



---

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

Identificación de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  de lesiones periapicales agudas en ratones BALB/c sometidos a hiperglucemia inducida con dosis única de estreptozotocina

**T E S I S**

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA  
ESPECIALIZACIÓN EN ENDOPERIODONTOLOGÍA

ELABORADA POR:

CAMPOS MARTÍNEZ CYNTHYA ELIZABETH

ASESORES:

MTRA. CAROLINA VEGA NAVARRO

ESP. JESÚS VILLAVICENCIO PÉREZ

DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	I-II
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	III
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>1.1 Diabetes Mellitus</b> .....	3
1.1.1 Diabetes tipo 2 .....	4
1.1.2 Manifestaciones clínicas en boca en pacientes diabéticos .....	8
1.1.3 Afecciones inmunológicas en la DMT-2 .....	8
1.1.4 Modelos animales para la inducción de DMT-2 en roedores .....	10
<b>1.2 Periodontitis apical</b> .....	13
1.2.1 Significancia biológica y clínica de la periodontitis apical .....	14
1.2.2 Aspectos inmunopatológicos en el proceso inflamatorio de la periodontitis apical .....	14
1.2.3 Etiología de la periodontitis apical .....	21
1.2.4 Clasificación de la periodontitis apical .....	22
1.2.5 Fisiopatología de la Periodontitis apical aguda .....	24
1.2.6 Modelos animales y la periodontitis apical .....	27
<b>1.3 Lesiones periapicales y su relación con Diabetes</b> .....	27
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	33
4.1 Objetivos particulares .....	33
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	34
<b>6. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	35
6.1 Inducción de diabetes .....	35
6.2 Inducción de lesiones periapicales .....	36
6.3 Determinación de citocinas en suero IL-1- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, con técnica de ELISA-Sandwich .....	36
6.3.1 Obtención de suero para la prueba .....	36
6.3.2 Técnica de ELISA-Sandwich .....	36
6.4 Identificación de IL-1 $\beta$ e IFN- $\gamma$ por medio de la Técnica de PCR .....	37
6.4.1 Extracción del RNA .....	37
6.4.2 Obtención del CDNA .....	38
6.4.3 RT-PCR .....	38
6.4.5 Electroforesis .....	39
6.5 Estudio histológico .....	40
<b>7. RESULTADOS</b> .....	41
7.1 Glucosa en sangre .....	41
7.2 El peso y la presencia de un cuadro de hiperglucemia .....	41

7.3 Tolerancia a la glucosa -----	42
7.4 Evaluación metabólica -----	43
7.4.1 Polidipsia -----	44
7.4.2 Polifagia -----	45
7.4.3 Poliuria -----	46
7.4.4 Análisis de orina -----	46
7.5 Determinación de citocinas (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ e IL-4) en suero, por medio de la técnica de ELISA -----	48
7.5.1 IL-1 $\beta$ -----	48
7.5.2 IFN- $\gamma$ -----	49
7.5.3 IL-4 -----	49
7.6 Determinación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ e IFN- $\gamma$ ) in situ de lesión periapical por medio de la técnica de PCR -----	50
7.6.1 IL-1 $\beta$ -----	50
7.6.2 IFN- $\gamma$ -----	51
7.7 Cortes histológicos -----	53
<b>8. DISCUSIÓN -----</b>	<b>54</b>
<b>9. CONCLUSIONES -----</b>	<b>60</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----</b>	<b>61</b>
<b>11. APÉNDICES -----</b>	<b>70</b>
11.1 APÉNDICE 1 -----	70
11.2 APÉNDICE 2 -----	72
11.3 APÉNDICE 3 -----	73

## ABREVIATURAS:

<b>DMT-1</b>	Diabetes Mellitus Tipo 1
<b>DMT-2</b>	Diabetes Mellitus Tipo 2
<b>BALB/c</b>	Nomenclatura para designar cepa de ratones con fondo genético Th2 generados por endogamia
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa
<b>ELISA</b>	Análisis de inmunoadsorción ligados a enzima
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>PTG</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa
<b>(HbA<sub>1c</sub>)</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alpha
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PGE 2</b>	Prostaglandina E2
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina

<b>RANK</b>	Receptor activador del factor nuclear kappa B
<b>RANKL</b>	Receptor activador del factor nuclear kappa B con su ligando
<b>ON</b>	Oxido Nítrico
<b>PBS-T</b>	PBS-Tweem
<b>H-E</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>Th</b>	Células T colaboradoras (Del inglés T-helper)
<b>Th1</b>	Inmunidad celular o retardada
<b>Th2</b>	Inmunidad humoral
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>GLUT-2</b>	Transportador de glucosa 2
<b>CD4<sup>+</sup></b>	Células T cooperadoras
<b>CD8<sup>+</sup></b>	Células T citotóxicas
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>cDNA</b>	Ácido desoxiribonucleico codificador
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>DNAsa</b>	Enzima que corta la cadena de DNA
<b>RNAsa</b>	Enzima que corta la cadena de RNA
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>O-GlcNAcasa</b>	O-GlcNAc-selectiva N-acetil-β-D-glucosaminidasa

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figuras</b>	<b>Pagina</b>
1.- Proyección de personas con diabetes (2007-2025 grupo de edad 20-79 años [millones])	<b>4</b>
2.- Estructura molecular de la estreptozotocina	<b>12</b>
3.- Secuencia de eventos en el proceso inflamatorio	<b>16</b>
4.- Presencia de biofilm en el foramen apical de un diente afectado con periodontitis apical	<b>22</b>
5.- Plan de Trabajo	<b>34</b>
6.- Gráfica que muestra los promedios de glucemia	<b>41</b>
7.- Peso de los grupos experimentales y grupo control	<b>42</b>
8.- Curva de tolerancia a la glucosa en ratones BALB/c sanos y en dos grupos experimentales	<b>43</b>
9.- Cajas metabólicas diseñadas para monitorear el consumo de alimento, agua y producción de orina, en un periodo de 24 hrs.	<b>44</b>
10.- Barras representativas del promedio de la cantidad de agua ingerida en 24 horas	<b>45</b>
11.- Barras representativas de la cantidad de alimento promedio ingerido en 24 horas	<b>45</b>
12.- Volumen de orina promedio producida por ratón en 24 horas	<b>46</b>
13.- Tiras reactivas obtenidas para el análisis de orina	<b>46</b>
14.- Niveles de IL-1 $\beta$ a los 0, 2 y 7 días después de la exposición pulpar	<b>48</b>
15.- Niveles de IFN- $\gamma$ en suero a los 0,2 y 7 días después de la exposición pulpar	<b>49</b>
16.- Niveles de IL-4 en suero a los 0, 2 y 7 días después de la exposición pulpar.	<b>50</b>
17.- Determinación de la producción de IL-1 $\beta$ in situ de la zona de lesión post-exposición pulpar.	<b>51</b>
18.- Determinación de la producción de IFN - $\gamma$ in situ de la zona de lesión post-exposición pulpar	<b>52</b>
19.- Cortes histológicos	<b>53</b>
<b>Tablas</b>	
<b>Tabla 1.</b> Criterios diagnósticos para Diabetes tipo 2 (DMT-2)	<b>5</b>
<b>Tabla 2.</b> : Resultado del análisis de orina	<b>47</b>

## RESUMEN

La Diabetes Tipo 2 (DMT-2) representa un conjunto de alteraciones metabólicas de etiología múltiple, caracterizada por hiperglucemia, elevada prevalencia, complicaciones crónicas y alta mortalidad. La DMT-2 es una de las enfermedades con mayor impacto social y sanitario. En los últimos años se ha reconocido la necesidad de analizar a través de estudios en pacientes y modelos experimentales las principales repercusiones en la salud que provoca la DMT-2. El tiempo de cicatrización es uno de los principales procesos afectados en los pacientes con DMT-2, en el área de odontología es fundamental el tiempo de curación, por ejemplo en las lesiones que afectan al tejido periapical. El objetivo de este trabajo fue identificar la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) y anti-inflamatorias (IL-4) de lesiones periapicales agudas en un modelo murino de hiperglucemia inducida con dosis única de estreptozotocina. Se utilizaron ratones BALB/c machos de 7 semanas de edad, al grupo experimental se le administró vía intraperitoneal una dosis única de 130 mg/kg de estreptozotocina (STZ) y al grupo control se le administró únicamente vehículo. Se evaluó el peso, glucemia, ingesta de agua y alimento, producción de orina y tolerancia a la glucosa para establecer la patología diabética. Las lesiones periapicales fueron inducidas 7 semanas después, exponiendo el tejido pulpar de los primeros molares superiores al medio bucal de los ratones durante 7 días. Se tomaron muestras de suero en la semana 7 post-inducción con STZ, a los 2 y 7 días post-lesión para determinar IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  e IL-4 por la técnica de ELISA-Sandwich. Por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se determinó la producción localizada de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Se realizó el estudio histológico de los tejidos afectados 7 días después de inducir las lesiones periapicales y se llevó a cabo conteo celular por campos. Los valores de glucemia, peso y la curva de tolerancia a la glucosa confirmaron el modelo de hiperglucemia similar a DMT-2 (incidencia del 50%). Los ratones con DMT-2 presentaron niveles incrementados de IL-1 $\beta$  e IL-4 en suero en la semana 7 post-inducción con STZ, a los 2 y 7 días post-lesión, sin embargo los niveles de IFN- $\gamma$  fueron menores en comparación al grupo control y al grupo que recibió STZ pero no desarrollo DMT-2. La producción local de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en los tejidos asociados a la lesión periapical fue mayor en el grupo con DMT-2 con respecto al grupo control. En conclusión la hiperglucemia provocó una mayor producción de IL-1 $\beta$  e IL-4 en suero 7 semanas después de la inducción de DM-T2 con STZ y condujo a una disminución de IFN- $\gamma$ . Inducir una lesión periapical aguda con una duración de 7 días favoreció la producción elevada progresiva de estas citocinas en suero, una producción incrementada de los transcritos para IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en los tejidos afectados y un mayor infiltrado celular donde abundan predominantemente PMNs.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una violación en la integridad de los tejidos pulpar y periapical origina en ellos reacciones usualmente inflamatorias y el grado de severidad de éstas depende del avance de lesión en los tejidos, de la vascularidad linfohemática, de la resistencia del huésped y virulencia de los organismos patológicos implicados [1].

Dado a la complejidad de los factores que intervienen en la patogénesis de las lesiones pulpares y periapicales, los cambios que ocurren en éstos tejidos abarcan una variedad de respuestas fisiológicas y patológicas. Tanto la pulpa, como el ligamento periodontal, responden a la agresión de la misma forma que lo hace el tejido conectivo en cualquier parte del cuerpo. Actualmente gracias a algunos avances tecnológicos en el área biológica, es posible estudiar los fenómenos que tienen lugar en éstos tejidos [1,2,3] .

La patología periapical de tipo inflamatorio, puede iniciar por alteraciones de origen no pulpar como en la oclusión traumática, o como resultado de la infección bacteriana de la pulpa dental con afección periapical, en la cual puede existir lisis ósea en el periápice aun sin estar completamente destruido el tejido pulpar en la zona más apical del conducto [4].

El mecanismo inflamatorio que ocurre en las lesiones periapicales, representa una barrera de defensa del organismo para evitar el paso de bacterias al periápice, que conlleva al reclutamiento de células inflamatorias (polimorfonucleares (PMNs), células mononucleares como linfocitos y macrófagos) [5], citocinas inflamatorias y mediadores de la inflamación, que junto con algunas enzimas líticas provocan reabsorción ósea. Una vez que ocurre la lisis ósea, se produce la formación de tejido fibroso como resultado de la síntesis de colágeno por los fibroblastos de la periferia, lo que refleja la imposibilidad del sistema inmunológico para eliminar elementos antigénicos procedentes del conducto radicular infectado y la necesidad de limitar el daño [6].

Cuando ocurre una intensa proliferación microbiana de alta virulencia con una resistencia orgánica, se produce un proceso periapical agudo, de naturaleza supurativa caracterizada por un infiltrado donde predominan neutrófilos, mientras que si se presenta una multiplicación bacteriana de menor intensidad, se produce un proceso crónico de larga duración, con reabsorción ósea, y por lo general asintomático [4].

El desarrollo de una lesión periapical demuestra una interrelación dinámica entre el sistema inmune mediante una respuesta inflamatoria; y los microorganismos provenientes del conducto radicular [7].

Se conocen algunos factores que pueden afectar el desarrollo de la enfermedad periapical, dentro de los cuales se incluyen: cambios en la presión del tejido periapical,

alteraciones en los efectos y producción de mediadores químicos, alteraciones inmunológicas presentes, etc; que son capaces de inducir lesiones muchas más severas y con un tiempo más prolongado de reparación y cicatrización [8]. Sin embargo también se han asociado a distintas patologías como la diabetes, en la que existen alteraciones en la respuesta inmune que pueden provocar una mayor prevalencia de periodontitis apical después del tratamiento endodóntico [9].

### **1.1 Diabetes Mellitus**

Es una alteración caracterizada por hiperglucemia en ayuno, o glucemia mayor de 200 mg/dl en más de una ocasión, al realizarse la prueba de tolerancia de glucosa (PTG). Es un síndrome que afecta sobre todo el metabolismo de carbohidratos, aunque también a proteínas y lípidos [10].

Clasificación:

- Diabetes tipo 1 (DMT-1) (Diabetes dependiente de insulina).

Cursa con severa inuslinopenia y cetoacidosis. El paciente que la padece depende de insulina exógena para prevenir estas complicaciones. La herencia es de gran importancia, como factor etiológico del padecimiento. Otro factor a considerar, es la respuesta inmune, debido a que en la mayoría de los pacientes diagnosticados se les encuentra en sangre anticuerpos que atacan las células de los islotes pancreáticos [10].

- Diabetes tipo 2 (DMT-2) (Diabetes no dependiente de insulina).

Padecimiento presente a causa de una secreción defectuosa de insulina o una resistencia a ésta. Por lo general es diagnosticada después de los 40 años. Este tipo de diabetes cursa con una respuesta inadecuada a la insulina, por lo que se produce hiperglucemia y sobreestimulación prolongada de las células B del páncreas, que si es prolongada, lleva a su agotamiento y finalmente insulinopenia [11].

Factores de riesgo:

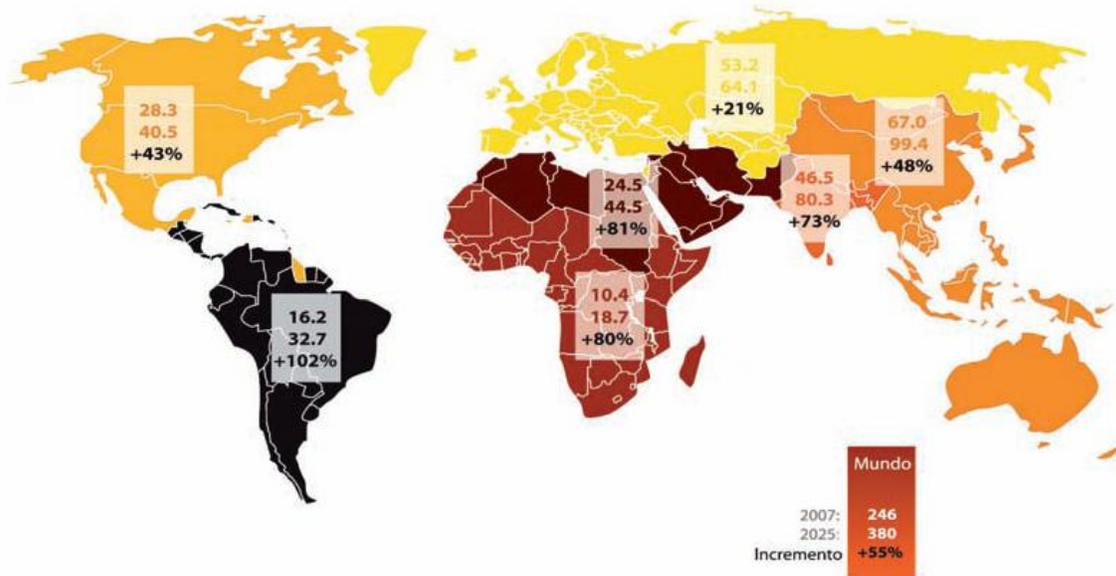
Personas mayores de 40 años, obesos, Antecedentes heredofamiliares de Diabetes, Mujeres con hijos macrosómicos, Integrantes de grupos étnicos, con elevada prevalencia de diabetes no insulino dependiente, pacientes con hipertensión arterial.

- Diabetes secundaria

Es un tipo de diabetes en el que se desconoce la causa precisa, o se presenta secundaria a otras alteraciones orgánicas, metabólicas o genéticas definidas, como: Enfermedades pancreáticas (pancreatitis esclerosante, hemocromatosis o pancreatectomía), Endocrinopatías (Acromegalia, Aldosteronismo, Síndrome de Cushing, etc), Medicamentos como glucocorticoides, estrógenos, antihipertensivos, diuréticos, antidepresivos y adrenérgicos [11].

### 1.1.1 Diabetes Tipo 2 (DMT-2)

EPIDEMIOLOGÍA: Es la forma más común de diabetes a nivel mundial y se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más importante. De acuerdo a la Organización Mundial de la salud (OMS), existen en el mundo más de 180 millones de personas con diabetes, esperándose que para el año 2025 sean más de 380 millones [12,13], también se estima que una de cada 20 muertes en el mundo es atribuible a ésta enfermedad, de tal manera que en el año 2005 más de 1.1 millones de personas fallecieron por complicaciones de la diabetes, aproximadamente la mitad de las muertes afectaron a menores de 70 años y un 55% fueron mujeres (Figura 1).



**Figura 1.** IDF Atlas diabetes 2006. Proyección de personas con diabetes (2007-2025 grupo de edad 20-79 años [millones]) [14].

En la actualidad, México es uno de los países con mayor ocurrencia de Diabetes tipo 2 (DMT-2) en el mundo, en 1995 ocupaba el noveno lugar con un número elevado de casos de diabetes y se espera que para el año 2030 ocupe el séptimo con casi 12 millones de pacientes diabéticos [12].

**DIAGNÓSTICO:** El criterio esencial considerado para el diagnóstico de diabetes tipo 2 es la hiperglucemia, en la que se refleja una alteración en la función insulínica y la imposibilidad del organismo para mantener una concentración normal de glucemia sérica [15] , sin embargo los criterios de diagnóstico han cambiado desde hace más de 10 años [16].

Los cambios más significativos incluyeron a los niveles de glucosa sérica en ayunas (Fasting Plasma Glucose. FPG) los cuales se redujeron de 120 mg/dl hasta 100 mg/dl y la introducción de una nueva categoría de “alteración de glucosa en ayunas” (Impaired fasting glucose IFG) en las que son considerados niveles de 100 a 125 mg/dl. También se considera la medición de “tolerancia a la glucosa” dos horas después de una carga de 75 gramos de glucosa donde son considerados como normales niveles menores de 140 mg/dl, sin embargo con respecto a esta prueba también se contemplan cifras de “tolerancia de glucosa alterada” (Impaired glucose tolerance IGT) en donde las cifras corresponden a un rango entre 140 mg/dl y 199 mg/dl (Tabla 1).

Cuando el paciente se encuentra en los rangos de glucosa en ayunas alterada o de intolerancia a glucosa es adecuado tomar medidas precautorias que permitan evitar la evolución a diabetes (cambios en la dieta, ejercicio e incluso tratamiento con hipoglucemiantes), mientras que si el paciente ha demostrado cifras mayores a las anteriormente mencionadas podría determinarse el diagnóstico de diabetes [16,17].

<b>Criterios de diagnóstico de Diabetes tipo 2</b>				
<b>Prueba</b>	<b>Normoglicemia</b>	<b>Alteración de glucosa en ayunas</b>	<b>Intolerancia a glucosa</b>	<b>Diabetes</b>
<b>Glucemia en ayunas</b>	< 100	100-125		≥126 mg/Dl
<b>Tolerancia a la glucosa</b>	<140		140-199	≥200 mg/dL y puede haber signos de diabetes

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos para Diabetes tipo 2 (DMT-2) [17].

El diagnóstico es complejo en la DMT-2 debido a que un gran porcentaje de individuos enfermos desconocen su condición, por lo que su detección suele ocurrir de forma tardía siendo posible que ya sean evidentes complicaciones de la enfermedad, por ejemplo alteraciones cardiovasculares, macrovasculares, retinopatía, etc. [15]. Por todo eso se ha propuesto que determinados individuos que reúnan algunos signos o presenten factores de riesgo de diabetes en los que se incluyen: índice de masa corporal mayor a 25, inactividad física habitual, familiares de primer grado con diabetes, hipertensión arterial (140/90 mm/Hg), síndrome del ovario poliquístico, historia de enfermedad vascular, principalmente; sean sometidos a pruebas diagnósticas de diabetes que incluso puedan repetirse cada tres años [18].

El realizar pruebas diagnósticas repetidamente es importante para la interpretación de sus resultados y de evidenciar la presencia de diabetes, es sabido que puede existir una variación significativa de los resultados en pruebas de diagnóstico cuando se repiten en un intervalo de 2 a 6 semanas, por ello es esencial que si se presentan anomalías en las cifras de cada una de las pruebas, deben ser confirmadas repitiéndolas en varias ocasiones. A pesar de que la prueba de tolerancia a la glucosa es una excelente herramienta de diagnóstico para diabetes, no se recomienda que se realice como una prueba de rutina, debido a que en la mayoría de los casos es más práctico realizar la prueba de glucosa sérica en ayunas o considerar la sintomatología del paciente cuando ya se han presentado complicaciones por la hiperglicemia [17,18].

Otra de las pruebas que se realizan para corroborar la presencia de hiperglucemia es la medición de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>), sin embargo es importante cuidar los falsos positivos y negativos relacionados con algún problema de hemoglobinopatía o alteraciones en los glóbulos rojos, a pesar de ello no deja de ser una excelente herramienta para monitorear el control y la efectividad del tratamiento en el paciente diabético [19].

**PATOGÉNESIS:** Hasta el momento se reconoce que esta enfermedad es de índole multifactorial y que no solo depende de un solo factor capaz de desencadenarla. Algunos factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 son: genéticos, calidad de vida (obesidad, sedentarismo, dieta, estrés), embarazo, y características demográficas (sexo, edad y grupo étnico) [11].

La patogénesis de la Diabetes tipo 2 es compleja e involucra la interacción de factores genéticos y ambientales. Una serie de factores ambientales juegan un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad, particularmente se incluyen el sedentarismo y la

ingesta de una dieta hipercalórica que por lo regular conducen a obesidad. Los signos clínicos son heterogéneos y existe un amplio rango de edad en el que pueden iniciarse, así como el grado de obesidad o la gravedad de hiperglucemia que se presenten también suelen ser variables. Desde un punto de vista fisiopatológico, las personas con Diabetes tipo 2 demuestran constantemente tres anormalidades cardinales [20]:

- Resistencia a la acción de la insulina en tejidos periféricos principalmente en el músculo aunque también en el hígado
- Secreción defectuosa de insulina, particularmente al existir un estímulo que incremente los niveles de glucemia
- Producción aumentada de glucosa por parte del hígado

A pesar de que hace algunos años no era posible entender de forma precisa la forma en que los factores genéticos, ambientales o fisiopatológicos interactúan para inducir al desarrollo de la enfermedad, actualmente se sabe que en la forma más común de Diabetes tipo 2 se presenta una combinación entre la presencia de resistencia a la insulina y una secreción anormal de ésta hormona [21].

Desde un punto de vista fisiopatológico la incapacidad de las células  $\beta$  del páncreas para adaptarse a la reducción de sensibilidad a la insulina puede provocar aumento en la secreción de la hormona, generando la precipitación o la pronta aparición de la diabetes tipo 2. Otros factores que también pueden provocar un aumento considerable de insulina son la pubertad, el embarazo, el sedentarismo y una dieta hipercalórica que induzca a obesidad. Una predisposición genética subyacente parece ser un factor crítico para provocar la falla de las células beta en el páncreas [21,22].

**FISIOPATOLOGÍA:** En la diabetes se presentan una serie de alteraciones bioquímicas o metabólicas en las que se encuentran involucrados los carbohidratos, en este síndrome la hiperglucemia y glucosuria reflejan un desequilibrio en la utilización de la glucosa. Al disminuir la utilización de éste monosacárido para la síntesis de ATP, el organismo puede obtenerla a partir de lípidos o proteínas, aumentando en el primer caso, el catabolismo lipídico y la formación de cuerpos cetónicos, y en el segundo el incremento de vías catabólicas de proteínas, con lo que se provoca una disminución en la síntesis de moléculas estructurales y funcionales, que se forman a partir de aminoácidos (inmunoglobulinas, factores proteínicos de la coagulación, hormonas, enzimas y proteínas tisulares). Lo que ocasiona susceptibilidad a las infecciones, alteraciones en la coagulación y en la cicatrización de heridas, trastornos enzimáticos y hormonales, así como

alteraciones morfológicas, que llevan a una pérdida de peso gradual del peso corporal [10,23].

La glucosuria se presenta cuando la capacidad de recuperación de glucosa a nivel renal supera el umbral de reabsorción en las nefronas, que en promedio es de 180 mg/dl [24]. Al perderse glucosa por la orina, actúa como soluto y ocasiona una mayor pérdida de agua, dando lugar a un incremento en el volumen urinario (poliuria). La eliminación excesiva de agua por vía urinaria, desencadena un mecanismo compensador de sed intensa (polidipsia). La polifagia se encuentra relacionada con la incapacidad de utilizar la glucosa como principal fuente energética, a través de mecanismos fisiológicos vinculados con el hipotálamo (sitio regulador del hambre), el paciente diabético presenta un incremento en la tendencia y frecuencia de consumo de alimentos [23].

### **1.1.2 Manifestaciones clínicas en boca en pacientes diabéticos**

Debido a la disminución de la resistencia tisular en la diabetes, se llega a presentar periodontitis fulminante con abscesos periodontales y papilas gingivales dolorosas, inflamadas y hemorrágicas. Xerostomía y disminución de la secreción salival. Alteraciones periodontales en las que por los elementos que favorecen a la persistencia de la inflamación en tejidos periodontales, se produce una pérdida de la adherencia epitelial y pérdida ósea. Se ve afectada la producción de elementos estructurales en ligamento periodontal y hueso alveolar, provocando movilidad dentaria [25].

Por la mayor tendencia a la acumulación de sarro, se presenta mayor incidencia de caries, enfermedad periodontal, y en general una alta susceptibilidad a infecciones en la boca, así como alteraciones en la cicatrización, por lo que cualquier tratamiento quirúrgico realizado a nivel bucal, requiere que el paciente diabético, se encuentre bajo un tratamiento y control médico adecuados [25].

### **1.1.3 Afecciones inmunológicas en la DMT-2**

La incidencia de infecciones se incrementa en pacientes que padecen diabetes mellitus y algunos de esos procesos infecciosos suelen traer un mayor número de complicaciones en los individuos diabéticos que en personas sanas, esto puede explicarse dado a que se sabe que en el paciente diabético existen alteraciones en los mecanismos de defensa que suelen ser muy similares tanto en pacientes que padecen diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2 [26].

a) Defectos de la inmunidad innata:

- Inmunidad humoral: Los pacientes diabéticos pueden presentar alteraciones en la síntesis de los componentes que participan en el sistema de complemento, particularmente existe una concentración C4 debajo del rango normal, sin embargo esto no aumenta el riesgo a presentar infecciones en ellos [26].

Algunos estudios realizados en monocitos de pacientes diabéticos, han mostrado una producción menor de sus productos, como lo son algunas interleucinas (IL-1, e IL-8) después de ser estimulados con diferentes productos bacterianos, así como también se ha sugerido que elevar las concentraciones de glucemia en pacientes no diabéticos, también influye en la disminución de los mediadores mencionados previamente, sin embargo el Factor de Necrosis Tumoral-(TNF) $\alpha$  se ha encontrado en los mismos niveles tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos, esto se debe a que el TNF- $\alpha$  disminuye en ambos pacientes durante transcurso de 24 horas, por lo que por lo general no se encuentran variaciones en su concentración entre un grupo y otro [9,27].

El cuadro de hiperglucemia en los pacientes con Diabetes Mellitus puede inducir a un entorno propicio para aumentar la virulencia de ciertos microorganismos, un ejemplo de ello es la *Candida albicans*, que en condiciones de hiperglucemia puede inducir a la inhibición de la actividad fagocítica mediada por el sistema de complemento. Por lo general en pacientes Diabéticos mal controlados se presentan signos como la glucosuria, la cual puede aumentar el crecimiento de cepas de *Escherichia coli*, lo que probablemente juega in papel en el aumento de la incidencia de infecciones en el tracto urinario en éstos pacientes [28].

- Inmunidad celular:

PMN: El paciente diabético presenta alteraciones en el metabolismo energético, y algunas células como lo son los PMNs, dependen de una adecuada formación de moléculas de alta energía para una función óptima, por lo que en estos pacientes la función quimiotáctica de dichas células puede mostrarse significativamente disminuida, así como también su capacidad de adherencia a las paredes del vaso en zonas de inflamación. La función fagocítica de las células, parece mostrarse mayormente afectada en pacientes diabéticos con un pobre o nulo control, que en aquellos que presentan un adecuado tratamiento de su padecimiento [26].

No se ha encontrado correlación con el nivel de glucemia y la capacidad fagocítica de algunas células como los PMN, aunque algunos estudios han demostrado que la actividad bactericida mejora cuando los niveles de glucosa en sangre se normalizan [28].

Algunos estudios no han podido demostrar diferencias significativas en las distintas funciones celulares (quimiotaxis, quimioradiolucencia, fagocitosis, etc) de los PMNs entre pacientes diabéticos con y sin bacteriuria, y pacientes no diabéticos. Sin embargo es posible que en presencia de una combinación de alteraciones funcionales de los PMNs se presente un impacto en la respuesta inmunológica de éstas células en pacientes diabéticos [28].

**Monocitos/Macrófagos:** Algunos datos recientes de estudios en pacientes diabéticos, reflejan una función quimiotáctica y fagocítica alterada en estas células, la cual se ha asociado a una disfunción intrínseca en los propios monocitos en éste tipo de pacientes. Algunos estudios han podido demostrar una respuesta inmune disminuida en niños con Diabetes al administrar la vacuna contra la hepatitis B, así como también existe una producción menor de citocinas pro-inflamatorias tras las estimulación de las células con LPS [28].

**Adherencia:** La adherencia de un microorganismo a la mucosa o a las células epiteliales, es un paso importante en la patogénesis de las infecciones. La infección con *C. albicans* suele ser muy frecuente en pacientes diabéticos, se han planteado que los niveles altos de glucemia y glucosuria por un mal control del padecimiento diabético y uso continuo de prótesis dentales, pueden representar factores de riesgo para el desarrollo de infección con *C. albicans*, particularmente en los pacientes diabéticos existe un incremento en la adherencia de éste microorganismo a los epitelios. Éste aumento en la adherencia de algunos microorganismos a las células diabéticas, incluyen también a *E. coli*, principalmente a las células epiteliales del tracto urinario [28].

#### **1.1.4 Modelos animales para la inducción de DMT-2 en roedores**

La mayoría de los modelos experimentales combinan dos características principales de la diabetes tipo 2 capaces de provocar hiperglucemia: la obesidad asociada a la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta pancreáticas con o sin disminución de la masa de las mismas.

**Ratón KK:** Estos ratones son criados originalmente para tener un tamaño mayor pero no suelen ser tan obsesos (por lo regular pesan menos de 60 gramos), con este tipo de roedores se han podido trabajar distintas metodologías para que las crías sean capaces de

desarrollar resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hiperglucemia. La cepa más estudiada es el ratón KK producido en Japón. En este ratón se ha podido aumentar notablemente los niveles de insulina al ser alimentados con una dieta rica en grasas [29].

Ratón NZO: Este tipo de ratones (New Zealand Obese) presentan un peso alto y la evidencia de acumulación considerable de tejido graso en la porción abdominal. Aproximadamente del 40 al 50% de ratones machos de esta especie suelen desarrollar diabetes tipo 2 con una edad de entre 12 y 20 semanas cuando se mantienen con una dieta que contiene 4.5% de grasa. La obesidad en estos ratones es acompañada por intolerancia a la glucosa, resistencia periférica a la insulina y secreción defectuosa de insulina por parte de las células beta del páncreas. [30]

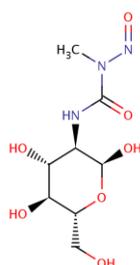
Diabetes inducida con thioglucosa: La thioglucosa induce lesiones específicas en el núcleo ventromedial del hipotálamo que provocan hiperinsulinemia crónica, la cual en etapas iniciales genera hipoglucemia para después conducir a hiperfagia, obesidad y el desarrollo de resistencia a la insulina e hiperglucemia [31].

Ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasas: Hembras C57BL/6J (también conocidas como B6) son alimentadas con una dieta con un contenido alto de grasas y carbohidratos para desarrollar hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia y aumento de la adiposidad [32].

Ratones db/db: Es un ratón que se caracteriza por ser un modelo animal con diabetes tipo 2 y se caracteriza por fenotipos obesos y diabéticos debido a la interrupción del receptor de la leptina [33]. En esta cepa, la hiperinsulinemia es evidente por 10 días de edad y los niveles de glucemia se elevan levemente en un mes desarrollando diabetes aproximadamente a las 10 semanas de edad. A pesar de las complicaciones diabéticas se han obtenido informes que analizan la presencia de lesiones cariosas severas y enfermedad periodontal avanzada en estos ratones [34].

Estreptozotocina en roedores: Se han descrito modelos experimentales en los que es aplicada una sola dosis de la toxina estreptozotocina, la cual puede ser aplicada en roedores recién nacidos o con una edad que va de las 6 a las 8 semanas. Estos animales presentan inicialmente hiperglucemia y son capaces de presentar intolerancia a la glucosa rápidamente con una reducción de la masa de las células beta en el páncreas, pero se ha evidenciado la regeneración posterior de las células beta hasta aproximadamente un 50% del total de la masa de dichas células [35].

La estreptozotocina (STZ) es una toxina capaz de inducir la necrosis rápida e irreversible de las células beta del páncreas (Figura 3) y aunque es ampliamente utilizada para la inducción de diabetes inulino-dependiente (IDDM) por medio de dosis múltiples de éste fármaco, se ha conseguido exitosamente la producción de un nuevo modelo experimental en ratones para inducir de forma lenta y progresiva Diabetes tipo 2 (DMT-2) también conocida como diabetes no insulino-dependiente, al aplicar una pequeña y única dosis subdiabetogénica de estreptozotocina. Ésta nueva metodología ha sido empleada en distintos tipos de ratones en los que es aplicable una dosis variable; por ejemplo en ratones ICR y ddY machos ha resultado efectiva una dosis de 90-100 mg/kg de estreptozotocina y en ratones BALB/c ha funcionado con una dosis de 130 mg/kg todos con una edad de ochos semanas [36,37].



**Figura 2:** Estructura molecular de la estreptozotocina

En los ratones a los que ha sido administrada estreptozotocina, se ha observado que las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos son normales en una semana después de la administración sin embargo éstas disminuyen progresivamente. También el grado de tolerancia a la glucosa y los niveles séricos de insulina estimulada por glucosa disminuyen desde las 2 semanas en que es aplicado el fármaco. Estos resultados han permitido determinar que estos modelos inducen diabetes no dependiente de insulina al caracterizarse por una respuesta deficiente de la insulina a la estimulación con glucosa [38].

Algunos estudios demuestran la activación de mecanismos inmunológicos como respuesta a la agresión en el tejido pancreático por la estreptozotocina, donde diversas citocinas inflamatorias se ven considerablemente aumentadas en las primeras semanas después de haber realizado la inducción con el fármaco [9,27].

## **1.2 Periodontitis apical**

Durante la práctica odontológica conservadora, uno de los retos más importantes es el preservar la salud y vitalidad pulpar; sin embargo cuando no es posible conseguirlo o es inminente la necesidad de extirpar la pulpa dental los objetivos cambian y es requerido el tratamiento endodóntico, con el cual pueda conseguirse la prevención o eliminación de agentes infecciosos en el sistema de conductos. Dentro de las principales indicaciones para iniciar el tratamiento de endodoncia se incluye la existencia de periodontitis apical, sin embargo esta condición podría ser también una secuela de un procedimiento previo inadecuado [4].

La periodontitis apical se define literalmente como la “inflamación alrededor de la porción apical de la raíz de un diente”, puede incluirse en el término de “periodontitis perirradicular”, sin embargo éste último término no excluye lesiones inflamatorias que se presenten en la porción lateral radicular o en las furcas de dientes multirradiculares [39].

Los procesos infecciosos e inflamatorios de la pulpa y de los tejidos periapicales se consideran también como una complicación de la caries dental o de cualquier proceso que provoque la exposición de la pulpa, haciéndola potencialmente susceptible a la infección dada la presencia de la flora bucal. Esta exposición puede afectar directamente al tejido pulpar, sin embargo la pulpa también puede afectarse indirectamente por la presencia de una lesión previamente establecida de origen periodontal que haya iniciado a partir de una invasión bacteriana por medio del surco gingival, tal es el caso de las lesiones endoperiodontales [40]. Sin embargo aunque efectivamente la periodontitis apical es una respuesta a la infección pulpar, también puede ser una complicación por un trauma ocasionado por un golpe o fractura en el diente, por atrición durante la masticación, parafunciones o abrasión [39].

Esencialmente, la periodontitis apical debe ser considerada como una respuesta del organismo a un agente que sea capaz de activar mecanismos inflamatorios en los tejidos periapicales.

### **1.2.1 Significancia biológica y clínica de la periodontitis apical:**

- Teoría de la infección

Actualmente se han reconocido organismos con diferente virulencia como los causantes de la infección pulpar, sin ser siempre sencillo el control de la infección, particularmente cuando el tratamiento endodóntico no llega a ser tan efectivo.

Existen algunos organismos que habitan en la cavidad bucal los cuales normalmente no son considerados patógenos, sin embargo pueden tener una virulencia mayor una vez que puedan acceder a la pulpa o a los tejidos periapicales. Algunos estudios han documentado sobre algunas especies que han sido aisladas de conductos radiculares infectados, dentro de las cuales se incluyen aquellas que pertenecen a los géneros de *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* y *Lactibacillus* [41,42], sin embargo por medio de análisis molecular también ha sido posible identificar miembros de la clase *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, y *Proteobacteria* [43,44,45].

- La infección endodóntica y el estado general de salud.

Se ha reconocido que la periodontitis apical es una respuesta a la infección que debe ser contenida, controlada y eliminada para no afectar al estado general de salud del paciente que la presenta, debido a que los agentes infecciosos pueden propagarse a través de la circulación a órganos lejanos en los que sean capaces de causar daño o enfermedad [46].

Los resultados que se han obtenido de investigaciones recientes demuestran que las bacteremias que ocurren durante el tratamiento endodóntico son de una incidencia y magnitud mucho menor que incluso la mayoría de los procedimientos odontológicos de rutina, sin embargo en presencia de enfermedades como la endocarditis bacteriana es pertinente el uso de antibioticoterapia profiláctica conjuntamente al tratamiento de conductos [47].

### **1.2.2 Aspectos inmunopatológicos en el proceso inflamatorio de la periodontitis apical**

La periodontitis apical es el resultado de un encuentro dinámico entre los microorganismos presentes en el sistema de conductos y la respuesta inmune activada en los tejidos periapicales del huésped, lo que se manifiesta como un proceso en el que están implicados mecanismos inflamatorios. Una respuesta favorable por parte del sistema

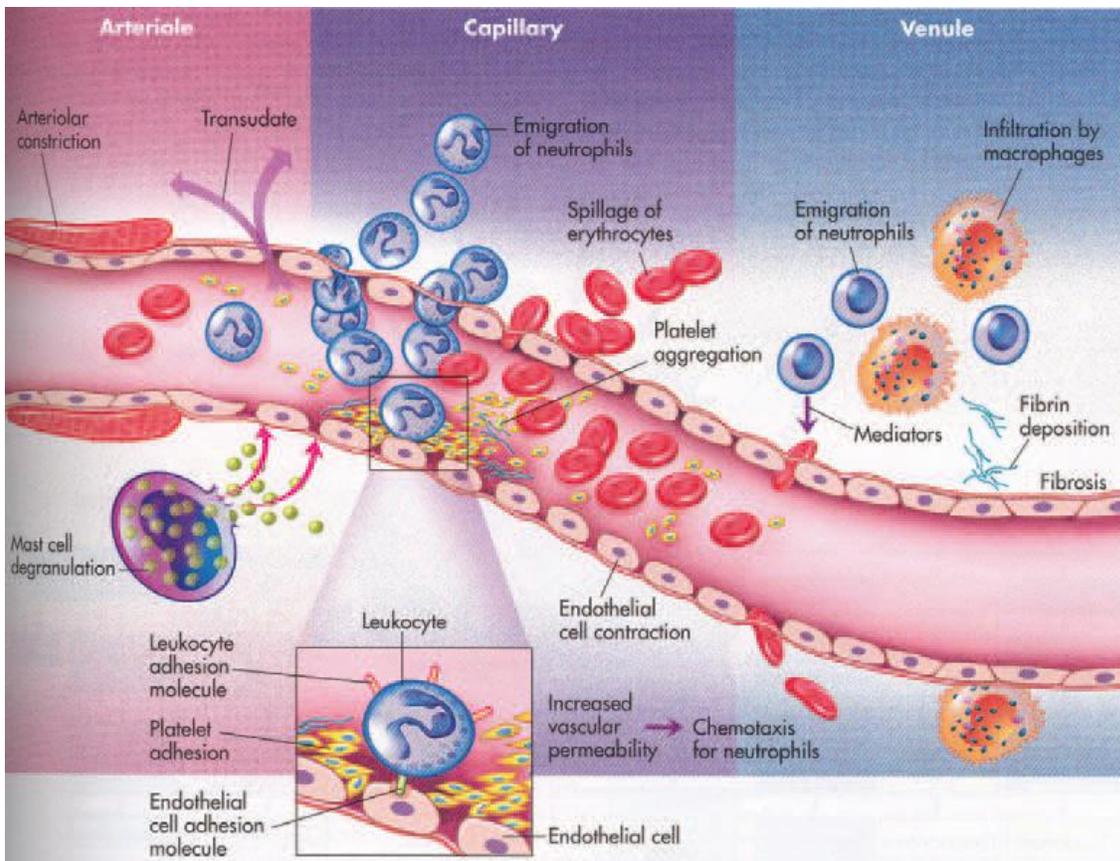
inmune previene una invasión bacteriana extrarradicular abundante, sin embargo los mecanismos involucrados no sólo se restringen en eliminar a los microorganismos o sus productos, sino también pueden destruir componentes de los tejidos normales e inducir con esto a la reabsorción ósea e incluso terminar en última instancia a provocar la pérdida irremediable del diente [48].

A diferencia del tejido pulpar, los tejidos periapicales cuentan con una amplia cantidad de células indiferenciadas que participan tanto en los mecanismos inflamatorios así como en los reparativos y un rico suministro sanguíneo y drenaje venoso; sin embargo estos elementos contribuyen en el inicio de la patología periapical, dependiendo de la severidad y duración a la exposición a agentes irritativos o infecciosos provenientes de los conductos radiculares [49].

La inflamación representa un mecanismo de defensa contra cualquier agente que cause daño en el organismo y se caracteriza por infiltración de células y la síntesis de mediadores químicos. El sistema inmune está compuesto por respuestas innatas y adaptativas, en general la acumulación de neutrófilos y macrófagos que son componentes de la inmunidad innata, se presentan al principio del proceso inflamatorio. Las células que se infiltran en sitios donde existe inflamación generalmente son denominadas células inflamatorias, y el número de estas células en el área se relaciona con el volumen o propiedades del estímulo que genera la lesión [48].

La inflamación aguda involucra reacciones inmunológicas temporales caracterizadas por una severa infiltración celular y producción de mediadores químicos los cuales provocan vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar, lo que resulta en un aumento de fluido en los tejidos extracelulares generando edema y aumento de volumen, signos típicos de la inflamación aguda (Figura 4) . Los cuatro signos principales de la inflamación aguda son, rubor, calor, tumor y dolor, los cuales fueron originalmente descritos hace 2000 años por Celcus, la pérdida de la función es una consecuencia conocida de la inflamación y descrita posteriormente como un quinto signo por Virchow [50].

Durante la inflamación crónica se hacen presentes otros tipos de células que incluyen a los linfocitos, los cuales pertenecen al tipo de inmunidad adaptativa [50].



**Figura 3.** McCance KL, Huether SE (2002). Secuencia de eventos en el proceso inflamatorio. Durante una agresión existen células en el tejido conectivo (mastocitos) capaces de secretar Histamina, la cual provoca constricción de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos lo que aumenta la permeabilidad vascular y una dilatación de las células en vénulas post-capilares; esto da lugar a una presión elevada en la microcirculación que provoca salida de plasma, células sanguíneas y plaquetas alrededor de los tejidos agredidos. Conforme existe la salida de plasma al tejido conectivo, el resto de la sangre circula más lentamente dentro del vaso sanguíneo y se vuelve más viscosa permitiendo la adhesión de leucocitos a las paredes vasculares [51].

**INMUNIDAD INNATA:** Este tipo de inmunidad también es conocida como inmunidad no adaptativa, la cual no requiere del contacto previo con el agente infectante y no se modifica tras la exposición repetida a un determinado agente infeccioso [52,53]. Los determinantes de la inmunidad innata incluyen factores genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales [53]. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra patógenos, además contra daños químicos, físicos y fisiológicos, varias reacciones se encargan de reparar el daño o aislarlo y mantener la homeostasis [53]. Sus principales componentes son barreras físicas y químicas, como los epitelios y sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales; células fagocíticas (neutrófilos,

macrófagos, células dendríticas) y linfocitos citolíticos naturales o Natural Killer (NK); proteínas de la sangre, que incluyen componentes del sistema de complemento y otros mediadores químicos como citocinas y quimiocinas [55].

-Elementos celulares: Durante la primera etapa del proceso inflamatorio se presenta infiltración de células fagocíticas como los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, entre otras; estas células reconocen a los microorganismos, los fagocitan y los destruyen. Estos leucocitos son los mediadores de respuestas inmunitarias innatas donde su misión es formar la primera línea de defensa ante la infección [53].

*Neutrófilos:* Generalmente son las primeras células en infiltrarse en la zona de lesión al ser las más abundantes en la sangre, sin embargo no se muestran en los tejidos sanos. Su promedio de vida es corto y regularmente mueren pocas horas después de haber sido sintetizados en la médula ósea. Se caracterizan por tener una gran movilidad y capacidad fagocítica con la que pueden destruir diferentes microorganismos o sus productos para convertirlos en pequeños péptidos por medio de distintas enzimas lisosomales [53].

La molécula C5a y los lipopolisacáridos (LPS) son quimiotácticos muy potentes para los neutrófilos, pero existen otras proteínas llamadas citocinas que pueden provocar este mismo efecto en los neutrófilos, en las que se incluye a la interleucina- 8 (IL-8) [52].

La biología de los neutrófilos y su papel en la inflamación han sido bien documentados, resultando la interacción de éstas células con los microorganismos de particular importancia en la progresión de la periodontitis, tanto en el margen de la encía como en los tejidos perirradiculares. A pesar de que los neutrófilos son células esencialmente protectoras o de defensa, si pueden causar graves daños a los tejidos del hospedero, debido a que sus gránulos citoplasmáticos contienen varias enzimas que al liberarse son capaces de degradar los elementos estructurales de los tejidos sanos. Dado a que su vida media es tan corta, comúnmente mueren un gran número de éste tipo de células en los mecanismos inflamatorios de tipo agudo, por lo que su acumulación en los tejidos es una causa importante para el desarrollo de la periodontitis apical en su fase aguda [54].

*Macrófagos:* La infiltración de macrófagos en la zona de lesión es relativamente lenta en comparación con los neutrófilos, sin embargo tienen una gran capacidad fagocítica ante casi cualquier tipo de agente extraño y su presencia es más prolongada en el sitio de lesión. Los macrófagos derivan a partir de los monocitos que se encuentran en la sangre y se desplazan a sitios específicos. Contienen en su superficie receptores para manosa capaces de reconocer glucoproteínas de la superficie de los microorganismos, lo que les permite iniciar el proceso fagocítico. Estas células presentan antígenos a los linfocitos T

eficazmente, aunque las células que desempeñan con mucha mayor eficacia la presentación de antígenos a las células T en reposo, son las células dendríticas [50].

Los macrófagos son una fuente importante de mediadores químicos como la interleucina 1 (IL)1, factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$  y el interferón (IFN)  $\gamma$ , que juegan un rol importante en la activación o maduración de células ubicadas alrededor del sitio inflamado [55].

*Células dendríticas:* Estas células aunque tienen una menor capacidad fagocítica, son consideradas como presentadoras de antígenos por excelencia, esenciales para la activación de las células T [53].

- Mediadores químicos: En las respuestas inmunitarias intervienen moléculas de naturaleza muy diversa, entre ellas se encuentran los anticuerpos y las citocinas, que producen los linfocitos, así como muchas otras moléculas que se puedan detectar normalmente en el suero.

*Citocinas:* Son proteínas solubles de bajo peso molecular producidas principalmente por las células que participan en las respuestas inmunológicas. Han sido clasificadas en diversos grupos como por ejemplo: proinflamatorias, Th1, Th2, Th17, Tregs, etc. [55].

*Quimiocinas:* Constituyen un grupo de moléculas de pequeño tamaño, promotoras y reguladoras de inflamación, capaces de atraer a diversos tipos de leucocitos a los sitios de inflamación (citocinas quimiotácticas), incluyendo células T, monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Son producidos por muchas células linfoides y no linfoides en los que se incluyen además de las mencionadas a las células dendríticas, las células cebadas, las NK (Natural Killer), las endoteliales, los fibroblastos, las del epitelio intestinal y respiratorio [53].

*Metabolitos del ácido araquidónico:* El ácido araquidónico es un ácido graso polinsaturado de 20 carbonos y con cuatro dobles enlaces, y se encuentra presente en las membranas celulares. Los metabolitos del ácido araquidónico son conocidos como eicosanoides, dentro de los cuales se incluyen a las prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina y leucotrienos. Estos metabolitos son sintetizados por dos clases de enzimas importantes: la ciclooxigenasa (cox) para la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos y la lipoxigenasa para los leucotrienos y lipoxinas [52].

Las prostaglandinas (PGs) fueron identificadas por primera vez en el semen humano, originalmente se creía que se formaban en la próstata (de ahí su nomenclatura). Se forman al metabolizarse el ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxigenasa. Las PGs más importantes relacionadas con la inflamación son: PGE2, PGD2, PGF2 $\alpha$ , PG12.

La PGE2 regula la vasodilatación y el estímulo doloroso aunque también se le ha relacionado con la activación de células osteoclásticas. Gran parte de la rápida pérdida de hueso en la periodontitis marginal y apical sucede durante los episodios de inflamación aguda cuando las lesiones presentan un gran número de neutrófilos, los cuales son una fuente importante de la PGE2, los altos niveles de esta prostaglandina se ha demostrado que están presentes en las lesiones agudas de la periodontitis apical [56].

*Neuropéptidos:* Son sustancias que son producidas en y por las células que conforman al sistema nervioso y su función es el de participar como neurotransmisores o mediadores químicos. La Sustancia P forma parte de la familia de neuropéptidos de las taquicininas, relacionada con desordenes emocionales, ansiedad estrés, y dolor en el sistema nervioso central, así como también con el dolor, modulación vascular y reacciones inmunológicas en tejidos específicos [53].

*Cininas:* Son péptidos compuestos de nueve a once aminoácidos, un ejemplo de éstas es la Bradicinina, la cual es un potente vasodilatador que se encarga de regular la permeabilidad vascular al igual que la sensación dolorosa [53].

**INMUNIDAD ADAPTATIVA:** Las reacciones inmunológicas iniciales son mediadas por la inmunidad innata, en donde los neutrófilos y macrófagos juegan un papel relevante. Sin embargo, cuando el estímulo nocivo persiste rebasando las capacidades de la inmunidad innata, las respuestas de la inmunidad adaptativa comienzan. Esta respuesta no es inmediata, requiere de algunos días para manifestarse e incluye la producción de anticuerpos y de linfocitos en un particular estado de activación que pueden ser descritos como “linfocitos sensibilizados”, las células y los anticuerpos resultantes tienen la propiedad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor de su producción [53].

La intensidad de las respuestas adaptativas aumenta conforme se incrementa el número de exposiciones al mismo agente patógeno: el sistema inmunitario adaptativo “recuerda” al agente infeccioso, siendo capaz de impedir que provoque enfermedad, por ejemplo en el caso de las enfermedades como el sarampión o la difteria, se producen respuestas adaptativas que inducen inmunidad frente a la enfermedad y persiste durante el resto de la vida del individuo [52].

Las características de la inmunidad adquirida o adaptativa son: especificidad para moléculas diversas, especialización que las capacita para responder de forma singular a diferentes microorganismos y su capacidad para recordar y responder con mayor fuerza tras exposiciones repetidas al mismo organismo [55].

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales reconocidos como: respuesta inmune humoral, donde los linfocitos B juegan un rol importante y una respuesta celular, donde los linfocitos T son las células protagonistas [52].

### Células T

Las células T han sido clasificadas en dos categorías dependiendo de los receptores presentes en su superficie (TCRs), los cuáles son de tipo  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , aunque las funciones de los TCR $\gamma\delta$  son todavía inciertos, se les ha relacionado con sistemas de defensa no específicos contra estímulos exógenos. Las células que expresan en su superficie TCR $\alpha\beta$  son clasificadas en células T helper CD4<sup>+</sup> (Th) que se activan cuando las células presentadoras de antígeno les presentan péptidos de parásitos y bacterias extracelulares y en células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (Tc), que se activan cuando las células presentadoras de antígeno les presentan péptidos principalmente de parásitos intracelulares, como los virus que se encuentran en el citosol [55].

Las células CD4<sup>+</sup> se clasifican en células Th1 y en Th2. Las células Th1 producen IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-12 y participa en la inmunidad celular, mientras que las Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 las cuales promueven la síntesis de anticuerpos por parte de las células B participando así con la inmunidad de tipo humoral [55].

Las células CD8<sup>+</sup> son conocidas como células T citotóxicas, tienen las funciones de destruir antígenos específicos y producir citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  las cuales tienen efectos citotóxicos cuando son secretadas cerca de células que se planean destruir [53].

En cualquier tipo de clasificación cuando las células T se activan pueden ejercer sus actividades programadas: proliferación, producción de citocinas, cooperación, citotoxicidad o la regulación (supresión) de otras respuestas inmunitarias [52].

### Células B

Éstas células son producidas en la médula ósea, cada célula B está programada genéticamente para codificar un receptor de superficie específico de un antígeno determinado, una vez que una célula B reconoce a su antígeno se multiplica y se diferencia, dando lugar a células plasmáticas capaces de producir anticuerpos [53].

Los receptores para antígeno de los linfocitos B (BCR), son moléculas preformadas de anticuerpo de la clase IgM. La interacción de los receptores con el antígeno nativo es directa y no parecen participar otras moléculas; sin embargo cada receptor se encuentra asociado a dos proteínas diméricas, llamadas Ig alfa-beta (Ig  $\alpha\beta$ ) e Ig gamma-gamma (Ig  $\gamma\gamma$ ). Éstas proteínas transmembranales y otras moléculas accesorias solubles y estructurales, permiten la transmisión de señales al interior de la célula B así como su activación para la producción de anticuerpos, sin embargo la activación productiva de las células B requiere de la ayuda de las células Th, ésta ayuda es mediada por citocinas y por la estimulación derivada de la interacción entre moléculas coestimuladoras de ambos tipos de células [53].

A través de sus receptores, los linfocitos B son capaces de interactuar con antígenos solubles, de pinocitarlos, de procesarlos y de presentarlos a las células T, es decir, las células B también funcionan como células procesadoras y presentadoras de antígeno [52].

### **1.2.3 Etiología de la periodontitis apical**

Invasión bacteriana: Una de las principales causas de la patología periapical involucra a la invasión de microorganismos provenientes de los conductos radiculares del diente afectado, los cuales son capaces de inducir a mecanismos inflamatorios en el periápice incluyendo destrucción del hueso alveolar (Figura 4).

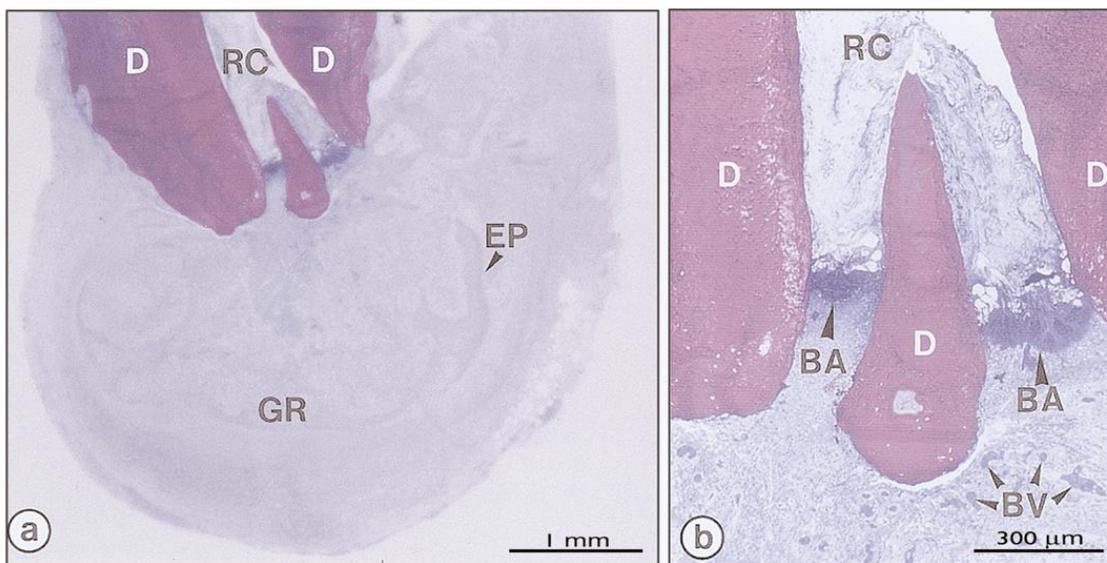
Los microorganismos que se han relacionado con el inicio de periodontitis apical son *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus Clostridium*, *Candida*, *Actinomyces* y en los últimos años se ha asociado el *Enterococcus faecalis* con la presencia de lesiones periapicales persistentes [40, 56, 57].

Otros: Se ha relacionado la presencia de periodontitis apical con la presencia de materiales empleados en la obturación del sistema de conductos, sin embargo no existen datos significativos que reflejen que este tipo de materiales sean capaces de inducir lesiones muy severas in vivo. También ha sido documentada la posibilidad de inflamación residual posterior al tratamiento endodóntico, lo que puede reflejar la persistencia de infección en la porción apical del diente debido a un sistema complejo de conductos, la neoformación de biofilm o infección extrarradicular, incluso también la presencia de agentes infecciosos en los túbulos dentinarios puede ser un factor que provoque la presencia de la lesión periapical [57].

Durante el tratamiento endodóntico debe ser realizado un perfecto protocolo de instrumentación e irrigación, de tal manera que se consiga eliminar la mayor cantidad de

microorganismos del interior de los conductos, sin embargo un paso clave del éxito en el tratamiento es la obturación, debido a que si no se consigue con ella un perfecto sellado de la porción apical o coronal del o los conductos lleva a la filtración de microorganismos [57].

También ha sido documentada la posibilidad de una susceptibilidad a la persistencia de periodontitis apical evaluando el polimorfismo del gen alelo 2 de la IL-1 $\beta$  el cual se ha asociado con un aumento en los mecanismos inflamatorios presentes en la periodontitis apical al favorecer el incremento de hasta cuatro veces más de la producción de IL-1 $\beta$  en zonas con lesión periapical [58].



**Figura 4:** Tomado de Nair (2004). Presencia de biofilm en el foramen apical de un diente afectado con periodontitis apical (GR). El delta apical de la imagen (a) se amplifica en la imagen (b) donde se puede observar la ubicación de las bacterias (BA) en los forámenes apicales, la masa bacteriana parece ser frenada por un muro de granulocitos neutrofílicos (NG). Aumentos a) 20x, (b) 65x [59].

#### 1.2.4 Clasificación de la periodontitis apical

Las lesiones periapicales han sido clasificadas de acuerdo a sus consideraciones clínicas e histológicas, la clasificación de las lesiones correlaciona la sintomatología clínica, la duración así como las características histológicas.

La periodontitis apical suele ser clasificada convenientemente en dos tipos: periodontitis apical aguda la cual se asocia con lesiones de corto tiempo de evolución y con

sintomatología dolorosa y en periodontitis apical crónica la cual por su parte se caracteriza por lesiones de un tiempo de evolución más prolongado y por lo regular no refleja sintomatología dolorosa [49, 60] .

a) La periodontitis apical de tipo agudo, puede ser descrita también como una periodontitis apical sintomática en la que se refleja la primera fase de lesión en los tejidos periapicales derivada de un proceso patológico de la pulpa dental que incluye: mediadores inflamatorios resultantes de un tejido pulpar irreversiblemente inflamado, productos bacterianos presentes en el proceso de necrosis pulpar, agentes irritantes que pueden incluir sustancias de irrigación o la extrusión de materiales de obturación y también de alteraciones relacionadas al trauma oclusal [49] .

Clínicamente puede reflejar una sensación dolorosa moderada hasta severa e intensa localizada y que en ocasiones llega a ser pulsátil. El paciente percibe una ligera extravasación del diente, por lo que se muestra sensible a la oclusión (lo que dificulta la masticación e incluso la fonación). Las pruebas de sensibilidad resultan ser positivas al frío, al calor y a la prueba eléctrica, así como también hay respuesta positiva ante la percusión tanto horizontal como vertical. En los casos de existir necrosis pulpar asociada a la lesión periapical aguda, no hay respuesta a las pruebas térmicas ni eléctricas. Radiográficamente puede observarse un evidente ensanchamiento del espacio del ligamento periodontal, aunque en la mayoría de las veces se suele observar un espacio del ligamento periodontal normal y una lámina dura intacta [61,62,63].

En la periodontitis apical de tipo agudo se presentan zonas definidas de infiltrado de neutrófilos, y se le puede considerar primaria cuando el proceso inflamatorio es de corta duración y se inicia en un periodonto sano como respuesta a varios agentes irritantes o infecciosos, sin embargo se puede considerar secundaria cuando la respuesta aguda ocurre en una lesión de periodontitis apical preexistente (reactivación apical, exacerbación, absceso fénix) [63].

b) Cuando el proceso inflamatorio agudo persiste y en conjunto disminuye la virulencia de los agentes irritantes, se produce un cuadro inflamatorio crónico no supurativo entorno al diente a lo cual se le clasifica como: Periodontitis apical crónica, que se caracteriza por neoformación y proliferación vascular, presencia de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y fibroblastos, en ocasiones pueden encontrarse también células espumosas con cristales de colesterol y destrucción del hueso alveolar la cual puede ser radiográficamente observable como una zona radiolúcida alrededor del ápice [64] .

Clásicamente se han descrito en los procesos inflamatorios periapicales crónicos, cuatro zonas concéntricas alrededor del foco inflamatorio, conocidas como áreas de Fish, que muestran las siguientes características [65]:

- 1.- Zona de infección y necrosis: Corresponde al extremo más apical del conducto radicular y a la zona del muñón apical más próxima al conducto, donde se localizan gérmenes, endotoxinas, antígenos, factores quimiotácticos etc.
- 2.- Zona de contaminación: Alrededor de la anterior, se caracteriza por estar libre de microorganismos, una destrucción hística, infiltrado inflamatorio compuesto de neutrófilos y macrófagos
- 3.- Zona de irritación: Existe un tejido de granulación evidente, con capilares neoformados, linfocitos, “macrófagos espumosos” y fibroblastos
- 4.- Zona de estimulación o regeneración: Es la zona más periférica y muestra una intensa actividad fibroblástica.

Entre las lesiones que son incluidas en la periodontitis apical de tipo crónica se incluyen: granuloma apical, absceso dentoalveolar crónico, quiste apical, osteítis periapical [40,60].

### **1.2.5 Fisiopatología de la Periodontitis apical aguda**

La irritación periapical puede inducir la activación de respuestas inflamatorias no específicas, así como reacciones inmunológicas específicas. Estas reacciones están mediadas por productos plasmáticos o celulares relacionados con los sitios de lesión [66].

La destrucción rápida inicial de hueso en la zona apical de la raíz se ha asociado con la producción de prostaglandinas, en especial, la PGE2, a través de la vía de la ciclooxygenasa [56].

El inicio de la periodontitis apical se ha asociado a la presencia de diversas citocinas, dentro de las cuales se incluyen a: IL-1, -3, -6, -8 y -10 y el TNF considerando a éstas, como las que se producen en mayor proporción en las zonas de reabsorción ósea, por lo que parecen ser de particular importancia en el desarrollo de las lesiones apicales [66, 67].

Del mismo modo, se sabe que una cantidad elevada de factores osteolíticos como RANKL y catepsina K, dan como resultado una mayor resorción ósea apical. El balance existente entre RANKL y osteoprotegerina (OPG), es un factor importante en la regulación de la

resorción ósea en las lesiones periapicales. La diferenciación y activación de las células osteoclásticas están reguladas por la interacción de RANK (receptor activador del factor nuclear kappa B) con su ligando RANKL; mientras que la osteoprotegerina (OPG) es un receptor para RANKL que inhibe la participación de la correlación RANK-RANKL (inhibe la resorción). En condiciones homeostáticas los niveles de RANKL y OPG se encuentran en equilibrio de tal manera que ocurren adecuadamente los mecanismos de osteogénesis y resorción ósea (en el proceso de remodelado óseo). Ante la presencia de un estímulo que genere inflamación, se aumenta la proporción del RANKL con respecto a los niveles de OPG, conduciendo a la estimulación y activación de los osteoclastos provocando la reabsorción ósea patológica. Ésta correlación entre los niveles de RANKL/OPG puede ser indicativo de una lesión en expansión con la resorción ósea activa o una lesión estable con un mínimo de resorción [68].

La IL-1  $\alpha$  y  $\beta$  son producidas por una variedad de células como son los macrófagos, células B, osteoclastos, células porlimorfonucleares y fibroblastos; sin embargo las fuentes más importantes de estas citocinas son los monocitos/macrófagos en los sitios de inflamación [69,70].

Existen algunos estudios que demuestran que durante la fase aguda (una semana), tanto la IL-1  $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  son observadas adyacentes a las células osteoclásticas, las cuales se caracterizan por presentar un citoplasma francamente amplio, por ello las lesiones periapicales tienden a expandirse; sin embargo en esta misma fase existe el doble de células que expresan IL-1 $\beta$  que aquellas que expresan a la IL-1 $\alpha$ . Por otra parte, durante la fase crónica (mínimo cuatro semanas de evolución) la cantidad de IL-1  $\beta$  disminuye, reduciéndose también el grado de lesión periapical [71,72].

Sin embargo, la IL-1  $\beta$  es considerada como un mediador más potente; sus efectos a nivel local incluyen el aumento de la adherencia leucocitaria a las paredes endoteliales, estimulación de linfocitos, potencialización de los neutrófilos, la activación de prostaglandinas y enzimas proteolíticas, activa las células osteoclásticas induciendo el proceso de resorción ósea al inhibir la remodelación y formación del tejido óseo, por todo esto, éste mediador representa un factor importante en la patogénesis de las lesiones periapicales [73].

Algunas investigaciones demuestran que ante una repercusión sistémica que altere la respuesta inmunológica, determinaría una función inapropiada de las células encargadas de activar a las células T, las cuales son consideradas como las encargadas de activar a su vez, a las células capaces de producir citocinas pro-inflamatorias dentro de las cuales se

considera a la IL-1 $\beta$ , de tal forma que la concentración de IL-1 $\beta$  en zonas de inflamación puede verse disminuida en comparación a sitios de inflamación donde no influya una disfunción inmune [74,75].

Ha sido comprobado que algunas citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y RANKL tienen un rol importante en el proceso de destrucción del tejido óseo periapical [76]. IL-12 en conjunto con IL-18 son capaces de inducir la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK [77]. IFN- $\gamma$  es un mediador clave en la activación de macrófagos que regulan la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$ , las cuales son citocinas responsables de provocar daño en el tejido periapical [78].

**CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA PERIODONTITIS APICAL AGUDA:** Una vez que agentes irritantes (mediadores de la inflamación, factores quimiotácticos, el sistema de complemento, algunos derivados del ácido araquidónico y ciertas enzimas hidrolíticas como colganasa y catepsina) alcanzan el periápice, se producen cambios en los tejidos: vasodilatación (provoca hiperemia, edema y aumento de la permeabilidad capilar) y extravasación de neutrófilos, constituyendo una inflamación aguda no supurativa. La extravasación de fibrinógeno condiciona la formación de una red de fibrina que intente detener el proceso. El aumento de la presión local, produce un dolor localizado por compresión de los haces de fibras nerviosas, que puede ser variable, dependiendo del grado de extensión, rapidez en la evolución del proceso y otros factores [75].

Si los agentes irritantes persisten, se produce una inflamación aguda supurativa, con un incremento en el número de neutrófilos, provocando la formación rápida de material purulento en un corto periodo de tiempo, lo que aumentaría la presión intersticial en el periápice, provocando un cuadro clínico doloroso grave [61].

Presenta un infiltrado inflamatorio en el ligamento periodontal apical (con un alto contenido de polimorfonucleares y macrófagos), vasodilatación, hiperemia y una acumulación de exudado seroso que provoca la distensión del periodonto provocando una ligera extrusión del diente afectado, finalmente se inicia el proceso de *lisis ósea*, como resultado de la liberación de enzimas lisosómicas como la colagenasa [61].

### **1.2.6 Modelos animales y la periodontitis apical**

Los modelos animales permiten probar hipótesis específicas que puedan ser consideradas como aplicables en estudios clínicos. Con los que respecta a la patogénesis de las lesiones periapicales, puede ser analizada en relación a la concentración y tipos de sustancias o elementos irritantes presentes en el tejido periapical capaces de provocar mecanismos que puedan ser estudiados radiográficamente, histológicamente e histomorfométricamente o por medio de la cuantificación de los mediadores inflamatorios específicos expresados [79,80].

Aunque son varios los factores etiológicos considerados en la patogénesis de las lesiones periapicales, la invasión bacteriana ha sido identificada como un elemento determinante en la inducción de respuestas inmunológicas asociadas con la lisis ósea presente en las lesiones de tejidos periapicales [59].

En los modelos animales han sido empleadas distintas metodologías que se valen de la colonización y crecimiento microbiano en los conductos radiculares para la inducción de lesiones periapicales. Algunos estudios han conseguido este objetivo por medio de la inoculación de bacterias asociadas con infecciones endodónticas en humanos [80,81], mientras que en otros se ha contemplado la idea descrita desde 1965 por Kakehashi en donde se confirma la capacidad de las bacterias del medio bucal para infectar los conductos radiculares de pulpas dentales expuestas generando como complicación lesiones en el tejido periapical [81].

### **1.3 Lesiones periapicales y su relación con Diabetes**

Los pacientes diabéticos son susceptibles a presentar infecciones con una evolución mucho más complicada que aquellos individuos que no son diabéticos [83]. Una de las posibles causas que favorecen a la prevalencia y aparición frecuente de infecciones es la respuesta inmune defectuosa estudiada como complicación de la diabetes. Hasta la fecha ha sido descrita la inmunidad celular alterada en pacientes diabéticos, donde se ven afectados mecanismos quimiotácticos, de fagocitosis y disminución en la producción de algunos productos celulares o citocinas. [84,85]. Otras razones que pueden conducir a la mayor prevalencia de infecciones en los pacientes diabéticos son que hay microorganismos que suelen ser más virulentos en un entorno de hiperglucemia, y existe un aumento en la adherencia de los microorganismos a las células diabéticas. Por otro lado, en la diabetes también se encuentran disminuidos los procesos anabólicos de las proteínas dando como consecuencia una síntesis menor de inmunoglobulinas [10].

Se ha podido comprobar que un control adecuado de la hiperglucemia suele mejorar las condiciones metabólicas y las funciones de las células que participan en los mecanismos de defensa de personas diabéticas [26].

En Odontología se ha relacionado a la diabetes con una mayor incidencia de lesiones cariosas, enfermedad periodontal generalizada y alteraciones en los tejidos periapicales en individuos que la padecen.

Las lesiones periapicales se presentan por el efecto que causan algunos agentes irritantes en el periápice dentro de los cuales se incluyen a los microorganismos y/o sus productos provenientes del sistema de conductos radicular con pulpa necrótica, siendo hasta el momento el tratamiento endodóntico el procedimiento más adecuado para el control y manejo de estas lesiones [86]. Sin embargo, la diabetes puede ser un factor que llegue a afectar la respuesta inmune en los tejidos que conforman al periápice, causando un retraso en la reparación y cicatrización que provoca una mayor prevalencia de las lesiones y una mayor tasa de la enfermedad periapical después del tratamiento en pacientes diabéticos [87].

Algunos estudios han confirmado clínicamente la relación entre la diabetes y sus efectos en la evolución de la periodontitis apical; existen revisiones que analizan la progresión y los procesos de reparación de lesiones periapicales, así como el resultado del tratamiento endodóntico en pacientes diabéticos, de las cuales es posible concluir que existe mayor incidencia y prevalencia de lesiones en pacientes diabéticos así como también una probabilidad más alta en que éstos presenten mayor sintomatología pre y transoperatoria principalmente cuando existen antecedentes de presencia de enfermedad periapical. Otros datos han demostrado que la reparación de lesiones tratadas de forma quirúrgica tiene un resultado menos exitoso y por lo general suelen observarse signos de recuperación de los tejidos periapicales afectados hasta después de dos años o más en pacientes con antecedentes de diabetes. [9]

Existen algunos datos que han permitido demostrar la relación que existe entre niveles elevados de glucosa en sangre con formas agresivas de la enfermedad periodontal [88, 89], así como también la asociación que hay entre ambas enfermedades, es decir entre la enfermedad periodontal y la diabetes, de tal forma que una condición severa de una puede agravar la de la otra [90].

Por todo esto existen razones para creer que cuando no hay un manejo médico, farmacológico o dietético adecuado para el control de la diabetes, ésta puede provocar repercusiones en los mecanismos inmunes de los tejidos periapicales. En un estudio clínico se realizó un análisis radiográfico para evaluar la prevalencia de lesiones

periapicales en dientes con tratamiento endodóntico no quirúrgico previo en pacientes diabéticos (incluyendo individuos con diabetes tipo 1 y 2) y en personas sanas, del cual se obtuvieron resultados que reflejaron que la presencia de diabetes es determinante para favorecer a la permanencia de lesiones periapicales y retraso en la cicatrización de los tejidos dañados, lo cual fue más evidente en hombres diabéticos que en mujeres, suponiendo que esto podía relacionarse con el hecho de que la mujeres demostraron tener un mejor control y tratamiento de su enfermedad [91]. Así mismo se ha demostrado una mayor incidencia de periodontitis apical en pacientes diabéticos que en pacientes sanos, al evaluar radiográficamente que al menos en un diente se presentaba lesión apical en el 81.3% de los pacientes con diabetes, mientras que al menos un diente con enfermedad periapical se presentaba en el 58% de los pacientes sanos [92].

Otro estudio también demuestra la presencia de signos radiográficos de reparación en lesiones periapicales en dientes que fueron tratados endodónticamente, sin embargo en esta investigación se considero como variable el control glucémico, de tal forma que fueron observados 12 pacientes con niveles de glucemia bajos ( de 70 a 80 mg/dL) y 13 pacientes con un nivel de glucemia mayor (90 a 110 mg/dL), en los cuales después de 30 días después de haber sido efectuado el tratamiento de conductos fue posible observar una disminución de la lesión en el 74% de los individuos con niveles bajos de glucosa , mientras que sólo se consiguió una reducción de la lesión en un 48% de las personas con hiperglucemia [93].

Varios modelos animales se han desarrollado para estudiar la relación entre la diabetes y las lesiones periapicales. Uno de éstos estudios fue realizado con ratas Wistar, donde en un grupo fue inducida la diabetes con STZ (50mg/ml) disuelta en citrato con un pH de 4.5 y en otro a las que solo se les administró citrato con un pH de 4.5, las lesiones periapicales fueron provocadas al dejar expuesto el tejido pulpar de molares inferiores al medio bucal. Los resultados mostraron la presencia de un proceso inflamatorio mayor en la región apical, una reabsorción radicular y resorción ósea alrededor de los dientes afectados y lesiones histopométricamente más grandes en las ratas a las que se les administró STZ que en aquellas a las que no les fue administrada la STZ [81].

Algunos estudios han revisado el inicio y evolución de lesiones en los tejidos periapicales en modelos de animales diabéticos, en algunos se realiza una exposición a soluciones ricas en sacarosa para generar el desarrollo de lesiones cariosas que impacten desfavorablemente en el ápice radicular provocando periodontitis apical severa, la cual puede ir acompañada de gingivitis que puede ser resultante de la misma lesión apical, uno de éstos estudios fue realizado con ratas GK (con la presencia espontánea de diabetes no insulino dependiente) y con ratas Wistar sanas como control. La metodología constó en

dar a un grupo de ratas diabéticas y sanas una solución con sacarosa y a otro grupo únicamente agua, provocando también en cada una de ellas lesiones periapicales al realizar la exposición pulpar al medio bucal. En esta investigación se observó que las lesiones eran mayores en aquellas ratas a las que se les dio la solución azucarada, sin embargo eran aún más severas en las ratas diabéticas que en las ratas control. Valoraciones histopométricas hicieron posible comprobar que las lesiones periapicales son significativamente más extensas y más graves en ratas diabéticas que han sido expuestas a una dieta ricas en carbohidratos [94].

La diabetes tipo 2 favorece al desarrollo acelerado de lesiones cariosas que cuando no son tratadas pueden inducir alteraciones pulpares y periapicales, esto pudo comprobarse al inducir lesiones cariosas capaces de provocar consecuentemente daño periapical en ratones diabéticos db/db y no diabéticos db+/. La incidencia y severidad de las lesiones cariosas fueron significativamente mayores en los ratones diabéticos db/db que en los no diabéticos db+/. Cuando éstas lesiones llegaban a dañar los tejidos pulpares y periapicales en los ratones diabéticos se observan distintas características dependiendo el grado de lesión observado en el periápice; cuando la lesión era categorizada como leve, existía infiltrado de un número pequeño de neutrófilos en la zona perivascular cerca del ápice radicular así como también coincidían éstos resultados en presencia de pulpitis y necrosis pulpar central. En lesiones graves, se observó la formación de abscesos cerca del ápice de la raíz con una cantidad considerable de infiltrado de neutrófilos. La periodontitis apical severa se acompañaba frecuentemente de restos pulpares necróticos y resulto en la presencia de edema en los tejidos periapicales y afecciones en el hueso alveolar adyacente donde normalmente la resorción ósea era evidente. La incidencia y severidad de las lesiones fueron significativamente mayores en los ratones diabéticos que en los ratones no diabéticos, éstos últimos en raras ocasiones presentaban periodontitis apical [95].

Varios factores son los que están involucrados para que las lesiones en animales diabéticos sean más graves que en animales sanos. Una de las razones puede estar relacionada con el deterioro de la función leucocitaria, en algunos estudios se ha determinado que la susceptibilidad a infecciones provocada por la diabetes se debe a una mala respuesta por parte de las células del sistema inmune, demostrando que la contabilización de leucocitos puede ser significativamente menor en ratas diabéticas que en aquellas que son sanas, por lo que se piensa que los animales diabéticos pudieron haber tenido un número insuficiente de leucocitos para poder defenderse de la continua agresión ocasionada por las bacterias presentes en el sistema de conductos radiculares, lo que resulta en la presencia de lesiones periapicales más graves [94].

Cuando las células  $\beta$  del páncreas han sido dañadas, la secreción de insulina se ve alterada principalmente después de suministrar una carga importante de glucosa generando un estado hiperglucémico capaz de exacerbar los efectos presentes en la diabetes, esto sugiere que en modelos animales donde se suministra constantemente una solución de sacarosa puede generar una secreción deficiente de insulina agravando la condición diabética, y si han sido inducidas lesiones periapicales, éstas pueden ser mucho más severas [94].

Otra explicación que se puede dar a que algunos animales diabéticos en modelos experimentales desarrollen lesiones periapicales más severas es, que en el caso de los seres humanos, existe una alteración en la regulación metabólica del calcio sérico y lo mismo parece ocurrir en los modelos de ratas o ratones experimentales con diabetes no insulino dependiente, en la cual una deficiencia de la secreción de insulina puede relacionarse con un balance negativo del calcio en el cuerpo lo que conduce a una remodelación ósea reducida, éste desequilibrio y reducido recambio óseo, puede ser también en parte una razón por la cual las lesiones periapicales son más extensas en animales con diabetes [96,97].

En la actualidad se cuenta con un número limitado de investigaciones que estudian la relación existente entre la diabetes y una mayor prevalencia de la patología periapical con lesiones más graves, que reflejen resultados menos favorables del tratamiento endodóntico; sin embargo los datos reportados hasta la fecha permiten saber que la diabetes y un pobre control de la glucemia pueden ser factores importantes de riesgo para desarrollar lesiones periapicales más severas y con un proceso reparativo más complejo y prolongado.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe un incremento mundial en el número de personas que padecen enfermedades crónico-degenerativas como lo es la diabetes. La diabetes puede ocasionar múltiples alteraciones en los pacientes que la padecen, como por ejemplo: disfunciones inmunológicas que se traducen en una disminución en la estimulación para la producción de citocinas, en la adherencia leucocitaria, quimiotaxis y fagocitosis, o por el aumento de la adherencia de microorganismos a células diabéticas, lo que convierte al paciente diabético en una persona altamente susceptible a infecciones.

En Odontología se ha relacionado a la diabetes con una mayor incidencia de lesiones cariosas, periodontitis generalizada y alteraciones en los tejidos periapicales en individuos que la padecen, incluso se ha sugerido que cuando no existe un adecuado control de la diabetes puede provocar una mayor prevalencia de lesiones en los tejidos periapicales que comprometan el resultado eficaz del tratamiento endodóntico. Es por esto que se vuelve cada vez más necesario estudiar los efectos de éste padecimiento, por medio de modelos experimentales.

En este trabajo de tesis se estudio la influencia de un estado hiperglucémico inducido con una dosis única de STZ en ratones BALB/c, que refleja signos clínicos similares a los que se presentan en la DMT-2, en la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  y su efecto en los mecanismos inflamatorios presentes en lesiones periapicales.

## 3. HIPÓTESIS

Dada la repercusión inflamatoria que provoca la inducción de un estado hiperglucémico por medio de la administración de una dosis de STZ, la cual suele manifestarse con la presencia de respuestas inmunológicas que aumentan la síntesis de algunas citocinas como por ejemplo la IL-1 $\beta$  en las primeras semanas de inducción:

El daño inflamatorio asociado a la producción incrementada de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en lesiones periapicales agudas será mayor en ratones con diabetes que en ratones sanos.

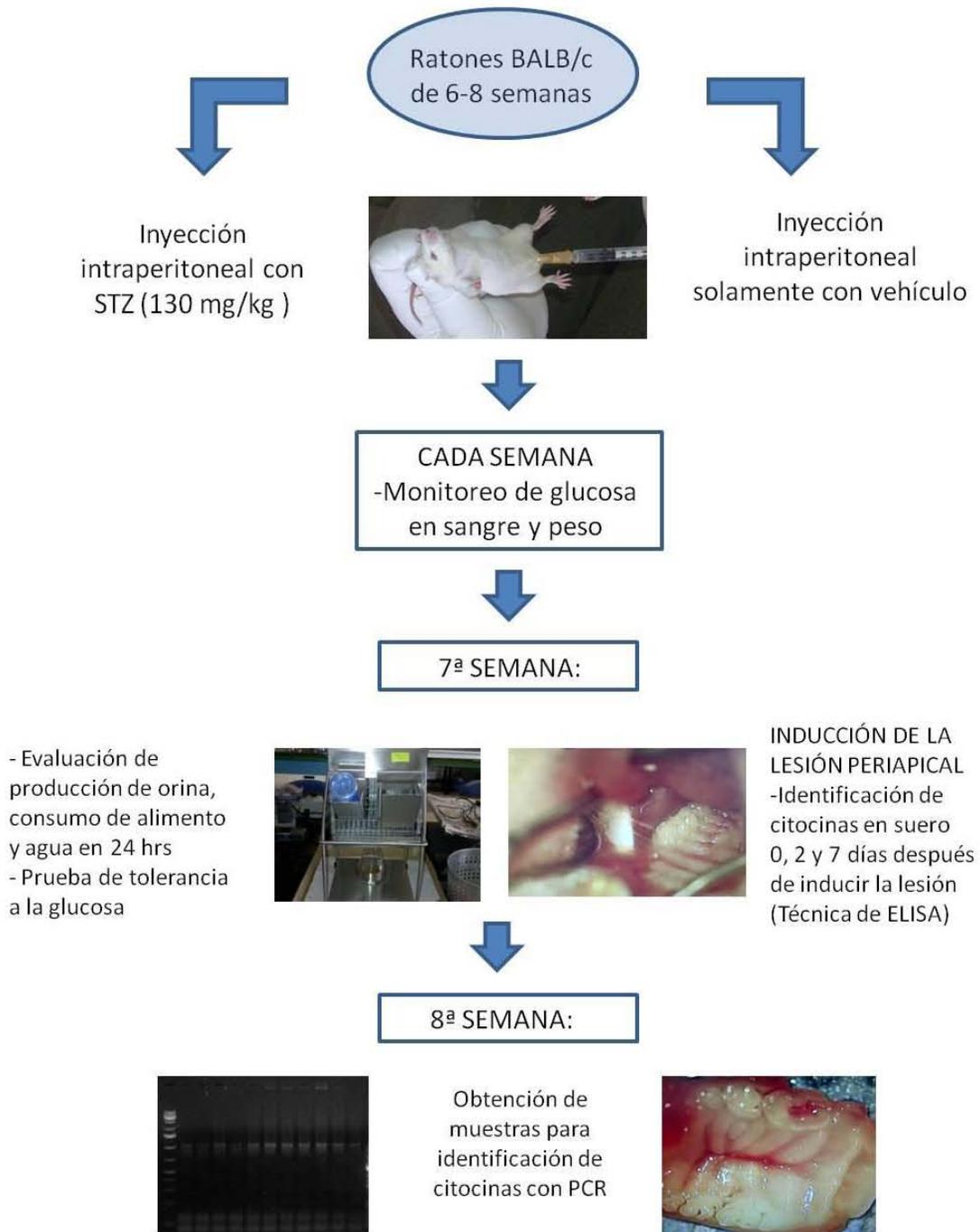
#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Identificar la producción de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c con lesiones periapicales agudas sometidos a un método experimental de hiperglucemia inducida con dosis única de STZ.

##### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Desarrollar un modelo experimental de hiperglucemia en ratones BALB/c con una sola dosis de STZ previamente establecida.
  
- Comprobar la presencia de hiperglucemia en el grupo de ratones a los que fue administrada  $\gamma$  STZ, así como también registrar las manifestaciones clínicas de DMT-2 en ellos (consumo de alimento, agua y producción de orina).
  
- Determinar un procedimiento que conduzca a la inducción de lesiones periapicales en incisivos centrales inferiores de ratones BALB/c.
  
- Determinar la producción de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en el sitio de lesión periapical aguda por medio de la técnica de PCR.
  
- Determinar la presencia de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-4 en suero a los 0, 2 y 7 días después de haber llevado a cabo el procedimiento para inducir la lesión periapical a través de la técnica de ELISA-sandwich.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 5:** Plan de Trabajo

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

Ratones:

Se utilizaron 24 ratones machos de 6 a 8 semanas de edad con fondo genético BALB/c, con los cuales se formaron dos grupos: uno con 16 ratones y el otro con 8, seleccionados de forma aleatoria. El grupo 1 representó al grupo testigo, es decir aquel en el que a los ratones les fue administrada una dosis de STZ; mientras que el grupo 2 representó el grupo control (ratones sanos). Para la fase experimental fueron inducidas lesiones periapicales las cuales se analizaron exclusivamente en su fase aguda en ambos grupos.

### 6.1 Inducción de diabetes

La diabetes fue inducida en los ratones del grupo 1, los cuales eran ratones BALB/c machos de 7 semanas de edad con un ayuno de 8 horas previas a la inducción. Fue administrada por vía intraperitoneal una dosis de 130 mg/kg de estreptozotocina (Sigma, St Louis, MO, USA) disuelta en buffer de citratos 0.05 M con pH de 4.5 recién preparado. Para los ratones del grupo 2 o grupo control se les administró el equivalente en volumen de buffer de citratos (0.05 M a un pH de 4.5).

Se pesaron a los ratones de ambos grupos y en ellos se midió la concentración de glucemia (a partir de una muestra de sangre de la vena caudal de la cola) en los días 0, 7, 14, 28, 35, 42, 49 y 56 con 8 horas de ayuno previas a la medición. La medición de glucemia se realizó empleando las tiras reactivas y sensor Optium Xceed.

Los cuidados de los ratones de ambos grupos se realizaron de acuerdo a los parámetros establecidos por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, realizando un monitoreo visual diario. Los ratones de ambos grupos sobrevivieron las 8 semanas de la fase experimental.

En el día 49 de la fase experimental se colocaron a los ratones del grupo 1 y 2 en cajas metabólicas pesando el alimento que fue colocado en cada caja (100 g) así como también la cantidad de agua (100 ml) y después de 24 horas se volvió a pesar para realizar la diferencia entre el alimento y agua colocados al inicio y los consumidos. Se midió el volumen de orina producida después de 24 horas. De la orina obtenida de la muestra en la caja metabólica se utilizó la prueba Combur 10 Test M que consiste en una tira reactiva para determinar la densidad, pH, leucocitos, nitrito, proteínas, glucosa, cetonas, urobilinógeno, bilirrubina, sangre y hemoglobina en orina.

A la 7ª semana (día 49) después de la administración de STZ se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa con ayuno de 8 horas y administrando una carga de glucosa vía oral a cada uno de los ratones (1.5 g/kg) y se monitorearon los niveles de glucemia a los 30, 60, 90 y 120 minutos después, empleando las tiras reactivas y el sensor Accu-Chek.

## **6.2 Inducción de lesiones periapicales**

Este procedimiento fue realizado a las 7 semanas después de haber administrado STZ al grupo testigo y vehículo al grupo control, para inducir las lesiones se administró anestesia con 80 mg/kg de ketamina y 9 mg/kg de xilazina, la exposición del tejido pulpar de los primeros molares superiores del lado derecho en los ratones BALB/c con diabetes inducida por medio de STZ y en los ratones BALB/c control se realizó bajo magnificación con fresas estériles de bola ¼. Las cavidades se mantuvieron abiertas y expuestas al medio bucal de los ratones. Ambos grupos de ratones fueron sacrificados una semana después de la exposición pulpar.

## **6.3 Determinación de citocinas en suero IL-1-β, IFN-γ, IL-4, con técnica de ELISA**

### **6.3.1 Obtención de suero para la prueba:**

El suero fue obtenido en los días 0, 2 y 7 después de haber realizado la exposición pulpar tanto en los ratones a los que se les administró STZ como aquellos a los que no, después de 8 horas de ayuno se metió a cada uno de los ratones a una caja de madera con un foco de 60 watts que favorecía a emitir calor que provocara la dilatación de la vena caudal y así facilitar el sangrado. Con un bisturí se cortó la vena más sobresaliente y fueron recolectados aproximadamente 500 µl de sangre en tubos Eppendorf, se quitó el coágulo y se centrifugó el sobrenadante 2 veces a 2,500 rpm durante 10 minutos. Los sueros fueron congelados a -20° C hasta su procesamiento.

### **6.3.2 Técnica de ELISA:**

Se realizó una técnica de ELISA tipo Sandwich y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Preprotech México). Las placas de 96 pozos (High binding, Costar) fueron sensibilizadas con 100 µl por pozo del anticuerpo de captura (purified antimouse IL-1β, IFN-γ e IL-4) diluido en PBS a una concentración de 1 µg/ml. Se cubrió la placa y se dejó incubar toda la noche a 4° C.

Pasada la incubación la placa se lavó tres veces usando un buffer de lavado PBS-Tween 0.05% (PBS-T). Posteriormente la placa fue secada, se bloqueó la placa con 300  $\mu$ l de buffer de bloqueo PBS-BSA 1% (200  $\mu$ l por pozo) y se dejó incubar al menos por una hora a temperatura ambiente. Después se lavó la placa cuatro veces con PBS-T y se procedió a hacer la curva de citocina recombinante murina por duplicado en los primeros pozos de la placa. La curva se realizó a una concentración de 12500 ng/ml y se realizaron diluciones a la mitad, hasta el pozo 11 y en el último pozo sólo se agregó PBS-BSA 1%. A los pozos restantes se agregaron por duplicado 25  $\mu$ l de las muestras de los sueros. Se incubaron toda la noche a 4° C.

Posteriormente se lavó la placa cuatro veces con PBS-T y se agregó el anticuerpo biotilnado diluido en PBS-BSA a una concentración de 0.05  $\mu$ g/ml, y se agregaron 100  $\mu$ l por pozo, se dejó incubando a temperatura ambiente por una hora. Trascorrida la incubación, la placa se lavó cuatro veces con PBS-T, y se agregaron a cada pozo 100  $\mu$ l de estreptoavidina diluida 1:200 en PBS-BSA 1% y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se lavó la placa cinco veces con PBS-T y se añadió a cada placa 10 ml de ABTS y 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (Thermo LabSystems) a 405 nm. Los datos arrojados por el lector de ELISA fueron procesados por el software Multiskan Ascent y evaluados en el software de GrahPad Prism 5.0.

## **6.4 Identificación de IL-1 $\beta$ e IFN- $\gamma$ por medio de la Técnica de PCR**

### **6.4.1 Extracción del RNA**

Se agregó 1 ml de trizol por cada 50-200 mg o por 1x10<sup>6</sup> a 5x10<sup>5</sup> mínimo células de tejido. Esto puede ser almacenado a -70° C durante un mes. Esta mezcla debe estar en un tubo eppendorft y se debe poner en hielo.

Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo grado molecular (J.T. Baker 9180-02) por cada ml de trizol agregado y se agita vigorosamente (4  $\mu$ l si se agregaron 200  $\mu$ l de trizol), se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos para después centrifugarlo a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4° C.

Después de centrifugar se pueden identificar tres fases (Una superior transparente, una ligera nata blanca y en la parte inferior queda el resto del trizol), se tomó únicamente la parte transparente evitando tocar alguna de las otras dos fases. Se toma el sobrenadante y se le agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol frío por ml de trizol utilizado (50  $\mu$ l si fueron

utilizados 200 µl de trizol), se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugar a 14 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.

Se tiró el sobrenadante y se lavó con 500 µl de etanol 70% mínimo dos veces y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos a 4° C.

Se dejó secar el botón a temperatura ambiente y se resuspendió con 20 µl de H<sub>2</sub>O CEPC y se agregaron inhibidores de RNAsas, posteriormente se hace una dilución de 1:200 (5 µl de muestra + 1000 µl de H<sub>2</sub>O CEPC) para cuantificar el RNA en un espectrofotómetro a 260 nm (Jenway, Genova).

#### 6.4.2 Obtención del CDNA

Se agregó lo equivalente en µls de 1000 ng de RNA de cada muestra en solución a una mezcla que incluyó 1 µl de DNTP's y 1 µl de Oligo (dT), lo resultante debía ser aforado a 10 µl con H<sub>2</sub>O (agua inyectable)

Cada muestra se colocó en el termociclador (BIOER XP CYCLER) a 65° C durante 5 minutos para después colocarlo en hielo por un minuto.

Se preparó una mezcla para colocar en cada muestra lo siguiente:

- 2 µl de Buffer RT
- 4 µl de Cl<sub>2</sub>Mg
- 2 µl de DTT
- 1 µl de RNA out

Se colocó esta mezcla a cada muestra en el termociclador 42° C por 2 minutos

Al salir del termociclador se colocó 0.5 µl de SSII RT (Super Script) y se volvió a llevar al termociclador a 42°C por 50 minutos y posteriormente a 70°C durante 15 minutos

Se colocó 0.5 µl de RNAH (RNAs aH) y se llevó al termociclador a 36°C por quince minutos, lo obtenido puede mantenerse a -20°C

#### 6.4.3 RT-PCR:

Cuantificación de CDNA: Esta parte se realizó empleando una dilución 1:200 de muestra de CDNA en agua grado biología molecular, se calibró con agua e espectrofotómetro y se leyeron las muestras a 260 nm. Posterior a la cuantificación se decidió tomar 6 µl para la prueba de PCR.

Amplificación del gen: Se utilizaron primers específicos para el reconocimiento del gen de la IL-1 $\beta$  y del IFN- $\gamma$  (referidos en Apéndice 2). En este proceso se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas con capacidad de 0.2 ml, en los cuales con un volumen final por reacción de 25  $\mu$ l se colocaron los siguientes reactivos:

REACTIVO	VOLUMEN
Buffer (1x con una concentración de MgCl <sub>2</sub> 1.5mM)	2.5 $\mu$ l
dNTP's (10 Mm)	0.4 $\mu$ l
Primer F (15 pM)	1 $\mu$ l
Primer R (15 pM)	1 $\mu$ l
Taq	0.3 $\mu$ l
DNA-polimerasa (1.5 U)	
Agua (H <sub>2</sub> O mq)	13.8 $\mu$ l
Muestra de CDNA	6 $\mu$ l

Una vez que se tuvieron los tubos rotulados y con los respectivos reactivos se sometieron al siguiente programa con 40 repeticiones en el termociclador, con una temperatura de alineación de 59°C para IL-1 $\beta$  y de 54°C para IFN- $\gamma$ :

- 95°C por 5 minutos
  - 94°C por 40 segundos
  - (Temperatura de alineación) por 40 segundos
  - 72°C por 40 segundos
  - 72°C por 4 minutos
- } 40 ciclos

#### 6.4.5 Electroforesis:

Se utilizó un gel de agarosa (ICN BIOCHEMICALS) 1% en buffer TBE 1x (Apéndice 1) sobre una cámara molde y un peine de 13 pozos, que se mantuvo a 4° C por 15 minutos para que solidificara.

A cada uno de los tubos se les agregó 5  $\mu$ l de buffer de carga blue Juice con Sybr-Green (IN VITROGEN) una vez mezclados se tomaron 5  $\mu$ l de la muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero para colocar 3  $\mu$ l de marcador de peso molecular 100 pb (IN VITROGEN). Las muestras fueron colocadas en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 90 volts, durante 40 minutos. Se capturó la imagen con el equipo fujifilm Fla 5000.

## 6.5 Estudio histológico

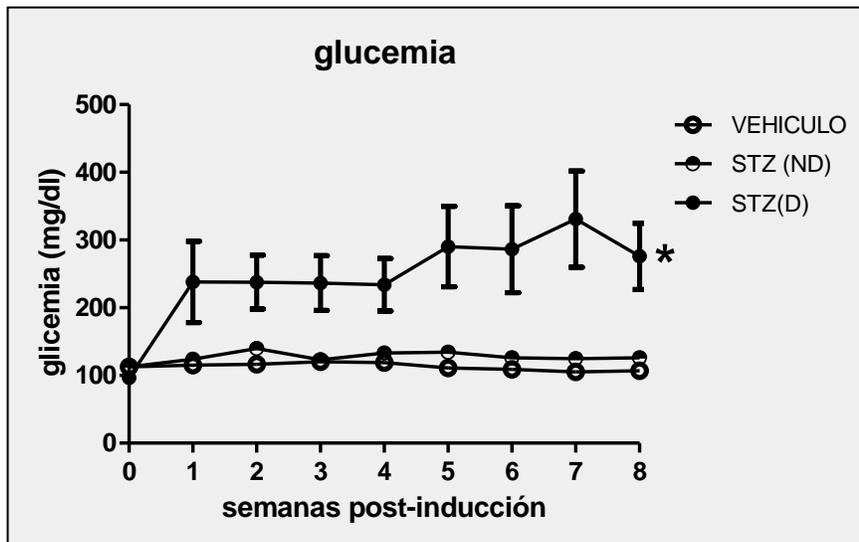
Para el estudio histológico, se prepararon las muestras aislando y fijando las mandíbulas en paraformaldehído fresco (4%) durante 8 horas y luego se lavaron tres veces. Los bloques de hueso que contienen las lesiones o los dientes tratados para la investigación fueron descalcificados con EDTA al 7% e incluidos en parafina; los cortes se realizaron a 5 micras con un microtomo. Para estudiar y cuantificar de diez campos a 40x las células presentes en las zonas periapicales; las muestras fueron montadas y teñidas con hematoxilina y eosina (H-E).

La técnica (H-E) consiste en colocar las muestras en Hematoxilina durante 1 minuto, posteriormente lavar con agua de la llave, se diferencia en alcohol-ácido y se vuelve a lavar; se procede a virar en agua amoniacal y se lava con agua destilada, finalmente se tiñe con Eosina durante 45 segundos y se coloca alcohol 96<sup>0</sup> durante un minuto se deshidrata y se monta en resina sintética (Apéndice 3).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Glucosa en sangre

La glucemia fue monitoreada semanalmente durante 8 semanas, que fue el tiempo de duración del experimento. A continuación se muestran los resultados promedio de dos experimentos. En la Fig. 6 se puede apreciar que no todos los ratones inducidos con STZ se hicieron diabéticos. La incidencia de diabetes fue del 50%. El grupo tratado con STZ que no desarrolló diabetes [STZ(ND)] nunca excedió los 150 mg/dl de glucosa en sangre durante todo el experimento incluso mantuvo valores similares al grupo de ratones control. Los ratones que se hicieron diabéticos [STZ(D)] tuvieron un incremento en su glucemia de 200 mg/dl promedio desde la primera semana post-inducción, y alcanzaron los niveles más altos de glucemia en las semanas cinco y siete.



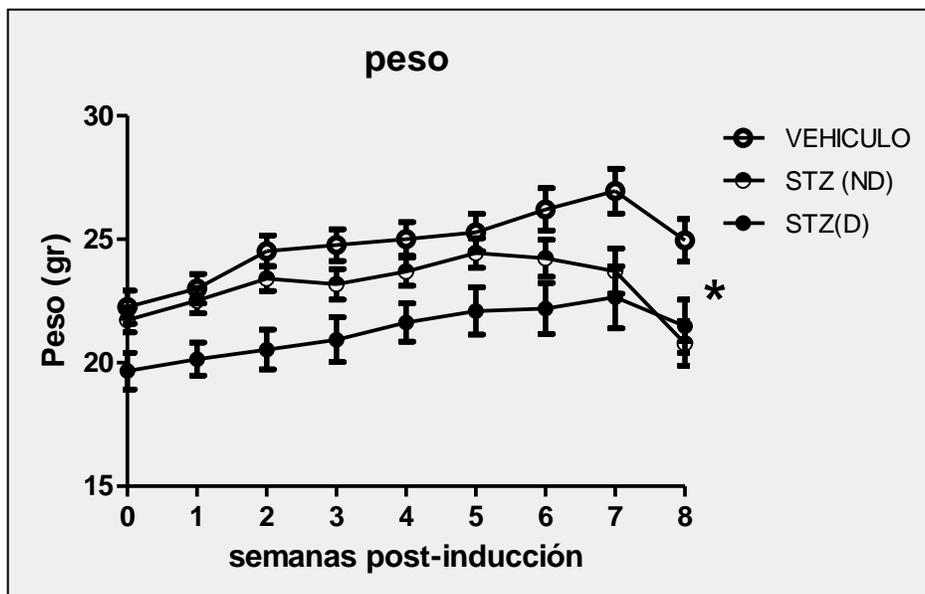
**Figura 6: Niveles de glucosa en sangre.** Promedios de glucemia observada semanalmente durante 8 semanas de experimentación de ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que sí desarrollaron diabetes [STZ(D)]. \* $P < 0.05$  (0.0002), estadísticamente significativo, prueba "t" de student, Graph Pad Prism.

### 7.2 El peso y la presencia de un cuadro de hiperglucemia

En relación a los grupos experimentales a los cuales se les administró STZ, se observó que en aquellos donde no se presentaron niveles de glucemia elevados [STZ(ND)], el peso tuvo variaciones y no presentó un incremento constante.

En cuanto al grupo de ratones hiperglucémicos [STZ(D)] tuvieron bajo peso desde el inicio del experimento, aunque durante el transcurso del experimento mostraron un peso promedio en ascenso de forma continua.

En la figura 7 también se refleja una baja en el peso de todos los grupos entre las semanas siete y ocho lo que hace suponer que esto puede asociarse al hecho de que en este momento fue realizado el procedimiento odontológico para inducir la lesión periapical, lo que podría impactar en una disminución en su alimentación y con ello en el peso.



**Figura 7:** Peso corporal. Promedios del peso corporal determinado semanalmente durante 8 semanas de experimentación de ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)]. \* $P < 0.05$ , estadísticamente significativo, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

### 7.3 Tolerancia a la glucosa

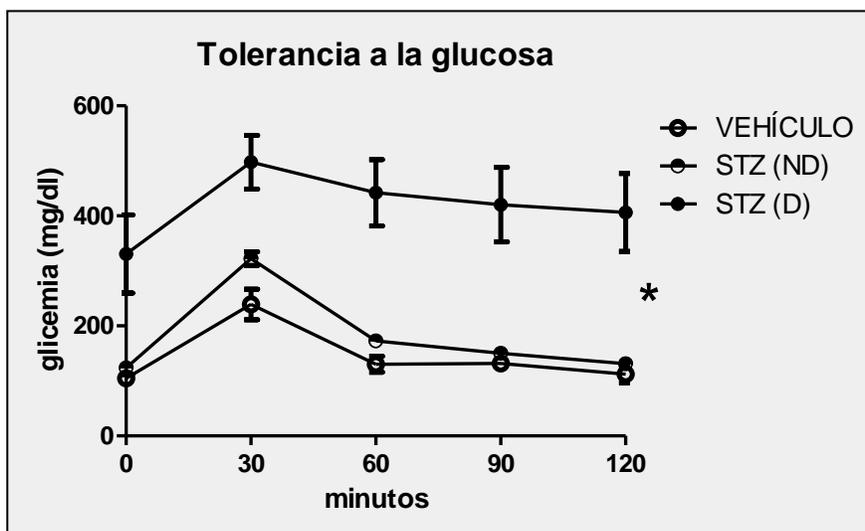
Para realizar la prueba de tolerancia se monitoreó la glucemia a las 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de una solución de 1.5 g/kg de glucosa por vía oral.

En el grupo de ratones sanos la glucemia alcanzó un nivel promedio de 200 mg/dl a los 30 minutos de haber administrado glucosa y con el transcurso del tiempo disminuyó de forma gradual hasta que después de haber transcurrido 120 minutos se volvieron a registrar los mismos valores de glucemia inicial.

En el grupo experimental STZ(ND) durante el experimento presentaron niveles de glucemia ligeramente mayores en comparación al grupo de ratones control después de 30

minutos post-administración de glucosa. Sin embargo, al final de la prueba de tolerancia también tuvieron la capacidad de alcanzar los niveles de glucemia basales.

Con respecto al grupo de ratones STZ(D) se puede observar que desde el inicio, antes de administrar la glucosa vía oral, tenían registros de glucemias altos y una vez administrada la glucosa alcanzaron un punto máximo de hiperglucemia a los 30 minutos de haber iniciado la prueba con niveles promedio de 500 mg/dl. Posterior se observó una disminución paulatina de la glucemia, sin embargo después de 120 minutos la glucosa se mantuvo en niveles elevados y no consiguieron regresar a la glucemia de inicio.



**Figura 8:** Tolerancia a la glucosa. Glucemias promedio a la semana 7 post-inducción con STZ de ratones tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)], ratones tratados con STZ que sí desarrollaron diabetes [STZ(D)] y ratones tratados únicamente con vehículo (control). \* $P < 0.05$ , estadísticamente significativo, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

#### 7.4 Evaluación metabólica

En la 7ª semana post-inducción con STZ se colocaron los 3 grupos de ratones estudiados durante el experimento (Control, STZ(ND) y STZ(D)) en cajas metabólicas (5 ratones por grupo). Transcurridas 24 horas, los ratones fueron retirados y se recuperó el alimento, el agua sobrantes, así como la orina que fue producida para análisis.

Los datos a confirmar fueron: poliuria, polifagia y polidipsia, así como afección de la función renal tras el análisis de los componentes presentes en la orina.

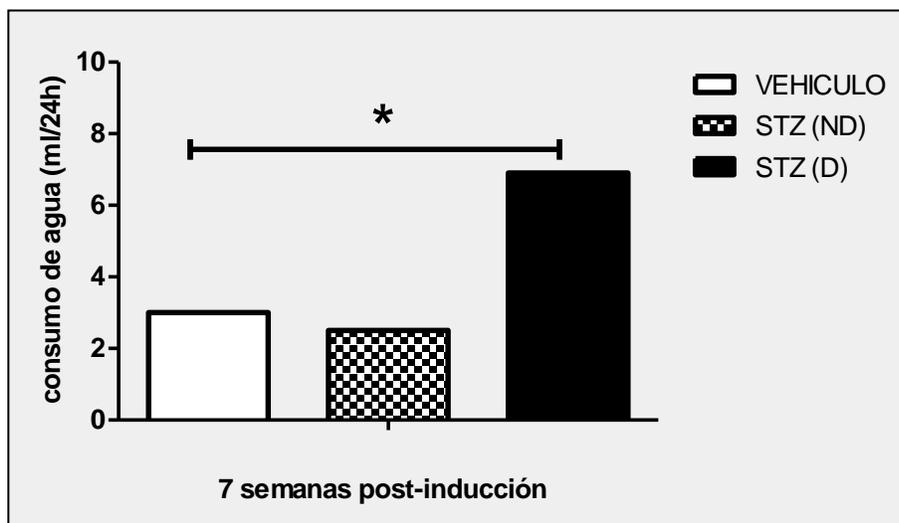


**Figura 9:** Cajas metabólicas diseñadas para monitorear el consumo de alimento, agua y producción de orina, en un periodo de 24 hrs. Estas cajas cuentan con un contenedor para alimento y facilitan la adaptación de un bebedero. En la base de la jaula se encuentra una red recolectora de heces y una charola tipo embudo cuya función es llevar la orina hacia un recipiente colector. Determinación realizada en la semana 7 post- inducción con STZ. Ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)].

#### 7.4.1 Polidipsia:

Dado a las condiciones de hiperglucemia en los ratones de los grupos experimentales, fueron evaluados los signos de la patología diabética, poliuria, polidipsia y polifagia. La polidipsia (sed aumentada) es una característica del estado hiperglucémico que se presenta como consecuencia a una deshidratación celular que estimula a receptores hipotalámicos tras una pérdida considerable de agua a través del riñón (poliuria).

En la figura 10 se muestran los resultados del consumo de agua promedio por ratón en cada uno de los grupos durante 24 horas a las 7 semanas después de haber sido administrada dosis única de STZ. Se observó que los ratones del grupo experimental STZ(D) tuvieron un aumento considerable en el consumo de agua comparados con que aquellos ratones del grupo que recibió únicamente vehículo (control) y los del grupo experimental STZ(ND).

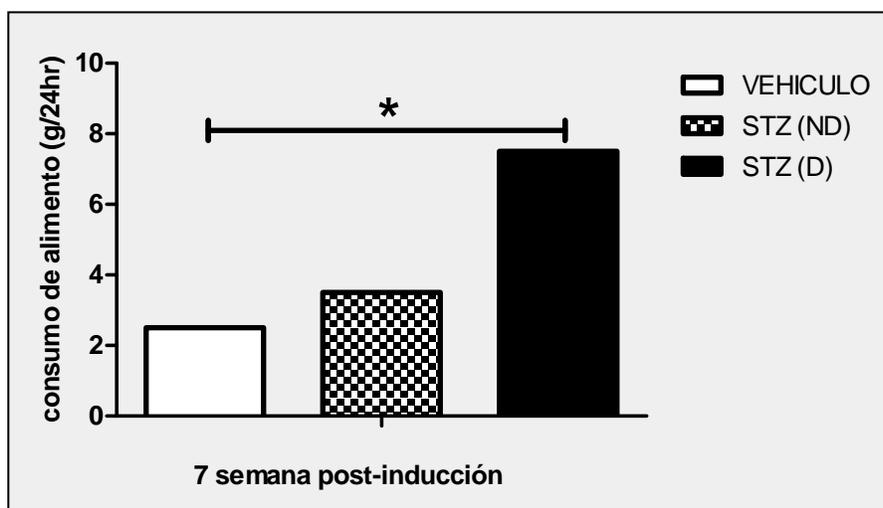


**Figura 10:** Consumo de agua. Barras representativas del promedio de la cantidad de agua ingerida en 24 horas en la semana 7 post-inducción con STZ de los ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)]. \*P<0.05, estadísticamente significativo, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

#### 7.4.2 Polifagia:

En el modelo experimental de hiperglucemia por la administración de dosis única de STZ se consigue que la glucosa no ingrese adecuadamente a la célula, por lo que suelen estimularse receptores propios de los núcleos laterales del hipotálamo que regulan el hambre y la saciedad, induciendo al consumo de alimento elevado.

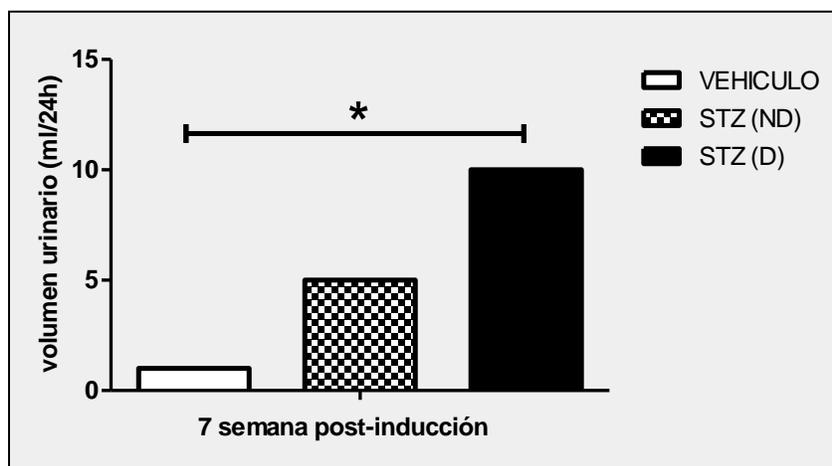
Con respecto al consumo de alimento durante 24 horas, se observó que los ratones de los grupos experimentales [STZ(ND) y STZ(D)] tuvieron una mayor ingesta de alimento que los del grupo control (vehículo), sin embargo, los ratones del grupo con STZ(D) consumieron aun más que aquellos ratones con STZ(ND) (Figura 11).



**Figura 11:** Consumo de alimento. Barras representativas de la cantidad de alimento promedio ingerido en 24 horas en la semana 7 post-inducción con STZ de los ratones BALB/c control y de los grupos experimentales hiperglucémicos y no hiperglucémicos.  $P < 0.05$ , estadísticamente significativo, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

#### 7.4.3 Poliuria:

Cuando existe un incremento en la glucosa sérica las células funcionales del riñón suelen presentar alteraciones en su mecanismo de filtración y reabsorción de glucosa provocando que ésta sea eliminada por la orina y con ella un mayor cantidad de agua. En la gráfica 12 se muestra el promedio de orina producida en 24 horas por ratón, siendo evidente su incremento en los ratones del grupo STZ(D) en comparación con los ratones que recibieron únicamente vehículo (control) y el grupo experimental STZ(ND).



**Figura 12:** Volumen de orina. Barras representativas de la producción de orina promedio producida por ratón en 24 horas a la 7ª semana post-inducción con STZ en los grupos experimentales y control. Ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)].  $*P < 0.05$ , estadísticamente significativo, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

#### 7.4.4 Análisis de orina. (Tiras reactivas de la prueba Combur 10 Test M)



**Figura 13:** Tiras reactivas obtenidas para el análisis de orina. (A) Tira del grupo control con vehículo. (B) Tira del grupo experimental con ratones no hiperglucémicos. (C) Tira del grupo experimental con ratones hiperglucémicos.

Después de haber obtenido la orina producida en 24 horas, se realizó el análisis de la misma y se observó que los grupos experimentales a los que les fue administrada STZ presentaron glucosuria y evidencia de lesión renal al existir la presencia de sangre en el grupo STZ (ND) y de nitritos en el grupo de STZ (D). Los ratones del grupo control no mostraron ningún dato en el análisis de la orina que manifestara afección renal (Tabla 2).

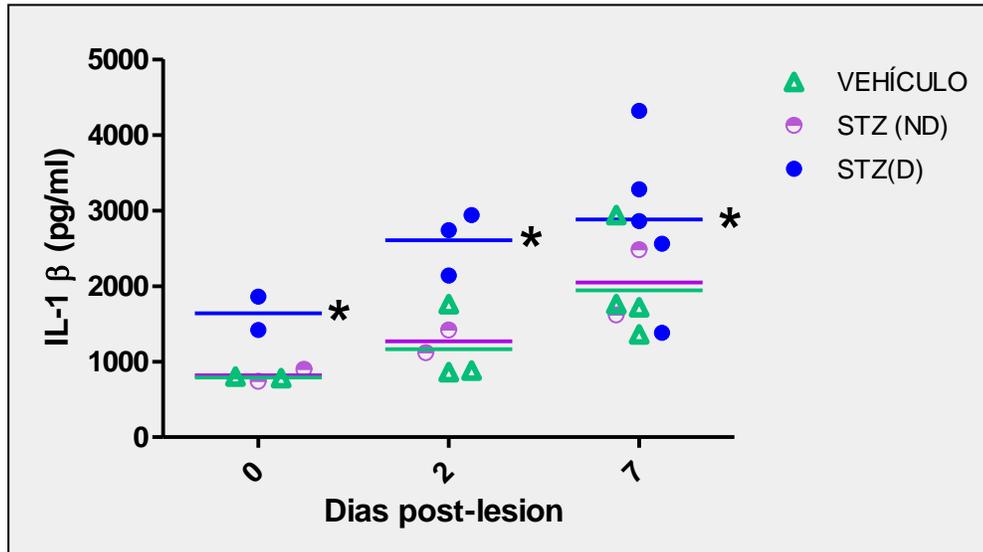
<b>Parámetros</b>	<b>Grupo de ratones con vehículo</b>	<b>Grupo de ratones con STZ (No hiperglucémicos)</b>	<b>Grupo de ratones con STZ (hiperglucémicos)</b>
<b>Leucocitos</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Nitritos</b>	Negativo	Negativo	Positivo
<b>Urobilinógeno</b>	Normal	Normal	Normal
<b>Proteínas</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>pH</b>	6	6	6
<b>Sangre</b>	Negativo	Positivo	Negativo
<b>Densidad</b>	1.020	1.020	1.030
<b>Cetona</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Bilirrubina</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Glucosa</b>	Negativo	Positivo	Positivo

**Tabla 2:** Análisis de orina. Realizado a los diferentes grupos de experimentación realizado a la 7ª semana post-inducción con STZ.

## 7.5 Determinación de citocinas (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ e IL-4) en suero, por medio de la técnica de ELISA-sandwich

**7.5.1 IL-1 $\beta$ :** La identificación de esta citocina pro-inflamatoria en suero se realizó a la 7<sup>a</sup> semana post-inducción con STZ, previo al procedimiento de exposición pulpar y a los 2 y 7 días posteriores a la lesión.

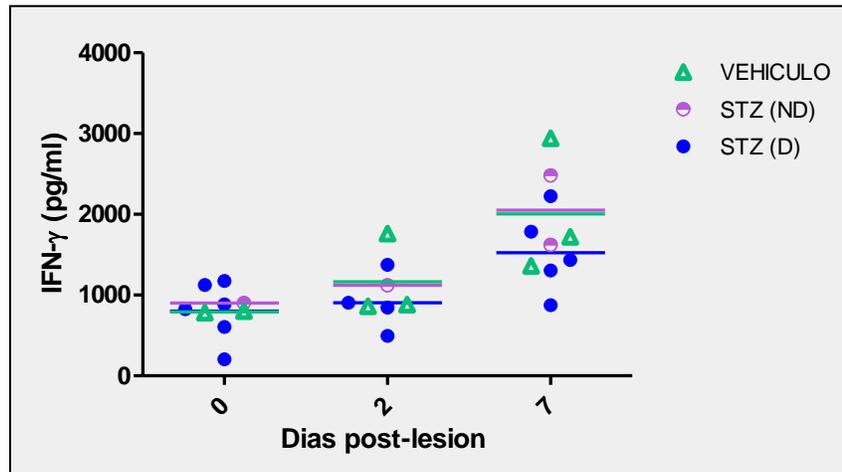
Los resultados de esta prueba reflejan que los niveles de IL-1 $\beta$  en el suero de los ratones del grupo experimental con dosis única de STZ(D), fueron siempre más elevados que los del grupo de ratones STZ(ND) y que los ratones del grupo control. Sin embargo fue notorio el incremento paulatino de esta citocina después de haber realizado el procedimiento de exposición pulpar en todos los grupos de ratones. Los niveles de IL-1 $\beta$  en el suero de los ratones control fueron similares a los del grupo de ratones con estreptozotocina no hiperglucémicos a lo largo de esta prueba (Fig 14).



**Figura 14:** Niveles de IL-1 $\beta$  en suero. Determinación a los 0, 2 y 7 días después de la exposición pulpar en ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)]. \*P<0.05, estadísticamente significativo, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

**7.5.2 IFN- $\gamma$ :** La prueba para esta citocina pro-inflamatoria, también se realizó en el mismo tiempo que para IL-1 $\beta$  (0, 2 y 7 días posteriores a la exposición pulpar).

Los niveles de IFN- $\gamma$  se observaron similares en todos los grupos experimentales al inicio de la prueba, sin embargo es posible identificar un ligero incremento de esta citocina a los 2 y 7 días después del procedimiento odontológico sin diferencia estadística entre grupos.



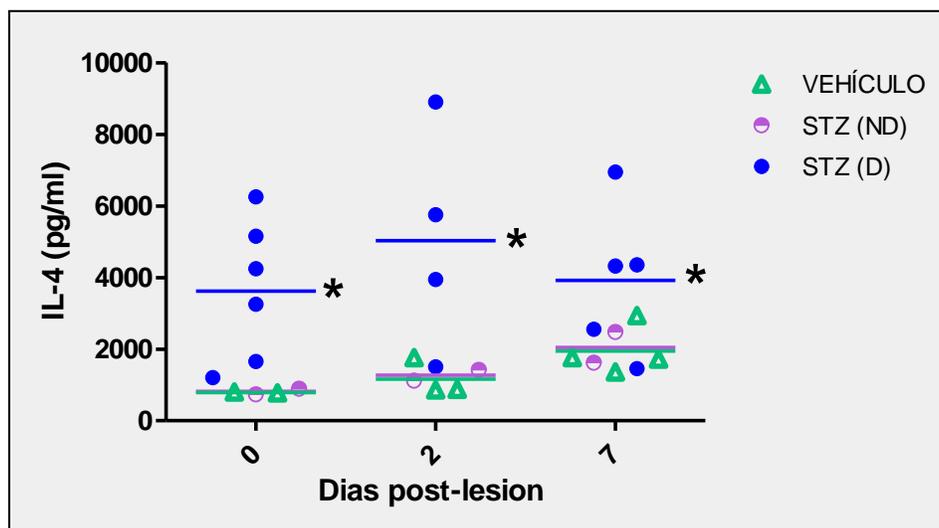
**Figura 15:** Niveles de IFN- $\gamma$  en suero. Determinación a los 0, 2 y 7 días después de la exposición pulpar en ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)], sin diferencia estadística significativa, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

**7.5.3 IL-4:** Esta citocina es considerada como un mediador que participa en los mecanismos de regulación negativa de los procesos inflamatorios. Esta prueba se realizó en la misma fecha en la que se identificaron las citocinas pro-inflamatorias arriba mostradas.

Los resultados de la figura 16 reflejan un nivel elevado de IL-4 en el grupo de ratones del grupo STZ(D) desde el inicio de la prueba, a los 2 días después de haber realizado la exposición pulpar se observa un incremento importante y a los 7 días los niveles descienden.

En el grupo experimental de ratones STZ(ND) así como en el grupo de ratones que recibieron únicamente vehículo se observaron niveles bajos de esta citocina al principio de la prueba, sin embargo se presentó un incremento paulatino no significativo en ambos

grupos con el transcurso del experimento (a los 2 y 7 días después de la exposición pulpar) (Fig.16).



**Figura 16:** Niveles de IL-4 en suero. Determinación a los 0, 2 y 7 días después de la exposición pulpar en ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)]. \* $P < 0.05$ , estadísticamente significativo, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

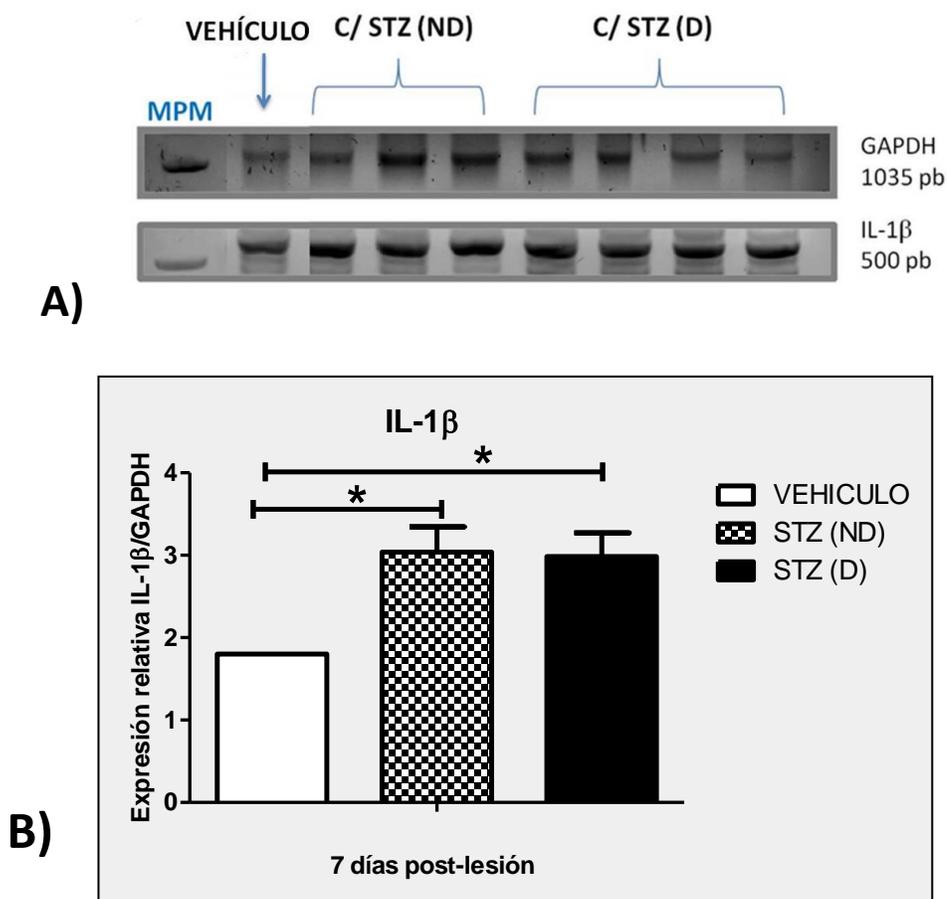
## 7.6 Determinación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ e IFN- $\gamma$ ) in situ de lesión periapical por medio de la técnica de PCR.

La determinación de los niveles de IL-1 $\beta$  y de IFN- $\gamma$  se realizó en la 8ª semana post-inducción con estreptozotocina y 7 días después de haber realizado el procedimiento de exposición pulpar por medio de la técnica de PCR.

**7.6.1 IL-1 $\beta$ :** Debido a que esta citocina se ha asociado con la fisiopatología de la enfermedad periapical aguda, fue importante identificar su producción en la zona relacionada con los dientes a los que se les realizó exposición de su tejido pulpar y la relación que tiene en un estado de hiperglucemia inducido por una dosis única con STZ.

En la figura 17A se identifica su expresión relativa del gen constitutivo Gliceraldehído 3-Fosfato dehidrogenasa (GAPDH) y del transcrito para IL-1 $\beta$  en un gel de agarosa utilizado de la electroforesis de los productos amplificados de ambos genes.

En la figura 17B se puede apreciar la producción del transcrito para IL-1 $\beta$ . En los dos grupos experimentales de ratones STZ(D) y STZ(ND) el transcrito para IL-1 $\beta$  fue elevado con respecto al grupo de ratones que recibieron únicamente vehículo.

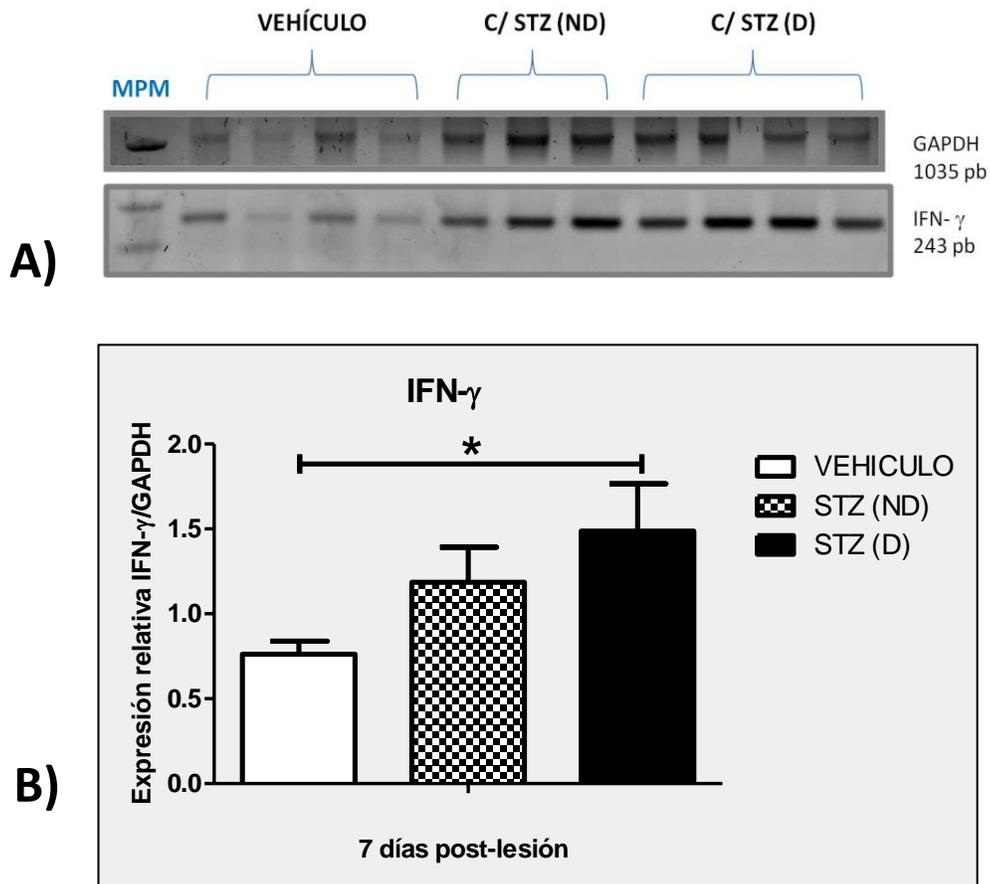


**Figura 17:** Determinación por RT-PCR del transcrito para IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  *in situ* de la zona de lesión post-exposición pulpar. (A) Imagen de electroforesis para la amplificación por RT-PCR del gen de IL-1 $\beta$ . (B) Gráfica de la producción de IL-1 $\beta$  por PCR. En ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)]. \*P<0.05, estadísticamente significativo, prueba “t” de student, Graph Pad Prism.

**7.6.2 IFN- $\gamma$ :** Dado a la característica de esta citocina como elemento pro-inflamatorio relacionado con el mecanismo de inicio del proceso de inflamación, también fue importante analizar su producción en los tejidos relacionados con los dientes a los que se les realizó exposición del tejido pulpar y la relación que tiene en un estado de hiperglucemia inducido por una dosis única con STZ.

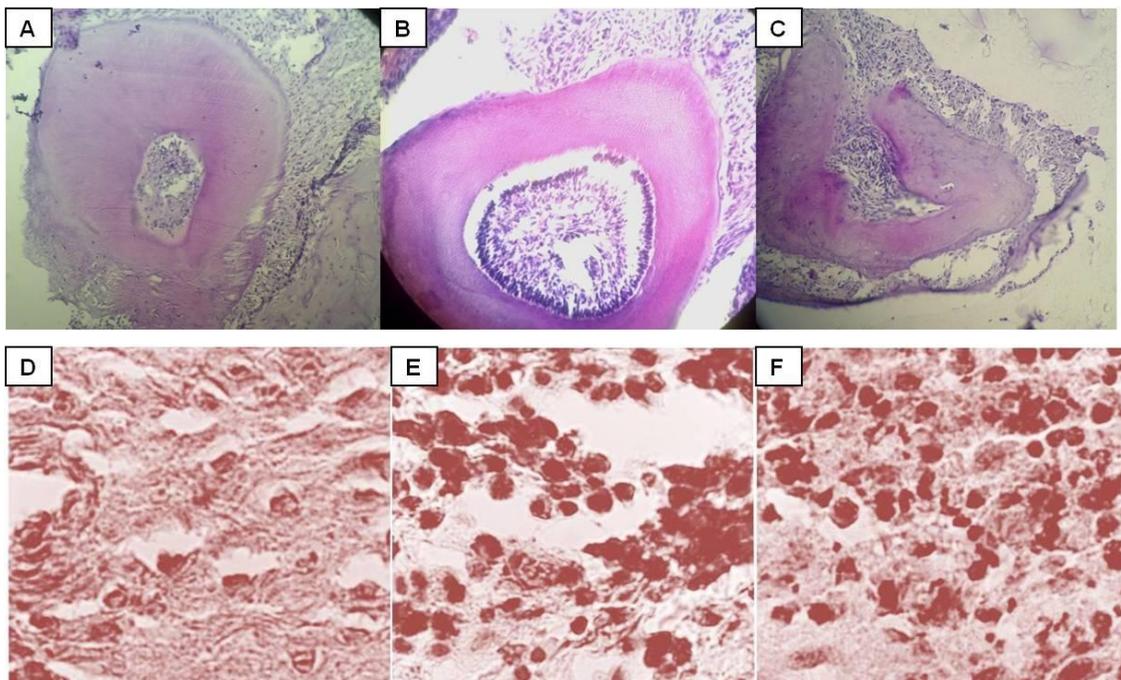
En la figura 18A se identifica su expresión relativa del gen constitutivo (GAPDH) y del transcrito para IFN- $\gamma$  en un gel de agarosa utilizado de la electroforesis de los productos amplificados de ambos genes.

En la figura 18B se puede apreciar la producción del transcrito para IFN- $\gamma$ . En la gráfica que se encuentra a continuación de la figura, se observa que el haber administrado estreptozotocina en los grupos experimentales de ratones influye en una mayor producción de esta citocina. En los dos grupos experimentales de ratones STZ(D) y STZ(ND) el transcrito para IFN- $\gamma$  fue elevado con respecto al grupo de ratones que recibieron únicamente vehículo. Sin embargo el grupo STZ(D) presentó una producción mayor de IFN- $\gamma$  con respecto a los ratones del grupo STZ(ND) y éstos últimos a su vez niveles incrementados de IFN- $\gamma$  con respecto a los ratones del grupo que recibió únicamente vehículo.



**Figura 18:** Determinación por RT-PCR del transcrito para IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  *in situ* de la zona de lesión post-exposición pulpar. (A) Imagen de electroforesis para la amplificación por RT-PCR del gen de IFN- $\gamma$ . (B) Gráfica de la producción de IFN- $\gamma$ . En ratones tratados únicamente con vehículo (control), tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)] y ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)]. \* $P < 0.05$ , estadísticamente significativo, prueba "t" de student, Graph Pad Prism.

## 7.7 Cortes histológicos:



**Figura 19:** Cortes histológicos de la lesión pulpar. Tinción E&H (aumento 10x, Olympus). A) Ratones tratados únicamente con vehículo (control), B) ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)] y C) ratones tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)]. Tinción E&H (aumento 40x, Olympus). D) Ratones tratados únicamente con vehículo (control), E) ratones tratados con STZ que si desarrollaron diabetes [STZ(D)] y F) ratones tratados con STZ pero que no desarrollaron diabetes [STZ(ND)].

Las lesiones periapicales inducidas en este trabajo tuvieron un tiempo de evolución de 7 días, se realizó un estudio histológico para evaluar las condiciones del proceso inflamatorio presente por el daño en los tejidos relacionados con dichas lesiones en ese periodo.

Se efectuó un conteo de células de diez campos a 40x por muestra para determinar el infiltrado celular, el cual fue predominantemente de tipo agudo con abundantes células polimorfonucleares, obteniendo un valor promedio en el grupo control (vehículo) de 10.83; en el grupo STZ(ND) de 31.16 y en el grupo STZ (D) de 28.86, siendo evidente el incremento de infiltrado celular en los ratones de los grupos experimentales a los que se les administró STZ. No hubo diferencia importante entre los ratones que mostraron signos de patología diabética [STZ(D)] y los que no manifestaron hiperglucemia [STZ(ND)].

## 8. DISCUSIÓN

La STZ ha sido utilizada comúnmente para inducir modelos animales de DMT-1 y modelos animales DMT-2 con hipoinsulinemia, dependiendo de la dosis intraperitoneal o intravenosa empleada [98].

Hasta ahora no ha sido aclarada con precisión la manera en que la inyección sistémica de STZ causa daño en las células  $\beta$  del páncreas, sin embargo se han sugerido distintos procesos que pueden explicarlo. Se ha reportado la relevancia del mecanismo de especificidad de la acción de la STZ en la célula  $\beta$  al inhibir la O-GlcNAc-selectiva N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (O-GlcNAcase) que se encuentra en altas concentraciones en estas células, en comparación con las células de otros tejidos; es decir que la STZ presenta un efecto citotóxico relativamente específico para las células  $\beta$  del páncreas [99].

También ha sido reportado un efecto citotóxico preferencial de la STZ en líneas celulares que expresan GLUT2, dentro de las cuales se consideran a algunas de las células  $\beta$  del páncreas. GLUT2 es una isoforma transportadora de glucosa, sin embargo puede tener también un reconocimiento específico para STZ, de tal manera que esta droga es transportada por GLUT2 al páncreas provocando su efecto destructor en él, sin embargo no todas las células pancreáticas se ven afectadas, algunas se mantienen para seguir produciendo cierta cantidad de insulina [100].

Se han realizado modelos animales para inducir un estado hiperglucémico con condiciones similares a la DMT-2 o no insulino dependiente por medio de la administración de dosis única de estreptozotocina, en las que han sido utilizadas dosis de 100, 125 y 150 mg/kg; debido a que dosis mayores (200 mg/kg) pueden inducir condiciones similares a la DMT-1 o insulino dependiente [101].

El modelo de hiperglucemia desarrollado en esta investigación se realizó por medio de la administración de una única dosis de 130 mg/Kg de STZ en ratones con fondo genético BALB/c con edad de 7 semanas, que presentaron: hiperglucemia en ayunas, fallo en la tolerancia a la glucosa, poliuria, polifagia, polidipsia y glucosuria. La incidencia del desarrollo de DMT-2 observada en este trabajo fue del 50%.

La incidencia “baja” del desarrollo del modelo de DMT-2, comparada con reportes científicos de otros grupos, puede deberse a que la edad de los ratones utilizados en este trabajo no fue del todo controlada. Es decir, mientras el modelo demanda ratones de 7-8 semanas de edad en nuestro bioterio institucional se nos entregaron ratones que fluctuaban entre 7-9 semanas de edad. En consecuencia no se pudo controlar con

precisión la edad en la que fueron tratados los ratones que no presentaron hiperglucemia a lo largo de toda la fase experimental.

Debido a que el 50% de los ratones tratados con STZ no desarrollaron hiperglucemias [STZ(ND)], se decidió establecer un nuevo grupo de ratones, que aunque fueron sometidos al mismo tratamiento de dosis única con 130 mg/kg de STZ no desarrollaron incremento progresivo de la glucemia a lo largo de las 8 semanas de la fase experimental. Por el contrario, respondieron de forma similar a la que lo hicieron los ratones a los que únicamente se les administró el vehículo (control).

Algunos estudios han demostrado que el ayuno también tiene relevancia en el resultado del efecto conseguido con la STZ y se sugiere que previo a su administración exista un ayuno mínimo de 5 horas, sin embargo este factor ha sido descartado, debido a que el ayuno fue controlado en todos los ratones del grupo experimental, considerando 8 horas sin alimento previo a la administración de STZ [102].

Aunque aún no se cuentan con cifras oficiales de glucemia para determinar diabetes en modelos animales hay coincidencias entre algunos autores en los niveles de glucemia para establecer el diagnóstico de DMT-2, se menciona que deben ser considerados valores de glucemia por arriba de 11.1 mmol/L (equivalente a 200 mg/dl) empleando múltiples dosis de 35 mg/kg de STZ [103], otras investigaciones sugieren el registro de cifras de glucemia de  $266 \pm 58$  mg/dl con una sola dosis de 100 mg/kg de STZ [101], éstos mismos resultados de glucemia también han podido obtenerse por medio de modelos con dosis única de 130 mg/kg de STZ [102]. La administración de una dosis mayor de STZ puede llevar a valores que alcanzan hasta los 600 mg/dl de glucemia provocando un modelo similar a la DMT-1 o insulino dependiente [101].

En este trabajo se diagnosticó diabetes en los ratones del grupo experimental [STZ(D)] en los que fueron registrados valores de glucemia en condiciones de ayuno de 8 horas por arriba de los 146 mg/dl y que nunca presentaron valores mayores a los 434 mg/dl, así como también fue posible obtener resultados a través de una curva de tolerancia a la diabetes (CTG) con glucemias mayores a 200 mg/dl y que después de 2 horas de haber administrado una carga de glucosa, no se obtuvieron los valores de glucemia iniciales con ayuno. Estos criterios fueron los utilizados para establecer el diagnóstico de DMT-2 en el modelo

En la Diabetes tipo 1 (DMT-1) se ve afectada talla con una retención significativa del crecimiento con alteraciones en la regulación hipotalámica de la hormona del crecimiento y disminución significativa de peso que puede asociarse a la misma talla disminuida [104], sin embargo en nuestro estudio no fue observada una pérdida de peso considerable en

ninguno de los grupos experimentales, descartando así un modelo similar a DMT-1, otro dato relevante es que los ratones hiperglucémicos [STZ(D)] desde el inicio del experimento siempre mantuvieron un peso menor en comparación con los ratones no hiperglucémicos [STZ(ND)] y del grupo control [VEHICULO].

En los tres grupos, experimentales y en el grupo control se observó una disminución en el peso entre las semanas 7 y 8 post-inducción con STZ, sin embargo esto puede estar relacionado con el procedimiento odontológico efectuado en la semana 7 que seguramente repercutió en la alimentación de los ratones y con ello en su peso.

En la evaluación con las cajas metabólicas se observó que los ratones del grupo experimental con hiperglucemia [STZ(D)] tuvieron un mayor consumo de agua, ingesta de alimento y producción de orina en comparación al grupo experimental sin hiperglucemia [STZ(ND)] y el grupo control (VEHICULO).

En los grupos STZ(D) y STZ(ND) se identificó presencia de glucosa en orina lo cual suele ser un signo importante para diagnosticar la patología diabética, la glucosuria comúnmente se presenta cuando los niveles de glucemia es tan elevada que rebasa el umbral renal (180 mg/dl) para reabsorber la glucosa de la sangre que llega al riñón, eliminándose parte de ella por la orina [24].

Los ratones del grupo experimental STZ(ND) no presentaron glicemias elevadas, el hecho de registrar presencia de glucosa en orina puede explicarse de dos maneras: posiblemente fue falso positivo debido a que la muestra de orina estuviera contaminada con residuos de alimento, si fuera el caso de la orina de los ratones control debería haber tenido glucosa también. La otra posibilidad es que aunque no tuvieron un incremento de la glucemia también presentaron afección renal, esto se podría deberse a que aunque la STZ tiene alta especificidad para afectar las células  $\beta$  del páncreas, pero también presenta cierta especificidad por hígado y riñón. Por lo que posiblemente hubo cierto grado de daño a nivel que pudo provocar una alteración en la filtración de glucosa y eritrocitos en los ratones [98].

Por otra parte en este estudio se analizó la presencia de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-4 en suero por medio de la técnica de ELISA-sandwich. Fueron registrados niveles altos de IL-1 $\beta$  en los ratones hiperglucémicos [STZ(D)] en la 7ª semana de experimentación en comparación con el grupo experimental de ratones no hiperglucémicos [STZ(ND)] y grupo control [VEHÍCULO], datos que se asemejan a lo obtenido por otros autores, en los que se relaciona el incremento de IL-1 $\beta$  en ratones diabéticos como efecto de un proceso inflamatorio inherente al tratamiento con STZ [105]. Sin embargo estos datos también coinciden con otros estudios donde se ha confirmado una producción aumentada de

marcadores inflamatorios como: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en pacientes con DMT-2, incluso son elementos relevantes para predecir el desarrollo de la patología diabética [106].

En la semana 7 post-inducción con STZ fue realizada una lesión inflamatoria local al provocar la exposición pulpar en los molares de los ratones de los tres grupos [STZ(D); STZ(ND) y vehículo], esto explica porque los niveles de IL-1 $\beta$  estuvieron incrementados en los 2 y 7 días posteriores al procedimiento odontológico en todos los grupos. Sin embargo es de llamar la atención que el grupo experimental con hiperglucemia [STZ(D)] fue el que registro los niveles más elevados de esta citocina, pudiendo ser la sumatoria de la inflamación generada mecánicamente y el estado patológico de diabetes.

Con respecto a la evaluación de IFN- $\gamma$ , se pudo observar que en la semana 7 post-inducción el grupo experimental con hiperglucemia [STZ(D)] tuvo niveles menores de esta citocina en comparación al resto de los grupos, mientras que para IL-4 este grupo experimental reflejó los niveles más altos. Éstos resultados concuerdan con lo demostrado en diversos estudios donde se ha relacionado a la Diabetes con un fenotipo Th2, algunos autores han desarrollado modelos animales con STZ en los que se ha observado un incremento en la producción de IL-4 e IL-10 pero con una reducción significativa de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , sin embargo también se ha considerado la consolidación de un fenotipo Th1 o Th2 dependiendo del tiempo de evolución de la patología diabética, en una etapa temprana de la inducción de Diabetes con STZ (una semana) provoca un fenotipo Th1 dominante con la producción de citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  pero en una etapa avanzada (cuando menos 4 semanas después de la inducción) aparece un fenotipo Th2 con producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 en un intento de compensar el proceso inflamatorio inicial resultante de la administración de la administración de la STZ [107].

Después de haber realizado el proceso odontológico en los ratones de los distintos grupos [STZ(D); STZ(ND) y vehículo] fueron registrados cambios en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4 a los 2 y 7 días post-lesión. La expresión de IFN- $\gamma$  tuvo un incremento progresivo en todos los grupos sin embargo el grupo experimental con hiperglucemia [STZ(D)] siempre mostró niveles inferiores por debajo de los otros dos grupos [STZ(ND) y (VEHÍCULO)], esto puede deberse a que un proceso inflamatorio local, puede impactar en la producción sistémica aumentada de esta citocina pro-inflamatoria.

En relación a la IL-4 también se observó un incremento progresivo en los días 2 y 7 después de la lesión odontológica en el grupo control (VEHÍCULO) y en el grupo experimental sin hiperglucemia [STZ(ND)], mientras que en el grupo experimental con hiperglucemia [STZ(D)] en el día 2 días post-lesión la IL-4 aumentó y a los 7 días tuvo una disminución.

Como se mencionó previamente, a la 7ª semana post-inducción del estado hiperglucémico con STZ, se realizó la exposición del tejido pulpar en los primeros molares superiores, y fue evaluada la expresión relativa de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en los tejidos afectados una semana después por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Es hasta ahora sabido que la periodontitis apical está causada principalmente por infección bacteriana dentro del sistema de conductos radicular, y la destrucción del hueso periapical es una característica de esta enfermedad [108], en modelos animales ha sido efectivo realizar la apertura de una cavidad y exponer el tejido pulpar para inducir inflamación periapical y destrucción ósea [109]. Sin embargo, los mecanismos responsables de la resorción del hueso apical no se han establecido completamente, algunos autores sugieren que la resorción ósea está estrechamente vinculada con la infiltración de células inflamatorias en las lesiones periapicales y que las citocinas producidas en los tejidos inflamados son las responsables de la periodontitis apical, siendo la IL-1 la citocina que recientemente ha sido considerada relevante en la patogénesis de las lesiones periapicales inducidas en modelos animales por medio de la exposición del tejido pulpar al medio bucal [110, 111]. Actualmente se ha demostrado que la IL-1 $\beta$  es una citocina pro-inflamatoria capaz de estimular de manera importante a la resorción ósea del hueso periapical [112].

Diversos estudios han demostrado la presencia de una mayor cantidad de macrófagos productores de IL-1 $\beta$  que de IL- $\alpha$  en una etapa temprana de la lesión periapical (que no rebasa los 14 días) donde ocurre la activación de la destrucción ósea periapical en lesiones inducidas, mientras que en la etapa tardía o crónica de la lesión los niveles de IL-1 $\beta$  disminuyen al mismo tiempo que se incrementan los niveles de IL-1 $\alpha$ , y aparecen numerosos osteoblastos y la etapa de remodelación ósea inicia [70].

Por medio de la técnica de RT-PCR pudimos corroborar la producción de IL-1 $\beta$  en el sitio de los tejidos dañados 7 días después de la exposición pulpar. Los niveles de IL-1 $\beta$  fueron mayores en los grupos experimentales [STZ(D) y STZ(ND)] que en el grupo control (VEHÍCULO). Los niveles incrementados de IL-1 $\beta$  en el tejido periapical de los ratones hiperglucémicos [STZ(D)] puede explicarse por la condición patológica de diabetes, además de que a nivel sistémico también se encontró incrementada. Por otro lado, en el grupo experimental de ratones no hiperglucémicos [STZ(ND)] los niveles incrementados de IL-1 $\beta$  podrían deberse a la administración de STZ, que aunque no provocó la inducción de hiperglucemia, si pudo haber generado reacciones inmunológicas que condujeran a una reacción inflamatoria local aumentada en los tejidos periapicales.

Se ha propuesto que IFN- $\gamma$  juega un papel importante en la destrucción del hueso periapical [76] participando como mediador clave para la activación de macrófagos que regulan la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y por promover la síntesis de óxido nítrico. [78,113,114]. Algunos estudios han podido demostrar que las respuestas inmunológicas de tipo Th1 mediadas por IFN- $\gamma$  y otras citocinas pro-inflamatorias, están involucradas con la progresión de la lesión y destrucción ósea en la etapa inicial de la patología periapical mientras que los mecanismos inmunosupresores mediados por citocinas de tipo Th2 inhiben a los mecanismos inflamatorios y promueven la curación en la fase tardía [115]. Nuestros resultados coinciden con los datos reportados en los que a los 7 días post-lesión es evidente la producción de IFN- $\gamma$  en los tejidos dañados, sin embargo pudimos observar que su expresión es mayor cuando se lleva a cabo la administración de STZ y se incrementa aún más en aquellos ratones que sumado a la inyección con STZ presentaron condiciones de hiperglucemia y signos similares a DMT-2.

La periodontitis apical da como resultado una inflamación en el periodonto con un origen endodóntico, el cual puede llegar a una fase crónica caracterizada por tejido de granulación, con un cambio de infiltrado polimorfonuclear de la etapa aguda a mononuclear donde predominan linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, este proceso se ve promovido por citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , las cuales a su vez activan los osteoclastos y por tanto la reabsorción ósea. Hay autores que opinan que no existe diferencia significativa de resorción ósea alveolar entre diabéticos tipo 2 y no diabéticos. En nuestro estudio todas las muestras observadas presentaron un predominio de infiltrado con PMNs, fue mayor la cantidad de células en los diabéticos, siendo un factor que debe ser considerado en la evolución de las lesiones periapicales [59, 116].

Con el conjunto de resultados obtenidos en este estudio podemos decir que en el modelo murino de DMT-2, la condición patológica provocó una mayor producción de IL-1 $\beta$  e IL-4 en suero 7 semanas después de la inducción de DM-T2 con STZ y condujo a una disminución de IFN- $\gamma$ . Inducir una lesión periapical aguda con una duración de 7 días favoreció la producción progresiva elevada de estas citocinas en suero, a una producción incrementada de los transcritos para IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en los tejidos afectados y a un mayor infiltrado celular donde abundan predominantemente PMNs

## 9. CONCLUSIONES

1. La administración intraperitoneal de dosis única de STZ (130mg/kg) a ratones BALB/c machos con una edad no mayor a 7 semanas y con un ayuno mínimo de 5 horas permitió la inducción de un modelo experimental de DMT-2 con signos de hiperglucemia, poliuria, polidipsia, polifagia e intolerancia a la glucosa.

2.- En un modelo experimental de DMT-2 existió una mayor producción de IL-1 $\beta$  e IL-4 en suero 7 semanas post-inducción con STZ, mientras que la cantidad de IFN- $\gamma$  disminuyó.

3.- Inducir una lesión periapical aguda por medio de la exposición del tejido pulpar durante 7 días al medio bucal, favoreció al incremento progresivo de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en suero en los ratones a los que se les administró STZ y en los que solo recibieron vehículo. IL-4 aumentó progresivamente en el grupo con vehículo y en el grupo de ratones con STZ no hiperglucémicos, sin embargo disminuye 7 días después de inducir la lesión periapical en los ratones del grupo con STZ e hiperglucemia.

4.- Después de 7 días de inducir una lesión periapical aguda se incrementó la producción de los transcritos para IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  en los tejidos afectados de los ratones sometidos a un modelo con STZ, sin embargo se produce mas IFN- $\gamma$  en presencia de hiperglucemia.

5.- El análisis histológico mostró que existe un mayor infiltrado inflamatorio en los tejidos relacionados con una lesión periapical aguda donde predominan abundantes PMNs en los ratones a los que les fue administrada STZ.

6.- El modelo murino de DMT-2 sugiere que la hiperglucemia repercute en el desarrollo de una lesión periapical aguda.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Cohen (2002), *Vías de la pulpa*, Editorial Elsevier Service, España
- 2.- Segura EJ, Cisneros CR, Llamas CJ, Velasco OE. (2009) Pain associated with root canal treatment. [Int Endod J](#). Jul;42(7):614-20. Epub 2009 May 8.
- 3.- Rodriguez NA, Cisneros CR, Velasco OE, Llamas CJ, Torres LD, Segura EJ. (2009) "Antibiotic use by members of the Spanish Endodontic Society." *Int Endod J*. Sep;35(9):1198-203. Epub 2009 Jul 22.
- 4.- Canalda S.C, Aguadé B.E. (2001), *Endodoncia, Técnicas clínicas y bases científicas*, Editorial Masson, Barcelona
- 5.- Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H (1992) Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions. Correlations with clinical findings of the involved teeth. *JOE*; 18 497-500
- 6.- Haofei X y cols. (2007) Effect of an Estrogen-deficient State and Alendronate Therapy on Bone Loss Resulting from Experimental Periapical Lesions in Rats. *JOE*—November Vol 33, No 11ç
- 7.- Brekalo I, Kocjan W, Gordana S, Pezelj S, (2007) Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin 6 in Human Periapical Lesions. *Mediators of Inflammation* Volume 2007, Article ID 38210, 4 pages
- 8.- Seltzer S, Naidorf I J, Flare-ups in endodontics.(1985). Etiological factors. *J Endodon*;11:472-8.
- 9.- Fouad AF (2003) "Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections". *Journal of Dental Education*; 67:459-467
- 10.- Martínez CS, Martínez CJ, Esquivel HR, (1998). "Hígado y Sistema Endócrino. Su participación en el metabolismo". UNAM. México
- 11.- McPhee S, Ganong W, Lingappa V, Lange J. (2000). "Fisiopatología médica. Una introducción a la medicina interna". 2ª edición. Editorial Manual Moderno. México
- 12.- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H., Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53
- 13.- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J., *Global and societal implications of the diabetic epidemic*. *Nature* 2001, 414: 782-787
- 14.- International Diabetes Federation. (2006), *Diabetes Atlas*, Third edition. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Prevalence estimates of diabetes mellitus (DM), 2030. Disponible en [http:// www.diabetesatlas.org/content/prevalence-estimates-diabetes-mellitus- dm-2030](http://www.diabetesatlas.org/content/prevalence-estimates-diabetes-mellitus-dm-2030)
- 15.- Gomis R, Rovira A, Felú J, Oyarzábal M, (2007), *Tratado SED de Diabetes Mellitus*. Editorial Médica Panamericana, Madrid España

- 16.- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:1183-1197.
- 17.- Kronenberg H, Melmed S, Polonsky K, Reed P (2008), *Williams Textbook of Endocrinology*, 11a edición, Editorial Saunders Elsevier, Canada.
- 18.- Charles MA, Shipley MJ, Rose G, (1991) *Risk factors for NIDDM in white population: Paris prospective study*. *Diabetes*; 40:796-799
- 19.- McCance DR, Hanson RL, Charles MA, (1994), *Comparison of tests for glycated haemoglobin and fasting and two hours plasma glucose concentrations as diagnostic methods for diabetes*. *BMJ*;308:1323-1328.
- 20.- Hong Y, Pedersen NL, Brismar K, de Faire U. (1997). *Genetic and environmental architecture of the features of the insuline resistance síndrome*. *Am J Hum Genet*: 60:143-152
- 21.- Haffner SM, Stern MP, Dunn J, (1990), *Diminished insulin sensitivity and increased insulin response in nonobese, nondiabetic Mexican Americans*. *Metabolism*; 39:842-847
- 22.- Lilliojia S, Mott DM, Howard BV, (1988) *Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action: longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians*. *N Engl J MED*; 318:1217-1225
- 23.- Greenspan F, Gardner D, (2003). "Endocrinología básica y clínica". 5ª edición. Editorial Manual Moderno. México.
- 24.- Ganong W. (2004), *Fisiología Médica*, 19ª edición, Editorial Manual Moderno. México. pp 543
- 25.- Mealey B, Oates T. (2006). "Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases". [Journal of Periodontology](#). Vol. 77, No. 8, Pages 1289-1303
- 26.- Geerlings S, Hoepelman A., (1999) "Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM)", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 26 (1999) 259-265
- 27.- Fouad A., Barry J., Russo J., Radolf J., Zhu Q. (2002)" Periapical Lesion Progression with Controlled Microbial Inoculation in a Type I Diabetic Mouse Model" *Journal of Endodontics*, Volume 28, Issue 1, January 2002, Pages 8-16
- 28.- Joshi N, Caputo GM, Weitecamp MR, Karchmer AW. (1999) "Infections in patients with diabetes mellitus". *N Engl J Med* 1999;341:1906–12.
- 29.- Matsuo T, Shino A, Iwatsuka H, Suzuoki Z. (1970) *Induction of overt diabetes in KK mice by dietary means*. *Endocrinol Jpn*; 17:477-488
- 30.- Leiter EH, Reifsnyder PC, Flurkey K. (1998) *NIDDM genes in mice, deleterious synergism by both parental genomes contributes to diabetogenic thresholds*. *Diabetes*;47:1287-1295.

- 31.- Blair SC, Caterson ID, Cooney GJ. *Glucose and lipid metabolism in gold-thioglucose injected mouse model of diabetes*. In Shafir E (ed). *Lessons from Animal Diabetes IV*. Boston, Birkhauser, 1996: 239-267
- 32.- Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J. (1995) *Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice*. *Metabolism*; 44: 645-651
- 33.- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. (1996). "Evidence that diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice". *Cell* 84:491-495
- 34.- Yamazaki M, Kato A, Kato C, Fujii E, Adachi K, Miyoshi A, Suzuki M. (2009) "Segmentation of the pathophysiological stage of diabetic changes in the db/db mouse". *J Toxicol Pathol*; 22: 133-137
- 35.- Portha B, Picon L, Rosselin G. (1979) *Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes*. *Diabetología*; 17:371-377
- 36.- Sánchez-Zamora Y, Terrazas LI, Vilches-Flores A, Leal E, Juárez I, Whitacre C, Kithcart A, Pruitt J, Sielecki T, Saroskar AR, Rodríguez-Sosa M. (2010) *Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *FASEB J*; 24:2583-2590
- 37.- Hayashi K, Kojima R, Ito M. (2006) *Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice*. *Biol Pharm Bull*; 29:1110-1119
- 38.- Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Hayashi K, Naruse A. (2001) *Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice*. *Environ Toxicol Pharmacol*; 9:71-78
- 39.- Østavik D., Pitt FT., (2008) *Essential Endodontology Prevention and Treatment of Apical periodontitis*, 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell Munksgaard, Singapore
- 40.- Simon JH, Glick DH, Frank AL.(1972) The relationship of endodontic-periodontic lesions. *J Clin Periodontol.*;43:202
- 41.- Sundqvist G. (1992) "Ecology of the root canal flora". *J Endodo*; 18:427-430
- 42.- Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. (1997). "Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp." *Oral Microbiol Immunol*;12:318-322
- 43.- Fabricus L, Dahlén G, Holm SE, Möller ÅJR (1982), "Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. *Scandinavian Journal of Dental Research*;90:134-144

- 44.- Munson MA, Pitt Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG (2002). "Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *Journal of Dental Research*;81:761-766
- 45.- Nair R (1987). "Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics*; 13: 29-39
- 46.- Billings F (1913) "Chronic focal infection as a causative factor in chronic arthritis". *Journal of the American Medical Association*; 61: 819-823. Revisado en: Østavik D., Pitt FT., (2008) *Essential Endontology Prevention and Treatment of Apical periodontitis*, 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell Munksgaard, Singapore
- 47.- Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L (1994) "Systemic diseases caused by microorganisms. *Endodontics and Dental Traumatology*; 11: 57-65. Revisado en: Østavik D., Pitt FT., (2008) *Essential Endontology Prevention and Treatment of Apical periodontitis*, 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell Munksgaard, Singapore
- 48.- Marton IJ, Kiss C (2000) *Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis*. *Oral Microbiol Immunol*, 15:139-150
- 49.- Torabinejad M, Walton R (2010) "Endodoncia, principios y práctica". Versión en español de la 4<sup>a</sup> edición de la obra en inglés. Saunders. Elsevier. Barcelona-España USA: 56-65
- 50.- Cohen W, Bonta Y. (2004). Gingivitis: An inflammatory Periodontal Disease. A supplement to compendium of continuing education in dentistry. Medical World Business Press. Vol.25, No.7 (Suppl 1)
- 51.- McCance KL, Huether SE eds (2002). *Pathophysiology-The Biologic Basis for Disease in Adults and Children*. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia; Pa Mosby; 199
- 52.- Roitt I, (2003) "Inmunología : fundamentos", Médica Panamericana, México.
- 53.- Rojas EO (2006). "Inmunología de memoria", 3<sup>a</sup> edición, Médica Panamericana. México.
- 54.- Fernández-Real, J.M., Pickup JC (2007) Innate immunity. Insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrinology and metabolism*. 19 (1):10-16
- 55.-Abbas AK., Lichtman AH. (2005). *Inmunología celular y molecular*. 5<sup>a</sup> edición, Elsevier. España
- 56.- McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J (1991). The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. *J Endod*; 17:97-100.
- 57.- Nair PN. (1997)"Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response". *Periodontology* 2000;13:121–148
- 58.- Morsani J, Aminoshariae A, Han Y, Montagnese T, Mickel A. (2011) "Genetic Predisposition to Persistent Apical Periodontitis". *J Endod*;37:455-459

- 59.- Nair PN (2004) "Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Causes of Endodontic Failures". Crit Rev Oral Biol Med; 15(6):348-38
- 60.- AAE Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology (2009), JOE Vol 35 Numero 12 Diciembre
- 61.- Leonardo M., Leal J., (1994), *Endodoncia, Tratamiento de los conductos radiculares*, Editorial Médica Panamericana, Argentina
- 62.- Ingle B, (1996), *Endodoncia*, Editorial Mc Graw Hill, 4ª Edición, México
- 63.- Weine FS, (1997), *Tratamiento Endodóntico*, Editorial Edit. Harcourt Brace, España
- 64.- Bhaskar SN (1966). "Periapical lesions-types, incidencia and clinical features". Oral Surg.; 21:657-671
- 65.- Fish EW. "Bone infection" J Amer Dent Assoc 1939;26-691-712. En: .- Canalda S.C, Aguadé B.E. (2001), *Endodoncia, Técnicas clínicas y bases científicas*, Editorial Masson, Barcelona pp:77-78
- 66.- Huang GT, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N.(2001) Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. ;92:83-88.
- 67.- Haofei Xiong, Lili Wei, Bin Peng (2009) "[Immunohistochemical Localization of IL-17 in Induced Rat Periapical Lesions](#)", Journal of Endodontics, Volume 35, Issue 2, February, Pages 216-220
- 68.- Kawashima N., Okiji T., Kosaka T., Suda H.(1996) "[Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: A quantitative immunohistochemical study](#)" Journal of Endodontics, Volume 22, Issue 6, June 1996, Pages 311-316
- 69.- Shimauchi H, Takayama S, Imai-Tanaka T, Okada H. (1998) "[Balance of interleukin-1 \$\beta\$  and interleukin-1 receptor antagonist in human periapical lesions](#)". Journal of Endodontics, Volume 24, Issue 2, February Pages 116-119
- 70.- Matsumoto A, Anan H, Maeda K. (1998) "An immunohistochemical study of the behavior of cells expressing interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta within experimentally induced periapical lesions in rats". J Endodon ;24:811-6.
- 71.- Darling AL (1973) "Inflamación periapical". En: Goldman HM Patología oral, Editorial Salvat, Barcelona
- 72.- Levine D, Witherspoon D, Gutmann J, Iacopino A. (2001) "[Interleukin-1 \$\beta\$  Production in Periradicular Lesions in a Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome Model Compared with a Noninfected Host.](#)" *Journal of Endodontics, Volume 27, Issue 8, August, Pages 499-502*

- 73.-Matsuo T, Ebisu S, Nakanishi T, Yonemura K, Harada Y, Okada H.(1994) "Interleukin 1 a and interleukin 1 b in periapical exudates of infected root canals: correlations with the clinical findings of the involved teeth". J Endodon; 20:432-5.
- 74.- Wisithphrom K, Windsor L (2006) "[The Effects of Tumor Necrosis Factor- \$\alpha\$ , Interleukin-1 \$\beta\$ , Interleukin-6, and Transforming Growth Factor- \$\beta\$ 1 on Pulp Fibroblast Mediated Collagen Degradation](#)" Journal of Endodontics, Volume 32, Issue 9, September 2006, Pages 853-861
- 75.- Brekalo I, Kocjan W, Gordana S, Pezelj S, (2007) Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin 6 in Human Periapical Lesions. Mediators of Inflammation Volume 2007, Article ID 38210, 4 pages
- 76.- Menezes R, Garlet TP, Letra A. (2008) Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of lesions. Journal of Endodontics 34, 932–8.
- 77.- Okamura, H., S. Kashiwamura, H. Tsutsui, T. Yoshimoto, and K. Nakanishi. (1998). Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. Curr. Opin. Immunol. 10:259–264
- 78.- Kawashima N, Suzuki N, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, Suda H (2007) Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics 103, 707–11.
- 79.- Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM.(1994), "Pathogenesis of induced rat periapical lesions". Oral Surg Oral Med Oral Pathol ;78:494-502
- 80.- Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P.(1994) "Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions". Oral Microbiol Immunol;9:129–35.
- 81.- Kohsaka T y cols. (2002). "Periapical Lesions in Rats with Streptozotocin- Induced Diabetes. JOE. Vol 28. No1 Enero.
- 82.- Vernillo AT (2003) *Diabetes mellitus: relevance to dental treatment*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics; 91; 263-270
- 83.- Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B (1997) *Impaired leukocyte functions in diabetic patients*. Diabetes Medicine;14, 29-34
- 84.- Saiki O, Negoro S, Tsuyuguchi I, Yamamura Y. (1980). "Depressed immunological defense mechanisms in mice with experimentally induced diabetes". Infect Immun.; 28:127-131
- 85.- Gustke CJ, Stein SH, Hart TC, Hoffman WH, Hanes PJ, Russel CM, Schuster GS, Watson SC. (1998). "HLA-DR alleles are associated with IDDM, but not with impaired neutrophil chemotaxis in IDDM. J Dent Res 77:1497-1503
- 86.- Figdor D. (2002). "Apical periodontitis: a very prevalent problem". Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics; 94:651-2

- 87.- Jimenez PA, Segura EJ, Poyato FM, Velasco OE, Rios SJ. (2004). "Prevalence of apical periodontitis and frequency of root filled teeth in an adult Spanish population". *International Endodontic Journal*, 37:167-173
- 88.- Katz J, Chaushu G, Sgan-Cohen HD, (2000). "Relationship of blood glucose level to community periodontal Index of treatment needs and body mass index in a permanent Israeli military populations; 71: 1521-1527
- 89.- Katz J, (2001). "Elevated blood glucose levels in patients with severe periodontal disease". *J Clin Periodontol*;28:710-2
- 90.- Grossi SG, Genco RJ (1998). "Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship". *Ann Periodontol*;3:51-61
- 91.- Leandro RB, Katz J, Guelmann M, Heft M. (2003). "Periradicular radiographic assessment in diabetic and control individuals". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 96: 449-52
- 92.- Segura EJ, Jimenez PA, Ríos SJ (2005). "High prevalence of apical periodontitis amongst type 2 diabetic patients". *Int Endod J* ;38:564-9.
- 93.- Cheraskin E, Ringsdorf WM Jr.(1968). "The biology of the endodontic patient, 3: variability in periapical healing and blood glucose." *J Oral Med* ;23(3):87-90
- 94.- Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, Nakamura H, Kameyama Y, Kapila Y. (2003) "The Effect of High Sugar Intake of the Development of Periradicular Lesions in Rats with type 2 Diabetes". *J Dent Res* 82(4):322-325
- 95.- Sano T, Matsuura T, Ozaki K, Narama I. (2011). "Dental Caries and Caries-Related Periodontitis in Type 2 Diabetic Mice. *Vet Pathol* 48(2):506-512
- 96.- Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO, *et al.* (2001). "Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes". *J Am Soc Nephrol* 12:779-790.
- 97.- Hough S, Avioli LV, Bergfeld MA, Fallon MD, Slatopolsky E, Teitelbaum SL (1981). Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. *Endocrinology* 108:2228-2234
- 98.- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigación*. 48:2129-2139
- 99.- Konrad R, Mikolaenko I, Tolar J, Liu K, Kudlow E. (2001). The potencial mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic B-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-B-D-glucosaminidase. *Biochem J.*, 356: 31-41

- 100.- Schned WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. *Diabetes* 43 (11): 1326-1333
- 101.- Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Hayashi K, Naruse A. (2001). Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 9:71-78
- 102.- De la Mora CM (2009) Participación del factor inhibidor de la migración de macrófagos en la diabetes inducida con una sola dosis de estreptozotocina / tesis para obtener el título de Biólogo, México D.F.
- 103.- Zkang M, Lu XY, Li J, Xu ZG, Chen L, (2008) The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Experimental diabetes research*; 2008:704045
- 104.- Bedard K, Strecko J, Theriault K, Bedard J, Veyrat-Durebex C, Gaudreau P. (2008), Effect of high glucose environment on the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor: type 1 diabetes compared with in vitro glucotoxicity. *American Journal of physiology*; 294: 740-751.
- 105.- Esperanza García Reyes (2012) Caracterización del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino. /Tesis para obtener el grado de Maestras en Ciencias Biológicas. México D.F.
- 106.- O'Connor J, Satpathy A, Hartman M, Johnson W, Freund G, Horvath E, Kelley K, Dantzer R. (2005) IL-1B MEDIATED INNATE IMMUNITY IS AMPLIFIED IN THE DB/DB MOUSE MODEL OF Type 2 diabetes *J Immunol* 2005;174;4991-4997
- 107.- Sun N, Yang G, Zhao H, Savelkoul J, ( 2005) Multidose Streptozotocin Induction of Diabetes in BALB/cMice Induces a Dominant Oxidative Macrophage and a Conversion of TH1 to TH2 Phenotypes During Disease Progression, *Mediators of Inflammation*. 4 : 202–209
- 108.- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RT (1966) . The effect of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg* ;20:340-9.
- 109.- Balto K, Sasaki H, Stashenko P. (2001) Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun*; 69:744 –50.
- 110.- Torabinejad M, Eby WC, Naidorf JJ.(1985) Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J Endodon* ; 11:479-88.
- 111.- Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. (1994). Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*;78:494-502.
- 112.- Stashenko P, Dewhirst FE, Peros W J, Kent RL, Ago JM. (1987). Synergistic interaction between interleukin-1, tumor necrosis factor and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*;138:1464-8.

113.- Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ (2009) Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiology and Immunology* 24, 25–31.

114.- Silva MJB, Sousa LMA, Lara VPL et al. (2011) The Role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *Journal of Dental Research* 90, 495–500.

115.- Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP.(2012) Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J.* Apr;45(4):354-62

116.- Atao lu T, Ungör M, Serpek B, Halilo lu S, Atao lu H, Ari H. (2002). Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. *Int Endod J.*;35(2):181-85.

## 11. APÉNDICES

### 11.1 APÉNDICE 1:

#### SOLUCIONES Y REACTIVOS

##### **Buffer de solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) para 10 L pH 7.4**

- 80 gr NaCl (J.T. Baker)
- 11.6 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J.T. Baker)
- 2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. Baker)
- 2gr KCl (J.T. Baker)

##### **Buffer TBE 10X**

- Tris base (890 mM) (ICN Biomedicals Inc.)
- Ácido bórico (890 mM) (J.T. Baker)
- 40 ml de EDTA disódico (0.5 M) (J.T. Baker)

Se ajusta a pH 8.0 y se afora con H<sub>2</sub>O destilada hasta 500 ml

##### **Buffer de pegado (ELISA)**

- 0.1 M de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (J.T. Baker)

Para 1 L con agua destilada

##### **Solución de bloqueo (ELISA)**

- 1000 ml de PBS ml mas 1% de Albúmina sérica bovina (J.T. Baker)

##### **Solución de lavado (ELISA)**

- 1000 ml de PBS más 0.5% Tween 20 (Promega co.)

### **Sustrato ABTS para revelado (ELISA)**

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN Biochemicals Inc.) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (tecsiquim) en agua H<sub>2</sub>O destilada y con NaOH (Monterrey), llevar a pH 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 11 ml en tubos y se congelaron para su uso a -70°C.

## 11.2 APÉNDICE 2:

### Condiciones de PCR's

Gen	Secuencias de primers (dirección 5'-3')	Producto (pb)	T-alineación	Ciclos
GAPDH	(F) TCggTgTgAACggATTTggC (R) CTCTTgCTCAgTgTCCTTgC	1035 pb	56 °C	35
IL-1 $\beta$	(F) GAGTGTGGATCCCAAGCAAT (R) CTCAGTGCAGGCTATGACCA Referencia Hwang J. (2011)	500 pb	59 °C	40
IFN- $\gamma$	(F) AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG (R) GTCACAGTTTTCGCTGTATAGGG	243 pb	54 °C	40

### 11.3 APÉNDICE 3

#### Condiciones para estudio histológico:

##### Formalina 4%

Formaldehído	(40 ml)
Agua destilada	(960 ml)
Fosfato de sodio monobásico	(4 gr)
Fosfato de sodio dibásico	(6.5 gr)

##### Solución para la descalcificación, EDTA 7 %

EDTA Sigma	(70 gr)
Agua destilada	(800 ml)

Agregar Hidróxido de sodio en la solución y se disuelve con ayuda de una barra magnética, hasta que se disuelva totalmente el EDTA. Se ajusta el pH a 7.4 con ayuda de HCl y aforar la solución a 1000 ml.

##### Proceso de inclusión:

Lavar con agua corriente 30´

OH 50° 30´

OH 60° 20´

OH 70° 20´

OH 75° 20´

OH 80° 20´

OH 85° 20´

OH 90° 20´

OH 96° 20´

OH 100° 20´

OH 100° 20´

Colocar en aceite de cedro 20´y posteriormente lavar con amílico haciendo mínimo 3 cambios.

OH Amílico 20´

OH Amílico 20´

Parafina 1 (24 hrs)

Parafina 2 (24 hrs)

### **Solución Hematoxilina de Harris para tinción:**

Hematoxilina de Harris

Hycel de México

Se utiliza directamente del frasco hasta que cubra las láminas donde se encuentran los cortes a teñir

### **Eosina acidificada**

Eosina amarillenta (20 gr) Sigma

H2O destilada (500 ml)

HCl (10 ml)

Mezclar la eosina amarillenta en el agua destilada, agregar el HCl lentamente por las paredes del recipiente y dejar que se asiente la mezcla durante toda la noche. Se lava el precipitado mediante filtración con papel filtro y agua destilada varias veces (5-8 veces). Secar la pastilla que quedó en el papel filtro en un horno a 60 °C durante 24 hrs. Una vez seca la pastilla, colocarla en un mortero y macerar finamente la pastilla, una vez macerada agregar 1000 ml de alcohol 96°.

### Proceso de tinción Hematoxilina-Eosina

Xilol I	5´
Xilol II	5´
Alcohol-Xilol	3´
OH 100	3´
OH 90	2´
OH 80	2´
Oh 70	1´
Agua corriente	3´
Hematoxilina	5´
Agua corriente	lavado
Alcohol ácido	lavado
Agua amoniacal	lavado
Agua corriente	1´
Eosina alcohólica	5´
Agua corriente	lavado
OH 70	1´
OH 90	1´
OH 100	2´
Alcohol-Xilol	3´
Xilol I	5´
Xilol II	5´