

ARTICULO ORIGINAL

ESTUDIO HISTOQUIMICO DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESION DE GLICANOS DURANTE UNA GINGIVITIS EXPERIMENTAL EN HUMANOS*

Félix Alejandro Mejía Madrid¹, Julio Roberto Garzón Sánchez², Gabriel J. Cadavid Velásquez³, John Santiago Mejía Tobón⁴, Rodrigo Restrepo Molina⁵

RESUMEN. Mejía FA, Garzón JR, Cadavid GJ, Mejía JS, Restrepo R. Estudio histoquímico de los cambios en la expresión de glicanos durante una gingivitis experimental en humanos. *CES Odont* 1996; 9:15-19. En tres voluntarios sanos se indujo un modelo de gingivitis en la hemiarca superior derecha (14 días sin ninguna medida de higiene oral); la hemiarca superior izquierda sirvió como control. Se tuvo el propósito de demostrar los patrones de expresión de diferentes residuos glicosídicos usando un grupo de ocho lectinas biotiniladas en encía sana y enferma. Se tomaron biopsias por congelación en los días 0, 7 y 14 del experimento y se procesaron con la técnica histoquímica de la inmunoperoxidasa. Fue posible determinar la adhesión selectiva de las lectinas a las diferentes estructuras de los tejidos epitelial y conectivo de la encía y se observó un cambio en la expresión de residuos sacáridos a medida que avanzaba la inflamación experimental, posiblemente atribuible a la creación de criptoepitopes mediante el clivaje del azúcar terminal de los glicanos, a la posible acción de una transferasa y a la especificidad de las lectinas por el grupo sanguíneo del paciente al que pertenecía el tejido bajo examen.

Palabras claves: Lectinas, Inflamación gingival, Inmunohistoquímica.

ABSTRACT. Mejía FA, Garzón JR, Cadavid GJ, Mejía JS, Restrepo R. Glycan expression in healthy and diseased periodontium: A histochemical comparative pilot study. *CES Odont* 1996; 9:15-19. An experimental gingivitis model achieved by the suppression of all oral hygiene methods during 14 days was induced in the right maxillary quadrant of three male healthy volunteers. The left maxillary quadrant was used as a control site. The objective of the study was to reveal the expression patterns of the different glycosidic residues with the use of eight biotinized lectins in healthy and diseased periodontium. Biopsies were taken and immersed in liquid nitrogen on days 0, 7 and 14 of the experiment and were processed with the immunoperoxidase histochemical technique. It was possible to determine lectin selective adhesion to different structures of the epithelial and connective tissues of the periodontium. Additionally, a change in the expression of saccharose residues as the experimental inflammation progressed was observed. This was possibly due to the creation of cryptopeptides through cleavage of glycan terminal sugars, to the action of a transferase and to lectin specificity for the blood type group of the individual.

Key Words: Lectins, Gingival inflammation, Histochemistry

INTRODUCCION

La gingivitis, definida simplemente como la inflamación de la encía, es el preámbulo de la periodontitis, la mayor causa de pérdida de dientes en adultos a nivel mundial. La gingivitis se inicia por la acción de sustancias tóxicas e irritantes sobre la encía, las cuales son liberadas por la flora de la placa bacteriana supragingival y por mediadores de la respuesta inflamatoria del huésped.¹

La enfermedad se ha dividido en tres estadios, de acuerdo con los eventos histopatológicos que ocurren: lesiones inicial, temprana y establecida.² La lesión inicial (4 días) se caracteriza por una reacción inflamatoria aguda (aumento del fluido crevicular, migración de PMN), que no es evidente clínicamente.³ La lesión temprana sigue a la inicial después de siete días de acumulación de placa, puede persistir durante 21 días o más y es clínicamente detectable como gingivitis;^{4,5} el infiltrado es dominado por linfocitos (75%), macrófagos y algunas células plasmáticas.⁶ Después de un período variable, la lesión temprana evoluciona a una lesión

establecida, caracterizada por un incremento adicional en el tamaño de la encía, con predominio de células plasmáticas y linfocitos B en el infiltrado; los signos clínicos de inflamación son evidentes y pueden ser severos.^{7,8} El paso del tiempo y el aumento del acúmulo de placa conducen a una periodontitis, en la que es mucho más evidente la formación de una bolsa periodontal y se aprecia la destrucción del soporte óseo de los dientes.⁹

El depósito de una delgada película sobre la superficie del diente y sobre la encía es el primer paso para la formación de placa,¹⁰ cuyo crecimiento resulta de la colonización bacteriana sobre la película adquirida.

La flora bacteriana comensal de la cavidad oral de un individuo adulto está determinada en posición y actividad por las propiedades del medio. El establecimiento de la placa bacteriana comensal sigue las etapas de adquisición, distribución y adherencia de los microorganismos. En estado de salud esta flora está constituida principalmente por cocos y bacilos grampositivos, algunos anaerobios facultativos y, en menor proporción, por bacteroides y espiroquetas. Para la iniciación de la

* Investigación para optar al título de Especialista en Prótesis Periodontal.

¹ Odontólogo CES 1990; estudiante del programa de Prótesis Periodontal, CES, Medellín, 1995.

² Odontólogo Escuela Colombiana de Medicina 1989; estudiante del programa de Prótesis Periodontal, CES, 1995.

³ M.Sc., U. de Illinois, USA; Jefe, División de Investigaciones, Facultad de Odontología, CES.

⁴ Master en Ciencias, Instituto Politécnico Nacional, Mexico D.F.; Profesor CES.

⁵ Médico Patólogo, Universidad de Caldas, Manizales; Clínica Medellín.

gingivitis se requiere un cambio en la flora, principalmente de miembros del género *Actinomyces* y estreptococos y de especies gramnegativas como *F. nucleatum*, *V. parvula* y *Treponema sp.*^{11,12}

La interacción entre las bacterias y el huésped puede desencadenar la síntesis y la expresión de diferentes moléculas y ligandos que determinan la intensidad de la respuesta inmunológica en defensa contra el microorganismo. Las interacciones que ocurren en los procesos de adhesión celular, o bacteriana, o ambas, son controladas por las moléculas de adhesión celular (MAC), de las cuales se reconocen cuatro grupos principales, a saber: integrinas, superfamilia de las inmunoglobulinas, moléculas de adhesión tipo lectina y las del grupo CD44. Todas están ampliamente distribuidas, no solamente en las células del sistema inmune, sino también en otros tejidos, como el endotelio. La selectividad de las MAC por sus ligandos específicos es un determinante fundamental de la naturaleza de la respuesta inflamatoria, facilitando la migración selectiva de PMN, linfocitos o macrófagos hacia el tejido afectado; pueden igualmente mediar los procesos de adherencia e invasión de diversos microorganismos. La estimulación de las células inflamatorias (macrófagos principalmente) aumenta la secreción de mediadores inflamatorios como la interleuquina-1 (IL-1), el interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que amplifican la respuesta inflamatoria. Este ciclo de retroalimentación positiva sólo se logra controlar cuando el agente agresor es eliminado.¹³

Se han postulado dos mecanismos que explican la colonización microbiana de las mucosas: 1) producción de polisacáridos extracelulares por microorganismos,^{14,15} los cuales son viscosos y forman una matriz intermicrobiana gelatinosa que atrapa bacterias;¹⁰ 2) expresión de adhesinas con especificidad por ligandos de naturaleza sacarídica o proteica.¹⁷

Con frecuencia las lectinas expresadas por los microorganismos son específicas para sacáridos que en condiciones normales no son accesibles, por lo que se hace necesaria la expresión simultánea de una proteasa y/o glicosidasa (de origen bacteriano o de células inflamatorias) que hacen que se exponga el residuo sacárido correspondiente (criptoepitope). Este es uno de los eventos más importantes en la fisiopatología de la gingivitis, ya que simultáneamente se remueve el sacárido ligando de las bacterias no patógenas y se expone otro ligando para bacterias patógenas.¹⁸ En pacientes con enfermedad periodontal se han detectado niveles elevados de proteasas (tripsina, colagenasa) y de glicosidasas (neuramini-dasa) en el fluido crevicular, las cuales podrían participar en este proceso de modulación de la expresión de ligandos potenciales a bacterias patógenas y no patógenas.

El objetivo del presente estudio fue investigar la expresión de diferentes residuos sacáridos por medio de lectinas en un modelo de gingivitis experimental en humanos, para tratar de definir si en realidad se generan criptoepitopes de naturaleza sacarídica en las inmediaciones del sitio de colonización bacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de gingivitis experimental

La muestra estuvo constituida por 3 voluntarios de sexo masculino, con edades entre 27 y 34 años, que gozaban de buena salud a la fecha de la investigación y con su dentición completa y sin restauraciones que pudiesen aumentar la acumulación de placa bacteriana. A los tres se les realizó la historia médico-odontológica que se emplea rutinariamente en el Centro de Especialistas CES de Sabaneta. Uno de los voluntarios era fumador crónico y otro ocasional. Para determinar su estado clínico de salud gingival se les hizo un examen que incluyó el índice de placa de Silness y Loe¹⁹ y el índice gingival modificado de Lobene y col.²⁰ En esta investigación se utilizó la técnica de boca dividida para poder obtener en un mismo individuo los parámetros clínicos de salud e inflamación del tejido gingival y para tener un mayor control sobre el estadio de la inflamación que se estaba desarrollando en la encía con el fin de correlacionarlo con los resultados obtenidos. En la hemiarca superior izquierda se establecieron los parámetros clínicos de salud mediante procedimientos de higiene oral y en la hemiarca superior derecha los parámetros clínicos de inflamación, suprimiendo todas las medidas higiénicas.

Dos semanas antes de iniciar el experimento se implementó, para toda la boca, un régimen de higiene oral constituido por: a) cepillado y uso de seda dental, b) control de placa (pastilla reveladora) y c) profilaxis cada tres días. Las zonas de tejido seleccionadas para observación fueron las papilas gingivales, así: dientes 24, 25 y 26 (áreas control); 14, 15 y 16 (áreas experimentales). En estas áreas se suspendió todo tipo de higiene oral (cepillado y seda dental o cualquier método alterno) durante 14 días, para permitir el acúmulo espontáneo e ininterrumpido de placa. Se seleccionó el período experimental de 14 días porque permite observar clínica e histológicamente los cambios característicos de los estadios inicial y temprano de la gingivitis.²¹

Medición del grado de inflamación

El índice de placa se utilizó para distinguir claramente entre la severidad y la localización de agregados de placa blanda durante el período experimental y se registró en las papilas gingivales de los dientes mencionados cada siete días durante 14 días, antes de la toma de las biopsias. El índice gingival modificado se utilizó para distinguir claramente entre la calidad de la encía (severidad de la lesión) y la localización de la lesión. Este índice omite el sangrado a la presión y favorece una evaluación no invasiva de la extensión y severidad de la inflamación gingival y la detección visual temprana de sus cambios; además, permite tomar una biopsia poco traumatizada. Se aplicó en las papilas gingivales y en las superficies de los dientes seleccionados cada siete días durante 14 días, antes de la toma de las biopsias. Un solo examinador se encargó del registro de ambos índices y de la toma de las muestras de tejido gingival durante todo el período experimental.

Toma de biopsias

Se infiltró prilocaína (Citanest) a nivel del surco yugal correspondiente a la papila seleccionada, lo más lejos posible del área de la intervención para evitar la alteración del tejido que se iba a remover. Se utilizó un bisturí Bard Parker con hoja #15 para realizar en cada papila dos incisiones verticales y una horizontal que las unía. Las biopsias se tomaron a todos los sujetos en una misma sesión en los días señalados, con un tamaño promedio de 2 x 2 mm, bajo el siguiente esquema: día 0: una biopsia del área control y una del área experimental; día 7: una biopsia del área experimental; día 14: una biopsia del área experimental. En total se obtuvieron 12 biopsias: 3 de las áreas control y 9 de las áreas experimentales. El tejido se introdujo inmediatamente en un criovial a temperatura óptima de corte para poder realizar el procedimiento de congelación en nitrógeno líquido.

Se hicieron cortes de 7 μ de grueso en un criostato y se fijaron en acetona grado reactivo hasta la ejecución del proceso de inmunohistoquímica.

Procesamiento de las biopsias:

A cada biopsia se le hicieron 9 cortes para determinar histológicamente el grado de inflamación. Se tiñeron con hematoxilina y eosina placas de cada individuo y de cada día para confeccionar un total de 108 placas, de las cuales se utilizaron 72 para el estudio inmunohistoquímico. Las 36 restantes (placas piloto) se utilizaron para tinción convencional con hematoxilina y eosina, con el fin de determinar la orientación que tendría el tejido en las placas y, además, el grado de inflamación del tejido en los diferentes días.

Histoquímica

Se utilizaron las siguientes lectinas biotinizadas (Pierce Lab., Rockport IL, USA):

- Erythrina cristagalli* (ECL)
- Artocarpus integrifolia* (Jacalina)
- Aglutinina de arveja *Pisum sativum* (PSA)
- Aglutinina de germen de trigo (WGA)
- Vicia villosa* isolectina B4 (VvB4)
- Dolichos biflorus* (DBA)
- Sophora japonica* (SJA)
- Ulex europaeus* 1 (UEA-1)

La unión de las lectinas biotinizadas se detectó por medio de avidina, una glicoproteína tetramérica con gran afinidad por la biotina, y de peroxidasa biotinizada, la cual transforma "in situ" el sustrato AEC (3-amino, 4-etil carbazole) en un material insoluble de color marrón cuando se incuba en presencia de peróxido de hidrógeno, siguiendo una técnica previamente descrita.²² Se realizaron lavados con PBS (pH 7.2) durante 15 minutos y se hizo la contratinción con hematoxilina de Mayer durante un minuto. En seguida se lavaron las placas en agua durante cinco minutos y finalmente se montaron en gelatina glicerina.

Se procedió a observar las placas en un microscopio de luz para determinar los sitios de unión de la lectina a las diferentes estructuras del tejido gingival y se deter-

minó la adhesión de las lectinas a los componentes del epitelio oral externo (EOE) y el tejido conectivo (TC).

Para la evaluación de la intensidad de la tinción se utilizaron criterios subjetivos debido a la falta de métodos cuantitativos de mayor sensibilidad.

RESULTADOS

Los patrones de expresión de las ocho lectinas utilizadas se muestran en la Tabla de la página siguiente. Los sujetos participantes en el experimento se identifican en ella con los números 1, 2 y 3. Entre paréntesis se indica el grupo sanguíneo de cada uno.

Como se registraron patrones de expresión muy intensos con algunas lectinas a nivel del tejido conectivo, se hace relación a su presencia o ausencia en ese tejido.

Con la lectina UEA-1, específica para el antígeno fucosilado H, se observó una expresión propia para vasos sanguíneos (endotelio vascular) en el tejido conectivo, que revela aumento en los tejidos más inflamados.

En el tejido conectivo se observó una intensa reacción con ECL y jacalina, que reconocen galactosas terminales en posiciones α y β respectivamente, sobre todo en la membrana que separa el tejido conectivo del EOE. De igual intensidad fue la reacción con la lectina específica para residuos de manosa (PSA) y N-acetil glucosamina/ácido siálico (WGA). Con ECL, jacalina y UEA-1 se apreció un patrón de expresión que varió discretamente a medida que avanzaba el proceso inflamatorio.

Los patrones de expresión observados fueron comparables en los tres individuos, con excepción de las lectinas específicas para determinantes del grupo sanguíneo (A, B, O). La lectina DBA, específica para N-acetilgalactosamina y para grupo sanguíneo A (A1>A2),²³ mostró dicha especificidad, pues el único sujeto perteneciente al grupo B resultó negativo, mientras que en los otros dos, pertenecientes al grupo A, la expresión de este glicano fue positiva, de manera interesante, exclusivamente en el EOE.

En general, se apreció un leve o discreto aumento progresivo en la unión de las lectinas al EOE a medida que progresaba el proceso inflamatorio.

DISCUSION

Los carbohidratos presentes en las superficies celulares y en la matriz extracelular están implicados en una gran variedad de fenómenos biológicos tales como fertilización, embriogénesis, morfogénesis, migración celular²⁴ y receptores para hormonas y toxinas como sitios blanco para la adherencia de microorganismos y como mecanismos de defensa inmune.^{25,26}

Las lectinas son proteínas de origen no inmune con capacidad de reconocer con alta estereoespecificidad los glicanos asociados a lípidos o proteínas; han sido ampliamente usadas en pruebas histoquímicas para localizar la expresión de determinados glicanos en cortes histológicos.^{24,27,28}

En el presente estudio se utilizaron ocho lectinas biotinizadas para investigar la expresión de residuos sacáridos en tejido gingival humano sano (D-0) y enfermo (D-7 y D-14) de una gingivitis experimental. El modelo pretendió

Patrones de expresión de lectinas en tejido gingival sano (D-0) y enfermo (D-7 y D-14).

Lectina	Cuadrante	Día	Sujeto 1 (B+)				Sujeto 2 (A+)				Sujeto 3 (A+)			
			Células epiteliales				Células epiteliales				Células epiteliales			
			EB	EE	EG	TC	EB	EE	EG	TC	EB	EE	EG	TC
ECL	A	0	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	+	++
		7	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
		14	++	++	-	++	+	-	-	++	++	++	+	+
	B	0	++	++	-	++	++	+	-	++	+	+	+	++
		7	++	-	-	++	+	-	-	++	+	+	-	+
		14	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
JAC	A	0	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	-	+
		7	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	+	+
		14	++	+	+	++	++	++	++	+	+	+	++	+
	B	0	++	++	+	+	++	++	++	+	++	++	+	+
		7	++	+	-	+	++	++	++	+	++	++	+	+
		14	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+
PSA	A	0	+	+	-	++	++	++	+	++	++	++	-	+++
		7	++	++	+	++	++	++	+	++	++	++	-	++
		14	-	-	-	+++	++	++	+	+	++	++	+	+++
	B	0	+	+	-	++	+	+	-	++	++	++	-	+++
		7	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	-	++
		14	+	+	-	+	++	++	-	+	++	++	+	+++
WGA	A	0	++	++	+	++	+	+	-	+	++	++	+	++
		7	++	++	+	++	+	+	+	+	++	++	+	++
		14	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+
	B	0	++	++	+	+	+	-	-	+	++	++	++	+
		7	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++
		14	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+
VvB4	A	0	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		14	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	B	0	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		7	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
		14	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
DBA	A	0	-	-	-	-	++	++	+	-	++	+	+	-
		7	-	-	-	-	++	+	+	-	-	+	-	-
		14	-	-	-	-	++	++	+	-	+	+++	+++	-
	B	0	-	-	-	-	-	+	-	-	++	+	+	-
		7	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
		14	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
SJA	A	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
		14	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	B	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UEA-1	A	0	-	-	-	++	-	-	-	++	++	++	+	++
		7	-	-	-	+	+	-	+	++	++	++	++	++
		14	-	-	-	+	+	-	-	++	+++	+++	++	++
	B	0	-	-	-	+	-	-	-	+	++	++	+	++
		7	-	-	-	+	+	+	-	+	++	++	++	++
		14	-	-	-	+	-	+	+	+	+++	+++	++	++

+ = Expresión leve; ++ = expresión moderada; +++ = expresión intensa; - = expresión negativa.

A = Parte superior de la biopsia; B = parte inferior de la biopsia.

EB = Estrato basal; EE = estrato espinoso; EG = estrato granular; TC = tejido conectivo

evaluar los estadios iniciales del proceso inflamatorio gingival, teniendo como control al mismo individuo. En investigaciones anteriores se obtuvieron biopsias de pacientes con enfermedad periodontal crónica en los que no se determinó el estadio real de la enfermedad.^{23,29,30,31} Estos estudios revelan un patrón de reconocimiento por lectinas en el que se observa intensa expresión de glicanos en los estratos granular y espinoso en contraste con la muy pobre expresión en los estratos basal y córneo.

La expresión de residuos sacáridos depende del grupo sanguíneo del paciente.²⁹ del grado de diferenciación celular de los estratos del epitelio³⁰, y del grado y tipo de la reacción inflamatoria.

La evidencia obtenida sugiere que durante la gingivitis se establece un proceso de depleción selectiva de residuos de galactosa en el tejido conectivo gingival y un aumento en la expresión de los mismos en el EOE. Estos cambios en la expresión de azúcares en el tejido conectivo pueden ser producidos por proteasas o glicosidas del huésped o de los microorganismos. Dos mecanismos podrían explicar este fenómeno: el primero se relaciona con la creación de criptoepítopes mediante la remoción del azúcar terminal de los glicanos; el segundo incluye la acción de una transferasa que modifica el posible sitio de unión para una lectina específica.

De las ocho lectinas utilizadas, la PSA y la WGA, que identifican residuos sacáridos de los grupos galactosa, manosa/glucosa y N-acetilglucosamina respectivamente, mostraron un discreto aumento en el patrón de expresión (tanto en la cantidad de tejido teñido, como en la intensidad de la expresión). La excepción fue la jacalina, que identifica residuos de galactosa en posición β , la cual exhibió una tendencia a la disminución en su expresión durante la evolución de la gingivitis.

Los patrones de tinción observados en el EOE permiten sugerir que a medida que la gingivitis avanza se producen cambios en la expresión de algunos sacáridos (galactosa, manosa y N-acetilglucosamina) que podrían asociarse a un proceso de activación de las células del EOE, en respuesta a mediadores de la inflamación que difunden desde el tejido conectivo subyacente.

No se observó tinción para lectinas específicas de grupo sanguíneo A (DBA) o B (SJA) en tejido conectivo, pero sí para su precursor, el antígeno H. La lectina UEA-1, que es específica para el grupo sanguíneo H (O) mostró tinción selectiva de células endoteliales y epiteliales, en las cuales no se detectó expresión de los antígenos A o B a pesar de que los sujetos del estudio pertenecían a estos grupos.

CONCLUSION

Se observó un cambio en la expresión de residuos sacáridos en la encía humana, tanto en el tejido conectivo como en el epitelio oral externo, a medida que el proceso inflamatorio de la gingivitis experimental avanzaba.

BIBLIOGRAFIA

1. Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 345-49.
2. Page RC, Schröder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current works. *Lab Invest* 1976; 235-43.
3. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36: 177-83.

4. Seymour GJ, Powell RN, Aitken JF. Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. *J Periodontol* 1983; 54: 522-29.
5. Seymour GJ, Powell RN, Cole KL. Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. *J Periodont Res* 1983; 18: 375-83.
6. Schröder HE, Attstrom R. Pocket formation: an hypothesis. En: Lehner T, Cimasoni G. The borderline between caries and periodontal disease. Vol 2. London: Academic Press Inc, 1980.
7. Seymour GJ, Greenspan JS. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodont Res* 1979; 14: 39-45.
8. Okada H, Kida T, Yamagami H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect & Immun* 1983; 41: 365-71.
9. Lovdal A, Amo A, Waerhaug J. Incidence of clinical manifestations of periodontal disease in light of oral hygiene and calculus formation. *J Am Dent Assoc* 1958; 56: 21-45.
10. Ericson T. Salivary glicoproteins. *Arch Odont Scand* 1968; 26: 3-9.
11. Litsgarten MA, Mayo HE, Tremblay R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1975; 46: 10-21.
12. Litsgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1976; 47: 1-12.
13. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63: 338-66.
14. Mandel I. Dental plaque: nature, formation and effects. *J Periodontol* 1966; 37: 357-62.
15. Carlsson J. Plaque formation and streptococcal colonization on teeth. *Odont Rev* 1968; 14: 19-23.
16. Bahn AN. Microbial potential in the etiology of periodontal disease. *J Periodontol* 1979; 41: 603-10.
17. Leach SA, Hayes ML. A possible correlation between specific enzyme activities, dental plaque formation and cariogenicity. *Caries Res* 1968; 2: 38-45.
18. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 1989; 68: 750-60.
19. Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 1967; 38: 610-16.
20. Lobene RN, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L. A modified gingival index for use in clinical trials. *Clin Prev Dent* 1986; 8: 3-6.
21. Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J Periodont Res* 1973; 8: 1-9.
22. Hsu SM, Fanger H. Immunoperoxidase technique. *J Clin Pathol* 1981; 75: 734-38.
23. Steffensen B, Lopatin DE, Caffesse RG, Hanks CT. Blood group substances as differentiation markers human dentogingival epithelium. *J Periodont Res* 1987; 22: 451-55.
24. Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 1989; 246: 227-34.
25. Dabelsteen E. Receptors on the keratinocyte surface. En: Mayer J, Sqvier CA, Gerson SJ, eds. The structure and function of oral mucosa. Oxford: Pergamon Press, 1984: 83-93.
26. Olden K, Parent JB, White SL. Carbohydrates moieties of glycoproteins, a re-evaluation of their function. *Biochem Acta* 1982; 650: 209-32.
27. Lis H, Sharon N. Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 35-67.
28. Damjanov I. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab Invest* 1987; 55: 35-67.
29. Hormia M, Virtanen I. Saccharide residues in human gingiva as revealed with fluorochrome-coupled lectins. *J Periodont Res* 1989; 24: 137-45.
30. Hietanen J, Salo OP. Binding of four lectins to normal human oral mucosa. *Scand J Dent Res* 1984; 92: 443-47.
31. Murase N, Hosaka M, Takai Y, Tanimura T, Mori M. Histochemical demonstration of lectin binding sites and keratin in inflamed human gingiva. *J Periodont Res* 1985; 20: 625-636.

Correspondencia:
Félix Alejandro Mejía M.
Carrera 77AA No. 45G-52
Medellín, Colombia