beta y 6, y la hemoglobina son biomarcadores salivales con buena capacidad para detectar la periodontitis en sujetos sistémicamente sanos; la metaloproteinasa de matriz 9 y la interleucina 1beta también mostraron una buena capacidad para detectar la condición de no-periodontitis, sin embargo, no hay suficientes revisiones sistemáticas sobre la precisión de múltiples biomarcadores moleculares en saliva para el diagnóstico de la periodontitis (Arias-Bujanda et al., 2019), ni para el seguimiento progresivo de la enfermedad.

La elección de biomarcadores clínicos adecuados debe cumplir con el seguimiento de pautas como las de Bradford Hill que ayudan a conocer la relación del biomarcador con el trastorno clínico en cuestión, además, se toman en cuenta ciertos aspectos como: la validez clínica del proceso, la respuesta, grado de invasividad, que sea de bajo costo, fácil de ejecutar y el tiempo para la obtención de resultados (Aronson y Ferner, 2017).

Metabolitos pro-inflamatorios

Prostaglandinas, leucotrienos e interleucinas

Los mediadores lipídicos son moléculas derivadas de ácidos grasos con funciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, así como pro resolutivas o señales de término del proceso inflamatorio (Salvatierra, 2017).

Las prostaglandinas (PGE₂) son moléculas lipídicas sintetizadas a partir de eicosanoides por la acción de la enzima ciclo oxigenasa que constituyen una familia de mediadores celulares con diversas funciones como intervenir en la respuesta inflamatoria con una función pro inflamatoria, provocando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular que permite el mecanismo de diapédesis de los leucocitos y su llegada al territorio afectado, las

prostaglandinas también estimulan la síntesis de leucotrienos a partir de ácido araquidónico, potenciando aún más el proceso inflamatorio (Salvatierra, 2017). Se ha encontrado que la PGE2 tiene la capacidad de inducir la actividad osteoclástica, así como la reabsorción ósea que se observa en la periodontitis (Michea et al., 2016).

Los leucotrienos (LTB4) son sintetizados a partir de eicosanoides por la enzima lipooxigenasa, principalmente en neutrófilos, pero también por eosinófilos, macrófagos, linfocitos T y queratinocitos, actuando como una potente molécula quimiotáctica para neutrófilos, lo que incrementa la inflamación aguda. Por otro lado, tanto prostaglandinas como leucotrienos estimulan la síntesis de otros tipos de mediadores lipídicos tales como lipoxinas, resolvinas y protectinas que favorecen la resolución de los procesos inflamatorios (Salvatierra, 2017).

Las interleucinas (IL) son un conjunto de citocinas, sus funciones fisiológicas son regular la activación, diferenciación, proliferación y quimiotaxis de las células del sistema inmune, activan anticuerpos y regulan a otras citoquinas. Las IL-6 y 8 son citoquinas proinflamatorias secretadas principalmente por los macrófagos, células T, endoteliales, dendríticas, epiteliales y fibroblastos. Estas IL son reguladas por el NF-kappa B, quien también regula la expresión de genes en la inmunidad innata y adquirida (Salvatierra, 2017).

Dentro del ambiente inflamatorio, la síntesis de mediadores lipídicos proinflamatorios, como PGE2 y LTB4, provocan la llegada de más neutrófilos al sitio de infección, desencadenando la respuesta inmune innata (Michea et al., 2016).

Metabolitos pro-resolutorios

Lipoxinas, resolvinas y maresinas

Las resolvinas son potentes mediadores pro-resolutivos de la inflamación con 2 formas químicas diferentes, las series E y D. Tanto resolvina E1 (RvE1) como resolvina E2 (RvE2) inhiben significativamente la migración transendotelial de neutrófilos hacia la periferia y tienen funciones protectoras en las enfermedades periodontales, previniendo el establecimiento de una respuesta crónica luego de la infección por patógenos periodontales. El rol de las resolvinas y lipoxinas se ha estudiado en tejidos periodontales, demostrándose que RvD1 tiene funciones protectoras del ligamento periodontal al estimular la proliferación de fibroblastos durante la cicatrización de este tejido, y además inducir la síntesis de lipoxinas (Michea et al., 2016).

Las lipoxinas son mediadores lipídicos que derivan del ácido araquidónico y poseen propiedades antiinflamatorias y pro-resolutivas. Lipoxina A4 (LXA4) manda señales a diferentes tipos de células como neutrófilos y monocitos, donde bloquea la liberación de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α e IL-1, inhibiendo el tráfico de neutrófilos hacia el sitio afectado. Se ha encontrado que LXA4 es secretada por macrófagos y que además estimula su actividad fagocítica, lo que implica un importante mecanismo pro-resolutivo ayudando a restaurar la homeostasis tisular (Salvatierra, 2017).

Maresina 1 (Mar1) deriva de DHA mediante conversión sucesiva por vías 12 Lipooxigenasa (12-LOX) y 15-LOX, en macrófagos activados residentes en sitios de inflamación aguda. En el año 2012, se reportó que Mar1 sintetizada por macrófagos, redujo la infiltración neutrofílica y leucocitaria total, ya que los macrófagos son células clave en mantener y restablecer la homeóstasis tisular. Así mismo, el hecho de que Mar1 y RvE1 participen en la reparación tisular establece la posibilidad de que existan señales comunes al proceso de resolución inflamatoria y al de reparación tisular (Villanueva y Marrugo, 2014).

Metabolitos de la resorción ósea y osificación en saliva

RANKL y OPG

La función del sistema RANK/RANKL/OPG es la interacción entre miembros de la unidad básica multicelular que induce la diferenciación y activación de osteoclastos u osteoblastos, equilibrando el ciclo de remodelado óseo entre la formación o resorción (Tu et al., 2015).

El receptor activador de factor nuclear κ B (RANK) es una proteína transmembranal clasificada como un receptor homotrimérico de tipo I, conformado por 616 aminoácidos. Pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Se expresa en la membrana de los osteoclastos y también está presente en la superficie de linfocitos B y T, fibroblastos y células dendríticas (McGrath, 2011).

El ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) es una proteína transmembrana expresada por osteoblastos y células mesenquimales, y está compuesto por 317 aminoácidos, también pertenece a la superfamilia de TNF y es un mediador proosteoclástico esencial que junto con su receptor señuelo osteoprotegerina (OPG) también conocida como factor inhibidor de la diferenciación de osteoclastos, es esencial para el acoplamiento entre la resorción y la formación ósea (McGrath, 2011).

La unión del RANKL a su receptor (RANK) promueve la activación de la vía de señalización intracelular NF- κ B dando como resultado la diferenciación de los preosteoclastos en osteoclastos maduros, facilitando la resorción de hueso (McGrath, 2011, Tu et al., 2015, Nakashima et al., 2011 y Xiong y O'Brien, 2012). Altos niveles séricos de RANKL se han asociado con una disminución acelerada de la medida de cantidad de minerales (DMO),

mientras que la OPG tiene una función protectora de hueso, ya que altos niveles séricos se relacionan con un aumento significativo en la masa ósea (Sasso et al., 2015).

Las concentraciones de estas proteínas están reguladas por ciertos factores, en ausencia de inflamación, el balance está a favor de la OPG, mientras que, en presencia de inflamación, los mediadores químicos vuelven el balance a favor de la reabsorción. En la periodontitis: PGE2, IL-1B, FNT-alfa e IL-6 han sido los mediadores más relacionados a la reabsorción ósea (Asquino et al., 2021).

En el servicio clínico de estomatología se atienden a pacientes con enfermedad periodontal referidos de los diferentes servicios clínicos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Se ha propuesto que los microorganismos, componentes de microorganismos, moléculas solubles de la respuesta inmune inflamatoria, y efectores solubles de daño tisular involucrados en la enfermedad periodontal pueden incorporarse a circulación y dispersarse afectando otros tejidos e influyendo de manera sistémica. Algunos determinantes fisiopatológicos de la enfermedad periodontal están descritos, sin embargo, una completa caracterización de estos no se han reportado en la literatura y se desconoce si estos determinantes fisiopatológicos de la enfermedad periodontal influyen en la severidad de la enfermedad.

En este trabajo se busca obtener datos específicos de parámetros clínicos y fisiopatológicos, que permitan establecer una asociación entre la enfermedad periodontal y la severidad de la enfermedad en la población que se atiende en el INER por enfermedades no infecciosas y en empleados que representan a la población abierta. Además del trabajo experimental, se realizó una búsqueda de información de artículos científicos publicados en revistas indizadas, a través de plataformas como Google académico, PubMed, Scielo y en instituciones

académicas como la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), entre otras. Los resultados de este estudio permitirán conocer la fisiopatología de la enfermedad periodontal y su asociación con la enfermedad respiratoria no infecciosa.

Objetivo General

Determinar si existe asociación entre la fisiopatología y el control de la enfermedad periodontal a través de la búsqueda de biomarcadores salivales asociados a la severidad.

Objetivos específicos

1.- Medir determinantes fisiopatológicos de enfermedad periodontal en saliva:

- Indicador de resorción ósea: PGE2
- Indicadores de homeostasis ósea: OPG, LXA4
- Indicadores de inflamación: LTB4, IL8
- Indicadores de resolución de la inflamación: Mar1, RvD1
- Indicadores de daño tisular: Neutrófilos en saliva y Nucleosomas (surrogado de NETs)

2.- Determinar si los determinantes fisiopatológicos de la enfermedad periodontal se asocian a la severidad de la enfermedad.

Metodología utilizada

A) Lugar de estudio

El estudio se realizó en el servicio clínico de estomatología y en los laboratorios del Departamento de Investigación en Microbiología, en el INER

B) Tipo de investigación

Este trabajo constó de una investigación clínica, donde su estudio fue experimental, transversal y prospectivo. Además, se pretendió que a través del conocimiento del tema de estudio se generara comprensión y prevención.

C) Descripción de la población

El estudio se realizó con los pacientes que acudieron a consulta al servicio de Estomatología del INER y empleados del instituto que aceptaron participar en el estudio. Se realizó una evaluación estomatológica y periodontal dividiendo a los participantes en dos grupos:

1-Periodonto sano (Grupo control)

2-Patología periodontal, la cual se subdividió en gingivitis y periodontitis

D) Procedimiento del estudio

1.-Valoración de parámetros de enfermedad periodontal

Los valores medios de índice gingival, índice periodontal e índice de higiene, así como profundidad al sondaje (PD) y nivel de adherencia clínica (CAL) se midieron en los pacientes y controles.

2.-Higiene oral

Se realizó el saneamiento básico (curetajes, profilaxis, técnicas de cepillado y uso de aditamentos) en los pacientes con enfermedad periodontal y en los controles sin enfermedad periodontal en el consultorio del servicio de estomatología. Se le enseñaron las técnicas de higiene para realizar en casa y se recomendó la frecuencia y tiempo de aplicación. Se aplicaron cuestionarios para conocer los datos clínicos, hábitos alimenticios, hábitos de higiene y calidad de vida de los participantes del estudio. Se esperó que en los individuos control sin enfermedad periodontal desarrollaran la misma instrucción de higiene oral con lo cual se pudo prevenir la aparición de enfermedad periodontal.

3.-Obtención de muestras biológicas

a) Muestra de saliva: ésta fue colectada antes de iniciar el tratamiento dental. La muestra se tomó por la mañana y se le indicó al individuo que permitiera acumular saliva en el piso de la boca durante unos minutos y que vertiera la saliva directamente en un tubo de polipropileno de 50 ml. El individuo debió repetir este paso hasta acumular saliva en la marca de 5ml. Las muestras se llevaron al laboratorio y se procesaron para criopreservación.

b) Obtención de células orales por lavado bucal: Posterior a la toma de muestra de saliva, y previo a la aplicación de saneamiento, se les proporcionó a los pacientes un tubo de polipropileno de 50 ml conteniendo 15 ml de solución salina fisiológica. El paciente debió realizar un enjuague vigoroso durante 1 minuto y regresar la solución al mismo tubo de solución salina. Esta solución fue transportada al laboratorio.

Considerando que el ritmo circadiano modifica los parámetros inflamatorios, todas las tomas de muestra se realizaron en un horario restringido (Wiedloncha et al., 2018).

E) Procesamiento de las muestras

Procesamiento de saliva (figura 1)

Todo el procedimiento se realizó dentro de las cabinas de seguridad biológica (CSB) y utilizando la centrífuga con canastillas de seguridad, cuando aplicó.

a. - La muestra se repartió en dos tubos de 15 ml etiquetados con el código de la muestra y las leyendas "para proteínas" y "para lípidos", en el tubo para proteínas se le agregaron 2 ml de la muestra, mientras que para lípidos se agregó 1ml utilizando puntas con filtro. Se registró el volumen de la muestra.

b. - Al tubo "para proteínas" se añadieron 2.0 μ l de Tritón X-100. Se agitó en un vortex por 1 minuto. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugó a 2,000 rpm durante 15 minutos a 4°C con la tapa bien cerrada. El sobrenadante se transfirió en partes iguales a 2 viales de 1.5 ml etiquetados como "proteínas" y con el código del sujeto. Se centrifugó a 10,000 x g durante 5 minutos. Posteriormente se colectó el sobrenadante en 4 viales nuevos (500 μ l aproximadamente en cada vial) etiquetados de la misma manera. Finalmente se almacenó en congelación a -20°C.

c.- Al tubo "para lípidos" se adicionaron 4 ml de etanol absoluto frío. Se agitó en el vortex durante 1 minuto. Se incubó a -20°C durante ~30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 15 minutos a 4°C con la tapa bien cerrada y se transfirió el sobrenadante a viales nuevos etiquetados como "lípidos" y se evaporaron a 30°C durante 6h en una centrífuga de vacío. Se re suspendieron en un volumen equivalente al original del buffer de Elisa (Cayman Chemical). Se colectaron en 3 viales con aproximadamente el mismo volumen, se homogeneizaron y sonicaron durante 5 minutos. Se almacenaron a -20°C.

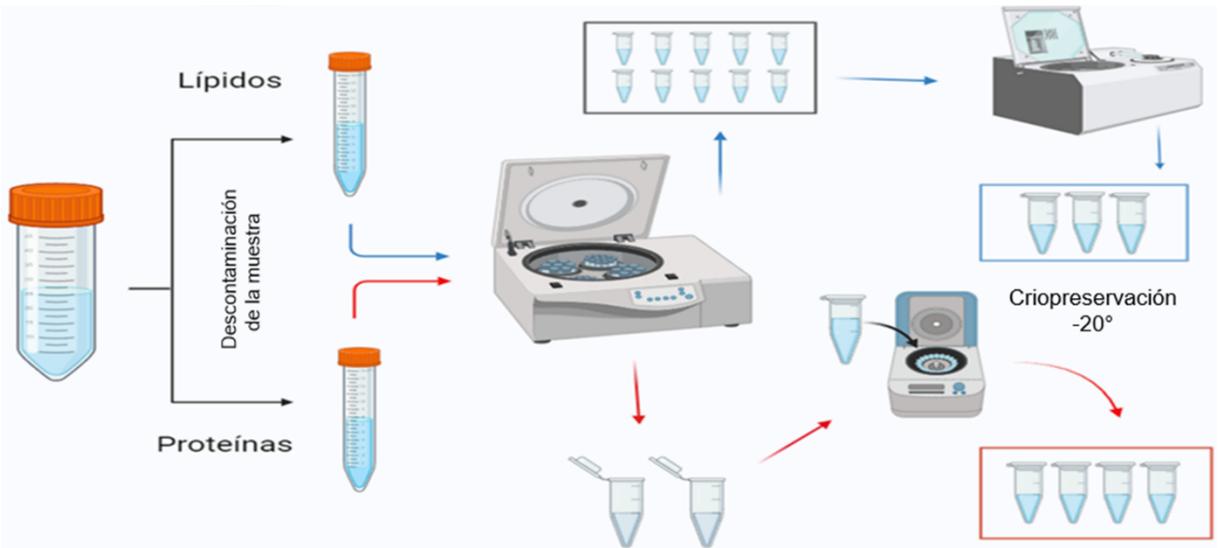


Figura 1. Procesamiento de muestra de saliva. Descontaminación, centrifugación, evaporación y criopreservación.

Procesamiento de lavado bucal (figura 2)

- a.- Se transfirió el líquido de lavado bucal a un tubo de polipropileno de 50 ml a través de una malla de $40\ \mu\text{m}$ para remover residuos de comida.
- b.- Se añadió un volumen igual de paraformaldehído al 2.5% y se incubó durante 30 minutos.
- c.- Se centrifugó a 2,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se eliminó la solución. Se resuspendió el paquete celular en 1 ml de PBS y se almacenó a 4°C hasta por 8 días.
- d.- Se contaron las células en la cámara de Neubauer y se ajustó a 10,000 células por ml (cuando fue necesario hacer disoluciones con PBS).

e.- Se realizó una impronta por cytopspin utilizando 100 μ l de la muestra. Se etiquetó la impronta con el código del sujeto, número de células y la fecha. Finalmente se utilizó el Cytopro en el programa número 3, durante 2 minutos con aceleración media.

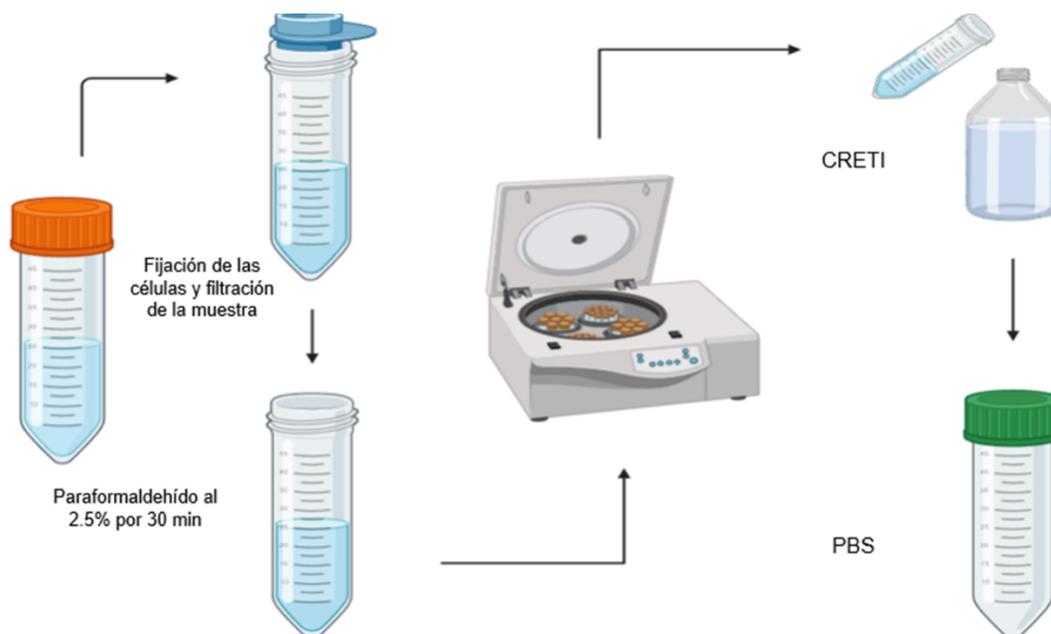


Figura 2. Procesamiento de enjuague bucal. Filtración de la muestra, fijación de las células con paraformaldehído al 2.5%, desecho de residuos al CRETÍ (corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico ambiental e inflamable) y resuspensión de células en PBS buffer (Phosphate-buffered saline).

f. Tinción de Wright y mieloperoxidasa a la impronta (figura 3)

Para la tinción con Wright, se agregaron 250 μ l de la tinción de Wright y se dejó reposar 5 minutos. Posteriormente se agregaron 250 μ l de agua pura y dejó reposar 5 minutos más. Se retiró el excedente, se enjuagó con abundante agua y se dejó secar. Para la tinción con mieloperoxidasa, se agregaron 500 μ l mieloperoxidasa, se dejó reposar 30 minutos. Se enjuagó y se dejó secar totalmente. Se fijó la muestra.

g.- Se evaluó la celularidad y se contabilizó la presencia de neutrófilos con un microscopio óptico a 40X.



Figura 3. Tinción de Wright y mieloperoxidasa para su posterior vista y conteo en el microscopio óptico.

4.- Cuantificación de PGE2, LXA4, RvD1 y Mar1 de las muestras obtenidas (figura 4)

Se descongelaron las muestras y se realizaron los ELISAs correspondientes para cada analito utilizando kits comerciales de la marca Cayman Chemicals, siguiendo las indicaciones del fabricante y los resultados fueron reportados en pg/ml.

5.- Cuantificación de RANKI y OPG en muestras de saliva.

Se realizó por ELISA utilizando kits comerciales (Enzo Biosciences e Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.- Cuantificación de IL-8 en muestras de saliva.

Se realizó por ELISA utilizando kits comerciales de la marca R&D siguiendo las indicaciones del fabricante.

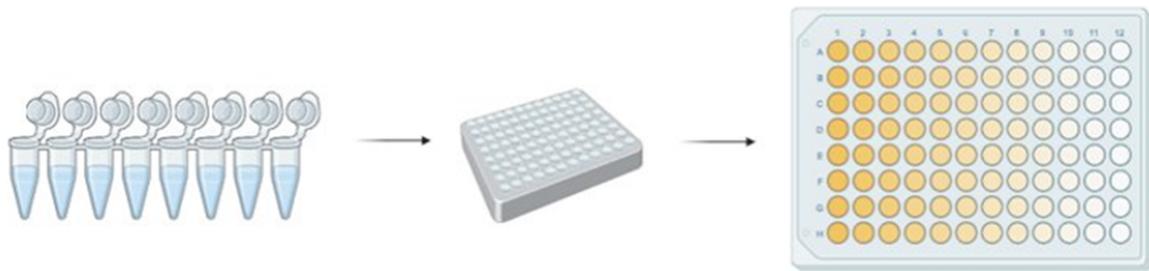


Figura 4. Placa de 96 pozos para realizar los ensayos ELISA de cada metabolito.

7.- Evaluación de disfunción celular en neutrófilos locales.

F) Número necesario de sujetos de investigación

Este estudio se diseñó para un tamaño de muestra de 45 pacientes, divididos en los tres grupos: de control, gingivitis y periodontitis. Fue preciso ajustar el tamaño de la muestra, más cálculos se realizaron cuando se tuvieron los primeros resultados.

G) Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión para los pacientes:

Se reclutaron pacientes con diagnóstico de enfermedad periodontal (según los criterios de la American Academy of Periodontology) que se refirieron al servicio de estomatología de los servicios clínicos de sueño, tabaquismo y otorrinología de 18-72 años, hombres y mujeres, pudieron tener múltiples enfermedades sistémicas y pudieron o no ser fumadores. Para participar los voluntarios debieron proporcionar su consentimiento por escrito.

Los criterios de exclusión para pacientes:

Se excluyeron a los individuos que presentaron las siguientes condiciones: enfermedad autoinmune, menores de edad, enfermedades infecciosas de vías respiratorias altas, seropositivos al VIH, consumo de anti-inflamatorios de manera regular, consumo antibióticos

y antidepresivos, que estuvieran recibiendo tratamiento periodontal actualmente o que hubiesen recibido tratamiento periodontal en los últimos 6 meses fuera del INER, pacientes embarazadas y pacientes que no proporcionaron su consentimiento por escrito.

Los criterios de inclusión para controles:

Se reclutaron individuos de 18-72 años, hombres y mujeres, sin enfermedad periodontal, pudieron o no fumar y pudieron o no tener diabetes.

Los criterios de exclusión para controles:

Fueron los mismos que los descritos para pacientes.

H) Captura, procesamiento y análisis

La captación de pacientes e individuos de población abierta y la toma de muestras clínicas se realizó por los médicos especialistas del servicio de estomatología. A todos se les invitó a participar voluntariamente en este protocolo de investigación explicando los antecedentes y los objetivos en lenguaje coloquial que les permitiera entenderlo. De aceptar debieron firmar el consentimiento por escrito y se les aplicó cuestionarios estructurados para recabar información personal y de salud. Para mantener su identidad en forma confidencial se les asignó una clave. Toda información, incluyendo los resultados experimentales fueron capturados en una base de datos haciendo uso de una computadora institucional y fueron utilizados para el análisis en el proceso de escritura. Los análisis estadísticos estuvieron a mi cargo y las historias clínicas fueron responsabilidad de los médicos participantes del estudio.

Actividades realizadas

En el periodo del 21 de agosto de 2023 al 21 de febrero de 2024 se realizó el reclutamiento de pacientes, toma de muestra a los mismos, el procesamiento de cada muestra que implicó la descontaminación y crio preservación. Además, se cuantificaron metabolitos proinflamatorios como: IL-8, nucleosomas, LTB4 y PGE2 en saliva, y neutrófilos en lavados bucales. También se cuantificaron metabolitos pro-resolutorios: LXA4, RvD1 y Mar1 en saliva, todos utilizados como biomarcadores. Así mismo, se cuantificaron metabolitos de resorción ósea y osificación en saliva, como: RANKL y OPG. Por último, se analizaron los datos obtenidos generando bases de datos, realizando gráficas y pruebas estadísticas para la escritura del informe final.

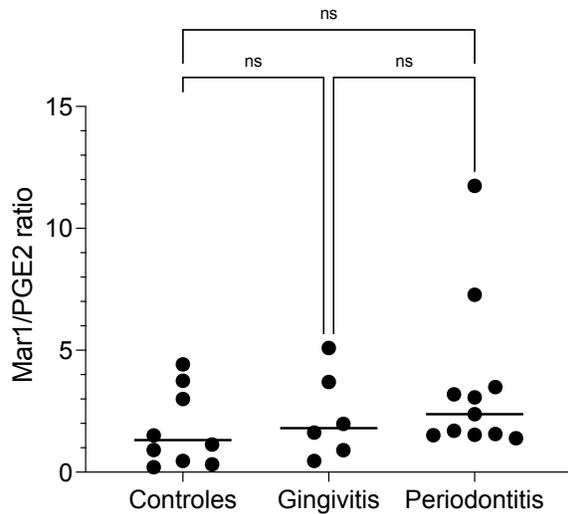
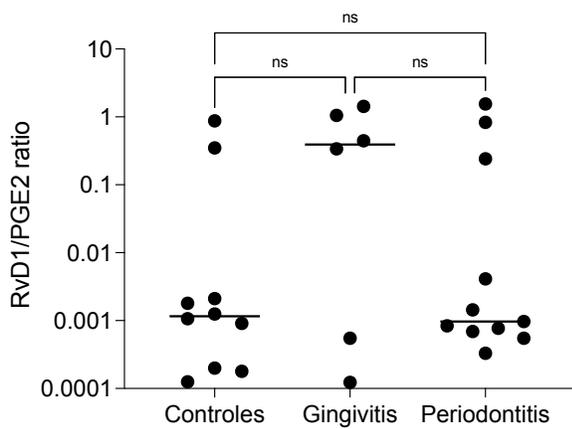
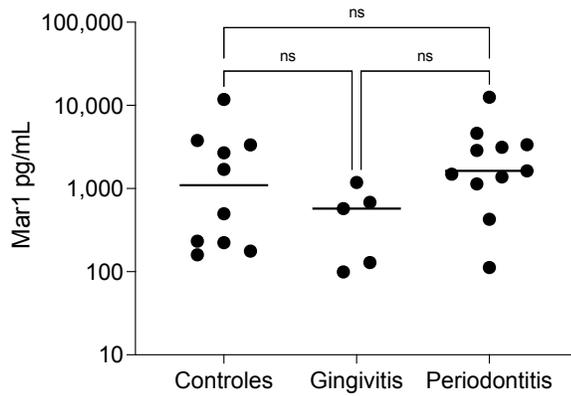
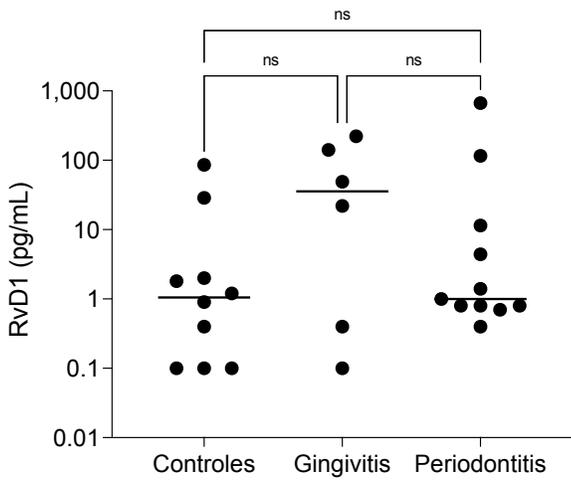
Metas alcanzadas

Se cumplió el objetivo general del proyecto al 100%, ya que se pudo determinar la asociación de la fisiopatología y el control de la enfermedad periodontal con ayuda de los objetivos particulares que también se cumplieron, midiendo todos los biomarcadores respectivamente como indicadores de resorción ósea, homeostasis ósea, inflamación, daño tisular y resolución de la inflamación asociados a la severidad.

Resultados y conclusiones

Indicadores de inflamación

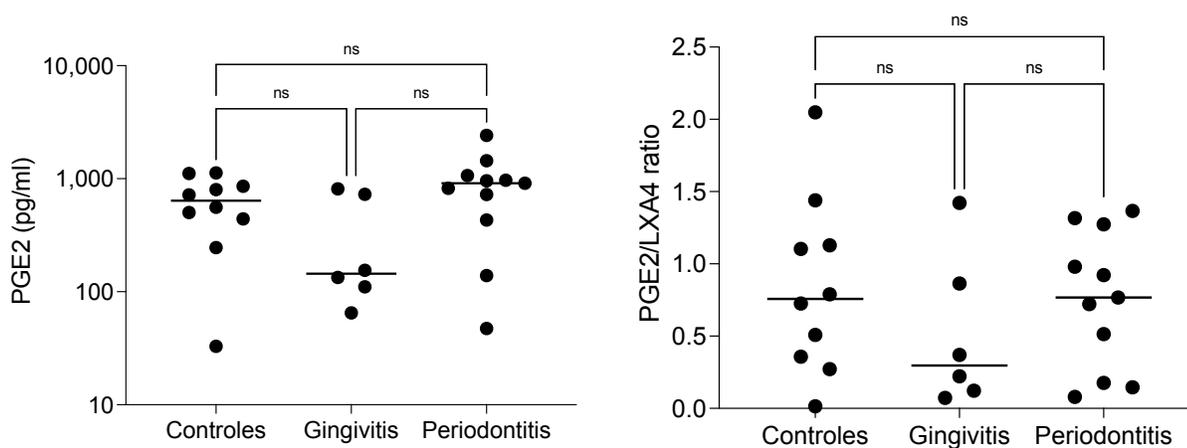
No se encontraron diferencias significativas al realizar las pruebas estadísticas, sin embargo, estos resultados sugieren que la enfermedad periodontal se acompaña de mayor reclutamiento de neutrófilos y un mayor daño tisular.



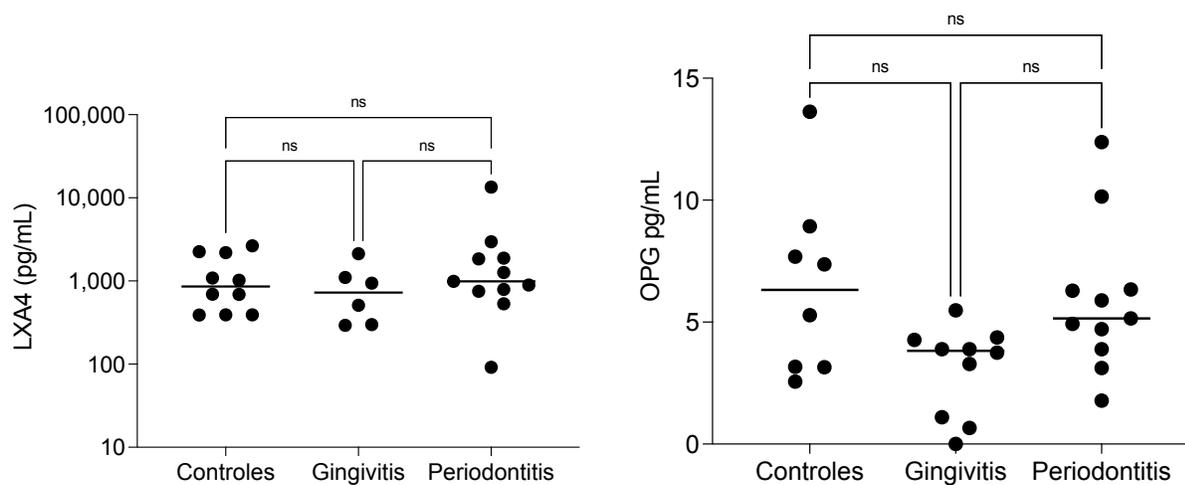
Indicadores de homeostasis ósea

Los resultados de homeostasis ósea sugieren un mayor desgaste del hueso en la etapa inicial del daño periodontal arrojando valores altos de PGE2 ya que induce la resorción, mientras que los niveles altos de OPG en periodontitis y en controles son debido al regreso de la homeostasis.

Resorción ósea



Osificación



1. La mayoría de los marcadores en estudio se presentan en niveles similares entre sujetos con el periodonto sano y los pacientes con periodontitis.

2. El grupo de individuos con gingivitis parece ser distinto, pero el tamaño de la muestra no permite comprobarlo.
3. Será necesario evaluar todos los factores presentes en el grupo heterogéneo de individuos que integran cada grupo para determinar su contribución en la patología periodontal.

Recomendación

Se recomienda ampliar los grupos de estudio para que las pruebas estadísticas arrojen mejores resultados, también se recomienda agregar algunos criterios o características clínicas de los pacientes como talla y peso o índice de masa corporal (IMC), especificar el grado de periodontitis de los pacientes que la padecen y determinar de manera contundente los criterios de inclusión o exclusión de los participantes, así como tener grupos homogéneos en cuanto a la edad y al sexo para que no sean un factor para que los resultados se vean afectados.

En cuanto al procesamiento de la muestra se recomienda medir los niveles de proteasas en las muestras de saliva para determinar su viabilidad cuando se realicen los ensayos ELISA, de igual forma se recomienda establecer el tiempo máximo para realizar las pruebas en los biomarcadores para que el tiempo no sea un factor para considerar.

Por último, se recomienda continuar la investigación y el trabajo en el laboratorio para poder usar esta herramienta en futuras investigaciones para dar solución a distintos problemas de salud.

Referencias bibliográficas

Acuña, M., y Juárez, R. (2021). Concentración de mucina salival en pacientes con enfermedad periodontal. *Odontoestomatología*, 24 (38): 1-8.

Arias-Bujanda, N., Balsa-Castro, C., Regueira-Iglesias, A., Nibali, L., Donos, N., y Tomás, I. (2019). Accuracy of single molecular biomarkers in gingival crevicular fluid for the diagnosis of periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 46 (12): 1166-1182.

Aronson, J. K., y Ferner, R. E. (2017). Biomarkers—A General Review. *Current Protocols in Pharmacology*, 76:1.

Asquino, N., Vigil, G., Pereira, V., Bueno, L., y Bologna R. (2022). Reabsorción ósea en la enfermedad periodontal: el papel de rank, rankl y opg. Una revisión bibliográfica. *Odontoestomatología*, 24 (40): 1-13.

Barembaum, S., y Azcurra, A. (2019). La saliva: una potencial herramienta en la Odontología. *Revista de la Facultad de Odontología*, 29 (2): 8-21.

Camacho-Sánchez, M., Leandro-Vargas, L.A., Mendoza Salas, M., Meza-Gutiérrez, N., y Montero-Zúñiga, F. (2023). Biomarcadores en el diagnóstico temprano y tratamiento de cáncer. *Tecnología en Marcha*, 36 (2): 109-117.

Carvajal, P. (2016). Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 9 (2): 177-183.

Caton, J., Armitage, G., y Berglundh, T. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions: Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45: 1-8.

Combina, C., Escandriolo, J., y Actis, A. (2020). Incorporación salival y plasmática de ácidos grasos luego de su ingesta inmediata en ratas. *Revista de la Facultad de Odontología*, 30 (3): 29-35.

Feng, Y., Li, Q., Chen, J., Yi, P., Xu, X., Fan, Y., Cui, B., Yu, Y., Li, X., Du, Y., Chen, Q., Zhang, Z., Jiang, J., Zhou, X., y Zhang, P. (2019). Salivary protease spectrum biomarkers of oral cancer. *International Journal of Oral Science*, 11:7.

Fine, D., Patil, A., y Loos, B. (2018) Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, 95-111.

Flores-Reyna, L., y Martínez-Fernández, M. (2022). Proteoma salival: alcances y perspectivas para el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad periodontal. Revisión de la literatura. *Revista Odontológica Mexicana*, 26 (1): 99-112.

Herrera, D., Figuero, E., Shapira, L., Jin, L., y Sanz, M. (2018). La nueva clasificación de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Revista Científica de la Sociedad Española de Periodoncia*, 1 (11): 94-110.

Kaczor-Urbanowicz, K., Carreras-Presas, C., Aro, K., Tu, M., Garcia-Godoy, F., y Wong, D. (2016). Saliva diagnostics – Current views and directions. *Experimental Biology and Medicine*, 0: 1–14.

Kaczor-Urbanowicz, KE., Martin, C., Aro, K., Tu, M., Garcia-Godoy, F. y Wong, DTW. (2017). Saliva diagnostics – Current views and directions. *Experimental Biology and Medicine*, 242 (5): 459-472.

Liccardo, D., Cannavo, A., Spagnuolo, G., Ferrara, N., Cittadini, A., Rengo, C. (2019). Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. *International Journal Molecular Sciences*, 20 (6): 1-14.

McGrath, EE. (2011). OPG/RANKL/RANK pathway as a therapeutic target in cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 6 (9): 1468-1473.

Michea, A., Briceño, C., Alcota, M., y González, F. (2016). Péptidos antimicrobianos y mediadores lipídicos: rol en las enfermedades periodontales. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 9 (3): 231-237.

Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., OhHara, M., y Feng, JQ. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 17 (10): 1231-1234.

Papapanou, P., Sanz, M., y Budunelli, N. (2018) Workgroup 2: Consensus Report, Periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 45: 162-170.

Pardo, F., y Hernández, L. (2018). Enfermedad periodontal: enfoques epidemiológicos para su análisis como problema de salud pública. *Revista de Salud Pública*, 20 (2): 258-264.

Pereira, M., Venancio, R., Lucas, J., Da Costa, R., De Lima, J., y Ximenes, S. (2021). Biomarcadores salivales en el diagnóstico y seguimiento de patologías orales y sistémicas. *Revista Bioanálisis*, 114 (1): 46-57.

Quesada-Chaves, D. (2018). Relación entre la enfermedad Periodontal y enfermedad cardiovascular. La necesidad de un protocolo de manejo. *Revista Costarricense de Cardiología*, 20 (2): 37-43.

Ruano, P. (2018). Diferencias inter-individuales y variabilidad inter-sesión de potenciales biomarcadores de dolor en sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado. [Trabajo de fin de grado]. Universidad de Valladolid, 8.

Russell, M., Rustrían, M., y Nachón, M. (2021). Modelos de autorreportes para detección de enfermedades periodontales: revisión sistemática. *Revista Electrónica de la Coordinación Universitaria de Observatorios de la Universidad Veracruzana*, 12 (1): 169-185.

Salvatierra, E., Salinas, J., Hidalgo, A., y Sánchez, M. (2017). Capacidad diagnóstica de los biomarcadores salivales interleucinas 6 y 8 para el diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cavidad oral. *Avances en Odontoestomatología*, 33 (2): 67-75.

Sánchez, C. R., Sánchez, R., Sigcho, C., & Expósito, A. (2021). Factores de riesgo de enfermedad periodontal. *Correo Científico Médico*, 25 (1).

Sasso, GR., Florencio-Silva, R., Simões, RS., Baracat, MC., Soares-Junior, JM., y Baracat, EC. (2015). Elevated serum osteoprotegerin levels in women: friend or foe? *Revista da Associação Médica Brasileira*, 61 (6): 524-529.

Secretaría de Salud. (2019). Resultados 2018 del sistema de vigilancia epidemiológica de patología bucales. Consultado en <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-sivepab-2018> Fecha de consulta 15/11/2023.

Taboada-Aranza, O., Cerón, J., y Rodríguez, A. (2018). Frecuencia y distribución de enfermedades periodontales asociadas a placa bacteriana en pacientes que acuden a una clínica universitaria. *Revista ADM*, 75 (3): 147-152.

Tonetti, M., Greenwell, H., y Kornman, K. (2018). Periodontitis case definition: Framework for staging and grading the individual periodontitis case. *Journal of Clinical Periodontology*, 45: 149-161

Torres, I., y Pérez, J. (2016). Biomarcadores y práctica clínica. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 39 (1): 5-8.

Tu, P., Duan, P., Zhang, RS., Xu, DB., Wang, Y., y Wu, HP. (2015). Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in post-menopausal women. *Osteoporosis International*, 26 (1): 179-185.

Villanueva, D., y Marrugo, J. (2014). Efectos de los ácidos grasos de la dieta y sus metabolitos en células de la respuesta alérgica. *Revista Médica Sanitas*, 17 (4): 212-230.

Villa, P. (2015). Enfoque salubrista de la enfermedad periodontal. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2 (4): 180-189.

Wiedloncha, M., Marcinowicz, P., Krupa, R., Janoska-Jaździk, M., Janus, M., Dębowska, W., Mosiołek, A., Waszkiewicz, N., y Szulc, A. (2018). Effect of antidepressant treatment on peripheral inflammation markers a meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 80: 217-226.

Xiong, J., y O'Brien, CA. (2012). Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27 (3): 499-505.

Anexos

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los participantes del estudio.

Características	Sanos, n=10	Gingivitis, n=10	Periodontitis, n=11
Sexo, Hombre, n (%)	6 (60)	2 (20)	6 (54.54)
Edad, años, mediana (rango)	30.5 (20-72)	33 (18-57)	54 (26-70)
Comorbilidades			
DT2, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)	1 (9.09)
Asma, Sí, n (%)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
SAOS, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)	2 (18.18)
EPOC, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)	1 (9.09)
Enfermedad Interticial, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Otras, Sí, n (%)	1 (10)	2 (20)	6 (54.54)
Fuma, Sí, n (%)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
Cuidado dental			
Cepillado, veces por día, mediana (rango)	2.5 (2-4)	2 (1-4)	2 (2-3)
Hilo dental, Sí, n (%)	4 (40)	3 (30)	2 (18.18)
Enjuague bucal, Sí, n (%)	4 (40)	1 (10)	2 (18.18)
Cepillo propio, Sí, n (%)	10 (100)	10 (100)	11 (100)
Cambio de cepillo, frecuencia, mediana (rango)	3 (2-4)	2 (1-4)	4 (1-6)
Limpieza de lengua, Sí, n (%)	8 (80)	8 (80)	7 (63.63)
Consumo de alimentos			
Pescado Sí, n (%)	6 (60)	6 (60)	10 (90.90)
Semillas Sí, n (%)	7 (70)	5 (50)	10 (90.90)
Pan, Sí n (%)	10 (100)	10 (100)	10 (90.90)
Caramelos y chocolate, Sí n (%)	80 (80)	5 (10)	9 (81.81)
Café Sí, n (%)	9 (90)	9 (90)	10 (90.90)
Refrescos, Sí n (%)	6 (60)	8 (80)	9 (81.81)
Bebidas alcoholicas, Sí n (%)	4 (40)	2 (20)	7 (63.63)

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de hombres y mujeres con periodonto sano

Características	Hombres, n=9	Mujeres, n=14
Edad, años, mediana (rango)	26 (22-72)	48.5 (20-64)
Comorbilidades		
DT2, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)
Asma, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)
SAOS, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)
EPOC, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)
Enfermedad Interticial, Sí, n (%)	0 (0)	0 (0)
Otras, Sí, n (%)	1 (11.11)	2 (14.28)
Fuma, Sí, n (%)	2 (22.22)	4 (28.57)
Cuidado dental		
Cepillado, veces por día, mediana (rango)	2 (1-4)	3 (2-3)
Hilo dental, Sí, n (%)	4 (44.44)	7 (50)
Enjuague bucal, Sí, n (%)	3 (33.33)	7 (50)
Cepillo propo, Sí, n (%)	9 (100)	14 (100)
Cambio de cepillo, frecuencia, media (rango)	4 (2-4)	4 (1-4)
Limpieza de lengua, Sí, n (%)	7 (77.77)	13 (92.85)
Consumo de alimentos		
Pescado Sí, n(%)	6 (66.66)	12 (85.71)
Semillas Sí, n(%)	9 (100)	11 (78.57)
Pan, Sí n(%)	8 (88.88)	13 (92.85)
Caramelos y chocolate, Sí n(%)	9 (100)	13 (92.85)
Café Sí, n(%)	7 (77.77)	13 (92.85)
Refrescos, Sí n(%)	4 (44.44)	11 (78.57)
Bebidas alcohólicas, Sí, n(%)	7 (77.77)	9 (64.28)



Asesor interno

Dra. Patricia Castilla Hernández, UAM-X
(30606)



Asesor externo

Dra. Esmeralda Juárez Carvajal,
Investigador en Ciencias Médicas “D”

Departamento de Investigación en
Microbiología. INER