



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Estudio comparativo de proteínas salivales y
concentraciones de calcio en pacientes con
periodontitis crónica y periodontitis agresiva.**

DEGRADO

TRABAJO ESPECIAL

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de
Venezuela por La Br. Fabiana
Barrios, como requisito parcial
para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. María Valentina
Salas

Caracas, Mayo de 2012.

RESUMEN

La saliva total humana es un fluido que presenta funciones importantes de digestión, gusto, lubricación de la mucosa bucal y actividad antibacteriana. Es una mezcla compleja de electrolitos como, Ca^{2+} , PO_4^{3-} y de proteínas como, inmunoglobulinas y enzimas. En los últimos años se ha incrementado el interés en el análisis de saliva como herramienta de diagnóstico en enfermedades sistémicas, determinación de drogas y enfermedades bucales como la enfermedad periodontal (EP). La EP, se caracteriza por una marcada respuesta inflamatoria en los tejidos de soporte del diente, con la formación de un saco periodontal, que lleva a la pérdida del hueso alveolar y eventualmente a la pérdida del diente. Existen diferentes formas de la EP, pero aquí nos enfocaremos específicamente en la periodontitis crónica (PC) y periodontitis agresiva (PA). En la PC ocurre la inflamación crónica de las encías y formación de sacos periodontales. La PA difiere de la forma crónica por la rapidez de la progresión de la pérdida de inserción del diente y de hueso alveolar. La detección de estas enfermedades se realiza a través de la determinación de la profundidad del saco periodontal por sondaje, exámenes clínicos y radiográficos, que no permiten identificar pacientes con mayor riesgo o el grado de actividad de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es comparar concentraciones de proteínas salivales, perfiles electroforéticos y concentraciones de Ca^{2+} salival en pacientes con PC y PA. Previo consentimiento informado, participaron 31 individuos para la determinación de proteínas, clasificados en los grupos: Control (C): 13, con PC: 11, con PA: 7. Antes de obtener las muestras de saliva, los pacientes estuvieron, al menos dos horas, sin comer, beber, ni realizar método de higiene bucal alguno. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry y col. (1951). La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó según el método de Laemmli (1970). Al aplicar la prueba de Fisher la concentración de proteínas del grupo de adultos con PC ($4,5 \pm 1,8$ mg/mL) fue mayor en comparación con el grupo C ($3,4 \pm 0,77$ mg/mL) y de igual forma ocurre con la concentración de proteínas del grupo de adultos con PA ($4,7 \pm 0,69$ mg/mL), encontrándose diferencias significativas entre las condiciones de EP en relación con el grupo C (PC.= $p < 0,05$; PA.= $p < 0,05$). Al comparar entre las condiciones de EP, la PA presenta un promedio mayor de la concentración de proteínas en comparación con el grupo de PC, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$). Los perfiles electroforéticos muestran diferencias entre los grupos en proteínas de baja masa molecular. Para la determinación de Ca^{2+} salival la cual se realizó con una modificación del método colorimétrico con orto-cresolftaleína complexona (Connerty y Briggs, 1966), participaron 88 individuos, clasificados en los grupos C: 44. PC: 34. PA. 10. Al aplicar la prueba de Fisher la concentración del grupo de adultos con PC ($1 \pm 0,45$ mmol/L) es mayor en comparación con el grupo C ($0,97 \pm 0,45$ mmol/L) y mayor que los adultos con PA ($0,92 \pm 0,34$ mmol/L), no se encontraron diferencias significativas entre el grupo C y el grupo con EP. De igual forma no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones de PC y PA.

Lista de Abreviaturas

AAP: Academia Americana de Periodontología	PAS: De las siglas en inglés de Periodic acid-Shiff
ANOVA: Análisis de varianza	PGE₂: Prostaglandina E ₂
COX: Ciclooxygenasa	PRP: Proteínas Ricas en Prolina
CRP: Proteína C Reactiva	PSA: Persulfato de Amonio
DE: Desviación estándar	SDS: Dodecil Sulfato de Sodio
Ig: Inmunoglobulina	SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
IgA: Inmunoglobulina A	TCA: Ácido tricloroacético
IgG: Inmunoglobulina G	TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
IgM: Inmunoglobulina M	TIMP-1: Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas de Matriz 1
IL-1: Interleucina 1	TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral alfa
IL-6: Interleucina 6	V: Voltios
LPMN: Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos	VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
LPS: Lipopolisacárido	
MMP: Metaloproteinasas de matriz	
OCPC: Orto-Cresoltaleina complexona	

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	6
GLÁNDULAS SALIVALES	7
<i>Glándulas parótidas.....</i>	8
<i>Glándulas submandibulares</i>	8
<i>Glándulas sublinguales.....</i>	9
FORMACIÓN DE LA SALIVA	9
FLUIDO GINGIVAL CREVICULAR.....	10
COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA SALIVA.....	11
<i>Componentes orgánicos.....</i>	11
<i>Componentes inorgánicos.....</i>	13
<i>Calcio (Ca²⁺).....</i>	13
<i>Fosfato (PO₄³⁻)</i>	13
<i>Hidroxiapatita.....</i>	14
CALCIO, FOSFATO Y FLUORURO EN EL MANTENIMIENTO DEL ESMALTE DENTAL	14
CAPACIDAD AMORTIGUADORA DE LA SALIVA.....	16
FLUJO SALIVAL.....	16
LA SALIVA COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO.....	17
ENFERMEDAD PERIODONTAL	19
<i>Gingivitis.....</i>	21
<i>Periodontitis.....</i>	21
<i>Periodontitis crónica.....</i>	24
<i>Periodontitis agresiva.....</i>	25
ETIOLOGÍA DE LA PERIODONTITIS.....	26
FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DENTAL	27
FORMACIÓN DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA SOBRE LA SUPERFICIE DEL DIENTE	28
COLONIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DENTAL Y MADURACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DENTAL.	29
FACTORES ETIOLÓGICOS BACTERIANOS DE LA PERIODONTITIS	30
CONSIDERACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA PERIODONTITIS	32
FACTORES DE RIESGO EN LA PERIODONTITIS	36
<i>Factores inmunológicos.....</i>	36
<i>Factores genéticos</i>	36
<i>Factores ambientales.....</i>	37
<i>Género.....</i>	37
<i>Estatus socioeconómico.....</i>	38
<i>Tabaco.....</i>	38
EPIDEMIOLOGÍA DE LA PERIODONTITIS.....	39

EL PAPEL DE LA SALIVA EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	40
OBJETIVO GENERAL	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	44
MATERIAL BIOLÓGICO.....	44
GRUPO DE ESTUDIO.....	45
CENTRIFUGACIÓN DE LAS MUESTRAS	46
DETERMINACIÓN DE Ca^{2+} SALIVAL MEDIANTE EL MÉTODO DE ORTO-CRESOLFALFA	
COMPLEXONA.....	46
DETERMINACIÓN DE FOSFATOS EN SALIVA TOTAL HUMANA POR MÉTODO DE FISKE Y SUBARROW.	
.....	47
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN SALIVA TOTAL HUMANA	48
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DISOCIANTES.	50
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA CORRIDA ELECTROFORÉTICA.	51
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA GELES CON TINCIÓN EN AZUL DE COOMASSIE.	51
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA GELES CON TINCIÓN DE PLATA.....	52
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA GELES PARA TINCIÓN CON ÁCIDO PERYÓDICO SHIFF.....	52
TINCIÓN DEL GEL CON AZUL DE COOMASSIE	52
TINCIÓN DEL GEL CON PLATA	53
TINCIÓN DEL GEL CON ÁCIDO PERYÓDICO-SCHIFF.	53
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
RESULTADOS.....	55
ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS DE SALIVA BAJO DIVERSOS PERÍODOS DE CONGELACIÓN.	55
ESTABILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DE PO_4^{3-} EN SALIVA.	55
ESTABILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} EN SALIVA.	56
ESTABILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN SALIVA.....	57
CONCENTRACIONES DE Ca^{2+} EN ADULTOS SANOS Y CON ENFERMEDAD PERIODONTAL	58
CONCENTRACIONES DE PROTEÍNAS EN ADULTOS SANOS Y CON ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	59
PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS DE SALIVA DE PACIENTES CON PERIODONTITIS	
CRÓNICA Y PERIODONTITIS AGRESIVA.....	60
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	85
ANEXOS	93
CONSENTIMIENTO INFORMADO	94
INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LOS INDIVIDUOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE	
SALIVA	95

INTRODUCCIÓN

La saliva entera es una mezcla compleja de fluidos que provienen de las glándulas salivales mayores y menores y del fluido gingival crevicular, también contiene bacterias bucales y restos de alimentos (Humphrey y Williamson, 2001). Es un fluido bucal incoloro, hipotónico y ligeramente ácido, que posee importantes funciones, participando en la formación del bolo alimenticio, humedeciendo los alimentos, y luego juega un papel clave en el inicio de la digestión ya que a través de la enzima α -amilasa digiere el almidón de los alimentos (Chiappin, 2007).

El 99% de la saliva es agua, mientras que el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas (Puy, 2006). Este fluido está involucrado en el mantenimiento de la salud bucal ya que participa en la lubricación y protección de los tejidos bucales, posee capacidad amortiguadora, mantiene la integridad del diente, tiene actividad antimicrobiana y juega un papel importante en el gusto y la digestión (Humprey y Williamson, 2001).

La cantidad y composición de saliva humana secretada depende de varios factores tales como la tasa de flujo, el ritmo circadiano, tipo y tamaño de las glándulas salivales, duración y tipo de estimulación, dieta, medicamentos, edad, género, tipo de sangre y estado fisiológico (Motemayel, 2010).

El término “saliva entera” o “total” es utilizado para describir la combinación de fluidos presentes en la cavidad bucal provenientes de las glándulas salivales, fluido gingival crevicular, bacterias, células epiteliales desprendidas y restos de alimentos (De Almeida y col., 2008).

Glándulas salivales

Las glándulas salivales pueden clasificarse según su tamaño (mayores y menores) y según sus secreciones (serosas, mucosas y mixtas). Los tres pares de glándulas mayores son las parótidas, las submandíbulares y las sublinguales y son las responsables de la secreción de la mayor parte de la saliva (Figura 1). Existen numerosas glándulas salivales menores que se encuentran dispersas por toda la mucosa bucal, distribuyéndose como glándulas labiales, bucales, palatolinguales, palatinas y linguales (Berkovitz y col., 1995).

Las unidades secretoras de las glándulas salivales están representadas por grupos de células llamadas acinos que conforman el adenómero, los cuales vierten su secreción a la cavidad bucal por medio de un sistema de conductos excretores (Ferris, 2009).

La estimulación de los nervios parasimpáticos causa la liberación de agua e iones, pero no de proteínas; mientras que la estimulación de los nervios simpáticos produce la liberación de proteínas empaquetadas dentro de las células acinares. Los nervios autónomos parasimpáticos y simpáticos regulan la actividad de secreción de la glándula salival (De Almeida y col., 2008).

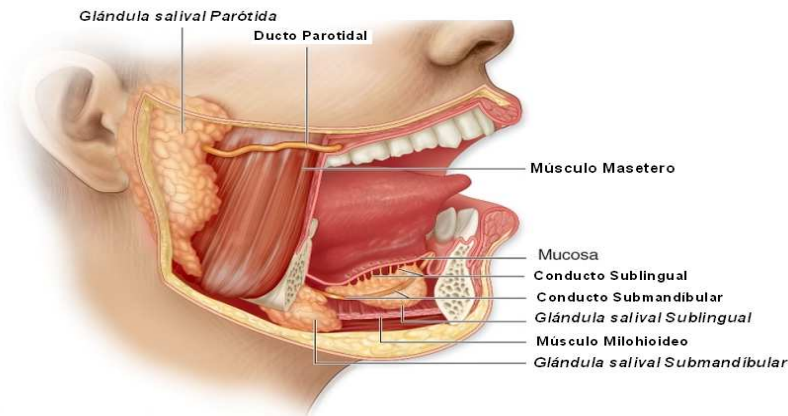


Figura 1: Glándulas salivales. Modificado de http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/Digestive%20System.htm. [Consulta: 10 de Abril de 2010].

Glándulas parótidas

Son las más grandes de las glándulas salivales mayores, están situadas por debajo y por delante del oído, cuyo conducto excretor desemboca en la cavidad bucal. Las células secretoras de estas glándulas son serosas, es decir, que su producto de secreción es rico en proteínas (Ross y col., 2004).

Glándulas submandibulares

Son un par de glándulas más o menos grande, ubicadas debajo del piso de la boca, una de cada lado, cerca de la mandíbula. Son glándulas mixtas, es decir, están formadas por acinos serosos y mucosos, el producto de secreción de estos últimos es la mucina, que es una mezcla de glucoproteínas (Ross y col., 2004).

Glándulas sublinguales

Son las más pequeñas de las glándulas salivales mayores, son pares. Están situadas en el piso de la boca, en posición anterior con respecto a las glándulas submandibulares. Poseen múltiples conductos excretores pequeños que desembocan en los conductos de Wharton. Predominan los ácinos mucosos y presentan pocas células serosas, en forma de semiluna también conocidas como glándulas de Von Ebner (Ross y col., 2004).

Formación de la saliva

Las glándulas salivales están compuestas por células epiteliales especializadas, y su estructura puede ser dividida en dos regiones específicas: La región acinar y ductal. La región acinar es donde el fluido es generado y la mayoría de la síntesis y secreción de proteínas se lleva a cabo. Los aminoácidos entran en las células acinares por transporte activo y luego de la síntesis intracelular de proteínas la mayoría son almacenadas en forma de gránulos que son liberadas en respuesta a una estimulación (Kaufman y Lamster, 2002).

La formación de la saliva ocurre en el acino y luego es modificada al pasar por los ductos. La secreción es formada activamente por el movimiento de iones de sodio y cloruro hacia el lumen, creando un gradiente osmótico que permite el paso del agua. Otros componentes acinares son añadidos aquí, antes de que el fluido entre al ducto, donde el sodio es reabsorbido (el cloruro pasa pasivamente para

mantener el equilibrio eléctrico), y el potasio y bicarbonato son secretados. Las proteínas como amilasas, mucinas, glucoproteínas, etc., se forman en el retículo endoplasmático de la célula acinar, y son procesadas en vesículas secretoras en el aparato de Golgi y expulsadas de la célula por exocitosis (Edgar, 1992).

Fluido gingival crevicular

Es un trasudado del suero o un exudado inflamatorio que se encuentra rodeando al diente, contiene sustancias provenientes de la biopelícula dental, moléculas de la sangre así como células epiteliales (Lamster y Ahlo, 2007).

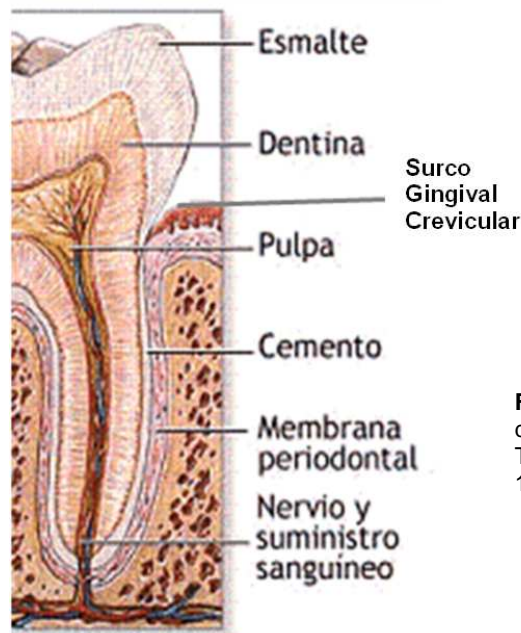


Figura 2: Estructura del diente y el periodonto donde se muestra el surco gingival crevicular. Tomado de [www. colodental.com](http://www.colodental.com). [Consulta: 11 de Abril de 2010].

Este fluido va hacia la cavidad bucal a través del surco gingival crevicular (Figura 2), que se forma por la separación existente entre el diente y la encía y está tapizado por el epitelio crevicular, que es continuo con el epitelio plano estratificado no queratinizado de fijación (Ross y col., 2004).

Composición bioquímica de la saliva

Como se mencionó anteriormente, la saliva es un fluido que cumple múltiples funciones en la cavidad bucal, esto se debe a la variedad de componentes inorgánicos como electrolitos y componentes orgánicos proteicos y no proteicos.

Componentes orgánicos

Dentro de los componentes orgánicos se encuentran una variedad de enzimas, inmunoglobulinas y glucoproteínas. Las proteínas de saliva humana tienen una amplia gama de propiedades funcionales, las cuales pueden estar relacionadas con la respuesta inmune, protección y lubricación de los tejidos bucales entre otras (Chiappin, 2007). En la Tabla 1 se encuentran las principales proteínas y su función en la cavidad bucal.

Tabla 1. Principales Proteínas salivales y su función.

Proteína salival	Masa molecular (kDa)	Función en la cavidad bucal
Inmunoglobulina A (Ig A)	400	Participa en las reacciones inmunitarias
Mucinas MG1 MG2	>1000 200	Antibacteriana, antifúngica, antiviral, formación del bolo, lubricación y viscoelasticidad.
Lactoperoxidasa	78	Antibacteriana
Lactoferrina	76	Antibacteriana y antifúngica
α –amilasa	50-55	Inicio de la digestión
Proteínas Ricas en Prolina (PRP)	Ácidas 16 Básicas 6-9 Glucosiladas 36	Remineralización del diente, lubricación y viscosidad
TIMP-1	28	Inhibidor de metaloproteinasas
VEGh	20	Antibacteriana
Lisozima	14	Antibacteriana
Cistatinas	14	Antibacteriana y antiviral
Histatinas	1-4	Antifúngica y participa en la formación de la biopelícula adquirida del diente

Componentes inorgánicos

En la saliva podemos encontrar una serie de electrolitos en diferentes concentraciones que componen el 0,2% de la saliva y participan en diversas funciones en la cavidad oral.

Calcio (Ca^{2+})

Es un ión divalente excretado junto con las proteínas salivales, por lo que su concentración depende del flujo salival. La fracción del calcio ionizado es cerca del 50% y depende fuertemente del pH salival (Gómez y col., 2006).

El calcio se encuentra en mayor proporción en la saliva no estimulada, que en la estimulada, ya que procede, sobre todo, de la secreción de las glándulas submaxilar y sublingual y cuando se produce una estimulación el mayor volumen secretado se obtiene de la glándula parótida (Puy, 2006).

Fosfato (PO_4^{3-})

Alrededor del 10-25% del fosfato inorgánico, dependiendo de factores como el pH, forma complejos con iones inorgánicos como el calcio o unido a proteínas. (Gómez y col., 2006).

La concentración de fosfato de la saliva procedente de las glándulas submaxilares es aproximadamente 1/3 de la concentración de la saliva parotidea, pero es seis veces superior a la que posee la saliva de las glándulas salivales menores (Nauntofte y col., 2003).

El fosfato actúa como agente amortiguador en situaciones donde el flujo salival no se encuentra estimulado. A un pH sobre 6 la saliva está sobresaturada de fosfato con respecto a la hidroxiapatita y cuando el pH se reduce por debajo del pH crítico (5,5), la hidroxiapatita comienza a disolverse, y los fosfatos liberados tratan de restablecer el pH salival, lo que depende en último término del contenido de iones fosfato así como del Ca^{2+} en el medio circundante (Puy, 2006).

Hidroxiapatita

Es un mineral formado por fosfato de calcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Figura 3). Es uno de los componentes del esmalte dental y la dentina, por lo que la integridad del diente depende del mantenimiento de las concentraciones saturantes de calcio y fosfato con respecto a la hidroxiapatita (Newman y col., 2004).

Calcio, fosfato y fluoruro en el mantenimiento del esmalte dental

El esmalte dental está compuesto de átomos, tales como el calcio y el fosfato. Estos iones forman un cristal duro llamado esmalte, el cual conforma la capa exterior de los dientes. Ciertas bacterias de la biopelícula bacteriana producen ácidos cuando están expuestas a azúcares provenientes de la ingesta de alimentos. La acción de estos ácidos conlleva a la disolución del cristal de hidroxiapatita del esmalte. Este proceso es llamado desmineralización.

La alta concentración de calcio y fósforo en la saliva, es mantenida por proteínas como las cistatinas, estaterinas y proteínas ricas en prolina (Humprey y Williamson, 2001), éstas permiten la incorporación de estos electrolitos al esmalte, contribuyendo al desarrollo del cristal de hidroxiapatita y por lo tanto remineralizando al diente (Raj y col., 1992).

El flúor está presente a muy bajas concentraciones en la saliva, pero desempeña un papel fundamental en la remineralización, ya que al combinarse con los cristales del esmalte, forma la fluoroapatita, que es mucho más resistente a la acción de los ácidos de las bacterias (Gómez y col., 2006). Este elemento no es producido de forma natural por las glándulas salivales, sino que es incorporado al organismo a través de la dieta, tanto por el agua como por ciertos alimentos como los vegetales, pescados, mariscos y el té. También proviene de ciertos medicamentos que contienen flúor en su formulación, además del empleo de geles, enjuagues y pastas dentales fluoradas, que pueden contribuir al incremento diario de flúor (García, 2001).

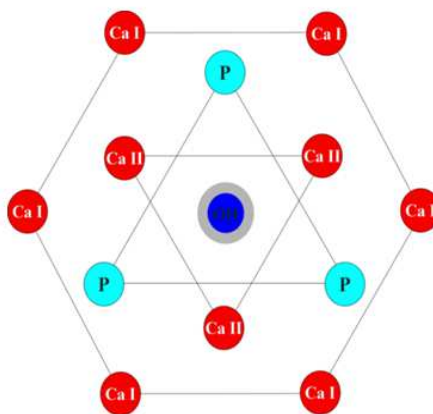


Figura 3: Estructura de la Hidroxiapatita. Tomado de http://patbucal.umayor.cl/bioquimica_caries/bioquimica_caries.html. . [Consulta: 04 de Mayo de 2010].

Capacidad amortiguadora de la saliva

Es la capacidad de la saliva para contrarrestar los cambios de pH. Esta propiedad ayuda a proteger a los tejidos bucales contra la acción de los ácidos provenientes de los alimentos o de la biopelícula dental, reduciendo así el potencial cariogénico del ambiente (Edgar, 1992).

El efecto amortiguador de la saliva se debe en gran parte debido al bicarbonato/carbonato y en menor proporción, a los iones fosfato, que neutraliza los ácidos ingeridos o producidos por el metabolismo de las bacterias en la boca (Motemayel, 2010).

Se ha reportado que el pH de la saliva se encuentra en un rango de 6,2 a 7,4 con una secreción de 0,3 a 7 mL de saliva por minuto (Schipper y Raymond, 2007), pero este valor del pH puede variar dependiendo del flujo salival, de 5,3 para un flujo bajo, a 7,8 para un flujo salival mayor (De Almeida y col., 2008)

Flujo salival

La tasa diaria de secreción de flujo salival es de 500 a 700 mL y el volumen promedio en la boca es de 1,1 mL. La producción de la saliva es controlada por el sistema nervioso autónomo. En reposo, el flujo salival puede variar de 0,25 a 0,35 mL/min (Puy, 2006). El flujo salival es diferente durante todo el día debido a variaciones asociadas a mecanismos fisiológicos que están altamente coordinados con los cambios que ocurren durante el día, este mecanismo es conocido como ritmo circadiano. El mayor flujo salival ocurre durante el día y alcanza su máximo

alrededor del mediodía, en horas de la tarde comienza a descender de manera continua hasta disminuir considerablemente en la noche, durante el sueño. Los ritmos circadianos afectan no solo el flujo salival sino que además altera las concentraciones de componentes salivales como electrolitos y proteínas (Naunfofte y col., 2003).

El flujo salival puede ser iniciado por varios tipos de estimuladores bien sea mecánicos, gustativos y olfativos. Un flujo salival estimulado es diferente en composición al de una condición de flujo salival no estimulado. Por ejemplo, un incremento en el flujo salival obtenido por estimulación con alimentos ácidos incrementaría a su vez la concentración de proteínas como las mucinas además de iones como el sodio y bicarbonato y disminuiría la concentración de fosfato y potasio en comparación con una saliva no estimulada (Chiappin, 2007). En este trabajo se emplearán muestras de saliva no estimulada, de esta forma se esperan obtener valores en los análisis de saliva lo más parecido en su estado de reposo.

La saliva como herramienta de diagnóstico

El posible uso de la saliva como herramienta de diagnóstico se debe al intercambio de sustancias que componen al líquido plasmático, por lo que ésta contiene moléculas que se encuentran en el plasma. Esto ocurre debido a la presencia de una capa delgada de células epiteliales que separa los ductos salivares del sistema circulatorio, haciendo posible para las sustancias ser transferidas a la saliva por difusión a través de la membrana o por medio de difusión pasiva por gradiente de concentración (Lima y col., 2009). La saliva como

herramienta clínica posee varias ventajas debido a que es de fácil obtención, la toma de muestras no es invasiva y tiene un bajo costo para su almacenamiento (Chiappin, 2007). Para los pacientes, la técnica de coleccionar saliva reduce en gran medida la ansiedad y la incomodidad que implica realizar una prueba de sangre (Lee y col., 2009).

La saliva es un buen indicador de los niveles plasmáticos de diversas sustancias tales como hormonas y drogas, por lo que puede utilizarse para analizar las concentraciones plasmáticas de medicamentos u otras sustancias (Puy, 2006).

Este fluido tiene cientos de componentes que sirven para detectar enfermedades sistémicas y también es utilizada como evidencia de exposición del organismo a sustancias dañinas y además provee biomarcadores de salud y del estado de enfermedades (Motemayel, 2010).

La saliva ha sido utilizada en varias áreas de la investigación para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades de origen viral, tuberculosis, linfomas, úlceras gástricas y cáncer, disfunción del hígado y síndrome de Sjögren. También ha sido utilizada para monitorear niveles de polipéptidos, esteroides, anticuerpos, alcohol y una gran variedad de drogas. Entre las enfermedades sistémicas en las cuales se han realizado estudios que involucran a la saliva como herramienta de diagnóstico tenemos al síndrome de Sjögren, tumores malignos, VIH, hepatitis A, B y C, enfermedad periodontal y además para el monitoreo de drogas como cocaína, nicotina, antipirina, alcohol entre otras. (Humprey y Williamson, 2001; Kaufman, 2002; Lee y col., 2009; Lima y col., 2009).

Enfermedad Periodontal

La enfermedad periodontal se caracteriza por una marcada respuesta inflamatoria en los tejidos de soporte del diente, con la formación de un saco periodontal (Figura 4), que lleva a la pérdida del hueso alveolar y eventualmente, a la pérdida del diente (Carranza y Sznajder, 1996).



Figura 4: Encía con enfermedad periodontal. En la figura se observa el estado de una encía sana con una encía que presenta enfermedad periodontal, la cual está inflamada, rojiza y presenta un saco periodontal en comparación con la sana que no presenta dichas características. Modificada de <http://www.dentalcentral.es/educacion.html>. [Consulta: 07 de Febrero de 2011].

En la etiología de la enfermedad periodontal se encuentra la microbiota gingival, que se compone principalmente de bacilos gramnegativos anaerobios (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, y *Bacteroides forsythus*) y aerobios (*Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga spp* y *Campylobacter rectum*). En menor proporción se encuentran pocos gramnegativos anaerobios (*Veillonella*) y grampositivos (*Peptostreptococcus*) (López y González, 2001).

Los componentes estructurales de las bacterias periodontopatógenas como los lipopolisacáridos (LPS) estimulan la producción local de mediadores inflamatorios como la interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) y la proteína C reactiva (CRP). La inflamación es uno de los principales componentes fisiopatológicos en la enfermedad periodontal, porque aumenta la reabsorción ósea y las células inflamatorias inducen la producción de enzimas que degradan el tejido conectivo, como las metaloproteinasas y elastasas (Ramírez, 2005).

El progreso de la enfermedad periodontal depende no sólo de la presencia y severidad de los factores bacterianos locales, sino también de la resistencia de los tejidos periodontales a la agresión, la que a su vez depende de factores genéticos y sistémicos individuales (Carranza y Sznajder, 1996).

Existen una serie de factores de riesgo que pueden predisponer a los individuos a desarrollar esta enfermedad, tales como sexo, raza, edad, hábito de fumar, inadecuada higiene bucal, desnutrición, estrés, y el nivel socioeconómico de los individuos; algunas enfermedades sistémicas, como: diabetes, trastornos de la función de los neutrófilos, estados de inmunosupresión (SIDA, leucemias) y otras como síndrome de Down, síndrome de Papillon Lefevre, síndrome de Chédiak-Higashi, enfermedad de Addison, entre otras, también favorecen su desarrollo (Guillarte y Perrone, 2004).

Podemos encontrar diferentes formas de la enfermedad periodontal con distintas manifestaciones clínicas dependiendo de la etiología y la respuesta del huésped, en las que se encuentran la gingivitis y la periodontitis (Edgar, 1992).

Gingivitis

Es una forma de enfermedad periodontal que se caracteriza por la inflamación de las encías (Carranza y Sznajder, 1996). La gingivitis es usualmente una fase temprana del proceso inflamatorio que puede conducir a la destrucción de los tejidos periodontales; sin embargo, es una condición reversible y no siempre progresa a periodontitis (Ramírez, 2005).

La inflamación gingival es generalmente inducida por la actividad de las bacterias localizadas a la altura del margen gingival, siendo la forma más común de gingivitis, sin embargo, la inflamación de los tejidos gingivales puede ser provocada por una gran variedad de factores como traumatismos, agentes químicos, temperaturas extremas, hormonas, hongos, defectos inmunitarios, embarazo, entre otros (Lindhe, 2009).

Periodontitis

Es el estadio sucesivo a la gingivitis y tiene lugar por la migración apical del epitelio de unión, pérdida de inserción conectiva y de parte del ligamento periodontal y del hueso alveolar de soporte, los cuales forman parte del periodonto (Newman y col., 2004).



Figura 5: Diferentes formas de enfermedad periodontal. Modificada de <http://www.dentalcentral.es/educacion.html>. [Consulta: 14 de Marzo de 2011].

El periodonto (Figura 6), es la estructura responsable de la sujeción del diente, constituido por diferentes estructuras como la encía, el ligamento periodontal, el cemento dental y el hueso alveolar (Ross y col., 2004).

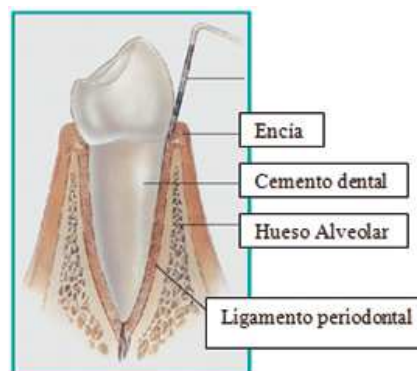


Figura 6: Periodonto. Se muestran los componentes del periodonto, donde el ligamento periodontal y el hueso alveolar son los más afectados en la periodontitis. Tomado de <http://www.clinicadentalmay.cl/periodoncia.htm>. [Consulta: 11 de Junio de 2011].

Un signo clínico de esta patología, que la distingue de la gingivitis es la presencia de pérdida ósea detectable y la formación de un saco periodontal de más de 3 mm detectado por sondaje periodontal (Newman y col., 2004; Cortesi, 2008).

El sondaje se realiza a través de un instrumento diagnóstico llamado *sonda periodontal* (Figura 7), que se usa para valorar clínicamente la destrucción del tejido conectivo, midiendo la profundidad de los sacos periodontales. Es similar a una

barra, calibrada en milímetros, con forma piramidal, y su extremo es romo y redondeado (Newman y col., 2004).



Figura 7: Sonda periodontal. Este instrumento es una barra, calibrada en milímetros que permite valorar la destrucción del tejido conectivo en la periodontitis. Modificada de <http://caredent-fuenlabrada.com>. [Consulta: 11 de Junio de 2011].

La destrucción periodontal resulta de la acción de varios productos tóxicos liberados desde la biopelícula dental del esmalte, como también de la respuesta del huésped frente al ataque bacteriano (Padilla y col., 2007). En la periodontitis los granulocitos neutrófilos y otras células de defensa migran hacia el tejido gingival inflamado después de la invasión bacteriana liberando altos niveles de enzimas lisosomales y metaloproteinasas, lo cual genera una serie de reacciones produciendo la destrucción de los tejidos del huésped (Castro, 2003).

Según la Academia Americana de Periodontología (AAP, 1999), la periodontitis puede clasificarse en varias formas según sus manifestaciones clínicas, pero para este trabajo sólo mencionaremos dos tipos de periodontitis:

Periodontitis crónica

Se caracteriza por la inflamación crónica de la encía, la formación de sacos periodontales y la pérdida del hueso marginal, está directamente relacionada con la presencia de la biopelícula dental. Este tipo de periodontitis se presenta casi de forma más o menos generalizada, con lesiones más avanzadas en donde la higiene es más difícil o en donde abundan factores irritativos. (Carranza y Sznajder, 1996).

Las características clínicas típicas en los pacientes con periodontitis crónica incluyen acumulación de biopelícula supragingival y subgingival, que por lo general se relaciona con la formación de cálculo, inflamación gingival, formación de sacos, pérdida de inserción periodontal y pérdida del hueso alveolar (Newman y col., 2004).

La periodontitis crónica puede clasificarse en localizada, en donde menos del 30 % de los dientes están afectados y en generalizada cuando existe más del 30 % de dientes afectados por esta enfermedad. También puede describirse por su intensidad como leve, moderada y severa sobre la base de la magnitud de la pérdida de inserción clínica (Newman y col., 2004; Echeverría, 2005).

Entre las especies bacterianas que se relacionan con la periodontitis crónica están *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens* y *T. denticola* (Newman y col., 2004).

En cuanto a la respuesta inmunitaria en pacientes con periodontitis crónica las concentraciones de MMP-8 (metaloproteinasa de matriz 8) de neutrófilos están elevadas, mientras que las TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas), no lo

están. Los microorganismos *F. nucleatum* y *T. denticola* liberan altas concentraciones de elastasa y MMP-8, contribuyendo a la destrucción del tejido periodontal (Newman y col., 2004).

Periodontitis agresiva

En esta condición la pérdida de soporte periodontal, progresa muy rápidamente de 4 a 5 μm por día, lo cual sería aproximadamente entre 3 a 5 veces más rápido que en la periodontitis crónica (Ferro y Gómez, 2007).

La periodontitis agresiva difiere de la forma crónica básicamente por la rapidez de la progresión de la pérdida de inserción y de hueso evidente en personas por lo demás sanas, ausencia de grandes acumulaciones de biopelícula dental y cálculos y antecedentes familiares de enfermedad agresiva que señala rasgo genético (Newman y col., 2004). En esta enfermedad es frecuente encontrar en los sacos periodontales proporciones elevadas de *Agreggati bacter actinomycetemcomitans* (Aa) y ocasionalmete de *Porphyromonas gingivalis* (Pérez, 2009).

La periodontitis agresiva se clasifica en dos formas, la localizada y la generalizada y ambas aparecen en pacientes sistémicamente sanos, ocurre una pérdida de inserción y destrucción ósea y hay una cierta predisposición familiar (Echeverría, 2005; Ferro y Gómez, 2007).

En la periodontitis agresiva localizada, es frecuente su aparición en los inicios de la pubertad, las lesiones están localizadas en los primeros

molares/incisivos y no más de dos dientes adicionales afectados. En la periodontitis agresiva generalizada, afecta habitualmente a personas menores de 30 años de edad, aunque pueden ser mayores, las lesiones se observan en tres dientes adicionales además de primeros molares e incisivos (Echeverría, 2005; Pérez, 2009). También puede clasificarse dependiendo de la severidad de la pérdida de inserción del diente en: Leve; cuando existe de 1 a 2 mm de pérdida de inserción clínica; Moderada: de 3 a 4 mm de pérdida de inserción clínica y severa: cuando hay una pérdida de inserción clínica de igual o mayor a los 5 mm (Carranza y Sznajder, 1996).

La periodontitis lleva a la pérdida del hueso alveolar pero principalmente del ligamento periodontal, el cual es el tejido conectivo que rodea la raíz y lo conecta con el hueso alveolar. Este ligamento está compuesto por fibras de colágeno que están dispuestas en haces que se insertan en el cemento y el hueso, dichas fibras reciben el nombre de fibras de Sharpey (Newman y col., 2004; Ross y col., 2004). La destrucción de las fibras de colágeno en el ligamento periodontal constituye un evento crucial para el avance de la enfermedad periodontal. En este punto radica la importancia de entender los procesos infecciosos relacionados con la acumulación de la biopelícula y cálculo dental.

Etiología de la periodontitis

La periodontitis crónica se le considera una enfermedad de avance lento. Sin embargo, ante la presencia de factores sistémicos o ambientales que pueden modificar la respuesta del huésped como la acumulación de placa, diabetes, hábito

de fumar o estrés pueden permitir que la progresión de la enfermedad sea más dañina. Por otra parte, la etiología y patogénesis de la periodontitis agresiva es compleja, no existe un factor, que por sí sólo, sea la causa de esta enfermedad.

Las lesiones periodontales pueden interpretarse como una expresión de respuesta a diferentes factores microbiológicos, como una alta susceptibilidad del paciente o como una combinación de ambos aspectos. Sin embargo, varios estudios han indicado que la biopelícula dental es fundamental para el desarrollo de esta enfermedad por lo que es importante conocer su origen y características (Newman, 2004).

Formación de la biopelícula dental

La biopelícula dental se define como los depósitos blandos que forman una película adherida a la superficie dentaria (Newman y col., 2004). Está compuesta sobre todo por microorganismos. Un gramo de placa (peso húmedo) contiene aproximadamente 2×10^{11} bacterias, que se localizan en una matriz intercelular, que corresponde al 30% de la masa de la biopelícula. Consta de materiales orgánicos e inorgánicos derivados de la saliva, el líquido gingival crevicular y productos bacterianos. Los componentes orgánicos incluyen polisacáridos, proteínas, glucoproteínas y lípidos (Newman y col., 2004) (Figura 8).

Los componentes inorgánicos de esta biopelícula son, en esencia, calcio y fósforo, con vestigios de otros iones como sodio, potasio y fluoruro. La fuente de estos elementos inorgánicos proviene de la saliva y del fluido crevicular. A medida

que aumenta el contenido de estos iones, la masa de la biopelícula dental se calcifica para formar el cálculo (Newman y col., 2004).

La formación de la biopelícula dental puede dividirse en varias fases entre las cuales están la formación de una película adquirida sobre el diente, la colonización microbiana y finalmente, la maduración de la placa.

Formación de la película adquirida sobre la superficie del diente

Esta es la etapa inicial en la formación de la biopelícula dental. Sobre la superficie del esmalte comienza a depositarse una película delgada amorfa que oscila entre 0,1 y 1,0 micrómetros de espesor, compuesta por proteínas y glucoproteínas aniónicas unidas a la hidroxiapatita del esmalte. Estas proteínas y glucoproteínas provienen de elementos salivales y del fluido crevicular, así como de los desechos bacterianos y de las células de los tejidos (Libeana, 2002). Los mecanismos que intervienen en la formación de la película sobre el esmalte incluyen fuerzas electroestáticas, tipo van der Waals, e hidrófobas. Es por ello que en la superficie de la hidroxiapatita que posee grupos fosfatos con carga negativa, interactúa con proteínas y glucoproteínas salivales y del fluido crevicular con carga positiva (Newman y col., 2004).

La película formada opera como barrera de protección proporcionando lubricación a las superficies e impidiendo su desecación. Además, posee moléculas que funcionan como sitios de unión para la adherencia de microorganismos y

enzimas de origen salival, como lisosimas, amilasas y peroxidasas, que favorecen la colonización bacteriana sobre la superficie de la película (Guilarte y Perrone, 2004).

Colonización de la superficie dental y maduración de la biopelícula dental.

Una vez formada la película adquirida, ocurre una colonización primaria de bacterias que se encuentran en la cavidad bucal, sobre la superficie de los dientes. Entre las primeras bacterias que colonizan la película adquirida predominan los microorganismos grampositivos facultativos como *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguis*. Estos colonizadores iniciales se adhieren a la película mediante moléculas específicas, denominadas adhesinas, presentes en la superficie bacteriana que interactúan con receptores en la película adquirida, como proteínas que tienen alto contenido de prolina, permitiendo la fijación de la célula bacteriana al esmalte dental (Fives-Taylor, 1985).

A los días de haberse formado esta colonización primaria ocurre una sucesión ecológica de la biopelícula, es decir, hay una transición de un ambiente aerobio inicial caracterizado por especies grampositivas a otro notablemente escaso de oxígeno en el que predominan microorganismos anaerobios gramnegativos, tales como *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* (Mombelli y col., 1990).

Estas especies de la biopelícula dental tienen la capacidad de adherirse entre sí, mediante un mecanismo conocido como *coagregación*, por medio de interacciones como fuerzas hidrofóbicas, electrostáticas y de van der Waals; permitiendo así la maduración de la misma (Fletcher, 1991).

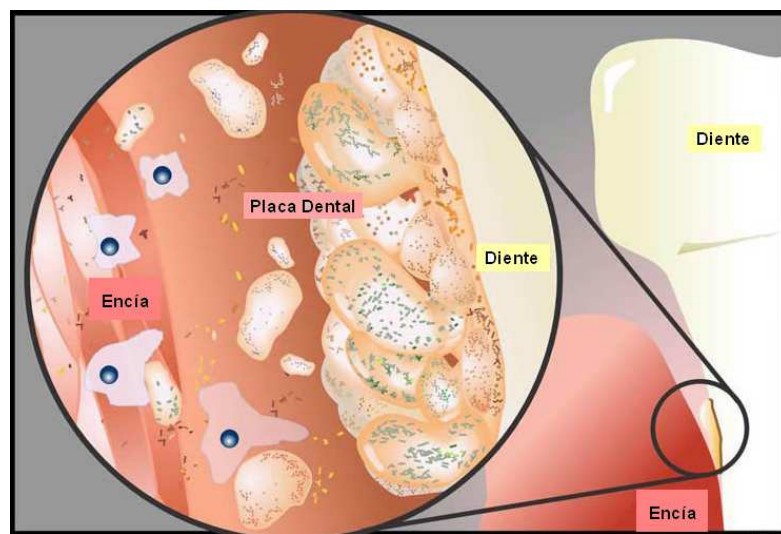


Figura 8: Formación de la biopelícula dental. Cientos de microorganismos, componentes orgánicos e inorgánicos se adhieren a la superficie del diente por medio de la película adquirida, constituida por proteínas. La presencia de esta placa dental juega un rol importante en la aparición de la enfermedad periodontal. Modificada de <http://mpkb.org/home/pathogenesis/microbiota/biofilm>. . [Consulta: 11 de Junio de 2011].

Factores etiológicos bacterianos de la periodontitis

Estudios microbiológicos de periodontitis agresiva proporcionaron evidencias claras de un fuerte vínculo entre la enfermedad y una microbiota bacteriana peculiar en la que predominaba el microorganismo *Aa* como lo señalaron Tonetti y Mombelli (1999). Este vínculo se basó en diferentes pruebas microbiológicas, inmunológicas y clínicas; donde encontraron una alta frecuencia de este patógeno en lesiones

características de periodontitis agresiva localizada; muchos de los pacientes con expresión de periodontitis agresiva presentaban títulos altos de anticuerpos contra *A. actinomycetemcomitans* en saliva y en los estudios clínicos se demostró una reducción de este microorganismo durante el tratamiento junto con una reacción clínica favorable (Newman y col, 2004).

Aunque otros estudios realizados por Lindhe (2009), Ishikawa y col., (2002) y Ruiz y col., (2005) reportaron que *Porphyromonas gingivalis* prevaleció en los pacientes con periodontitis agresiva, pues posee una batería de enzimas proteolíticas y toxinas capaces de destruir los tejidos periodontales, así como propiedades para la evasión de los mecanismos de defensa del huésped (Ruiz y col., 2005).

Las investigaciones acerca de las propiedades de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* se centran en la leucotoxina que produce esa bacteria. Esta leucotoxina es miembro de una familia de toxinas formadoras de poros, caracterizada por una serie de repeticiones ricas en glicina en la porción C terminal de la proteína. Las células afectadas por esta toxina son los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos o LPMN), monocitos y linfocitos, considerándose un mecanismo importante de evasión de las defensas del huésped.

Para el caso de la periodontitis crónica se considera que la acumulación de placa sobre la superficie del diente es agente iniciador de esta afección, permitiendo la colonización de microorganismos gramnegativos como *Bacteroides gingivalis* y *Treponema denticola*, que se relacionan con una elevada frecuencia de pérdida de inserción ósea.

Consideraciones inmunológicas en la periodontitis

Luego de haberse formado la biopelícula dental, los lipopolisacáridos presentes en la pared celular de las bacterias y citocinas derivadas del epitelio actúan como poderosos estimulantes para la respuesta inmunitaria del huésped. Es así como se induce una alta migración de LPMN los cuales liberan enzimas lisosomales y proteolíticas, mientras que los tejidos periodontales afectados por los productos bacteriales continúan secretando citocinas proinflamatorias acentuando de esta manera la reacción de profilaxis en el saco periodontal, en este punto se habla de gingivitis (Castro, 2003).

Los neutrófilos y otras células de defensa se mantienen fijos en el tejido conectivo adyacente al saco periodontal debido a la liberación de citocinas proinflamatorias generando una serie de reacciones que permiten el desarrollo del proceso inflamatorio, donde se destruye el tejido conectivo y el hueso alveolar, es aquí donde aparece la periodontitis (Castro, 2003) (Figura 9).

En el caso de las bacterias resistentes, los neutrófilos son el mecanismo principal de respuesta del huésped para controlar las bacterias y son la clave para demostrar la importancia de su función en la salud y en la enfermedad periodontal (Newman y col., 2004).

La presencia de bacterias como *Aa*, *P gingivalis* y otras cepas de microorganismos patógenos periodontales, son resistentes a los mecanismos de destrucción y además se relacionan estrechamente con la periodontitis agresiva, ya que tienen la capacidad de elaborar una variedad de enzimas proteolíticas que inactivan o degradan a los inhibidores de proteasas del huésped, lo que puede

conducir a un desequilibrio en los mecanismos de renovación de tejidos del huésped contribuyendo de esta manera con la destrucción tisular (Newman y col., 2004).

Estos microorganismos degradan proteínas en péptidos cortos como fuente de energía. Los tejidos del huésped proporcionan una fuente abundante de proteínas, entre ellas tenemos al colágeno que conforman las fibras del ligamento periodontal, el cual puede ser degradado por las colagenasas de las bacterias, pero también contribuyen con la enfermedad debido al intenso daño tisular resultante (Newman y col., 2004).

Los componentes bacterianos que están involucrados directa o indirectamente en la destrucción del tejido y los mediadores producidos como parte de la respuesta del huésped, que llevan a la destrucción tisular son las siguientes:

Proteinasas: Las metaloproteinasas de matriz (MMP) se consideran que son las principales proteinasas que intervienen en la destrucción del tejido periodontal mediante la degradación de las moléculas de la matriz extracelular. Las MMP son una familia de enzimas proteolíticas que degradan las moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno, la gelatina y la elastina. Las MMP-8 y MMP-1 son colagenasas; los neutrófilos liberan a la MMP-8, mientras que MMP-1 es expresada por fibroblastos, monocitos/macrófagos y células epiteliales (Ingman y col., 1996).

Otras proteinasas relacionadas con la periodontitis son la elastasa y la catepsina G. La elastasa es capaz de degradar una amplia gama de moléculas, como la elastina, el colágeno y la fibronectina. La catepsina G es una proteinasa

bactericida que también puede funcionar en la activación de la MMP-8 (Newman y col., 2004).

Citocinas: Dos citocinas proinflamatorias, IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF), tienen un papel fundamental en la destrucción del tejido periodontal y por lo tanto en la patogenia de la periodontitis. La IL-1 se encuentra en dos formas activas, IL-1 α e IL-1 β . El TNF también se encuentra en dos formas, TNF- α y TNF- β . Los macrófagos o linfocitos activados producen IL-1 y TNF que también pueden ser liberadas por fibroblastos, queratinocitos y células epiteliales. Los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos son potentes activadores que estimulan a macrófagos a producir IL-1, en tanto que TNF- α e IL-1 α también activan la producción de IL-1 β del macrófago. Entre los efectos proinflamatorios de estas citocinas está la estimulación de las células endoteliales para expresar selectinas que facilitan el reclutamiento de leucocitos, la activación de la producción de IL-1 del macrófago y la inducción de la prostaglandina E₂ (PGE₂) por macrófagos y fibroblastos gingivales (Page, 1991).

Las propiedades de estas citocinas en relacionadas con la destrucción del tejido tiene que ver con la estimulación de la reabsorción ósea y la inducción de proteinasas que destruyen los tejidos periodontales. La IL-1 es un estimulador potente de la proliferación, diferenciación y activación de los osteoclastos. Tanto la IL-1 como el TNF inducen la producción de MMP que pueden contribuir a la destrucción del tejido conectivo (Newman y col., 2004).

Prostaglandinas: Son metabolitos del ácido arquidónico que generan las ciclooxigenasas (COX-1, COX-2). Los macrófagos y fibroblastos se encargan de la producción de PGE₂ en el periodonto; este mediador inflamatorio produce un

aumento en la permeabilidad y dilatación de los vasos, estimula la liberación de MMP e induce la reabsorción ósea por activación de los osteoclastos y de esta manera ocurre la pérdida del hueso alveolar característica de la periodontitis. La concentración de prostaglandinas es mayor en pacientes con periodontitis crónica y agresiva (Castro, 2003).

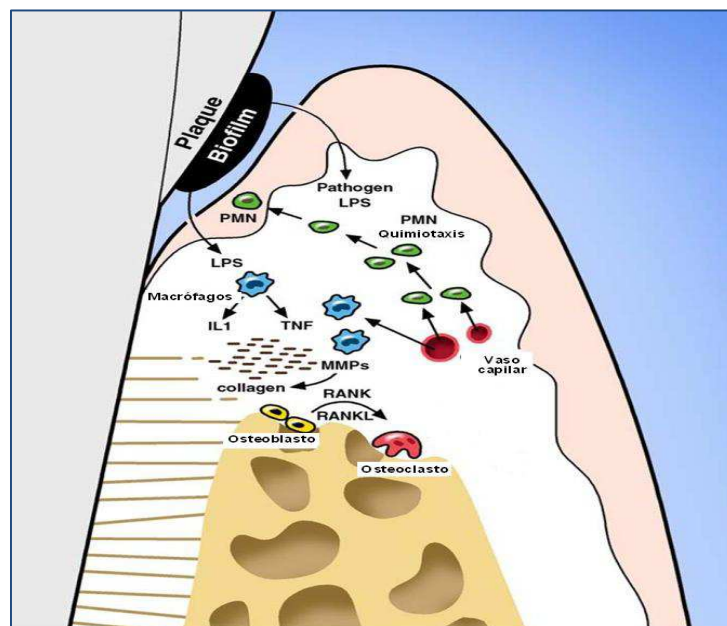


Figura 9: Proceso Inflamatorio en la enfermedad periodontal: Una vez establecida la biopelícula dental, comienza la respuesta ante las bacterias presentes (**LPS**), las citocinas derivadas del epitelio inducen la migración de neutrófilos (**PMN**) hacia el sitio afectado, liberando enzimas lisosomales, mientras que los tejidos periodontales afectados y granulocitos continúan secretando citocinas proinflamatorias (**IL-1 y TNF**), que incrementan a su vez la fijación de **PMN** y estimulan la producción de metaloproteinasas de matriz (**MMPs**) que degradan el tejido conectivo y hueso alveolar. Modificado de (Ozmeric, 2004).

Factores de riesgo en la periodontitis

Factores inmunológicos

Ciertos factores inmunitarios intervienen en la patogenia de la periodontitis agresiva. En investigaciones realizadas por Clark y col., en 1977 y por Leino y Hurtilla en 1999, comprobaron que los sujetos con periodontitis agresiva sufren de defectos funcionales de PMN, monocitos o ambos.

Estos defectos alteran la atracción quimiotáctica de PMN hacia el sitio de infección o bien su capacidad de fagocitar y eliminar microorganismos. También encontraron que existe una producción exagerada de PGE₂ por parte de los monocitos de pacientes con periodontitis agresiva como reacción a los LPS bacterianos, que incrementa la pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar. Estos defectos de PMN y monocitos pueden atribuirse a la infección bacteriana o bien a un origen genético.

Factores genéticos

Diversos autores han sugerido un patrón familiar de pérdida de hueso alveolar y señalado el origen genético de la periodontitis agresiva. En la actualidad no se han identificado genes específicos para esta enfermedad, sin embargo, análisis de segregación y de predisposición genética sugieren que ciertos defectos inmunológicos de la periodontitis pueden heredarse, tales como, anomalías de

neutrófilos y acción de anticuerpos ante la presencia de bacterias. (Newman y col., 2004).

Albandar y Tinoco en el 2002 presentaron una hipótesis en donde indican que la periodontitis agresiva puede estar asociada con una disminución o déficit de neutrófilos, lo que causa un reclutamiento de local anormal de los neutrófilos por consiguiente una respuesta inmune inadecuada en el individuo.

Si bien no se han descrito determinantes genéticos claros en pacientes con periodontitis crónica, se cree que lo que ocurre es una alteración en el equilibrio normal entre la biopelícula dental y la reacción del huésped, que conlleva a la destrucción periodontal (Newman y col., 2004).

Factores ambientales

Género

La severidad de las distintas formas de periodontitis prevalece más en hombres que en mujeres. Las razones para estas diferencias en género aun no han sido bien estudiadas en detalle, pero se relaciona con una pobre higiene bucal y menos visitas al odontólogo. También por supuesto está relacionada con las condiciones hormonales de cada género durante las diferentes etapas del desarrollo (AAP, 2005).

Estatus socioeconómico

Generalmente aquellas personas con acceso a una buena educación, con poder adquisitivo y en general que viven en circunstancias favorables, disfrutan de un mejor estado de salud que aquellos menos educados y ubicados en los estratos más pobres de la sociedad. Es probable que la relación entre niveles de estatus socioeconómico y salud gingival sea en función de una mejor higiene oral en individuos mejor educados que frecuenten al odontólogo (AAP, 2005).

Tabaco

Los pacientes con periodontitis que fuman, tienen mayor cantidad de dientes afectados y mayor pérdida de inserción clínica que los no fumadores con esta enfermedad. A pesar de esto, el tabaquismo puede ejercer un efecto distinto en los niveles de inserción del diente en personas jóvenes con periodontitis (Newman y col., 2004). La nicotina del tabaco inhibe el crecimiento e inserción de fibroblastos en el ligamento periodontal, disminuye significativamente el contenido de proteínas, daña la membrana celular del fibroblasto y disminuye el crecimiento de estas células. Además el humo del tabaco disminuye la presión del oxígeno en la cavidad bucal lo que favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios (Echeverría y col., 2005).

Epidemiología de la periodontitis

Estudios que se han realizado en varias partes del mundo para determinar la epidemiología de la periodontitis agresiva indican que se trata de una entidad rara que ocurre entre el 0,1 y el 0,5% de los adolescentes, variando su prevalencia en las diferentes poblaciones y grupos étnicos (Clarehugh, 1989). La AAP en 1996 señaló que la prevalencia en Finlandia fue de 0,1%, en Dinamarca e Inglaterra 0,06% en Nigeria 0,8% y en Estados Unidos, indican que la prevalencia de la pérdida de inserción periodontal en niños y adolescentes se encuentra entre el 0,2 y el 0,5% (Ruiz y col., 2005).

En Latinoamérica la prevalencia de la periodontitis es más alta en comparación con los países industrializados variando de un 40% a 80%, probablemente debido a las diferentes metodologías y criterios de diagnóstico.

En Brasil se encontró un 3,7% de prevalencia de periodontitis agresiva en un grupo de adolescentes y en Chile un 0,32% (Oppermann, 2007).

En Venezuela, los estudios epidemiológicos que se han realizado muestran una alta prevalencia de enfermedad periodontal en nuestra población y la más afectada es aquella de menos recursos económicos (Pérez, 2009). Sin embargo para este trabajo, no se encontró disponible, estadísticas recientes y específicas sobre periodontitis crónica y periodontitis agresiva en nuestro país.

El papel de la saliva en el diagnóstico de la enfermedad periodontal

El uso de la saliva como diagnóstico y método de identificación de marcadores y monitoreo para la enfermedad periodontal ha sido ampliamente estudiado (Lima y col., 2009). Entre los componentes importantes de la saliva, se encuentran varias enzimas. La respuesta del organismo a la enfermedad periodontal incluye la producción de algunas enzimas, que son liberadas por las células estromales, epiteliales y por las mismas bacterias. El análisis de estas enzimas en la secreción salival así como en el fluido crevicular, han contribuido a clarificar la patogénesis y a mejorar el diagnóstico precoz de la enfermedad periodontal (Todorovic y col, 2005).

Todorovic y col., en el 2005, analizaron muestras de saliva total no estimulada de pacientes con enfermedad periodontal y fueron comparadas con pacientes sanos y demostraron que hay un incremento significativo en la actividad enzimática de aspartato y alanino aminotransferasas, lactato deshidrogenasa, creatinina quinasa, fosfatasa alcalina y ácida y γ -glutamyl transferasa. Estas proteínas están relacionadas con un alto nivel de daño celular, concluyendo que la actividad enzimática en la saliva puede ser usada como marcador bioquímico en el diagnóstico y control de la enfermedad periodontal.

En el laboratorio de Biología Celular y Bioquímica Aplicada del Instituto de Biología Experimental se comenzó esta línea de investigación con el trabajo de Escárte y col., 2008, donde determinó las concentraciones de PO_4^{3-} , proteínas y perfiles electroforéticos en saliva procedente de niños venezolanos con y sin caries, ellos observaron una disminución de la concentración de PO_4^{3-} en las primeras

etapas de la caries y luego un aumento al avanzar la misma indicando que la caries se desarrolla cuando hay bajos niveles PO_4^{3-} . También se observó un aumento en la concentración de proteínas lo cual podría deberse al aumento de la secreción de proteínas con acción antibacteriana al avanzar la enfermedad.

Por otra parte Mejía en el 2008, determinó la concentración de PO_4^{3-} , Ca^{2+} y proteínas entre un grupo de adultos sanos y los comparó con adultos diagnosticados con enfermedad periodontal. La concentración de PO_4^{3-} entre grupos de hombres y mujeres sanos y con enfermedad periodontal fue similar y observó un aumento en la concentración de Ca^{2+} entre grupos de adultos con enfermedad periodontal en comparación a una condición sana. También encontró un incremento en la concentración de proteínas en adultos con enfermedad periodontal en contraste con una condición periodontalmente sana.

La saliva es una herramienta importante y muy útil para el diagnóstico de diversas patologías y permite comprender de alguna forma aquello que puede estar ocurriendo en nuestro cuerpo, pues es reflejado en la salud bucal.

Gran cantidad de investigaciones se han realizado a nivel internacional en relación con la saliva y la enfermedad periodontal y en su mayoría han sido publicaciones basados en estudios microbiológicos o inmunológicos, pero en Venezuela son muy pocos los trabajos que podemos encontrar en esta línea de investigación, es por esto que en este estudio deseamos emplear muestras de saliva humana de pacientes venezolanos, para estudiar diversos parámetros bioquímicos como Ca^{2+} , PO_4^{3-} y proteínas que puedan estar involucrados con la enfermedad periodontal.

Es importante destacar también, que la detección de la periodontitis crónica y de la periodontitis agresiva durante años se ha basado en la realización de la determinación de la profundidad del saco periodontal a través del sondaje, índice de placa, y la evaluación radiográfica de la pérdida de hueso alveolar, pero no permiten identificar pacientes con mayor riesgo para la periodontitis ni determinar la actividad de la enfermedad periodontal. Por lo tanto, sí al realizar estudios bioquímicos se encuentran diferencias en las concentraciones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y proteínas totales y perfiles electroforéticos de proteínas en la saliva total de pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva que no se observan en individuos sanos, entonces estos parámetros podrían servir como elementos para caracterizar a la enfermedad periodontal, logrando alcanzar la intención de este trabajo que no es más que la prevención y/o tomar medidas adecuadas para minimizar los efectos destructivos sobre los tejidos periodontales de la población venezolana.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la concentración de Ca^{2+} y de proteínas y los perfiles electroforéticos de saliva entera no estimulada en pacientes con periodontitis crónica y con periodontitis agresiva.

Objetivos específicos

- Evaluar la estabilidad de las concentraciones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y proteínas de saliva entera no estimulada luego de diferentes períodos de congelación.
- Determinar y comparar la concentración de Ca^{2+} en saliva entera no estimulada de pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva.
- Determinar y comparar la concentración de proteínas en saliva entera no estimulada de pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva.
- Comparar los perfiles electroforéticos de proteínas de saliva entera no estimulada en pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva.
- Comparar los perfiles electroforéticos de glucoproteínas en saliva entera no estimulada en pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para este trabajo se utilizaron muestras de saliva entera no estimulada de adultos, proporcionadas por la doctora María Antonieta Méndez de la Clínica Odontológica del postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela y por la doctora Vanesa Ibarra del Centro Nacional de Periodoncia.

Las muestras de saliva fueron colectadas previo consentimiento informado (Anexo 1) a los pacientes, quienes estuvieron sin comer, beber o realizar cualquier tipo de limpieza bucal al menos dos horas antes de tomar la muestra. La saliva colectada fue no estimulada, por lo que se le pidió al paciente estar relajado para dejar acumular la saliva en el piso de la boca hasta tener un volumen adecuado, aproximadamente de 3 mL y colocada en un vial estéril de poliestireno. Estas muestras fueron tomadas entre las 2:00 pm hasta 4:00 pm. Se conservaron las muestras en frío, para posteriormente ser transportadas al laboratorio.

Grupo de estudio

Un total de 88 individuos (59 mujeres y 29 hombres) con edades comprendidas entre 15 y 69 años (promedio: 36 años), participaron voluntariamente en este estudio, siendo agrupados de la siguiente forma:

- 31 individuos fueron tomados para la determinación de proteínas de los cuales 13 individuos eran periodontalmente sanos (11 mujeres y 2 hombres) y 18 individuos con características de periodontitis crónica (6 mujeres y 5 hombres) y periodontitis agresiva (6 mujeres y 1 hombre).
- 88 individuos conforman el grupo para la determinación de calcio conformado por 44 individuos periodontalmente sanos (36 mujeres y 8 hombres) y 44 individuos con características de periodontitis crónica (14 mujeres y 20 hombres) y periodontitis agresiva (9 mujeres y 1 hombre).

Como criterio de exclusión para los pacientes se tomó en cuenta que no sufrieran enfermedades sistémicas, no fueran gestantes, no fumaran o que no hayan ingerido medicamentos o antibióticos por un período de seis meses antes de la toma de la muestra.

Centrifugación de las muestras

Antes de analizar las muestras de saliva, fue necesaria la remoción previa de células epiteliales desprendidas, bacterias bucales, restos alimenticios y otros componentes que puedan interferir en las distintas mediciones. Para ello, se tomaron 2 mL de la muestra de saliva, se colocó en un tubo de Eppendorf® y se centrifugó a 16.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Luego se tomó el sobrenadante el cual fue guardado en otro tubo de Eppendorf® a -20 °C y se descartó el sedimento. Este procedimiento se realizó el mismo día de la recolección de las muestras con el fin de evitar alteraciones en los valores a medir en la saliva.

Determinación de Ca²⁺ salival mediante el método de orto-cresolftaleína complexona.

Se utilizó el método colorimétrico con orto-cresolftaleína complexona (Connerty y Briggs, 1966), adaptado para muestras de saliva en nuestro laboratorio por Cortés y col., 2008 y modificado para realizarse en placas de 96 pozos por Díaz y col., 2010 (resultados aun no publicados).

La solución de trabajo se preparó al momento de la medición, mezclando de acuerdo a la cantidad que se va a utilizar en el siguiente orden para un volumen final de 5 mL: Tampón etanolamina-borato (14,8 mol/L) 250 µL, solución B 8-hidroxiquinoleína (5%) 75 µL, solución A orto-cresolftaleína complexona (0,8 mg/ml) 250 µL y se completó hasta 5 mL con agua miliQ. Se realizó una curva de calibración en concentraciones crecientes a partir de una solución patrón de carbonato de calcio (CaCO₃).

Se añadió 198 μL de la mezcla de trabajo en el pozo correspondiente y luego se agregó 2 μL del sobrenadante de la muestra de saliva centrifugada. Se incubó por 5 minutos y finalmente se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro Tecan[®] modelo IP 214 a 570 nm.

Determinación de fosfatos en saliva total humana por método de Fiske y Subbarow.

Se empleó el método de Fiske y Subbarow (1925) para la determinación de PO_4^{3-} en el sobrenadante de las muestras de saliva.

Se hizo una dilución 1:20 de la muestra previamente centrifugada, se tomaron alícuotas de 50 μL hasta llevarlos a un volumen final de 1000 μL con agua miliQ. Luego se agregó a las muestras 700 μL de molibdato de amonio (MoNH_4) al 2% p/v disuelto en H_2SO_4 (2 N). Se agregaron 100 μl del agente reductor sulfato ferroso (FeSO_4) al 40% p/v disuelto en H_2SO_4 (1 N), se agitó y dejó en reposo durante 30 minutos.

Conjuntamente, se realizó una curva de calibración con estándar de fosfato KH_2PO_4 de concentración creciente, tomando alícuotas de 50 y 100 μl de estándar patrón en concentraciones de 0,1 mM y 1 mM de KH_2PO_4 . Transcurrido el tiempo de reacción, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 830 nm en un espectrofotómetro Beckhman[®].

Determinación de proteínas en saliva total humana

La determinación de proteínas totales en saliva se realizó mediante el método de Lowry y col. (1951). Se tomó una alícuota de 10 μL del sobrenadante de saliva y se llevó a un volumen final de 500 μL con agua destilada. Luego se añadió 2,5 mL de la solución ABC, la cual es una mezcla de soluciones agregadas en la proporción 100A:1B:1C; compuesta por solución A (NaCO_3 al 2% en 0,1 mol/ L de NaOH), solución B (Tartrato de Na-K al 2%) y solución C (CuSO_4 al 1%), para ser incubada 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente el tiempo se añadió 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico) diluido 1:2. Transcurridos 30 minutos luego de ocurrir la reacción se midió en un espectrofotómetro Beckhman® a 660 nm.

Se construyó paralelamente una curva de calibración en concentraciones crecientes con una muestra patrón de albúmina sérica bovina, con la finalidad de comparar la absorbancia de una muestra conocida con las medidas obtenidas de la muestra problema, tratadas de igual forma.

Determinación de la estabilidad de las muestras de saliva

Uno de los objetivos de este trabajo es observar el efecto del tiempo de congelación de las muestras de saliva en la integridad de los distintos parámetros a medir. Para ello se realizó el siguiente protocolo: Una vez recolectadas, las muestras fueron centrifugadas a 16,000 x g por 10 minutos y después se tomaron siete alícuotas de 200 μL de cada una de ellas y se colocaron en siete tubos

Eppendorf® rotulados con su identificación para el día de medición. Estas fueron almacenadas a -20 °C como se muestra en la figura 10.

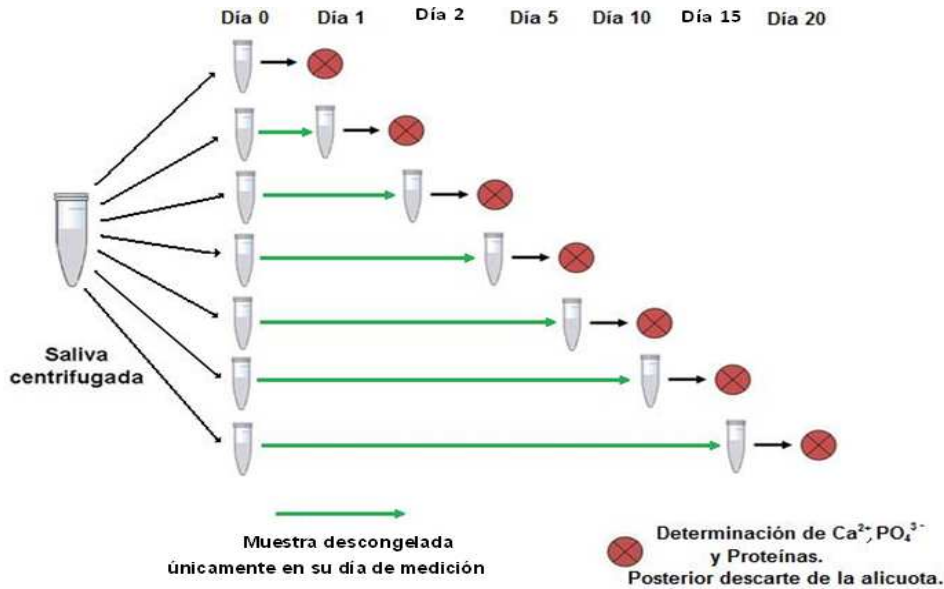


Figura 10: Determinación de la estabilidad de muestras de saliva. Esquema del procedimiento que se llevó a cabo para la determinación de la estabilidad de muestras de saliva en varios periodos de congelación.

En el primer día de recolección, todas las muestras fueron centrifugadas y congeladas a -20 °C, excepto la alícuota que correspondía al “Día 0”, a esa muestra se le realizó la determinación de Ca²⁺, PO₄³⁻ y proteínas como se señaló anteriormente; luego se descartaba la alícuota. En los siguientes días se descongelaba únicamente la muestra correspondiente al día de su medición (Día 1, Día 2, Día 5 y así sucesivamente hasta llegar al Día 20) realizándoles las distintas determinaciones para luego ser descartada. Se emplearon 5 diferentes muestras de saliva y las determinaciones se realizaron por triplicado.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes.

Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes de acuerdo con el protocolo descrito por Laemmli, 1970. La concentración de proteínas que se empleó dependía del tipo de tinción que se realizaría una vez finalizada la corrida electroforética. Primero se preparó el gel de corrida a una concentración en gradiente de 10% a 20%. Se utilizaron las siguientes soluciones: 3 mL de tampón Tris-HCL a pH 8,8 (0,4% de dodecil sulfato de sodio (SDS) p/v); 4 mL de acril-bisacrilamida (30 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida); 800 μ L de glicerol al 50%; 4,14 mL de agua destilada; 50 μ L de persulfato de amonio al 10% y 5 μ L de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina o TEMED. Una vez polimerizado este primer gel se añadió la preparación para el gel de apilamiento a una concentración de 5%, preparado con las siguientes soluciones: 3,75 mL de tampón Tris- HCL a pH 6,6 (0,4% de SDS p/v); 2,5 mL de acril-bisacrilamida (30 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida); 9,75 mL de agua destilada; 150 μ L de persulfato de amonio al 10% y 9 μ L de TEMED.

Luego de la polimerización de los geles se procedió a colocarlos en la cámara electroforética, donde se agregó tampón de corrida (Tris 0,25 mol/L, glicina 0,192 mol/L y SDS al 0,2%). La separación electroforética se realizó a un voltaje constante de 60 V por 16 horas. Los geles tenían un tamaño de 13 x 14 cm.

Preparación de las muestras para la corrida electroforética.

Se realizó una preparación previa de las muestras de saliva, dependiendo del tipo de tinción de los geles de electroforesis. Para este trabajo se realizaron geles teñidos con azul de Coomassie, con tinción de nitrato de plata (Ag_2NO_3) y con tinción de ácido peryódico-Schiff.

Preparación de muestras para geles con tinción en azul de Coomassie.

Las muestras de saliva conservadas a una temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, fueron descongeladas y se tomó un volumen para cargar en cada carril del gel con una concentración de proteínas de $300\text{ }\mu\text{g}$, volumen correspondiente a la concentración de proteínas determinadas previamente por el método de Lowry y col. (1951). Una vez obtenido ese volumen se le añadió ácido Tricloro acético (TCA) al 20% p/v para que las proteínas precipitaran. Se centrifugaron a 16.000 x g por 10 minutos, para concentrar las proteínas en el sedimento, se descartó el sobrenadante y se neutralizó el pH de la muestra con $5\text{ }\mu\text{L}$ de solución Tris 3 mol/L para luego resuspender las proteínas en un volumen de tampón de carga que contiene Tris-HCL a pH 6,8; SDS al 5%; glicerol al 20%; 2- β -mercaptoetanol al 4% y azul de bromofenol al 0,03%. Las muestras fueron calentadas en baño de María a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos para luego agregar las muestras a los bolsillos del gel.

Preparación de muestras para geles con tinción de plata.

Se tomó un volumen de aproximadamente 60 µg de proteínas de cada una de las muestras de saliva ya descongeladas y se llevó a un volumen final de 50 µL con tampón de carga (Tris-HCl a pH 6,8; dodecil sulfato de sodio al 8% p/v; glicerol al 40% p/v; 2-β-mercaptoetanol al 4% v/v; azul de bromofenol al 0,01% p/v). Esta mezcla se calentó a 100 °C por 5 minutos para luego ser cargados en los carriles del gel junto al estándar de masa molecular.

Preparación de muestras para geles para tinción con ácido peryódico Shiff.

Se realizó el mismo protocolo para la preparación de muestras para la tinción de azul de Coomassie.

Una vez de haber culminado la corrida electroforética, los geles fueron retirados de la cámara y se procedió a la distintas tinciones ya mencionadas como método para la visualización de las bandas.

Tinción del gel con azul de Coomassie

El gel fue coloreado con azul de Coomassie al 0,1% preparado con ácido acético durante toda la noche con agitación constante. Luego el gel fue descoloreado, haciendo lavados sucesivos con una solución descolorante que contiene metanol y ácido acético en proporción 5:1 haciendo varios cambios cada

20 minutos hasta obtener la intensidad de bandas deseada. Finalmente se colocó el gel en solución conservadora de geles que contiene glicerol para evitar su reducción de tamaño al estar en agua y ser escaneado.

Tinción del gel con plata

Se empleó el método descrito por Merrill y col., 1982. Se colocó el gel en solución fijadora que contiene ácido tricloro acético al 20% para fijar las proteínas por 30 minutos. Luego se lavó el gel tres veces con una solución que contiene etanol 10% y ácido acético 5%, por 10 minutos. Seguidamente se agregó la solución A que contiene dicromato de potasio y ácido nítrico por 5 minutos y luego se lavó 4 veces con agua desionizada un minuto cada vez. Se agregó la solución B que contiene nitrato de plata, por 30 minutos, transcurrido este tiempo se le añadió la solución C que contiene carbonato de sodio y formaldehído, se mantuvo en esta solución hasta obtener la intensidad de bandas deseada. La reacción fue detenida con ácido acético al 1% y finalmente se escaneó el gel.

Tinción del gel con ácido peryódico-Schiff.

Se realizó coloración de PAS, mediante una modificación del método de Dubray y Bezard, 1982. Primero se preparó el reactivo de Schiff tomando 1 g de Fucsia básica para disolverla en agua destilada a 60 °C, hasta llegar a punto ebullición. Una vez enfriado se agregó 2 g de metabisulfito de potasio y ácido clorhídrico, se dejó aclarar durante 24 horas para luego agregar 0,5 g de carbón

activado, se agita por un minuto, se filtró a través de papel de filtro grueso y se repitió la filtración hasta que la solución apareciera incolora.

Luego de haber preparado el reactivo de Schiff se colocó el gel en una solución de alcohol isopropílico al 2,5% 50 mL y ácido acético al 10% 20 mL para un volumen final de 200 mL, se dejó toda la noche para luego colocarlo en ácido acético al 7,5% por 30 minutos. Se agregó ácido periódico al 0,2% por una hora a 4 °C, y luego el reactivo de Schiff preparado anteriormente, a 4 °C por una hora y finalmente se decolora con ácido acético al 7,5% con varios cambios hasta obtener la coloración deseada.

Análisis estadístico

Los valores de la concentración de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y proteínas totales se muestran por su promedio \pm su desviación estándar (DE). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Least Significant Difference), como prueba a *posteriori* para determinar las diferencias entre las medias, donde un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 8 para Windows (SPSS Inc., U.S.A).

RESULTADOS

Estabilidad de las muestras de saliva bajo diversos períodos de congelación.

Se determinaron las concentraciones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y proteínas en 5 muestras de saliva de adultos durante 20 días de congelación a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Las mediciones se realizaron por triplicado y se muestran los resultados del promedio de cada día de medición. Estas muestras fueron tomadas del personal del laboratorio.

Estabilidad de la concentración de PO_4^{3-} en saliva.

En la figura 11 se muestra las concentraciones de PO_4^{3-} de cada una de las cinco muestras empleadas. El valor más alto, la muestra 1, tuvo $9,5\text{ mmol/L}$ en el día 0 de medición hasta disminuir a $7,63\text{ mmol/L}$ en el día 20. La muestra 2 presentó menor concentración desde el primer día $5,95\text{ mmol/L}$ hasta llegar a un valor de $0,91\text{ mmol/L}$. En general se observa una disminución en la concentración de PO_4^{3-} , siendo más evidente a partir del día 5 de medición donde comienza a descender acentuadamente, cuando se alarga el período de congelación de las muestras, a pesar de que cada muestra de saliva tiene una concentración inicial diferente de fosfatos.

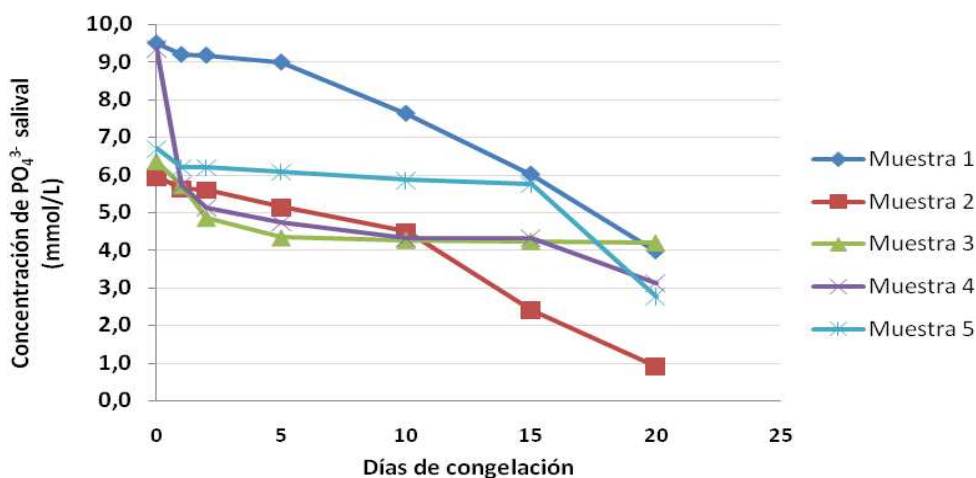


Figura 11: Evaluación de la estabilidad de la concentración de PO_4^{3-} . El sobrenadante de cinco muestras de saliva fue congelado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y descongeladas a los días 1, 2, 5, 10, 15 y 20. La muestra del día 0 no fue congelada. A todas las muestras se les determinó la concentración de PO_4^{3-} por el método de Fiske y Subbarow (1925), los ensayos se realizaron por triplicado.

Estabilidad de la concentración de Ca^{2+} en saliva.

En la figura 12 se muestra promedios de la concentración de Ca^{2+} para cada una de las muestras, determinado por el método colorimétrico con orto-cresolftaleína complexona. Se observó una disminución de la concentración de calcio en todas las muestras durante los 20 días de congelación. La muestra 2 fue la que presentó mayor concentración en el primer día de medición, con un valor de 2,09 mmol/L hasta llegar a un valor de 0,25 mmol/L. Es notoria que a partir del día 5, la concentración de calcio salival comienza a disminuir rápidamente hasta el último día de congelación.

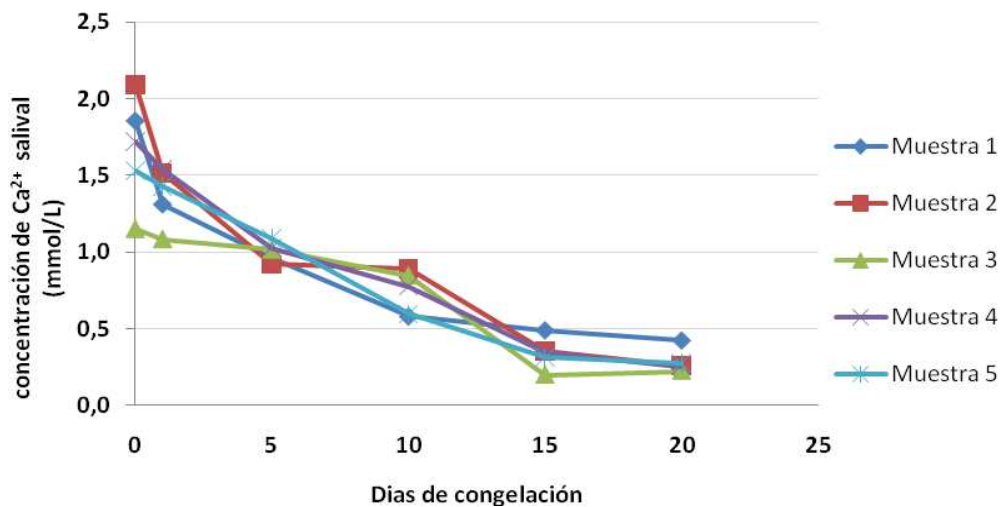


Figura 12: Evaluación de la estabilidad de la concentración de Ca^{2+} . El sobrenadante de cinco muestras de saliva fue congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongeladas a los días 1, 5, 10, 15 y 20. La muestra del día 0 no fue congelada. A todas las muestras se les determinó la concentración de Ca^{2+} por el método de Connerty y Brigs (1966), los ensayos se realizaron por triplicado.

Estabilidad de la concentración de proteínas totales en saliva.

En la figura 13 se observan las las concentraciones de proteínas de 5 diferentes muestras de saliva de adultos. En general hay una disminución en la concentración de proteínas en todas las muestras, durante los 20 días de congelación. En la mayoría de las muestras, se mantiene constante la concentración inicial de proteínas hasta los días 0, 1 y 2, como la muestra 1, que mostró la mayor concentración de proteínas $7,4\text{ mg/ mL}$, los días siguientes de medición (día 1 y 2) la concentración se mantiene en una valor de $7,1\text{ mg/mL}$ y de igual forma ocurre con las muestras 2, 3 y 5.

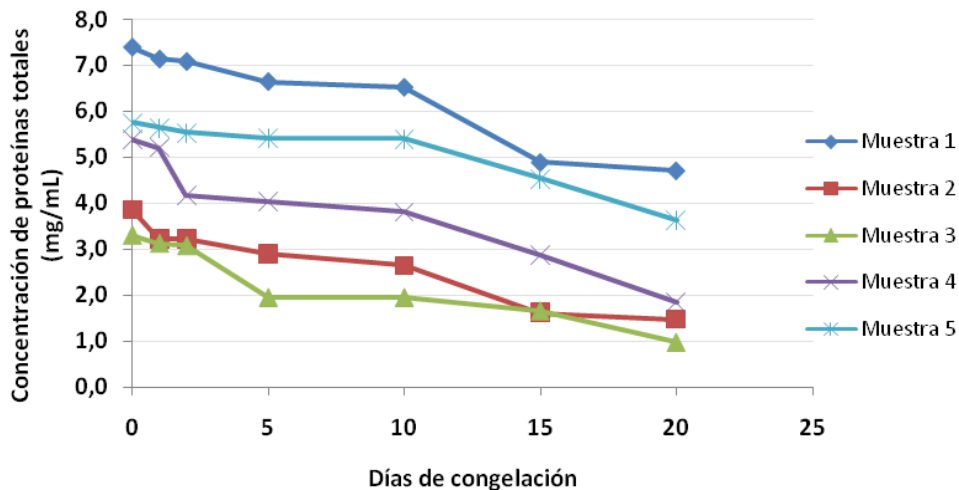


Figura 13: Evaluación de la estabilidad de la concentración de proteínas totales. El sobrenadante de cinco muestras de saliva fue congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongeladas a los días 1, 2, 5, 10, 15 y 20. La muestra del día 0 no fue congelada. A todas las muestras se les determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951), los ensayos se realizaron por triplicado.

Concentraciones de Ca^{2+} en adultos sanos y con enfermedad periodontal

Se determinó la concentración de Ca^{2+} salival en grupos de hombres ($n=29$) y de mujeres ($n=59$) para evaluar posibles diferencias entre una condición de periodontitis crónica y periodontitis agresiva. Adicionalmente se evaluaron diferencias entre ambos sexos y entre las diferentes condiciones periodontales.

La prueba de diferencia mínima significativa de Fisher como prueba a posteriori no encontró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos grupos estudiados.

Tabla 2. Promedios de la concentración de Ca²⁺ salival (mmol/L) en grupo control de hombres y mujeres sanos y con enfermedad periodontal.

Condición Periodontal	Hombres	Mujeres
Control	n=8	n=36
	0,98 ± 0,41	0,97 ± 0,50
Periodontitis Crónica	n= 20	n= 14
	1,16 ± 0,61	0,84 ± 0,37
Periodontitis Agresiva	n= 1	n=9
	0,95	0,89 ± 0,34

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), de dos vías, para un grupo de hombres y mujeres con periodontitis crónica y periodontitis agresiva. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Concentraciones de proteínas en adultos sanos y con enfermedad periodontal.

Se determinó el promedio de la concentración de proteínas totales en muestras de saliva de un grupo de adultos con periodonto sano (grupo control) y un grupo de adultos con enfermedad periodontal (periodontitis crónica y periodontitis agresiva). En ambos casos se incluye tanto a hombres como a mujeres (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de proteínas en adultos sanos y con enfermedad periodontal

Condición Periodontal	Concentración de Proteínas (mg/mL)
Control	n= 13
	3,4 ± 0,77
Periodontitis Crónica	n= 11
	4,5 ± 1,8 *
Periodontitis Agresiva	n= 7
	4,7 ± 0,69 *

*Estadísticamente significativo con respecto al control, de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p > 0,05$).

Perfiles electroforéticos de proteínas de saliva de pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva.

Para el análisis de proteínas presentes en la saliva de adultos con enfermedad periodontal se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes para separar las proteínas salivales y obtener un patrón electroforético de la saliva total y comparar los perfiles de proteínas presentes en la enfermedad periodontal.

En la figura 14 se presenta el perfil de proteínas de 4 diferentes muestras de saliva total de adultos con periodonto sano (C), periodontitis crónica (PC) y periodontitis agresiva (PA1 y PA2), obtenido a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes. Se observa que las cuatro muestras de saliva mostraron un patrón electroforético similar, distinguiéndose alrededor de 15 bandas aproximadamente, pero que varían en intensidad de acuerdo a la condición periodontal. La masa molecular aproximada de cada banda se encuentra en la misma figura.

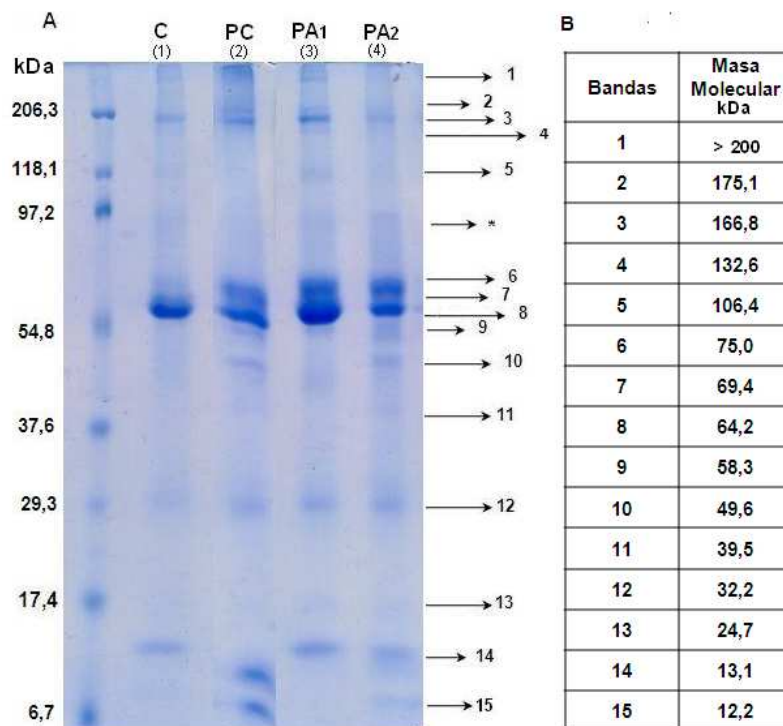


Figura 14: Perfiles electroforéticos de proteínas de saliva de pacientes con enfermedad periodontal. Panel **A**: Patrón electroforético de saliva de adultos con enfermedad periodontal en gel con tinción azul de Coomassie; de izquierda a derecha: Marcador de masa molecular (**kDa**), control sano (**C**), periodontitis crónica (**PC**) y periodontitis agresiva (**PA1 y PA2**). Panel **B** : masas moleculares calculadas para las bandas indicadas en **A**.

Se observa en los carriles (2) de periodontitis crónica y en los de periodontitis agresiva (3) y (4), las bandas 14 y 15 aparecen más intensas que en el carril (1) de la muestra control.

En la figura 15 se observa un gel en gradiente 10-20% teñido con azul de Coomassie de tres muestras de saliva de las condiciones periodontales estudiadas. Se obtuvo una mejor resolución de bandas en comparación con el gel anterior, observándose igualmente unas 15 bandas y en donde es posible distinguir bandas de proteínas de alta masa molecular (100-200 kDa) y de baja masa molecular (20-10 kDa). Se encontraron diferencias en la intensidad de ciertas bandas, particularmente de las bandas 1 (214 kDa), 2 (186 kDa), 3 (177 kDa) y 4 (148 kDa) que aparecen definidas en el carril (1) de la muestra control, mientras que en aquellos con enfermedad periodontal aparecen poco definidas.

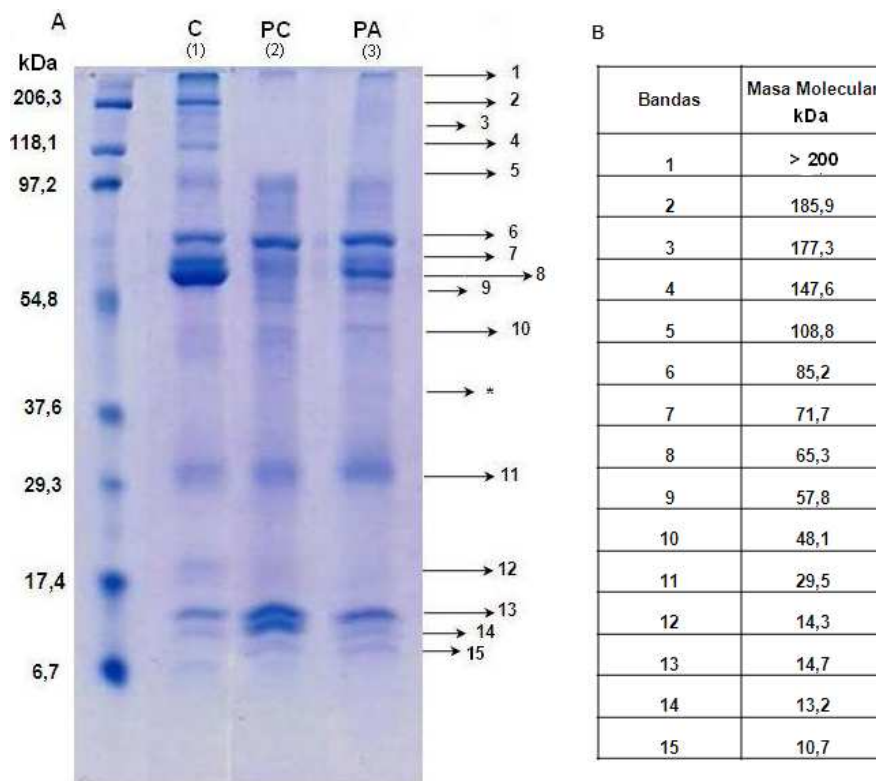


Figura 15: Perfiles electroforéticos de proteínas de saliva de pacientes con enfermedad periodontal. Panel **A**: Patrón electroforético de saliva de adultos con enfermedad periodontal, en gel con tinción azul de Coomassie; de izquierda a derecha: Marcador de masa molecular (**kDa**), control sano (**C**), periodontitis crónica (**PC**) y periodontitis agresiva (**PA**). Panel **B** : masas moleculares calculadas para las bandas indicadas en **A**.

Adicionalmente se realizó un gel en gradiente 10-20% el cual se tiñó con coloración de plata para la visualización del patrón electroforético de la saliva (Figura 16). En este gel se pudo observar un patrón similar tanto en la muestra control como en las muestras con enfermedad periodontal, pero al igual que la tinción en azul de Coomassie, se observan diferencias en la intensidad de algunas bandas presentes en las muestras de sujetos con periodontitis crónica y periodontitis agresiva en comparación con la muestra periodontalmente sana (C).

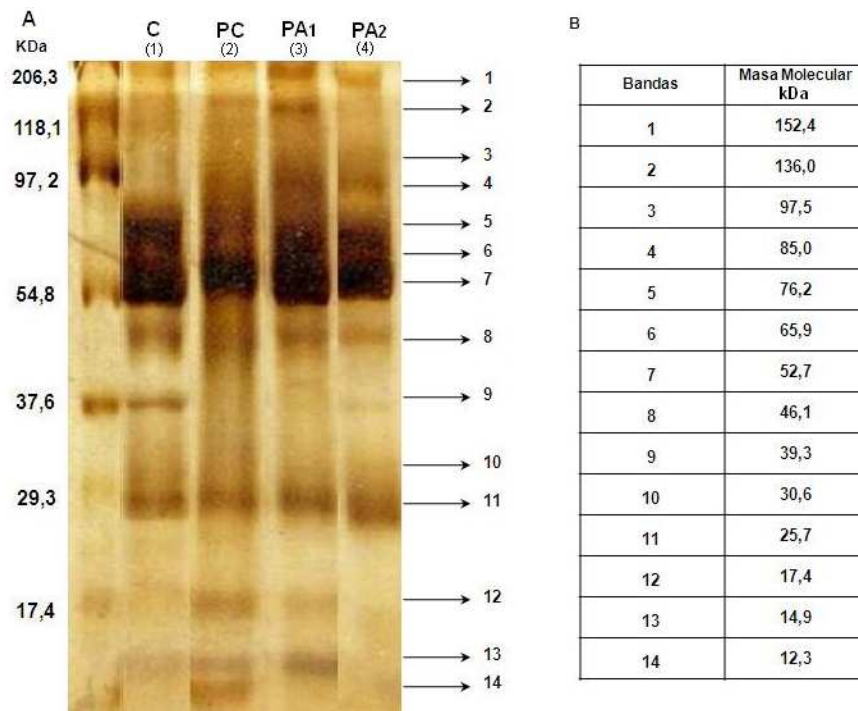


Figura 16: Perfiles electroforéticos de proteínas de saliva de pacientes con enfermedad periodontal. Panel **A:** Patrón electroforético de saliva de adultos con enfermedad periodontal, en gel con tinción de plata; de izquierda a derecha: Marcador de masa molecular (**kDa**), control sano (**C**), periodontitis crónica (**PC**) y periodontitis agresiva (**PA1 y PA2**). Panel **B:** masas moleculares calculadas para las bandas indicadas en **A**.

En este gel puede observarse más claramente, y con mayor intensidad, las bandas 8 (46 kDa), 9 (39 kDa), 10 (31 kDa), 11 (26 kDa), 12 (17 kDa), 13 (15 kDa) y 14 (12 kDa). En el carril (2) de periodontitis crónica, aparecen más intensas las bandas 12 (17 kDa), 13 (15 kDa) y 14 (12 kDa) que no se observan en el carril (1) de la muestra control, que si se encuentran en el carril (3) y menos intensas en el carril (4) de periodontitis agresiva

En la figura 17 se aprecia un gel de acrilamida con tinción de PAS en 4 muestras de saliva no estimulada, obtenida de individuos con periodontitis crónica y periodontitis agresiva. Se observa una banda intensa de 64,5 kDa (1). Muy cercana a ésta se encuentra otra banda de 61,4 kDa (2) aproximadamente en los carriles 1

y 2 y muy tenue en los carriles en 3 y 4. Otra banda de menor masa molecular aparece muy tenue en los tres carriles, con una masa molecular aproximada de 27,7 kDa. Al observar estas bandas podría decirse que hay un patrón similar para las cuatro muestras pero con variación en la intensidad en cada una de ellas.

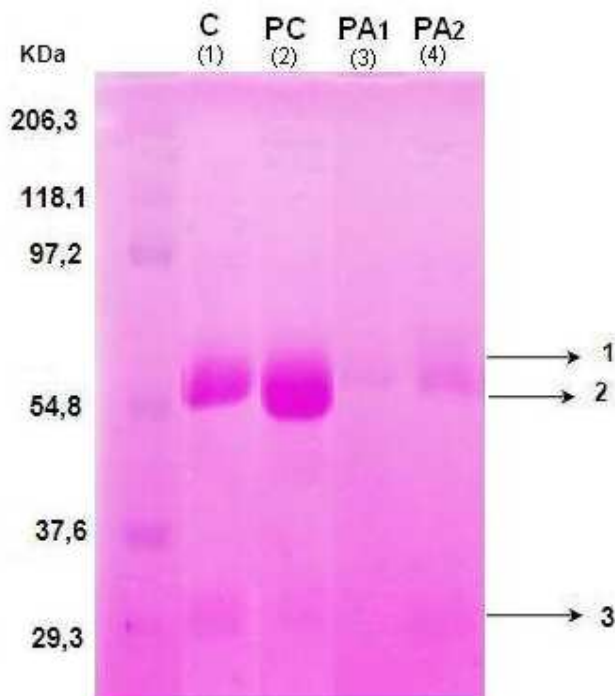


Figura 17: Perfiles electroforéticos de proteínas de saliva de pacientes con enfermedad periodontal. Patrón electroforético de saliva de adultos con enfermedad periodontal, gel con tinción de PAS; de izquierda a derecha: Marcador de masa molecular (kDa), control sano (C), periodontitis crónica (PC) y periodontitis agresiva (PA1 y PA2). La masa molecular aproximada para las bandas 1 es de 64,5 kDa, banda 2 de 61,4 kDa y banda 3 de 27,7 kDa.

DISCUSIÓN

La saliva como reflejo de la salud bucal y sistémica, es una valiosa fuente de información clínica relevante ya que contiene biomarcadores específicos para aspectos fisiológicos de la enfermedad periodontal y cambios cualitativos en estos biomarcadores podrían ser utilizados como diagnóstico o para discernir el grado de actividad de la enfermedad. Así se podrían identificar, de forma preventiva, individuos con mayor susceptibilidad a la enfermedad, detectar los sitios con enfermedad activa y predecir los sitios del periodonto que tendrían la enfermedad en un futuro.

Conociendo la relevancia que tiene la utilización de muestras de saliva en la investigación clínica y en nuestro caso en la enfermedad periodontal es de vital importancia la estandarización del método de recolección de las muestras de saliva debido a que la composición de la misma puede variar y de este paso depende el éxito de la investigación. Hoy en día existe un gran auge en la investigación clínica en saliva a nivel mundial, sin embargo no se presenta una metodología estandarizada para la recolección y tratamiento de las muestras de saliva, lo que ha contribuido con una alta variabilidad en los parámetros que se miden y por lo tanto existe una gran heterogeneidad de resultados en los trabajos que involucran estudios bioquímicos en la saliva (Shipper y col., 2007).

En este trabajo se ha determinado la estabilidad de PO_4^{3-} , Ca^{2+} y proteínas totales en cinco muestras de saliva entera no estimulada durante períodos crecientes de congelación, con la finalidad de proponer un tiempo adecuado de almacenamiento en congelación, recolección y tratamiento de las muestras de saliva

y de esta manera garantizar las concentraciones reales de estos compuestos al momento de realizar los distintos análisis.

Una vez recolectada la muestra de saliva es importante que los procesos de mantenimiento no afecten la naturaleza y composición de la saliva. Para la mayoría de los análisis, la saliva debe ser recolectada en frío, ya que la refrigeración previene la degradación de moléculas y evita el crecimiento bacteriano. La saliva contiene proteasas bacterianas que pueden degradar proteínas salivales, pudiendo afectar la investigación (Chiappin y col., 2007; Schipper y col., 2007).

Luego de ser recolectadas las muestras, éstas deben ser centrifugadas con la finalidad de remover las células epiteliales desprendidas, bacterias, restos alimenticios y otros componentes que puedan interferir en las distintas mediciones. Para este trabajo las muestras de saliva entera fueron centrifugadas en una microcentrífuga a una velocidad de 16,000 x g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C, un protocolo similar empleó Huang y col., en el 2004 en donde centrifugaron muestras de saliva entera a 14,000 x g durante 20 minutos a 4 °C para la realización de sus ensayos de proteómica.

En cuanto a al almacenamiento de las muestras antes de ser empleadas para los análisis, se decidió tenerlas a una temperatura de -20 °C. Chiappin y col., en el 2007, proponen que el almacenamiento de las muestras de saliva debe realizarse a 4 °C sí los análisis se realizan luego de 6 horas de su recolección, a -20 °C cuando se harán en los días sucesivos y si es posible para mejores resultados a -80 °C.

En los resultados mostrados en la figura 11, se observa una disminución de la concentración de PO_4^{3-} en las cinco muestras de saliva. En un promedio realizado a todas las muestras, la concentración de fosfatos disminuye en aproximadamente un 54% de su concentración inicial desde el primer día hasta el día 20 de medición, manteniéndose constante la concentración inicial los días 0, 1 y 2 luego comienza a disminuir notablemente. Durante la determinación de la concentración de este ión se pudo apreciar que las concentraciones de fosfatos son muy variables entre cada individuo, probablemente la utilización de los diferentes productos de higiene bucal (pasta dentales, enjuagues, hilo dental, etc.), permite que las concentraciones de fosfatos no se mantengan en un valor constante, por lo que consideramos no es un parámetro bioquímico fiable para futuros estudios.

En cuanto a la concentración de Ca^{2+} , en la figura 12 se observa una disminución de la concentración en todas las muestras durante los 20 días de congelación. En promedio, hay una pérdida de la concentración de Ca^{2+} del 83% desde el día 0 hasta el día 20 de congelación, mientras que al primer día de congelación se observa solo un 16% de pérdida de la concentración de Ca^{2+} , por lo que se recomienda hacer la medición de este parámetro el mismo día o hasta el día siguiente luego de su recolección. Schipper y col., 2007 señalaron que la asociación de mucinas MUC5B, responsables de la viscosidad y elasticidad de la saliva, requieren de interacciones con Ca^{2+} para su agregación, posiblemente esta captura de Ca^{2+} sea la causa por la cual se observa una disminución de la concentración de Ca^{2+} durante los diferentes días de congelación.

Una disminución de la concentración de proteínas totales también fue observada en el ensayo de tiempo de congelación. En la figura 13 se puede apreciar que la concentración de proteínas se mantiene constante, luego a partir del día 5 de medición comienza a disminuir la concentración. Se recomienda la medición de proteínas hasta el segundo día de almacenamiento bajo congelación donde sólo hay un 10% de pérdida. Esta disminución puede estar asociada a los efectos de la temperatura de congelación y ciertas proteasas bacterianas presentes.

En este ensayo de congelación se observó que al quinto día de medición todas las muestras de saliva centrifugadas presentaban moco en el fondo del tubo una vez que las muestras eran descongeladas. Es probable que la disminución de PO_4^{3-} , Ca^{2+} y proteínas se deba a la formación de este moco, ya que pueden estar involucrados en la agregación de mucinas salivales.

Una vez obtenidos estos resultados se estableció la siguiente metodología para la recolección, mantenimiento y medición de los parámetros bioquímicos de las muestras de saliva:

- ✓ Después de tomadas las muestras, se mantienen a 4 °C mientras son transportadas inmediatamente al laboratorio.
- ✓ Las muestras son centrifugadas a 16,000 x g durante 10 minutos a 4 ° C.
- ✓ Las mediciones de PO_4^{3-} y proteínas son realizadas el mismo día o hasta el segundo día de congelación, mientras que la medición de Ca^{2+} salival se realizan el mismo día.

En la medición de Ca^{2+} en adultos sanos y con enfermedad periodontal, primero se determinó la concentración de Ca^{2+} en hombres y mujeres con periodonto sano, para saber si había alguna diferencia de concentración asociada al sexo. De acuerdo a la prueba estadística empleada, los resultados no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Según Chiappin (2007) y Tibor y Pál, (2007), la concentración de Ca^{2+} en saliva no estimulada está entre 0,50 y 2,65 mmol/L, por lo que los resultados obtenidos concuerdan con lo establecido por estos autores.

Para la medición de Ca^{2+} las muestras de saliva de individuos sanos y con enfermedad periodontal fueron descartadas aquellas muestras que contenían sangre, ya que la hemoglobina presenta un máximo de absorción a una $\lambda = 577$ nm y otro a $\lambda = 539$ nm lo cual produce interferencia en la medición de Ca^{2+} que se realiza a $\lambda = 570$ nm (Thews y col., 1983).

En hombres, se observó que la concentración de Ca^{2+} es mayor en aquellos que presentan periodontitis crónica en comparación con el grupo control y mayor que el grupo de hombres con periodontitis agresiva. Una alta concentración de Ca^{2+} salival en los individuos con periodontitis crónica puede estar relacionada con la presencia de cálculo dental que es común en pacientes con periodontitis crónica. El cálculo dental tiene como componentes inorgánicos principales calcio y fósforo (Newman y col., 2004).

Los resultados obtenidos contradicen análisis previos realizados en nuestro laboratorio, en donde pacientes con periodontitis crónica generalizada y pacientes fumadores con periodontitis, presentaron un aumento significativo en la

concentración de Ca^{2+} salival respecto a los controles periodontalmente sanos (resultados no publicados).

Kiss y col., en el 2010, determinaron concentraciones de Ca^{2+} salival mediante absorción atómica en un total de 44 pacientes femeninos, 24 fumadores y 20 no fumadores, dentro de los cuales hay pacientes con o sin periodontitis. Los pacientes fumadores con periodontitis presentaron un nivel de Ca^{2+} salival mayor que aquellos no fumadores.

Recientemente Acharya y col., en el 2011, en un estudio preliminar, encontraron un alto nivel de Ca^{2+} salival asociado en 25 pacientes indios con periodontitis crónica generalizada. Las medias de concentraciones de Ca^{2+} en saliva no estimulada fue de $2,11 \pm 0,25$ mmol/L. Este valor fue significativamente mayor que en los controles sanos $1,86 \pm 0,25$ mmol/L. Ellos concluyen que un alto nivel de concentración de Ca^{2+} salival está asociado a la enfermedad periodontal, indicando que la medición de este parámetro podría ser un factor de riesgo en el desarrollo de esta enfermedad, como lo propusieron también Khalilij y Bilokvtska en 2010.

Los valores determinados por estos investigadores son un poco más altos y tampoco coinciden con nuestros resultados obtenidos. Aunque Acharya y col., (2011), no estudiaron diferencias entre los diversos tipos de enfermedad periodontal, posiblemente sí realizaran esta comparación se pudiera esperar un resultado similar al obtenido por nosotros.

En base a los trabajos expuestos anteriormente, se esperaba para este estudio encontrar diferencias en la concentración de Ca^{2+} salival al menos entre individuos con periodonto sano y pacientes con enfermedad periodontal.

Probablemente, dada a la gran variabilidad que hay en la saliva, se requiera de un mayor número de muestras para obtener un resultado similar.

Respecto a la concentración de proteínas totales tanto en adultos con enfermedad periodontal y con periodonto sano, se encontró que hay una tendencia a aumentar en individuos con enfermedad periodontal.

Henskens y col., en 1993, determinaron la concentración de proteínas totales, albúmina y cistatinas en individuos sanos y pacientes con enfermedad periodontal (diagnosticados con gingivitis y periodontitis) encontrando que las concentraciones de albúmina y proteínas fueron significativamente mayores en pacientes con enfermedad periodontal. En otro trabajo Henskens y col., en 1996, reportaron concentraciones elevadas de proteínas y cistatinas en pacientes diagnosticados con periodontitis, su conclusión fue que las glándulas salivales pueden responder a una enfermedad inflamatoria estimulando la producción de ciertas proteínas acinares.

Mejía en el 2008, estudió muestras de saliva entera no estimulada de adultos con enfermedad periodontal y obtuvo un incremento significativo en la concentración de proteínas totales en comparación con el grupo periodontalmente sano, relacionado a una mayor incorporación de componentes del suero a través del surco gingival crevicular durante esta enfermedad.

Miller y col. (2006), reportaron un incremento en la concentración de proteínas totales, MMP e IL-1 β , en muestras de saliva entera de individuos con enfermedad periodontal respecto a controles sanos, lo cual está relacionado al

proceso de inflamación local en la encías, debido a la aparición de mediadores proinflamatorios y la incorporación de proteínas del suero durante el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Nuestros resultados concuerdan con los trabajos anteriores considerando que la enfermedad periodontal se inicia con la inflamación local de las encías, durante este proceso los vasos sanguíneos que irrigan el área afectada se ven dilatados por la liberación de mediadores proinflamatorios (interleucinas y prostaglandinas), de esta manera la incorporación de componentes del suero como proteínas y electrolitos en la saliva entera es mayor.

La periodontitis agresiva es una enfermedad multifactorial, en la que se relaciona con defectos funcionales de LPMN, macrófagos o ambos, que alteran la atracción quimiotáctica de LPMN hacia el sitio de infección o bien su capacidad de fagocitar microorganismos. Este defecto se refleja en una alta producción de compuestos como prostaglandinas, interleucinas y metaloproteinasas que incrementan la pérdida del tejido conectivo y el hueso alveolar del periodonto. (Newman y col., 2004). En individuos con periodontitis crónica, aunque bien hay una respuesta inmune fuerte por parte del huésped ante la presencia de microorganismos patógenos, no se ha identificado hasta el momento que estos pacientes sufran de algún defecto en su sistema inmune, lo cual podría sugerir un cambio en la concentración de proteínas en sujetos que presentan periodontitis agresiva. Sabiendo esto, es probable que se requiera realizar otros estudios en el que se pueda evidenciar alguna diferencia entre ambas condiciones.

En la figura 14 se presenta el primer gel de electroforesis, con cuatro muestras de saliva de adultos con periodontitis crónica, periodontitis agresiva y control. Se observó que el patrón de bandas es similar en los cuatro carriles. La diversidad de proteínas que se encuentran en la saliva de cada individuo no varía en el tiempo, esto fue demostrado por Bellavía en 1971, quien utilizó en estudios repetitivos durante un año muestras de saliva de la glándula parótida provenientes de un mismo grupo de adultos sanos, a estas muestras se les realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida y se observó el mismo patrón de bandas uniforme con pocas diferencias entre cada individuo. Estas diferencias encontradas en los geles realizados se refieren a la intensidad de las bandas y a la presencia o ausencia de algunas de ellas en cada muestra de saliva.

Una vez realizado este primer gel, las bandas fueron caracterizadas de acuerdo al estándar de masa molecular (kDa) y fueron comparadas con la masa molecular de proteínas salivales identificadas y reportadas que se encuentran en la tabla 4:

Tabla 4. Proteínas salivales identificadas y reportadas

Proteína	Masa molecular kDa	Referencia
Aglutinina	300	Nieuw Amerongen y Veerman,2002
MG2a y MG2b	150-200	Nieuw Amerongen y Veerman,2002
Lactoferrina	80	Schenckels y col., 1995
Lactoperoxidasa	70	Nieuw Amerongen y Veerman,2002
MMP-8	66	García y col., 1998
Albúmina	65	Schenckels y col., 1995
α -amilasas	50-55	Schenckels y col., 1995
Argingipaína	44	García y col., 1998
MMP-1	42	García y col., 1998
Quitinasa	40	Nieuw Amerongen y Veerman,2002
PRP glucosilada	37	Schenckels y col., 1995
Calprotectina	36	García y col., 1998
TIMP-1	30	García y col., 1998
PRP-acídica	26	Schenckels y col., 1995
VEGh	20	Nieuw Amerongen y Veerman,2002
Cistatinas	14,4-15	Nieuw Amerongen y Veerman,2002
Lisozima	14	Schenckels y col., 1995

Haciendo una comparación entre las bandas de proteínas obtenidas y las ya identificadas tenemos a las bandas 2 (175 kDa) y 3 (167 kDa), tienen una masa molecular que podría corresponder a las dos isoformas de la mucina tipo 2 o MG2 (150-200 kDa) (Nieuw Amerongen y Veerman, 2002). Esta proteína se adhiere parcialmente a la superficie del esmalte dentario, su función es la agregación bacteriana de una amplia variedad de organismos tales como: *S sanguis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *P aeruginosa* y *Aa* (Busch y Borda, 2009). La masa molecular de la banda 6 (75kDa), se aproxima a la masa molecular de la lactoferrina (Schenckels y col., 1995). La banda 7 (69 kDa) se asemeja a la masa molecular de la albúmina (Schenckels y col., 1995), que se encuentra más difusa en sujetos con periodontitis crónica y con periodontitis agresiva en comparación con el control. La albúmina constituye el 62% de las proteínas totales del suero y su presencia en la saliva es a través del surco gingival crevicular. Henskens en 1993, reportó elevadas concentraciones de albúmina en pacientes que padecen enfermedad periodontal y concluye que el incremento en la concentración de proteínas totales se debe al paso de grandes cantidades de componentes del suero como la albúmina.

En el gel que aparece en la figura 15 se aprecia un patrón de bandas similar entre las tres muestras y hubo una mejor resolución entre las bandas, que permite hacer la comparación del perfil electroforético de las distintas condiciones periodontales estudiadas.

Se observa que bandas de alta masa molecular no están presentes o aparecen poco definidas en los carriles 2 y 3 que corresponden a las muestras de

los sujetos con periodontitis crónica y periodontitis agresiva, respectivamente. Estas bandas de alta masa molecular son las bandas 1 (214 kDa), 2 (186 kDa), 3 (177 kDa) y 4 (147 kDa), que se aproximan a la masa molecular de mucinas MG2. Busch y Borda en el 2009, indica en su estudio que pacientes con enfermedad periodontal presentan una disminución en la concentración salival de MG2, lo cual estaría asociado a una menor capacidad de defensa de la saliva, ya que las mucinas interactúan con bacterias tales como *Aa* impidiendo que se adhieran a la mucosa bucal.

En nuestro caso, la falta de proteínas en esta zona del gel podría deberse a la acción de proteasas presentes en la muestra de saliva, que al ser descongeladas varias veces para la realización de los geles, pudieron ser activadas.

En la figura 16 se muestra un gel en gradiente al 10-20% con tinción de plata para las mismas tres muestras empleadas en los geles de las figuras anteriores (14 y 15). Esta tinción de plata se realizó porque presenta la ventaja de detectar pequeñas cantidades de proteínas (0,3 ng de proteína) aunque por otra parte tiene como desventaja que proteínas que están en grandes cantidades tienden a generar "fondo" impidiendo observar el patrón de bandas. Sin embargo se pueden observar diferencias entre las bandas y en su intensidad. En la zona en donde se encuentran las bandas 4 (85 kDa) y 5 (76 kDa), se pueden apreciar bandas muy difusas en los carriles de periodontitis crónica y periodontitis agresiva, que no aparecen en el carril 1 de la muestra control, es probable que allí estén presentes MMP-2 (72 kDa) y MMP-9 (82 kDa) (García y col., 1998). Estas metaloproteinasas

de matriz se consideran que son las principales proteinasas que intervienen en la destrucción del tejido periodontal mediante la degradación de las moléculas de la matriz extracelular (Newman y col., 2004). En la zona de la banda 6 (66 kDa) se observa una mayor intensidad en el carril 2 que corresponden a la muestra con periodontitis crónica y también en los carriles 3 y 4 de las muestras de individuos con periodontitis agresiva. En esa zona difusa pueden estar las MMP-8 que justamente tiene una masa molecular de 66 kDa (García y col., 1998). Esta es una colagenasa producida por fibroblastos, células epiteliales y macrófagos que degrada colágeno tipo I y se ha encontrado incrementado en saliva de pacientes con periodontitis crónica (García y col., 1998; Newman y col., 2004). Esto contrasta con la situación encontrada en la periodontitis agresiva, en la que la actividad colagenasa se debe a las MMP-1 (42 kDa) y la cual puede relacionarse en este gel con la banda 9 (39 kDa). Quizás las diferencias de MMP se deban a las funciones alteradas de los neutrófilos del hospedero y esto subraya más aún la evidencia de que en estas diferentes formas de destrucción periodontal actúan mecanismos variables de daño tisular (Newman y col., 2004).

Cabe destacar que en esta zona y en la que está marcada con asterisco (*) en el gel de la figura 15, se sugiere la aparición de otra proteína llamada argingipaína (44 kDa) (García y col., 1998), de origen bacteriano específicamente de *Porphyromonas gingivalis* y es capaz de evadir los sistemas de defensa normales del hospedero, pues no es inhibida por los inhibidores de proteasas endógenos y tiene la habilidad de interrumpir las funciones de los PMN por lo que esta proteína desempeña una función fundamental como factor de virulencia en la enfermedad

periodontal (García y col., 1998). Sin embargo, no se encontró información disponible acerca de estudios realizados sobre esta proteína y su relación con la enfermedad periodontal, pero puede asociarse la misma en ambos tipos de periodontitis.

Continuando con esta zona, puede mencionarse la existencia de una proteína llamada calprotectina de 36 (kDa), derivada de los granulocitos, detectada por macrófagos y células epiteliales (García y col., 1998). Recientemente se demostró que la calprotectina está aumentada en niveles considerables en pacientes con cálculo dental, por lo que es de esperar encontrar cantidades elevadas de esta proteína en pacientes con periodontitis crónica ya que tienen una mayor acumulación de cálculo dental en comparación con los pacientes con periodontitis agresiva. Esta proteína también puede contribuir a la respuesta inmune en la enfermedad periodontal debido a que posee actividad antimicrobiana contra *P. gingivalis* en el epitelio gingival y una acción inhibitoria en el crecimiento de macrófagos y linfocitos (Simancas, 2009).

En la figura 15, la banda 11 (29,5 kDa) aparece más intensa y difusa en el carril de la muestra con periodontitis agresiva (3) en comparación con las muestras con periodontitis crónica (2) y control (1), pudiéndose relacionar con TIMP-1 de 30 kDa, inhibidor de proteasas que adquiere relevancia en la enfermedad periodontal puesto que un desbalance en su concentración puede desencadenar la destrucción de los tejidos periodontales por parte de las MMP (García y col., 1998). Esta proteína parece estar relacionada con la regulación de las colagenasas durante el

remodelado hístico, inflamación y cicatrización. Ingman y col., en 1996, determinaron la presencia de TIMP-1 en saliva de pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva, encontrando que la concentración de estos inhibidores era más elevada en pacientes con periodontitis agresiva en comparación con el grupo de pacientes con periodontitis crónica y el grupo control. Aunque esta banda no se observa con facilidad en el gel de la figura 16, tal vez debido al fondo que pudo haberse generado por la misma tinción, por lo que se recomienda realizar otros geles que permitan observar esta banda o un patrón de bandas en esta zona pudiendo ser relacionadas con esta proteína.

En las figura 15 y 16 se observaron proteínas definidas de baja masa molecular, entre ellas están las bandas 12, 13, 14 y 15. En la figura 15, en el carril 2, se aprecian bandas de 14 kDa aproximadamente que podrían relacionarse con las proteínas lisozima (14,5 kDa) (Schenckels y col., 1995) y cistatinas (15 kDa) (Nieuw Amerongen y Veerman, 2002). Las lisozimas son proteínas que cumplen una función bactericida, clivando enlaces β 1-4 glicosídicos entre el ácido murámico y los residuos N-acetilglucosamina en los peptidoglicanos de la pared celular en las bacterias (Schenckels y col., 1995).

Las cistatinas son inhibidoras de cisteín proteinasas que se encuentran en varios fluidos biológicos como el semen, saliva y lágrimas (Schenckels y col., 1995; Ozmeric, 2004). Henskens en 1996, reportó niveles significativamente altos de cistatinas en individuos con periodontitis crónica en comparación con individuos periodontalmente sanos. Este resultado puede apoyar nuestro estudio, por lo que

se puede afirmar entonces que esta proteína de baja masa molecular podría ser cistatina observándose en una banda con mayor intensidad en la muestra de periodontitis crónica en comparación con las muestras de periodontitis agresiva y el control (figuras 15 y 16).

La presencia marcada de esta proteína en las muestras de saliva de los individuos que fueron diagnosticados con enfermedad periodontal se debe a que durante el proceso inflamatorio en el periodonto los LPMN liberan mediadores proinflamatorios (citoquinas y prostaglandinas) y enzimas como las catepsinas (Ozmeric, 2004). Las catepsinas B, H y L son cisteín proteinasas que al ser liberadas por los LPMN no sólo actúan sobre el agente patógeno sino que también degradan las fibras de colágeno en el ligamento periodontal. Como respuesta el huésped libera a la saliva grandes cantidades de cistatina, con el fin de regular la acción de estas proteinasas y proteger los tejidos del periodonto. Mejía en el 2008, en su Trabajo Especial de Grado, realizó geles de acrilamida con muestras de saliva de pacientes sanos y con periodontitis crónica generalizada e indicó que existen bandas intensamente teñidas de aproximadamente 15 kDa en adultos con periodontitis crónica generalizada, indicando similitud en el tamaño de esta banda con la proteína cistatina (15 kDa), que puede sugerir una exagerada expresión que responde a mecanismos de protección y regulación durante los procesos inflamatorios en la enfermedad periodontal.

Luego de obtener estos resultados se puede decir que a pesar de que el análisis estadístico de la concentración de proteínas entre individuos con

periodontitis crónica y con periodontitis agresiva no demostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3), en la realización del análisis de los perfiles electroforeticos de ambos casos, se encontraron ligeras diferencias para estas dos condiciones periodontales. Es importante tomar en cuenta la limitación que tiene una electroforesis en una sola dimensión (separación solo por su tamaño), por lo que podrían realizarse otros estudios bioquímicos como espectrometría de masas o electroforesis en 2 dimensiones (donde las proteínas son separadas por su masa molecular y por su carga) que permitan tener un mayor criterio al momento de caracterizar y comparar las bandas en esta enfermedad.

Las glucoproteínas salivales tienen una importante función en la cavidad bucal y son pieza clave en el inicio de la enfermedad periodontal, ya que a través de ella ocurre la formación de la biopelícula dental, que dará paso a todo el proceso inflamatorio que caracteriza a esta enfermedad. La determinación de glucoproteínas en saliva podría ser empleado para la detección de la enfermedad periodontal, por lo que en este estudio se hicieron geles de acrilamida con tinción de ácido peryódico PAS con la finalidad de estudiar posibles diferencias en el patrón de glucoproteínas en sujetos con periodontitis crónica y periodontitis agresiva.

Las bandas presentes en el gel con tinción de PAS (figura 17), son similares a las encontradas por Beeley y col., en 1991, en muestras de saliva de la glándula parótida, a las cuales se les realizó una electroforesis en geles de acrilamida con tinción de PAS, en el cual se observaron bandas de 69 y 50 kDa y sugieren que

pertenecen a proteínas PRP altamente glucosiladas que podrían cumplir con funciones de lubricación en la cavidad bucal y a la α -amilasa de 66 kDa que favorece la formación del bolo alimenticio.

Para este análisis, se esperaba obtener un mayor número de bandas en cada una de las condiciones periodontales, pues en la saliva están presentes una variedad de glucoproteínas como mucinas, lactoferrinas, PRP y estaterinas. Probablemente no lograron teñirse bien el resto de las glucoproteínas presentes con esta tinción por lo que se recomienda utilizar un método que permita detectar glucoproteínas, como la adición de lectinas, tal como propone Beeley en su trabajo, en 1991.

Como hemos visto, el papel de las proteínas en el desarrollo de la enfermedad periodontal se resume en actuar como mediadores de expresión de otras moléculas, cambios en la morfología celular, activación de células para secreción de sustancias y de ésta manera establecer o exacerbar el daño tisular. Toda esta evidencia, sugiere que se debe analizar la patología periodontal y establecer en la literatura y en la investigación científica y clínica, el papel de las proteínas expresadas en la periodontitis, como facilitadores de vías de exploración de este tipo de enfermedades.

CONCLUSIONES

- Existe una disminución progresiva de las concentraciones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y proteínas totales de saliva entera no estimulada luego de ser congeladas, por lo tanto es importante el almacenamiento de las muestras y su análisis en el menor tiempo posible.
- En la determinación de la concentración de Ca^{2+} salival no se encontraron diferencias entre individuos sanos y pacientes con enfermedad periodontal ni tampoco entre las condiciones de periodontitis crónica y periodontitis agresiva.
- La concentración de proteínas totales en saliva es incrementada en pacientes con enfermedad periodontal con respecto al grupo control, sin embargo no se encontraron diferencias en la medición de este parámetro en individuos con periodontitis crónica y periodontitis agresiva.
- En el análisis de los perfiles electroforéticos de muestras de saliva de pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva se obtuvo un patrón de bandas similar para cada una de las condiciones. Mostraron similitudes en cuanto a disminución de proteínas de 200 kDa y presencia marcada de proteínas de 44 kDa y 65 kDa en comparación con la muestra control. En cuanto a diferencias, se sugiere una mayor intensidad de proteínas con masas moleculares de 66 kDa, 36 kDa y 14 kDa en periodontitis crónica mientras que en periodontitis agresiva existe un posible aumento de 42 kDa y 30 kDa.
- El perfil electroforético de glucoproteínas permitió distinguir muy pocas bandas, de proteínas de 60 kDa que aparecen más intensas en periodontitis crónica en comparación con periodontitis agresiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, A., Kharadi, M., Dhale, R., Deshmukh, V., Sontakke, A. **2011**. High salivary calcium level associated with periodontal disease in Indian subjects: a pilot study. *Oral Health. Prev. Dent.* **9**: 195-200.
- Albandar, J.M y Tinoco, E.M. 2002. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontology 2000.* **29**: 153-176.
- American Academy of Periodontology. **1999**. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *J Periodontol.* **4**: 1-6.
- American Academy of Periodontology. **2005**. Epidemiology of Periodontal Diseases. *J Periodontol.* **76**: 1406-1419.
- Bellavia, S. **1971**. Electrophoresis of proteins from human parotid saliva. *Archs oral Biol.* **16**: 751-758.
- Beeley, J., Sweeney, D., Lindsay, J., Buchanan, M., Sarna, L., Khoo, K. **1991**. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins. *Electrophoresis* **12**: 1032-1041.
- Berkovitz, B., Holland, G., Moxhamo, B. **1995**. Atlas en color y texto de anatomía oral: Histología y embriología. Primera edición. Editorial Elsevier. Madrid, España.
- Booth, V., Young, S., Cruchley, A., Taichman, S., Paleolog, E. **1998**. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* **33**:491– 9.
- Busch, L., Borda, E. **2009**. Mucinas salivales: estructura química, mecanismos de liberación y participación en la defensa no inmunológica de la cavidad bucal. Revista de la Facultad de Odontología (UBA). **24**: 1-16.
- Carranza, A., Sznajder, N. **1996**. Compendio de Periodoncia. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Castro, E. **2003**. Marcadores bioquímicos de la enfermedad periodontal. *Med Oral* **8**:322-8.

- Clark, R., Page, C., Wilde, G. **1977**. Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. *Infect Immun* **18**: 694-6
- Clerehugh V. **1989**. Diagnosis and epidemiology of early disease in adolescents. *Journal Phillip* **6**: 291-298.
- Connerty, H., Briggs, A. **1966**. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol.* **45**: 290-6.
- Cortesi, V. **2008**. Manual práctico para el auxiliar de odontología. Editorial Masson. Barcelona, España.
- Chiappin, S. **2007**. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chem Act.* **383**: 30-40.
- De Almeida, P., Grégio, A., Machado, M., De Lima, A., Azevedo, L. **2008**. Saliva Composition and Functions: Comprehensive Review. *J Contemp Dent Pract* **3**: 72-80.
- Dubray, G., Bezard, G. **1982**. A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* Jan **15**: 325-9.
- Echeverría, J., Guerrero, A., Bullon, P. **2005**. Manual SEPA de Periodoncia y terapéutica de implantes: fundamentos y guía. Editorial Médica Panamericana. Primera Edición. Madrid, España.
- Echeverría, G. 2003. Enfermedades periodontales y periimplantarias. Factores de riesgo y su diagnóstico. *Av Periodon Implantol.* **15**: 149-156.
- Edgar, W. **1992**. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* **172**: 305-312.
- Escárate, J., Gagliardi, A., Mejía, J., Cortés, C., More, J., Carmona, A. Pousa, S y colaboradores. **2008**. Determinación de la concentración de PO_4^{3-} , proteínas

totales y estudio de los patrones electroforéticos de proteínas salivales en pacientes infantiles venezolanos con y sin caries. *Mem Inst Biol Exp.* **5**:17-20.

- Ferris, G. **2009**. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. Madrid, España.
- Ferro, M y Gómez, M. **2007**. Fundamentos de la Odontología. Segunda Edición. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Fiske, C., Subbarow, Y. **1925**. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400.
- Fives-Taylor P. **1985**. Surface properties of *Streptococcus sanguis* FW213 mutants nonadherent to saliva-coated hydroxyapatite. *Infect Immun.* **47**: 752-759.
- Fletcher M. **1991**. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv Microbiol Physio.* **32**:53-85.
- García, E, Vicedo, A., García, J., Saldaña, A. **1998**. Enzimas proteolíticas relacionadas con la enfermedad periodontal inflamatoria. *Rev Cubana Estomatol.* **35**: 1-7.
- García, A. Metabolismo del flúor. **2001**. <http://www.geodental.com/default.htm?d=5044>. [Consulta: Abril, 2010].
- Gómez, A., Agudelo, C., Barrientos, S., Chávez, M., Cuellar A., Correa, C., Gamboa, F y colaboradores. **2006**. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Segunda Edición. Bogotá-Colombia.
- Guilarte, C y Perrone, M. **2004**. Microorganismos de la placa dental relacionados con La Etiología de la Periodontitis. *Acta Odontol Venez* **3**: 213-217.

- Henskens, Y., Van der Velden., Veerman, E., Nieuw A. **1993**. Albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis or periodontitis. *J Periodontal Res* **28**: 143-148.
- Henskens, Y. M., Veerman, E. C. I., Mantel, M. S., Van der Velden, Nieuw Amerongen. **1994**. Cystatin S y C in human whole saliva and in glandular saliva in periodontal health and disease. *J Dent Re.* **73**: 1606-1614.
- Henskens, Y. M., Veerman, E. C. I., Mantel, M. S., Van der Velden, Nieuw Amerongen., Timmerman, M., Snoek, C. **1994**. Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. *J Periodontal Res* **31**: 57-65.
- Huang, C. **2004**. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* **49**: 951-962.
- Humphrey, S., Williamson, T. **2001**. A review of saliva: Normal, composition, flow and function. *J Prosthet Dent* **85**: 162-9.
- Ingman, T, Tervahartiala T, Ding Y. **1996**. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **23**: 1127-1132.
- Ishikawa, I., Kawashima, Y., Oda, S y colaboradores. **2002**. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *J Periodon Res.* **37**:324-332.
- Kaufman, E y Lamster, I. **2002**. The diagnostic applications of saliva-A review. *Crit Rev Biol Med* **13**: 197-212.
- Kiss, E., Sewon, L., Gorzó, I., Nagy, K. **2010**. Salivary calcium concentration in relation to periodontal health of female tobacco smokers: a pilot study. *Quintessence Int* **9**: 779-785.
- Laemmli, U. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

- Lamster, I., Ahlo J. **2007**. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* **1098**: 216-229.
- Lee, J., Garon, E., Wong, E. **2009**. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res* **12**:206–211.
- Liebana, J. **2002**. Microbiología Oral. Segunda Edición. Mc Graw-Hill. Interamericana. España.
- Lieno, L., Hurrta, H. **1999**. A potencial role of an intracellular signaling defect in neutrophil functional abnormalities and promotion of tissue damage in patients with localized juvenile periodontitis. *Clin Chem Lab Med.* **37**: 215.
- Lindhe, J. **2009**. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Editorial Médica Panamericana. Cuarta Edición. Buenos Aires, Argentina.
- Lima, P., García, D., Saliba, S., Sumida, D., Okamoto, A. **2009**. *Saliva: reflection of the body.* *Int J Inf Dis.***14**: e184-e188.
- López, A., González, R. **2001**. Conceptos básicos de odontoestomatología para el médico de atención primaria. Editorial Masson. Barcelona, España.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., Randall, R. **1951**. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* **193**: 265-275.
- Mejía, J. **2008**. Estudio de parámetros bioquímicos en saliva de adultos venezolanos con enfermedad periodontal. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Merril, C., Goldman, D., Van Keuren, M. **1982**. Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels *Electrophoresis.* **3**: 17-23.
- Miller, C., Langub, C., Thomas, M. **2006**. Salivary biomarkers of existing periodontal disease. *J Am Dent Asso.* **137**: 322-329.

- Mombelli A, Lang, N., Burgin, W. **1990**. Microbial changes associated with the development of puberty gingivitis. *J Periodon Res* **25**: 331-338.
- Motemayel Ahmadi. **2010**. Saliva as a mirror of the body health. *DJH* 2010 **1**: 1-15.
- Nauntofte, B., Tenovuo J., Lagerlöf, F. **2003**. Secretion and composition of saliva. Dental caries: the disease and its clinical management. Blackwell Munksgaard, Oxford. **3**: 7-27.
- Newman, M., Takei, H., Carranza, F. **2004**. Periodontología Clínica. Novena edición. Mc Graw Hill. Mexico.
- Nieuw Amerongen, A., Veerman, E. C. **2002**. Saliva – the defender of the oral cavity. *Oral Dise* **8**: 2-22.
- Oppermann, R.V. 2007. An overview of the epidemiology of periodontal diseases in Latin America. *Braz Oral Res.***21**: 8-15.
- Ozmeric, N. **2004**. Review: Advances in periodontal disease markers. *Clinica Chimica Acta.* **343**: 1-16.
- Padilla, C., Lobos, O., Jure, G., Matus, S., Descouvieres, C., Hasbún, S., Maragaño, P. **2007**. Aislamiento de bacterias periodontopáticas desde hemocultivos y ateromas obtenidos de pacientes con arteriosclerosis y periodontitis. *Rev Med Chile.* **135**: 1118-1124.
- Page, R. **1991**. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* **34**: 235-242.
- Pérez, L. B. **2009**. Periodontitis Agresiva: Diagnóstico y tratamiento. *Act Odont Venezolana.* **47**: 1-15.
- Puy, C. **2006**. La saliva en el mantenimiento de la salud bucal y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. *Med. Bucal. Patol. Cir. Bucal.***11**: 49-55.

- Raj, P., Jonson, M., Levine, M., Nancollas, G. **1992**. Salivary statherin. *J Biol Chem* **267**: 5968-5976.
- Ramírez, J. **2005**. ¿Es la enfermedad periodontal un factor de riesgo cardiovascular? [http:// bibliotecadigital.univalle.edu.co](http://bibliotecadigital.univalle.edu.co). [Consulta, 01 de Mayo 2010].
- Ross, M., Gordon, K., Wojciech, P. **2004**. Histología: Texto y atlas a color con Biología celular y molecular. Cuarta edición. Editorial Panamericana.
- Ruiz, M., Burguera, L., Rodríguez, A. **2005**. Periodontitis agresiva causada por *Porphyromonas gingivalis*: reporte de un caso. *Med ULA* **12**: 36-43.
- Simancas, M., Arévalo, L., Díaz, C. 2009. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. *Duazary*. **7**: 106-116.
- Schipper. G Raymond, Silletti, E. **2007**. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol* **III4-II35**.
- Schenkels, L., Veerman, E., Nieuw Amerongen, A. **1995**. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **6**: 161-175.
- Takane, N., Hiroyasu, I., Yoshihiro, I., Noritaka, S., Koichi, I. **2002**. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *J Perio* **73**: 551-4.
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. **1983**. Anatomía, Fisiología y Patofisiología del Hombre. Editorial Reverté. España.
- Tibor, K., Pál, F. **2007**. Saliva in health and disease, chemical biology of. *Wiley Enc Chem Bio* **55**: 1-9.

- Todorovic, T., Dozic, I., Vicente, M., Ljuskovic, B., Pejovic, J., Marjanovic, M. **2005**. Enzimas salivales y enfermedad periodontal. *Med Oral Patol Cir Bucal* **11**: E115-9.
- Tonetti, M., Mombelli, A: Early-onset periodontitis. **1999**. *Ann Periodontol.* **4**:39.

Consultas en línea:

- www.academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/Digestive%20System.htm. [Consulta: 10 de Abril de 2010].
- www.colondental.com. [Consulta: 11 de Abril de 2010].
- www.patbucal.umayor.cl/bioquimica_caries/bioquimica_caries.html. [Consulta: 04 de Mayo de 2010].
- www.dentalcentral.es/educacion.html. [Consulta: 07 de Febrero de 2011].
- www.clinicadentalmay.cl/periodoncia.htm. [Consulta: 14 de Marzo de 2011].
- www.caredent-fuenlabrada.com. [Consulta: 11 de Junio de 2011].
- www.mpkb.org/home/pathogenesis/microbiota/biofilm. [Consulta: 11 de Junio de 2011].

ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE SALIVA PARA ESTUDIO CIENTIFICO EN ENFERMEDAD PERIODONTAL FORMATO PARA EL DONANTE

Yo (Nombre)_____ identificado con CI _____ mayor de edad he sido informado(a) sobre el estudio de la Enfermedad Periodontal que se está realizando, y estoy de acuerdo en proporcionar, en forma voluntaria y sin ninguna presión o inducción, una o varias muestras de saliva, para estudiarla científicamente y analizar los componentes de la misma y conocer mejor la Enfermedad Periodontal en nuestro país.

He comprendido el método para coleccionar la muestra de saliva y lo haré siguiendo las instrucciones dadas por el (la) odontólogo (a) y la proporcionaré el día y la hora cuando venga a la consulta.

He sido informado que la donación de saliva no implica riesgo alguno para mi salud ni para mi privacidad.

Tengo entendido que puedo terminar mi participación como donante en cualquier momento, notificándole al odontólogo (a) y acepto que puedo ser excluido como donante del programa en cualquier momento.

En tales condiciones consiento donar una o varias muestras de saliva para ser utilizadas en el proyecto de investigación.

Caracas _____

Nombre _____

Firma: _____

FORMATO PARA PERSONA QUE OBTIENE EL CONSENTIMIENTO

He explicado al paciente: _____ la naturaleza y objetivo del Estudio y que la donación voluntaria de una muestra de saliva no constituye ningún riesgo para el paciente. He contestado y contestaré sus preguntas a mi mejor entender y le entregado una copia donde se explica el Estudio sobre componentes de la saliva que se está realizando.

Investigador (a):
Dra. M. Valentina Salas
UCV

Odontólogo (a)
Dra.
Clínica Odontológica
