



Universidad Nacional Autónoma de México  

---

Facultad De Estudios Superiores Iztacala

Efecto del estrés mecánico en hueso alveolar de ratas  
diabetizadas con estreptozotocina

TESIS

Que para obtener el título de Cirujana Dentista

P R E S E N T A

OLALDE VÁZQUEZ ADRIANA BELÉN

Director Dr. José Francisco Gómez Clavel.

Dictaminadores Dr. Maximiliano Ibarra Barajas  
Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, Agosto del 2014.



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.

# Tabla de contenido

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>Marco teórico.....</b>	<b>11</b>
<b><i>Diabetes mellitus.....</i></b>	<b>11</b>
<i>Etiología y clasificación.....</i>	11
<i>Diagnóstico.....</i>	15
<i>Incidencia y prevalencia.....</i>	15
<i>Factores de riesgo .....</i>	17
<i>Alteraciones en la Diabetes mellitus .....</i>	18
<i>Productos de glicación avanzada.....</i>	19
<i>Manifestaciones orales de la Diabetes mellitus .....</i>	21
<b><i>Modelo de estudio de la Diabetes mellitus experimental bajo estrés mecánico ....</i></b>	<b>25</b>
<i>Estreptozotocina. Diabetes experimental.....</i>	25
<i>Tejidos involucrados en el estrés mecánico (periodonto) .....</i>	27
<i>Encía.....</i>	28
<i>Cemento radicular.....</i>	29
<i>Ligamento periodontal.....</i>	31
<i>Tejido óseo. Osteocitos, osteoblastos y osteoclastos .....</i>	34
<i>Biología Ósea.....</i>	40
<i>Remodelado óseo.....</i>	40
<i>Inflamación, diabetes y remodelado .....</i>	44
<i>Movimiento ortodóncico.....</i>	47

<i>Fenómenos en el lado de compresión</i> .....	50
<i>Fenómenos en el lado de tensión</i> .....	50
<i>Efectos de la presión ortodóncica en ligamento periodontal</i> .....	51
<i>Efectos de la presión ortodóncica en cemento radicular</i> .....	53
<i>Efectos de la presión ortodóncica en hueso alveolar</i> .....	53
<i>Acontecimientos biológicos ante una fuerza intensa</i> .....	54
<b>Metodología</b> .....	<b>55</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>65</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>74</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>78</b>
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>79</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>86</b>

## AGRADECIMENTOS



El primero de muchos logros por venir...

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México porque desde hace ya varios años ha sido mi casa de formación educativa.

A mis profesores y compañeros de carrera, por compartir sus conocimientos y experiencias.

Al doctor Gómez Clavel. Gracias doctor por su apoyo, por su tiempo, su paciencia, sus conocimientos, su confianza y por ser mi guía durante este tiempo.

A mis sinodales de tesis, al Dr. Max Ibarra, Dra. Leti Verdín, Dr. Marco Rodríguez, Dra. Cynthia Trejo y Dra. Elsa Calleja. Gracias infinitas a ustedes. Gracias por confiar en mí, por su ayuda y siempre darme las facilidades para realizar mi proyecto.

Al laboratorio de inmunobiología. Nada más que buenos recuerdos y buenos amigos me llevo de ahí. Gracias por tantos festejos y logros compartidos, gracias por su amistad. Gracias Dra. Verdín, la recuerdo siempre con esa gran sonrisa, buen humor y fortaleza. Gracias por todo.

A Miriam, Karen, Aris, Ximena y Gustavo. Gracias porque después de ser compañeros se convirtieron en mi compañía y apoyo. Gracias por alentarme siempre a seguir. Mucho éxito para ustedes.

QFB Fes Cuautitlán. Amigos entrañables, siempre conmigo, siempre cuidándome. Berry, que puedo decir,...sin llave no hay llavero! Te quiero china.

Axel. Gracias por ser mi fuerza y apoyo por confiar y hacerme creer en mí.

A mi familia, gracias por su apoyo incondicional, suceda lo que suceda siempre están conmigo, en las buenas y en las malas. Gracias por su paciencia y cariño. Gracias por darme esa fortaleza para llegar a este día. Gracias por dejarme ser.

Gracias a todos.

## Resumen

---

En este estudio evaluamos el efecto de la diabetes mellitus tipo 1 sobre las células óseas en presencia de estrés mecánico, con el objetivo de cuantificar el número de osteoclastos y medir el área de la laguna osteocitaria en el hueso alveolar de ratas hiperglicémicas sometidas a estrés mecánico. Se utilizó un modelo animal de diabetes experimental utilizando una dosis única de 65mg/Kg de peso corporal de estreptozotocina para inducir el estado diabético en los grupos experimentales. En los grupos testigo se utilizó una dosis única de 1ml. /Kg de peso corporal de solución de buffer de citratos con un pH de 4.5. Una vez corroborado el estado hiperglicémico o normoglicémico según el caso, se colocó un aparato de ortodoncia formado con un alambre de níquel-titanio en forma de “U” entre los primeros y segundos molares superiores. Se realizó el sacrificio a los 2, 4 y 6 días posteriores a la colocación del aparato, el maxilar fue extraído y procesado mediante la técnica histológica convencional.

En el análisis histológico se contaron el número de osteoclastos presentes en el hueso interradicular del primer molar así como el área de las lagunas osteocitarias utilizando los aumentos a 10x y 40x. Resultados: en los grupos hiperglicémicos fue notorio el aumento en el número de osteoclastos y del área de la laguna osteocitaria, nuestras diferencias en comparación con los grupos testigo fueron significativas en ambos casos.



# Introducción

---

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico que se presenta aproximadamente en el 3 al 4% de la población. La enfermedad se caracteriza por hiperglicemia crónica causada por una deficiencia de insulina, la persistente concentración elevada de glucosa en sangre da lugar a complicaciones agudas y crónicas causando daños a diversos órganos.

La diabetes tipo 1 es causada por una deficiencia absoluta de la secreción de insulina, originada por una respuesta autoinmune que destruye a las células  $\beta$  pancreáticas. Las manifestaciones orales asociadas con la diabetes están en la mayoría de los casos asociadas al paciente no controlado o mal controlado.

Entre las complicaciones a largo plazo, se encuentran alteraciones en el metabolismo óseo, incluyendo la disminución de la densidad ósea que puede conducir a fracturas, así como alteraciones en la reparación y la regeneración ósea, incluso en los pacientes tratados con insulina. La mayoría de los estudios de pacientes diabéticos tipo 1 muestran disminuidos los valores de densidad mineral ósea (DMO), incluso cuando el inicio de la enfermedad ocurre después de que se ha logrado la masa ósea máxima. Aproximadamente el 60 % de la masa ósea en adultos, incluyendo a las estructuras craneofaciales, se alcanza durante el período pico de crecimiento, que cuando coincide con el inicio de DM afecta el proceso de formación ósea (Abbassy y cols. 2008).

El mecanismo de la osteopenia en la diabetes está siendo estudiado pues aún no es muy claro, se ha propuesto que la formación deficiente de hueso es debida a una disminución de la actividad osteoblástica, pero es muy poca la información acerca de los efectos de la diabetes mellitus en el remodelado, formación y resorción del hueso alveolar que rodea al diente (Mishima y cols. 2002).

La mayoría de los pacientes que son tratados con ortodoncia son individuos jóvenes y sanos, sin embargo en los últimos 20 años ha habido un aumento dramático en el número de pacientes adultos que buscan un tratamiento de ortodoncia y muchos de ellos padecen enfermedades crónicas (Bensch y cols. 2004). La necesidad de tratamientos ortodóncicos en pacientes diabéticos se ha asociado a problemas oclusales y a anormalidades en el

desarrollo mandibular debido a que los pacientes con diabetes mellitus (DM) tipo 1 han mostrado una disminución en los valores de densidad ósea (Villarino y cols. 2011).

Para provocar el movimiento dentario es necesaria la aplicación de fuerzas mecánicas, capaces de activar a las células óseas y producir cambios inflamatorios en el tejido periodontal en el lado de la tensión y en el lado de presión. Dependiendo de la magnitud y duración de la fuerza aplicada se iniciara un proceso de reacciones óseas necesarias para producir el cambio de posición de los dientes en la arcada (Mérida 2011). La resorción ósea es causada por la actividad de los osteoclastos en el lado de compresión y por la formación inducida de hueso nuevo por osteoblastos en el lado de tensión. Una alteración del estado metabólico que interfiere con la remodelación ósea puede resultar en una tasa diferente de movimiento. Por lo tanto, la diabetes puede afectar el movimiento dental durante el tratamiento ortodóncico y la estabilidad o retención posterior al tratamiento (Braga y cols. 2011).

Varios mecanismos se han reportado para explicar la remodelación ósea alterada en la diabetes donde se sabe disminuye la formación de hueso como resultado de la disminución de la actividad osteoblástica. Sin embargo, todavía es controversial si el reclutamiento y la función osteoclástica están alteradas en la diabetes, porque según lo reportado por Villarino y cols en el 2006 no existen cambios o disminución en la actividad de los osteoclastos (Villarino y cols. 2006).

De acuerdo a Bensch y cols. (2003), Burden y cols. (2001), Proffit y Fields (2001), si la diabetes está controlada adecuadamente, la respuesta periodontal y del hueso ante las fuerzas ortodóncicas será casi normal, pudiendo obtener resultados satisfactorios. Por el contrario, si la diabetes no está bien controlada se acepta que será un factor de riesgo real para la aceleración de la enfermedad periodontal. Por lo tanto un tratamiento ortodóncico estará contraindicado mientras el trastorno metabólico no sea compensado (Villarino y cols. 2011).

El tejido óseo se renueva constantemente por la acción coordinada de osteoclastos y osteoblastos. Los osteocitos desempeñan un papel destacado en el inicio del remodelado en un lugar dado del esqueleto. Estos y otras células de estirpe osteoblástica producen diversos mediadores que modulan la diferenciación de los precursores osteoclásticos, paso inicial imprescindible para que comience la resorción. La actividad remodeladora de todo el

esqueleto, puede evaluarse bioquímicamente a través de la medición de los marcadores bioquímicos del remodelado óseo (Reynaga y Zeni 2009). Los marcadores de formación (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina y propéptidos del colágeno tipo I amino y carboxilo terminal) provienen de la actividad de osteoblastos y los de resorción (fosfatasa ácida resistente a tartrato, telopéptidos carboxilo y amino terminales e hidroxiprolina) de los osteoclastos. La utilidad clínica de los marcadores consiste en determinar cambios en el remodelado óseo (Reynaga y Zeni 2009).

Se han realizado estudios sobre la pérdida ósea alveolar en diabéticos con enfermedad periodontal, pero hay poca información sobre los efectos de la DM en la remodelación, formación y reabsorción en la pared alveolar que rodea al diente. Esa pared junto con el ligamento periodontal está implicada en el soporte mecánico dental (Mishima y cols. 2002).

El objetivo de nuestro estudio fue describir los cambios producidos por la DM tipo 1 en las células del hueso alveolar en presencia de estrés mecánico. Nuestros objetivos específicos fueron cuantificar el número de osteoclastos en el hueso alveolar de ratas hiperglicémicas sometido a estrés mecánico así como también medir el área de las lagunas osteocitarias del hueso alveolar sometido a estrés mecánico de ratas hiperglicémicas.

# Marco Teórico

---

## Diabetes mellitus

Llamamos diabetes mellitus (DM) al síndrome hiperglicémico acompañado por desórdenes lipídicos y proteicos, resultado de una deficiencia insulínica pudiendo ser ocasionada por la destrucción de células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina (Diabetes mellitus tipo 1), o bien, por la resistencia de las células ante los efectos de la insulina producida, generalmente relacionada con la obesidad (Diabetes mellitus tipo 2) (Vernillo 2003).

Biológicamente, la insulina es una de las hormonas anabólicas más importantes, es necesaria para:

- 1) El transporte de glucosa y aminoácidos a través de las membranas celulares.
- 2) La formación de glucógeno en el músculo esquelético.
- 3) La síntesis de lípidos.
- 4) Síntesis de ácidos nucleicos
- 5) La síntesis de las proteínas.

Su principal función metabólica consiste en aumentar la velocidad del transporte de la glucosa hacia el interior de las células musculares y adiposas (Mendoza y cols. 2005).

### *Etiología y clasificación*

---

#### *Diabetes mellitus tipo 1*

La gran mayoría de los casos de diabetes se dividen en dos grandes categorías etiopatogénicas. En una categoría, la diabetes tipo 1, es una deficiencia absoluta de la secreción de insulina. Los islotes pancreáticos son destruidos, como resultado de un proceso patológico autoinmune, mediado por células T dejando al paciente totalmente dependiente de insulina exógena. La destrucción autoinmune de las células del páncreas tiene múltiples predisposiciones genéticas. Esto también puede ser causado por factores del medio ambiente, por ejemplo una infección viral congénita, la rubéola o citomegalovirus. Debido al rápido y severo inicio de los síntomas, la diabetes tipo 1 se diagnostica a menudo en la adolescencia y se denomina "diabetes juvenil". El tipo 1 es el trastorno metabólico

más común del sistema endocrino de la infancia y la adolescencia, teniendo una incidencia máxima de los 10 a 14 años. La insulinitis autoinmune, causa de la diabetes tipo1, comprende varias etapas que culminan con la muerte de las células beta. En la primera etapa, los péptidos específicos de células beta con epítopes antigénicos, son procesados por células presentadoras de antígenos en los ganglios linfáticos locales y se forman clones de linfocitos autoreactivos (Ichinose y cols. 2007).

Debido a que las células  $\alpha$  del páncreas son funcionales en estos pacientes, ellos pueden producir el glucagón y por tanto, realizar glucógenolisis. Los pacientes no presentan problemas para sintetizar glucosa por medio de la gluconeogénesis. Sin embargo, la nula producción de insulina trae como consecuencia una disminución del número de transportadores de glucosa Glut 4 en el músculo esquelético y en las células adiposas. El resultado es entonces una hiperglicemia persistente después de la ingestión de alimentos ricos en carbohidratos. El organismo del diabético responde ante los bajos niveles de glucosa en las células dependientes de insulina, como si estuviera en un estado de ayuno prolongado o inanición, movilizand o sus reservas de lípidos y proteínas para obtener la glucosa, lo cual agrava la hiperglicemia. En el caso del tejido adiposo este empieza a movilizar sus lípidos, los ácidos grasos y el glicerol, una vez liberados se unen a lipoproteínas plasmáticas y son transportados al hígado. El metabolismo incrementado de los ácidos grasos y la disminución de la lipogénesis, como producto del déficit de NADPH, da origen al incremento de la síntesis de los cuerpos cetónicos como el ácido a-Hidroxi butirato, acetoacetato y acetona, a partir del Acetil CoA. Las altas concentraciones de cuerpos cetónicos consumen progresivamente las reservas alcalinas, desencadenando una acidosis metabólica. Debido a que la insulina interviene en la captación de los triglicéridos en las células, una secreción deficiente de esta hormona se relaciona con la hipertrigliceridemia característica en estos pacientes. Adicionalmente, la ausencia de insulina disminuye la entrada de los aminoácidos a las células musculares, lo que incrementa el catabolismo de sus proteínas. Los aminoácidos glucogénicos liberados por la proteólisis quedan disponibles para la gluconeogénesis hepática lo que genera un balance negativo del nitrógeno, que conduce al agotamiento de las proteínas y al desgaste tisular (Mendoza y cols. 2005).

La mayoría de los pacientes con diabetes tipo 1 experimentan un período de remisión clínica parcial, caracterizado por un requerimiento bajo de insulina y prácticamente la normalización de la glucemia. Este período se prolonga por más tiempo, cuando la diabetes tipo 1 se presenta durante o después de la pubertad, en comparación a la que inicia en edades más tempranas de la vida (Dost y cols. 2007).

### *Diabetes mellitus tipo 2*

La otra categoría más frecuente es la diabetes tipo 2, la causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta secretora de insulina compensatoria.

En este tipo de diabetes, la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y comienza generalmente a la edad de 40 años o después. Muchos de los pacientes sólo aumentan moderadamente los niveles de glucosa en sangre. A principios de la enfermedad, generalmente los síntomas clásicos de la diabetes no son lo suficiente graves para alertar al paciente. Debido a esta lentitud de la aparición clínica, la diabetes tipo 2 a menudo no es diagnosticada sino hasta después de varios años. La enfermedad se diagnostica por lo tanto, durante un chequeo médico de rutina.

En este tipo de diabetes, el paciente puede sintetizar la insulina en forma normal, sin embargo no puede utilizarla para la regulación del metabolismo de la glucosa, aminoácidos y lípidos. Esta situación puede ser consecuencia de:

- a) Defectos en la estructura de la insulina
- b) Disminución en el número de receptores de la insulina y/o en su afinidad por la hormona
- c) Producción insuficiente de insulina por las células  $\beta$  que pueda superar la resistencia.

La resistencia a la insulina es muy común en individuos obesos; se ha demostrado que el número de receptores para la insulina está disminuido en personas obesas. Por otra parte, el aumento de la grasa visceral se ha relacionado con el aumento de la producción de la resistina y de citocinas pro-inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF -  $\alpha$ ), estos pueden bloquear la cascada de señalización de la insulina, disminuyendo el número de transportadores de la glucosa Glut 4,7 y 12. La respuesta del organismo frente a estos eventos es aumentar la secreción de la insulina, es por esto que estos pacientes suelen presentar hiperinsulinemia. En los individuos con diabetes mellitus tipo 2, la glucosa

proveniente de la glucogenólisis hepática no puede ser utilizada por las células musculares y adiposas, esto debido a la resistencia a la insulina. El metabolismo hepático favorece la síntesis de lípidos a partir del glicerol y de los ácidos grasos que provienen de la dieta y/ o de las reservas del tejido adiposo, lo que favorece el desarrollo de un hígado graso. Los triglicéridos, que son liberados a la sangre en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (LDL), se van acumulando lo que favorece la hipertrigliceridemia (Mendoza y cols. 2005).

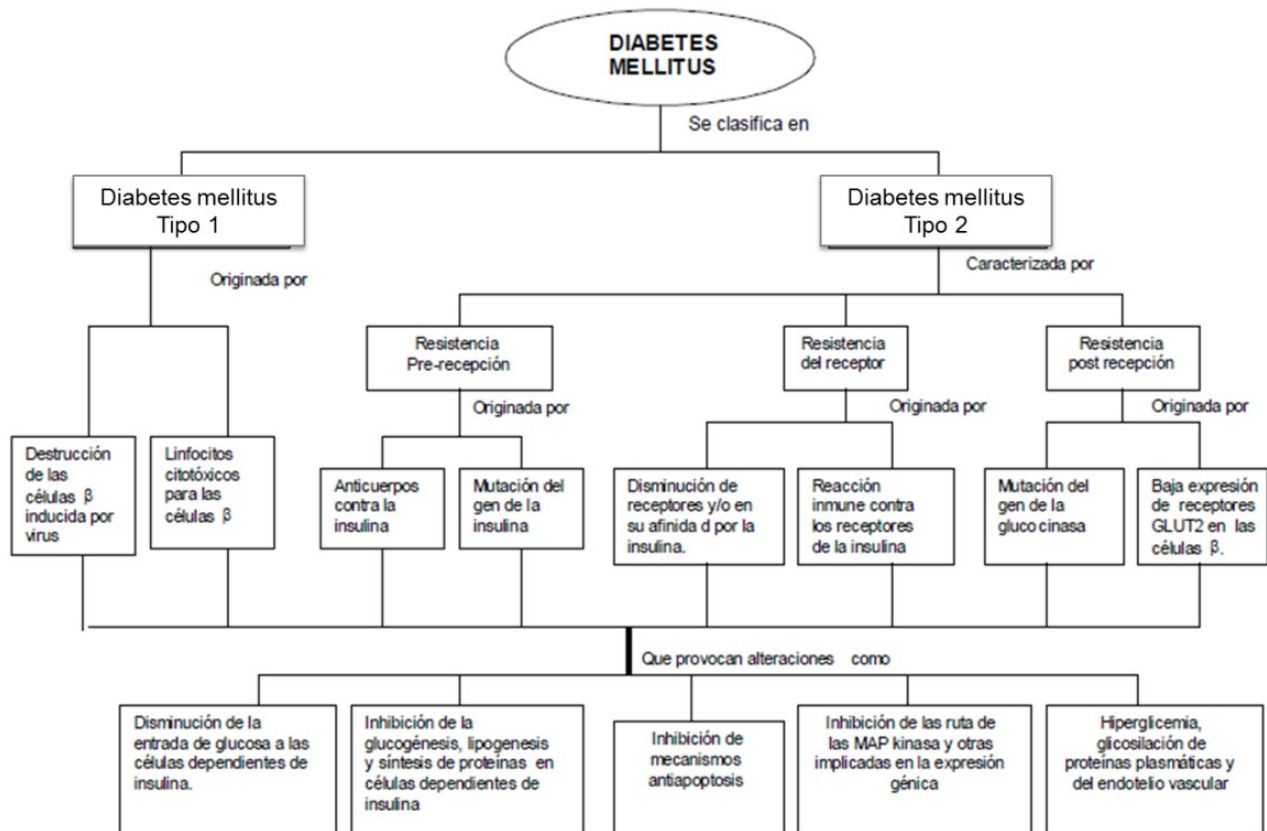


Figura Mt 1. Descripción de la Diabetes Mellitus tipo 1 y 2. (Mendoza y cols. 2005).

### *Diagnóstico*

---

Según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes y de la Organización Mundial de la Salud, el diagnóstico puede llevarse a cabo en las tres situaciones siguientes:

- Presencia de síntomas clínicos; poliuria, polidipsia, astenia y adelgazamiento inexplicado.
- Glucemia plasmática  $\geq 200$  mg/dl (11.1 mmol/L), independientemente de la hora de extracción en relación con las comidas.
- Glucemia plasmática en ayunas  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L) (Mendoza y cols. 2005).

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, menciona que un caso confirmado de diabetes, es aquel que: Persona cuyo diagnóstico se corrobora por medio del laboratorio: una glucemia plasmática en ayuno  $\geq 126$  mg/dL; una glucemia plasmática casual de  $\geq 200$  mg/dL; o bien una glucemia de  $\geq 200$  mg/dL a las dos horas después de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua, criterios diagnósticos de diabetes, en el Sistema Nacional de Salud.

### *Incidencia y prevalencia*

---

La epidemia de la diabetes mellitus (DM) es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial. (NOM-015-SSA2-2010).

El número de personas que padecen diabetes mellitus en el continente Americano fue estimado en 35 millones en el año 2000, de éstos 19 millones (54%) viven en América Latina y el Caribe. Se calcula que para el año 2025 el número de personas que padecerán diabetes mellitus en el continente Americano ascenderá a 64 millones de las cuales el 65% corresponderán a América Latina y el Caribe (Aschner y cols. 1992).

La mitad de las personas con diabetes no son conscientes de su condición, causando 4,8 millones de muertes en el mundo en el 2012.



México ocupa el 6º lugar mundial en número de personas con diabetes. Los estados con prevalencias más altas son: Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí (International Diabetes Federation 2014).

En México, la DM ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos sexos con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales, cabe señalar que según la Dirección General de Información en Salud en el 2007 hubo un número mayor de defunciones en el grupo de las mujeres (37,202 muertes) comparado con el de los hombres (33,310), con una tasa 69.2 por 100,000 habitantes en mujeres y de 64 en hombres, diferencias importantes a considerar en las acciones preventivas, de detección, diagnóstico y tratamiento de este padecimiento. (Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010)

En niños, ha aumentado su incidencia, en los últimos 50 años, tanto en países en vías de desarrollo, como en los desarrollados (Peter 2007).

Los casos nuevos de diabetes tipo 1, en menores de 5 años de edad, representan el 6.3% del total; en los niños de 5 a 9 años, el 3.1% y en los de 10 a 14 años, el 2.4% del total (Calliari y Monte 2008).

El aumento de la incidencia de diabetes tipo 1 es del 3 a 5% por año; este incremento es mayor en el grupo preescolar. Aproximadamente el 4% de los niños con diabetes tipo 1 tienen menos de 2 años al momento del diagnóstico (Cody 2007).

Entre 2003 y 2008, la tasa de incidencia de diabetes mellitus tipo 1 se ha incrementado al pasar de 12.97 a 15.85 por ciento (INEGI 2010).

En México, en 2008 casi 3% de los egresos hospitalarios a nivel nacional fueron debidos a la diabetes mellitus, porcentaje similar al reportado en 2003, cuando se calculó que los costos directos e indirectos de la enfermedad fueron de 100 millones de dólares anuales. Sumado a lo anterior, es importante recalcar que el costo de atención para esta enfermedad no recae exclusivamente en los servicios de salud, se calcula que, si un niño de 7 años desarrolla diabetes, deberá afrontar un costo acumulado de 52 mil dólares a valor presente hasta los 40 años para manejar y paliar las consecuencias de esta enfermedad (INEGI 2010).

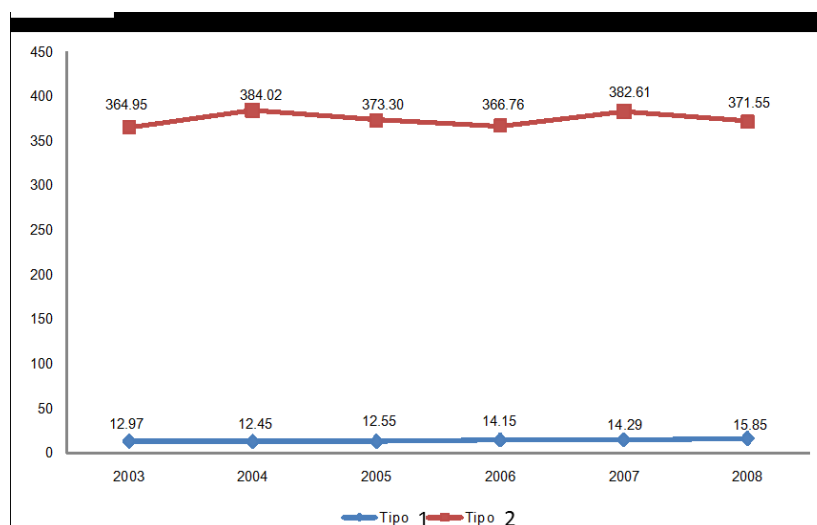


Figura Mt.2. Tasa de incidencia de diabetes mellitus por tipo 2003-2008 por cada 100 mil habitantes (INEGI 2010).

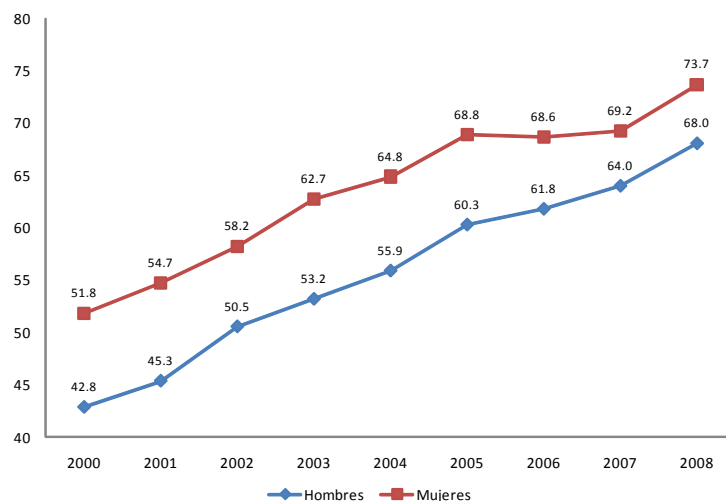
### *Factores de riesgo*

La diabetes mellitus es una enfermedad emergente debido al efecto que el progreso ha traído a la sociedad desde el siglo XX; es decir, su prevalencia ha ido paralelo con el incremento de la obesidad y el sedentarismo.

Cada vez se diagnostica más diabetes mellitus, lamentablemente en estadios avanzados de complicaciones tardías y es un reto el diagnóstico temprano de esta enfermedad así como encontrar los factores de riesgo asociados, presentes en la comunidad a fin de proponer una estrategia preventiva de la enfermedad. En estudios previos se ha encontrado una fuerte asociación de la obesidad, el sedentarismo, el antecedente familiar de diabetes tipo 2, la edad mayor a 40 años y la ingestión de grasas saturadas con la diabetes mellitus, así como la de factores como la presencia de diabetes mellitus gestacional, la macrosomía fetal, el bajo peso al nacer, la hipertensión arterial y la dislipidemia entre otros. La obesidad, en la que hay un aumento de la grasa corporal total, provoca una interferencia del equilibrio entre la producción y liberación endógena de insulina y su sensibilidad en los tejidos periféricos (García y cols. 2007).

La glicemia en ayunas alterada es una categoría diferente a la intolerancia a los carbohidratos y es el resultado de una propuesta de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) como factor de riesgo para desarrollar diabetes (García y cols. 2007).

Esta afección, se presenta principalmente entre las mujeres de 60 a 69 años (25.9% de los casos) y en los hombres de 50 a 59 años (25%). Sin embargo, en términos generales afecta en mayor medida a las mujeres (INEGI 2010).



Fuente: INEGI (2010). Estadísticas de Mortalidad y; CONAPO (2010). Proyecciones de la población de México 2005-2030. Proceso: INEGI.

Figura Mt.3. Tasa de mortalidad observada por diabetes mellitus según el sexo (INEGI).

### *Alteraciones en la Diabetes Mellitus*

La diabetes mellitus es una enfermedad endocrina con importantes implicaciones a nivel sistémico, como: angiopatía, neuropatía, retinopatía y nefropatía, entre otras. Estas complicaciones tienen su origen en eventos biomoleculares desencadenados por la hiperglicemia.

Las complicaciones vasculares pueden ser de dos tipos:

1. Microvasculares: afecta los capilares del riñón, ojos, y otros tejidos, cuya expresión clínica son la nefropatía y retinopatía diabética.

2. Macroangiopatía o arteroesclerosis: afecta grandes y medianas arterias cuya expresión clínica son infarto del miocardio, accidentes vasculares encefálicos y lesiones de los vasos de los miembros inferiores (Mahía y Pérez 2000).

### *Productos de glicación avanzada*

Numerosos estudios han demostrado que la diabetes mellitus se encuentra asociada al incremento de la formación de radicales libres derivados del oxígeno y a la disminución del potencial antioxidante del organismo, generando el daño oxidativo de algunos componentes de la célula tales como las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Mora y cols. 2009).

En presencia de hiperglucemia tiene lugar un proceso de glicosilación no enzimática y oxidación de proteínas (incluida la colágena) y lípidos para reducir los azúcares. En primer lugar se forman productos con carácter reversible conocidos como bases de Schiff y productos de Amadori (Baynes 1991). Un ejemplo de este tipo de productos es la HbA1c (hemoglobina glicosilada), utilizada en la clínica como marcador de control de la glucosa a largo plazo en pacientes diabéticos. Posteriormente, tienen lugar una serie de reacciones moleculares complejas que dan como resultado la formación de los llamados productos finales de glicosilación avanzados (AGEs). Los AGEs pertenecen a un grupo heterogéneo de compuestos de carácter irreversible, a este grupo pertenecen la carboximetilisina, la piralina y la pentosidina. Se ha visto que la forma de AGEs predominante en pacientes diabéticos y relacionada con el envejecimiento tisular es la carboximetilisina. Los AGEs no sólo se acumulan durante el envejecimiento y en aquellas situaciones de hiperglucemia sino también en aquellos estados caracterizados por un acúmulo incrementado de lipoproteínas modificadas y el retraso del aclaramiento de proteínas como sucede en la amiloidosis.

Se sabe que los AGEs juegan un papel central en la patogénesis de las complicaciones del paciente diabético y se han descrito una gran cantidad de receptores celulares para los AGEs. El que mejor ha sido caracterizado es el RAGE (receptor de AGE's) perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas de moléculas de superficie celular (Neeper y cols. 1992).

El RAGE está presente sobre la superficie de ciertas células diana en diabéticos, como por ejemplo en células endoteliales, en fagocitos mononucleares y ciertas células del sistema

nervioso central y periférico. De la interacción entre los AGEs y los RAGE tiene lugar la puesta en marcha de mecanismos de señalización intracelular que conllevan una alteración en el fenotipo celular. Esta alteración propicia la generación de un ambiente proinflamatorio resultando en el desarrollo de lesiones de los vasos y una alteración de la respuesta reparativa normal.

De la integración entre los AGEs y el RAGE presente en la superficie celular de macrófagos resultará la liberación de mediadores con carácter proinflamatorio con IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  que a su vez activarán a los osteoclastos y a las metaloproteinasas provocando reabsorción ósea y destrucción del tejido conectivo. De la integración entre los AGEs y el RAGE presente en la superficie celular de las células endoteliales resultará la mayor expresión de la selectina VCAM-1 (molécula de adhesión) favoreciendo la perpetuación de la respuesta inflamatoria y cambios que conllevan una trombosis focal y vasoconstricción.

En el estudio de Schneir y cols. (1984), se demostró que la glicosilación del colágeno preexistente en los márgenes de la herida disminuye su solubilidad alterando su remodelación, además la mayor actividad de la colagenasa existente en el diabético, degrada el nuevo colágeno sintetizado retrasando y dificultando todo ello la cicatrización de la herida.

La diabetes, tanto en el hombre como en animales de experimentación, parece tener una clara influencia sobre el crecimiento de los tejidos debido a los cambios metabólicos condicionados por la hiperglicemia. Esta afectación metabólica incide directamente sobre el tejido conectivo (Mogensen 1984).

Como resultado de la hiperglicemia, la glicación no enzimática y la oxidación de proteínas y lípidos induce la formación y acumulación de procesos de glicación avanzada (AGEs) en el plasma y los tejidos. Los AGEs pueden modificar los enlaces cruzados de las moléculas de la matriz afectando la eficiencia de los factores de crecimiento, elevar el estrés oxidativo en condiciones de hiperglicemia, acentuando la intensidad de la inflamación por la interacción con los receptores de los AGEs (RAGEs).

La diabetes puede afectar la micro arquitectura del hueso. La condición resultante, conocida como “osteopatía diabética” es caracterizada por la interrupción de la síntesis de matriz y la formación de cristales de hidroxapatita, probablemente debido a la disminución en número y actividad de los osteoblastos. El periodonto diabético es caracterizado por

microangiopatía e hiperplasia epitelial con un aumento en la inflamación (Chang y cols. 2013).

El colágeno modificado por AGEs es capaz de afectar la proliferación y diferenciación de los osteoblastos inhibiendo la actividad de fosfatasa alcalina y la formación de nódulos de mineralización. También se ha demostrado que la acumulación de AGEs sobre el colágeno altera las interacciones celulares con la matriz extracelular mediada por integrinas (Arnol 2012). Otros autores encontraron que la osteocalcina puede ser glicada, lo que alteraría su afinidad por la hidroxiapatita y jugaría un rol en las patogénesis de la osteoporosis y osteopenia presentes en la diabetes (Gundberg y cols. 1986).

En un modelo de ratas diabéticas se encontró que hubo una disminución de los enlaces entrecruzados de colágeno formados enzimáticamente y se detectó un incremento en los enlaces entrecruzados por AGEs, lo que resultó en un deterioro sobre la resistencia ósea, sin afectar el índice de densidad mineral ósea (DMO) (Saito y cols. 2006). Por otro lado, se ha demostrado que los AGEs inhiben la diferenciación de células progenitoras mesenquimales a células osteoprogenitoras (Kume y cols. 2005), alterando así la formación ósea.

Si bien es conocido y claro el efecto de los AGEs sobre los osteoblastos, no ocurre lo mismo con el efecto de los AGEs sobre los osteoclastos, ya que existen controversias al respecto. Por un lado Miyata y colaboradores (1997), encontraron un aumento en la actividad de los osteoclastos en presencia de AGEs. En contraposición Valcourt y colaboradores (2007), demostraron que el proceso de resorción es inhibido en presencia de AGEs, efecto que probablemente refleje una disminución de la solubilidad de las moléculas de colágeno glicadas.

### *Manifestaciones orales de la diabetes mellitus*

---

El conocimiento de las manifestaciones orales de la DM es de gran importancia para el odontólogo. Casi la mitad de los pacientes diabéticos no han sido diagnosticados con diabetes, un examen dental puede proporcionar la primera indicación de la enfermedad. Indicios importantes son mucosas secas (xerostomía), candidiasis oral, boca o la lengua ardorosa (glosopirosis), alteración de la cicatrización de heridas e infecciones orales recurrentes. De cualquier paciente que se sospecha de diabetes debe ser referido a un médico para una evaluación más exhaustiva.

Las manifestaciones orales asociadas con la diabetes están en el mayor de los casos relacionados al paciente no controlado o mal controlado. Los factores que pueden contribuir a las complicaciones orales en la diabetes incluyen la disminución en el número de polimorfonucleares (PMN), la disfunción de los leucocitos y el metabolismo anormal del colágeno. La disfunción de PMN conduce a la alteración de la resistencia a las infecciones. Un metabolismo alterado de la proteína resultante de la utilización de la glucosa puede contribuir al aumento de la descomposición del colágeno en los tejidos conectivos. Además, la alteración de la función de los neutrófilos, y la quimiotaxis de macrófagos puede añadir fallas en la cicatrización de la herida del paciente diabético.

La disminución del flujo salival es una característica común de la DM, a veces causa síntomas de xerostomía, como el síndrome de boca ardorosa, incluso el aumento de la glándula salival parótida puede ser notorio.

El flujo salival disminuido puede contribuir a un aumento a la susceptibilidad de caries. También, una mayor exposición a bacterias, como consecuencia de los elevados niveles de glucosa salivales, principalmente en pacientes con DM mal controlada o incontrolada, resulta en el aumento de sustrato bacteriano, alterando la microflora de la placa favoreciendo la susceptibilidad a caries y a la enfermedad periodontal. Como consecuencia, hay un aumento de la incidencia de caries dental. La caries se ha reportado entre los pacientes con DM incontrolados o mal controlados, por el contrario, el buen estado de los pacientes con DM con buenas medidas de salud oral muestran una reducción de la incidencia de la caries dental. Esto es debido a las restricciones en la dieta, el eficaz control metabólico y medidas eficientes de higiene oral (Bensch y cols. 2004). Se sabe que la enfermedad periodontal es agravada por el estado hiperglicémico, aunque los estudios que se han realizado varían en cuanto a la interpretación de los resultados por los índices y mediciones utilizadas. En estos pacientes la enfermedad periodontal se ha expresado como la prevalencia o la extensión de la inflamación gingival, profundización de la bolsa periodontal, pérdida de la inserción y en algunos estudios, pérdida ósea radiográficamente evidente (Karjalainen 2000).

Varios estudios muestran que la gingivitis es más grave en los niños con diabetes y aumenta junto con los niveles de glucosa en sangre. Incluso en pacientes diabéticos bien controlados hay inflamación gingival, probablemente debido a la alteración vascular que

favorece el buen funcionamiento de los neutrófilos. Cambios vasculares también parecen favorecer la progresión de la enfermedad periodontal. Esto también fue confirmado por Rylander y cols. (1986), que comparó la condición periodontal de diabéticos jóvenes controlados con insulina con 41 adultos jóvenes sanos. Los diabéticos tuvieron inflamación gingival significativamente superior en comparación con los jóvenes no diabéticos.

Como la enfermedad periodontal tiende a ser más pronunciada en pacientes no controlados o mal controlados, se podría plantear la hipótesis de que la normalización de los niveles de glucosa en sangre podría detener la progresión de la enfermedad periodontal. Sin embargo, esto no es cierto, puesto que Sastrowijoto y cols. (1990), demostraron que cuando existe una mejoría del control metabólico en la diabetes tipo 1, los pacientes no mejoraron la condición periodontal clínica. La condición periodontal sólo mejora cuando se intensifican las medidas higiénicas orales locales, sin embargo, la condición periodontal seguirá deteriorándose cuando el nivel de glucosa en sangre no sea controlado (Bensch y cols. 2004).

En el estudio experimental de diabetes de McNamara y cols. (1982), se encontró que la acumulación de placa fue más rápida y su composición microbiológica fue diferente en las ratas diabéticas en comparación con los animales del grupo control. Esto también ha sido corroborado en humanos (McNamara y cols. 1982).

Con respecto a la caries, se han reportado valores similares entre grupos diabéticos y controles (Kjellman 1970; Faulconbridge y cols. 1981). La mayoría de los estudios sobre las posibles diferencias en los factores salivales de los pacientes diabéticos y los controles se han centrado en la tasa de flujo salival. Los resultados muestran menor flujo salival en pacientes diabéticos (Kjellman 1970; Bánóczy y cols. 1987), aunque esto es contradictorio ya que existen autores que demuestran un flujo similar entre ambos grupos. (Mandell 1992; Tenovuo 1986).

Sólo Kjellman (1970) reportó una capacidad de amortiguación superior. En contraste con los diabéticos Bánóczy y cols. (1987) y Twetman y cols. (1989) no encontraron diferencias en los recuentos de *estreptococos mutans* entre los pacientes diabéticos y los controles, pero los recuentos de lactobacilos fueron más bajos en los pacientes con diabetes. También se ha aceptado que la colonización y la incidencia de levaduras en la boca de los pacientes diabéticos es mayor.



Bánóczy y cols. (1987), Bartholomew y cols. (1987) y Sepälä y cols. (1993), clasificaron los sujetos diabéticos de estudio en dos grupos, evaluando su estado diabético con base a los registros médicos a largo plazo. Los sujetos con problemas anteriores con la diabetes, tales como la hiperglucemia severa, infecciones recurrentes, cetoacidosis, glicosuria, coma diabético o diferentes etapas de retinopatías, neuropatías y nefropatías, se clasificaron como “diabetes tipo 1 deficientemente controlada”. Los sujetos con complicaciones diabéticas menos graves fueron clasificados como bien controlados. Los sujetos clasificados como un mal control de la diabetes clínicamente experimentaron una enfermedad periodontal más marcada y pérdida de hueso alveolar en comparación con los bien controlados (Karjalainen 2000).

## Modelo de estudio de la Diabetes Mellitus experimental bajo estrés mecánico

---

### *Estreptozotocina. Diabetes Experimental*

---

Dentro de los modelos para inducir diabetes en roedores se encuentran los que emplean agentes químicos, siendo los más utilizados en investigación el aloxan y la estreptozotocina (STZ). Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células  $\beta$  pancreáticas (Mora y cols. 2009).

En el parénquima pancreático se encuentran diferentes estructuras glandulares, la porción endocrina está constituida por los islotes pancreáticos o de Langerhans, los cuales están compuestos por células productoras de glucagón, células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, células productoras de somatostatina y células PP productoras de polipéptido pancreático (Lima 2001).

También se ha encontrado que estos compuestos diabetogénicos aumentan la generación de radical superóxido por el sistema xantina oxidasa de las células pancreáticas, de la misma forma que estimulan la producción de  $H_2O_2$  causando la fragmentación del ADN en islotes pancreáticos aislados de rata. Este daño pancreático causado por agentes diabetogénicos se conoce como “hipótesis de Okamoto” (Mora y cols. 2009).

Los islotes pancreáticos de Langerhans pueden sufrir alteraciones funcionales y morfológicas debido a fármacos que producen radicales libres, como son la aloxan y estreptozotocina. El aloxan y la estreptozotocina son sustancias que destruyen selectivamente a las células  $\beta$  pancreáticas, siendo utilizadas en la inducción de DM en animales experimentales presentando mayor resistencia los islotes pancreáticos humanos que los de las ratas. (Lima 2001)

Las dosis de estreptozotocina no han sido especificadas como en el caso del aloxan. Frecuentemente se ha utilizado una sola dosis intravenosa en ratas adultas de 40 y 60 mg/kg (Ganda y cols. 1976), aunque una sola dosis de 40 mg/kg puede ser inefectiva (Katsumata y cols. 1992). Cuando se administraron dosis de 50 mg/kg por vía intravenosa la glucosa en sangre aumento 15mg/dL. después de 2 semanas del tratamiento (Szkudelski 2001).

La acción de la estreptozotocina en las células  $\beta$  pancreáticas es acompañada por alteraciones en las concentraciones de glucosa e insulina. Dos horas después de la administración, son observados los cambios en la insulina. Estos cambios en las concentraciones de glucosa plasmática e insulina pancreática, reflejan cambios en la función de las células  $\beta$  (Szkudelski 2001). La DM posterior a la administración de STZ también muestra algunas complicaciones presentes en humanos con DM, incluidas la susceptibilidad a infecciones, el daño cardiovascular, retinopatía, alteraciones en la angiogénesis, retraso en la cicatrización, retraso en la expresión de factores de crecimiento y reducción en la formación ósea (Abbassy y cols. 2008).

Shyn y cols. (2001), en su artículo “La estreptozotocina en la inducción de diabetes”, mencionan dosis de 60mg/kg en ratas macho de 305- 382gr.

Mora y cols. (2009), trabajaron con ratas Wistar hembras entre 160 y 200gr. de peso administrando diferentes dosis de estreptozotocina, ellos obtuvieron los siguientes resultados: Como criterio de selección, previamente se había establecido que aquellos animales con valores de glucosa sanguínea (NGS) superiores a 200 mg/dL eran considerados diabéticos. Esta condición se logró en el día 3 para el 10% de los animales que recibieron la dosis de 33 mg/Kg (NGS =  $135 \pm 13$  mg/dL), el 50% en el grupo de 50 mg/Kg (NGS =  $200 \pm 33$  mg/dl) y el 100% de los que recibieron 75 mg/Kg (NGS =  $335 \pm 13$  mg/dL), aunque en esta última se presentó la muerte del 40% de la población asociada a la toxicidad de la dosis de STZ empleada. Los promedios presentados incluyen todos los animales del grupo (diabéticos y no diabéticos). Al día 5, el grupo control continuaba con NGS que podían considerarse normales ( $75 \pm 9$  mg/dL), todos los animales de la dosis de 75 mg/Kg habían muerto y los demás grupos presentaban NGS estadísticamente diferentes al grupo control y entre ellos.

Se encontró que el 60% de los animales con 33 mg/Kg de STZ (NGS =  $222 \pm 27$  mg/dL) y el 100% de los animales con 50 mg/Kg de STZ (NGS =  $288 \pm 54$  mg/dL) poseían NGS superiores a nuestro valor de referencia (200 mg/dL). Estos resultados evidencian que es necesario un tiempo de estabilización de al menos cinco días después de la inducción con una dosis de 50 mg/Kg de STZ, para así obtener animales francamente diabéticos (Mora y cols. 2009).

### *Tejidos involucrados en el estrés mecánico (Periodonto)*

---

El periodonto es el conjunto de tejidos que conforman el órgano de sostén y protección del elemento dentario. Está sujeto a variaciones morfológicas y funcionales, así como a cambios con la edad. Así, el periodonto se ajusta continuamente a las modificaciones que surgen con el envejecimiento, la masticación y el medio bucal.

De acuerdo a su función podemos clasificarlo en:

- Periodonto de protección: encía alrededor del cuello del diente y la unión dentogingival.
- Periodonto de inserción: cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar (Aint 2010).

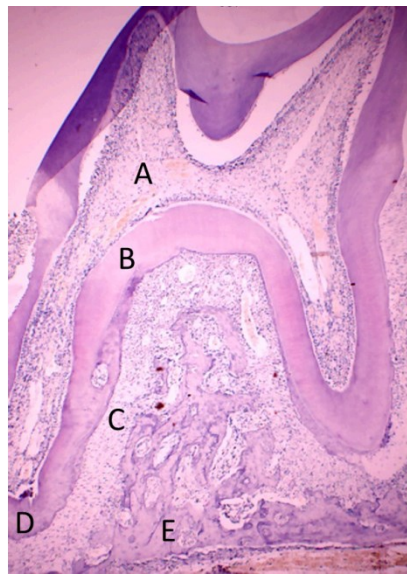


Figura A1. Corte transversal de primer molar superior de rata 10X. (A) Pulpa, (B) Dentina, (C) Ligamento periodontal, (D) Cemento radicular, (E) Hueso interradicular.

## Encía

Parte de la mucosa masticatoria que tapiza los procesos o rebordes alveolares y que rodea el cuello de los dientes a los cuales se adhiere a través de la unión dentogingival.

Por ser la encía una membrana mucosa, epitelioconjuntiva desde el punto de vista estructural posee un doble origen embriológico. El tejido epitelial del revestimiento deriva del ectodermo que tapiza la cavidad bucal primitiva o estomodeo y el tejido conectivo subyacente del mesénquima cefálico o ectomesenquima.

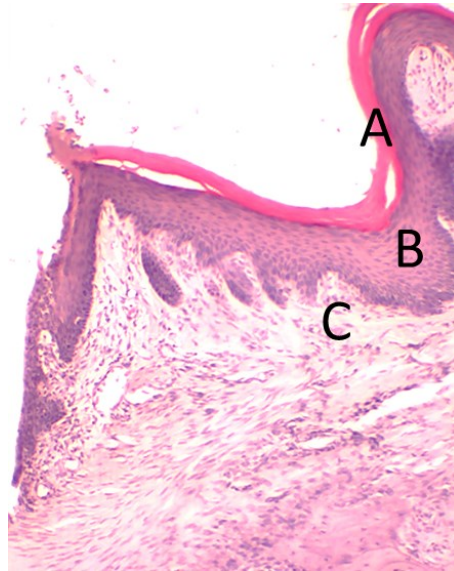


Figura A2. Encía 10X. (A) Queratina, (B) Tejido epitelial, (C) Tejido conectivo.

<b><i>Encía marginal</i></b>	
Epitelio	Queratinizado / no queratinizado
Células	Melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel.
Corion	
Células	Fibroblastos, células cebadas, macrófagos
Fibras	Colágenas, reticulina, elanina, oxitalan.
<b><i>Encía fija, insertada o adherida</i></b>	
Epitelio	Plano estratificado queratinizado
Células	Células de Langerhans y melanocitos en mayor

	cantidad, queratinocitos III, IV.
Corion	
	Denso, sumamente fibroso, con papilas delomorfas. De aspecto puntiforme
Fibras	Colágenas (ligamento gingival o supracrestal)
<b><i>Unión dentogingival</i></b>	Une la encía al diente.
<i>Epitelio del surco</i>	Plano estratificado no queratinizado. Muy semejante al epitelio de unión.
<i>Epitelio de unión</i> (Adherencia epitelial, epitelio de fijación).	Protección biológica que protege al periodonto
Epitelio	Plano estratificado no queratinizado
Células	(Intrínsecas) queratinocitos, células basales, células suprabasales. (Extrínsecas) granulocitos, linfocitos, monocitos
Corion	Laxo, con escasos fibroblastos y fibras de colágeno
Infiltrado inflamatorio	Neutrófilos, linfocitos, monocitos-macrófagos

Tabla A1. Células y ubicación en la unidad periodontal (de Ferraris 2000).

### *Cemento*

Dos tipos de tejido duro cubren las raíces de los dientes. El primero denominado cemento intermedio, se origina a partir de las células de la vaina radicular epitelial. El segundo denominado cemento celular-acelular, que es un depósito más grueso de una sustancia semejante al hueso producida por cementoblastos que se diferencian de los fibroblastos del ligamento periodontal. Este último es depositado de forma incremental, normalmente una capa acelular va seguida de una capa celular. A diferencia del hueso el cemento no contiene vasos sanguíneos, nervios o conductos de Havers o de Volkmann que son los conductos nutricios que contienen los vasos sanguíneos y nervios en el hueso.

El cemento radicular cumple dos funciones importantes: sella los túbulos de la dentina radicular y sirve de inserción para las fibras periodontales para mantener el diente dentro de su alveolo (James y Chiego 2007).

#### *Cemento intermedio*

Es una capa delgada no celular y amorfa de tejido duro. Este es depositado por la capa interna de las células epiteliales de la vaina radicular. El cemento intermedio es la primera capa de tejido duro que se deposita, teniendo como función el sellado de los túbulos dentinarios. Como capa amorfa no celular, es similar a la capa aprismática del esmalte en la superficie de la corona de los dientes.

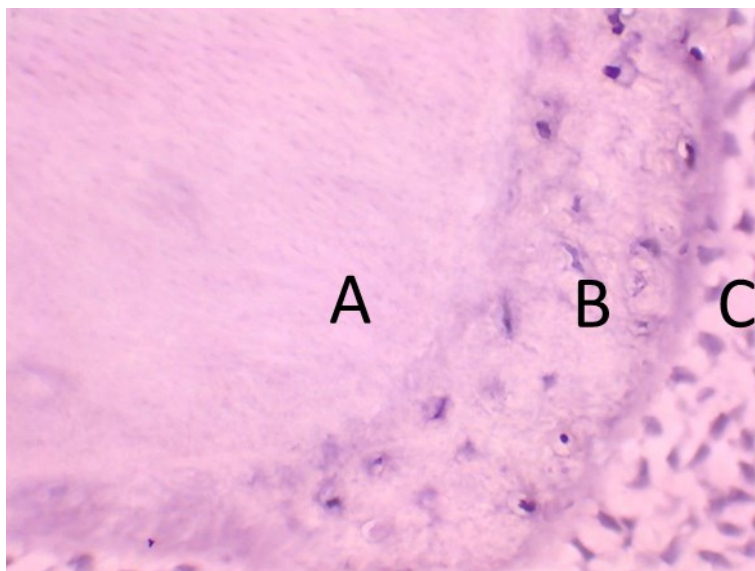


Figura A3. Corte longitudinal de raíz. 40X. (A) Dentina, (B) Cemento radicular, (C) Ligamento periodontal.

#### *Cemento celular y acelular*

Este cemento se deposita directamente sobre la superficie del cemento intermedio. El cemento se muestra más celular a medida que el espesor aumenta, probablemente para mantener su viabilidad. La delgada capa próxima a la región cervical no requiere células para mantener su viabilidad, ya que su superficie está impregnada por líquidos.

El cemento se forma por medio del depósito de capas de una matriz de colágeno que luego se mineraliza secundariamente. La matriz joven se denomina cementoide y su formación es similar a la del hueso a partir del osteoide y a la dentina a partir de la preentina.

Los *cementocitos* residen en lagunas y aparecen en mayor abundancia en el grueso cemento apical. Están situados en lo profundo del cemento, son poligonales y presentan pocos organelos.

Sin la presencia de nervios el cemento celular es insensible al dolor lo cual es un detalle clínico importante. El cemento también es más resistente a la resorción que el hueso, y parte de la razón de esta resistencia puede ser la falta de vascularización del cemento.

En la profundidad del cemento aparecen muchas lagunas vacías lo que implica que estas células mueren gradualmente. Algunas de estas células tienen prolongaciones largas que se encuentran en conductillos y en contacto con cementocitos adyacentes.

Más superficialmente, el cemento tiene haces de fibras no calcificadas que asociadas con la función de inserción de las fibras periodontales. Estas fibras perforantes son denominadas haces de fibras extrínsecas del cemento. La resorción del cemento es una característica del cemento envejecido.

El cemento es resistente a la resorción en los tejidos más jóvenes. Esta es la razón por la que el movimiento ortodóncico del diente provoca resorción del hueso alveolar antes que la pérdida de la raíz del diente. La reparación del cemento es un importante mecanismo protector de la raíz.

En el cemento y hueso alveolar envejecidos aparecen ondulaciones, algunas fibras están unidas a las crestas de estas ondas en lugar de estar sobre toda la superficie. Este es uno de los cambios más remarcables que ocurren en el envejecimiento de las estructuras de soporte de los dientes (James y Chiego 2007).

### *Ligamento periodontal*

El ligamento periodontal es un tejido conectivo fibroso entre el hueso alveolar propiamente dicho y el cemento que cubre la raíz. Está compuesto de fibras, células y sustancia intercelular. Esta última consta de fibras de colágeno y sustancia fundamental, que a su vez contiene proteínas y polisacáridos. Las fibras de colágeno ayudan a la unión del cemento con el hueso alveolar propiamente dicho.



Este tejido es marcadamente celular, contiene fibroblastos y células vasculares, nerviosas, óseas y cementarias. La principal función del ligamento es el soporte de los dientes (James y Chiego 2007).

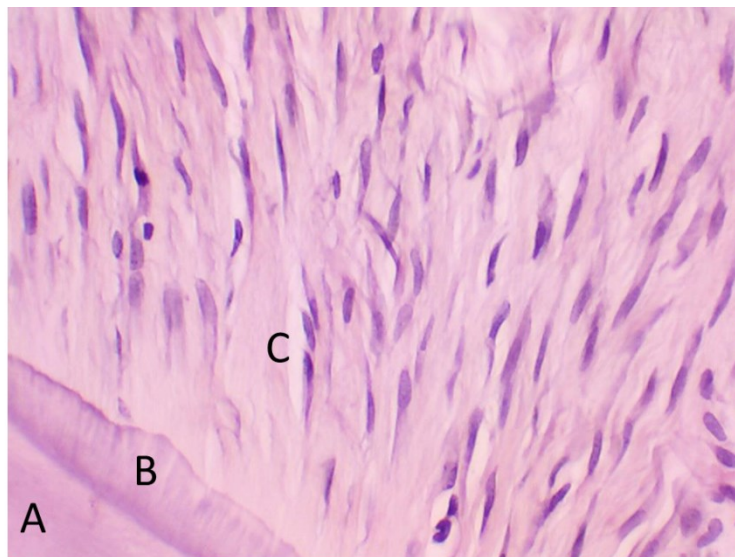


Figura A4. Corte longitudinal de raíz 40X. (A)Dentina, (B) Cemento radicular acelular, (C) Ligamento periodontal.

Se localizan dos grupos de fibras de acuerdo a su ubicación en el diente. El grupo gingival, localizado alrededor de los cuellos de los dientes y el grupo dentoalveolar que rodea las raíces de los dientes. Los haces de colágeno están incluidos en el cemento de la raíz y se extienden hacia el interior del hueso alveolar. Entre cada grupo de fibras hay un espacio denominado espacio intersticial que contiene una red de vasos sanguíneos, nervios y linfáticos que mantienen la vitalidad del ligamento periodontal y una red de fibras más finas que se entremezclan en los espacios y también sirven de soporte a los densos haces de fibras de colágeno.

La regularidad de estos espacios está claramente relacionada con las necesidades vasculares y nerviosas del funcionamiento del ligamento periodontal rodeando el diente en intervalos regulares y conectando con los vasos que discurren longitudinalmente hacia la raíz. Estos espacios están diseñados para resistir el impacto de las fuerzas masticatorias.

La mayoría de las fibras de soporte son de colágeno, aunque se han descrito pocas parecidas a fibras elásticas, denominadas fibras de oxitalano, son de un escaso diámetro y aparecen en la interface con los haces de colágeno y las paredes de los vasos sanguíneos.

#### *Células del Ligamento Periodontal*

Los *fibroblastos* son las que se observan en mayor número debido al alto contenido de colágeno de este tejido permitiendo una rápida sustitución de fibras. Investigaciones recientes muestran que los fibroblastos además de formar nuevas fibras de colágeno, actúan en la degradación de fibras deterioradas. Las fibras son ingeridas y descompuestas en aminoácidos, estos aminoácidos son recuperados por otras células y reciclados para la formación de nuevas fibras de colágeno (Gaete 2006).

#### *Tejido óseo*

Corresponde a una forma especializada de tejido conjuntivo denso, formado también por células (por lo menos 3 tipos identificables de células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) y una matriz extracelular con fibras de colágena tipo I como su principal componente fibroso y una matriz intersticial amorfa mineralizada (Gaete 2006).

*Los osteoblastos* derivan de células mesenquimales; en concreto de precursores pluripotenciales presentes en el estroma de la médula ósea, los cuales, dependiendo de diferentes estímulos, tienen capacidad para diferenciarse hacia fibroblastos, adipocitos, células musculares lisas u osteoblastos. También los pericitos o células murales de los vasos sanguíneos pueden diferenciarse a osteoblastos. Son células indivisibles, relativamente grandes, de forma redonda o poligonal. Su principal función es la síntesis de matriz extracelular denominada osteoide, así como la secreción de componentes macromoleculares orgánicos de la matriz ósea (fibras de colágeno, proteoglicanos, osteocalcina, osteopontina, osteonectina, (Riancho y Gutierrez 2003) siendo necesaria su preservación para que el tejido óseo mantenga sus propiedades biomecánicas.

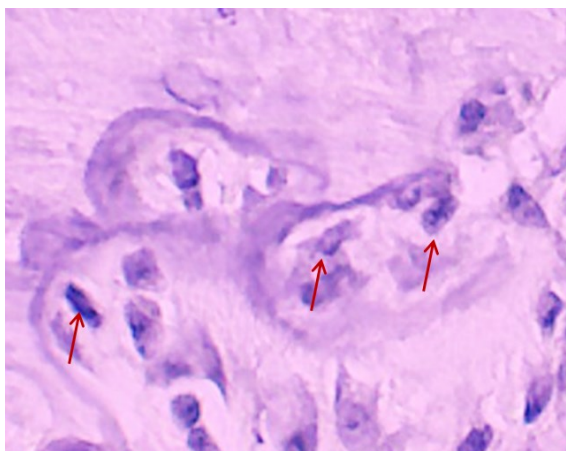


Figura A5. Osteoblastos de hueso interradicular ubicados en la periferia del hueso.  
10X.

#### *Los osteocitos*

El osteocito, es la célula que se encuentra dentro de la matriz ósea, proviene de células madre mesenquimatosas diferenciándose de los osteoblastos. Son células más pequeñas y basófilas que los osteoblastos. Rodeados por matriz ósea calcificada, generalmente conservan una capa delgada de osteoide, como revestimiento de sus lagunas. En su citoplasma se conserva retículo endoplásmico rugoso y aparatos de Golgi, con capacidad suficiente para reparar la matriz ósea, conservándola y liberando iones de Ca de dicha matriz cuando aumentan las necesidades corporales (Gaete 2006). El medio condicionado de células MLO-Y4 (Células que exhiben algunos marcadores de osteocitos) induce la diferenciación de osteoblastos (Heino y cols. 2002) y, sorprendentemente, la diferenciación de células madre mesenquimales, (Heino y cols. 2004) lo que apoya a la teoría de que los osteocitos pueden ser los que dirigen la remodelación ósea. Se ha pensado en la osteocitogénesis como un proceso pasivo por el que una subpoblación de los osteoblastos queda atrapada en osteoide que se va mineralizando pasivamente, por lo que el osteoblasto productor de matriz queda atrapado cuando el osteoblasto adyacente coloca osteoide encima de la célula embebida (Franz-Odenaal y cols. 2006.) en contraparte hay argumentos en contra de que la osteocitogénesis sea un proceso pasivo. Datos recientes obtenidos de osteocitos aviares aislados muestran que estas células pueden enviar señales de resorción ósea que generan la formación y la activación de osteoclastos en ausencia de cualquier factor osteotrópico (Tanaka y cols. 1995). El osteocito rodeado de osteoide debe cumplir con dos funciones de forma simultánea: regular la mineralización y formar

prolongaciones dendríticas para conectarse con los otros osteocitos y formar una red de comunicación. La célula sufre una transformación dramática al pasar de una célula poligonal a una célula que extiende dendritas hacia el frente de mineralización, que es seguido por dendritas que se extienden ya sea al espacio vascular o la superficie ósea (Bonewald 2011).

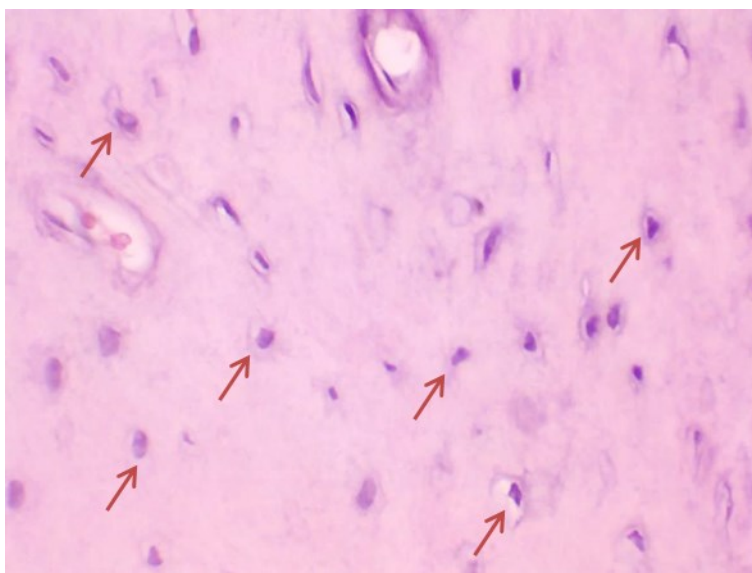


Figura A6. Osteocitos dentro de sus lagunas en hueso interradicular de rata. 10X.

El osteocito es la célula ósea más abundante (90-95%) y la más longeva, pues pueden alcanzar los 25 años de supervivencia (Franz-Odenaal 2006). Cada osteocito posee un elevado número de hasta 50 prolongaciones de morfología dendrítica que se distribuyen por el tejido circundante y alcanzan la superficie, utilizando canaliculos por los que circulan pequeñas moléculas, como óxido nítrico y prostaglandinas, que participan en una extensa red de señalización que empieza a ser reconocida como una parte fundamental del control del remodelado. Estas dendritas sirven de unión con otros osteocitos cercanos y también con los osteoblastos, células endoteliales y osteoclastos superficiales. (Batra y cols. 2012). Es obvio que esta red osteocito-canalicular funciona como un sincitio situado y distribuido idealmente para detectar cambios mecánicos o lesiones en la profundidad del hueso y establecer un sistema de comunicación necesario para atraer a la zona las células precisas

para adaptar la forma del hueso a la carga (modelado) o iniciar una nueva unidad de remodelado que repare el daño ocasionado, además, proporcione hueso nuevo al organismo o responda a necesidades hormonales sistémicas como la homeostasis del calcio o la función renal (Findlay 2012). Diversos estudios sugieren que los osteocitos dirigen la remodelación ósea a través de la regulación de las actividades de los osteoblastos y osteoclastos. Además a través de las proteínas que secretan como la proteína de matriz dentinaria 1 y el factor de crecimiento de fibroblastos (Guo y cols. 2010), el hueso se constituye como un órgano endocrino que regula la reabsorción renal del fosfato. El osteocito desde su matriz de osteoide puede controlar y regular la mineralización. En la transición de osteoblastos a osteocitos, la fosfatasa alcalina disminuye, y la cinasa II de caseína y la osteocalcina aumentan (Mikuni-Takagaki y cols. 1995). Las proteínas selectivas o específicas del osteocito han demostrado que actúan en el metabolismo mineral. La actividad secretora del osteocito es muy intensa, habiéndose detectado una gran cantidad de moléculas en los canaliculos, entre las que destacan RANKL y OPG (señalización de inicio de activación de un sitio de remodelado en respuesta al estímulo mecánico), ATP (modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular),  $\text{PGE}_2$  (promueve la osteoformación), óxido nítrico (promueve la osteoformación e inhibe la resorción), FGF23 (modula la proliferación y diferenciación celular, con acciones sistémicas de naturaleza hormonal) y la DMP-1 (organiza la formación de matriz mineralizada) (Franz-Odenaal 2006). Actualmente se ha aceptado que la reacción de las células óseas a las cargas biomecánicas es regulado por el flujo pulsátil del fluido canalicular (Weinbaum 1994). En principio se pensó que la transmisión de señales dependía de diferencias de potencial según avanzaba el fluido y también se indicó la presencia de factores nutricionales como mensajeros de la respuesta mecánica. Sin embargo, hoy en día se asume que la respuesta celular depende de los factores mecánicos que aporta el fluido sobre los osteocitos. Los cambios en las propiedades de la matriz ósea perilacunar y el tamaño lacunar influyen en el riesgo de fractura, y cualquier mecanismo que cambie las propiedades del material de la matriz perilacunar tendrá consecuencias mecanosensitivas en los osteocitos. (Nicoella y cols, 2008). La dinámica del flujo de líquido de la médula a través de la red lacunocanalicular de los osteocitos, drásticamente podría afectar la función del osteocitos y su viabilidad (Bonewald y cols. 2011).

Puesto que el área de superficie del sistema lacunocanalicular de los osteocitos en el hueso es de mayor magnitud que el área de la superficie del hueso (Marotti y cols. 1995), la eliminación de sólo unos pocos angstroms de mineral por osteocitos tendría efectos significativos sobre la circulación y los niveles de iones sanguíneos. Belanger (1969) acuñó el término osteolisis osteocítica y sugirió que ya la PTH o una dieta baja en calcio pueden inducir esta función en osteocitos. Los osteocitos también pueden expresar marcadores de osteoclastos, tales como fosfatasa ácida y la catepsina K, bajo ciertas condiciones, tales como la lactancia, para remodelar su matriz perilacunar. (Qing y cols. 2010.)

La morfología de los osteocitos puede ser controlada por la molécula E11/gp38/podoplanina, un marcador de osteocitos en el osteoide (Franz-Odendaal y cols. 2006), también llamado podoplanina, OTS-8, GP38, o PA2.25, se detectó por primera vez en la superficie celular de los osteocitos en el hueso de rata (Wetterwald y cols.1996; Schulze y cols. 1999) y en odontoblastos de dientes de rata (Schwab y cols 1999). También se expresa en las células de tipo I de pulmón de rata y de otros tejidos como cerebro, riñón, sistema linfático, y la piel.

Además E11, organiza la expresión de la tubulina, vimentina y actina, en los cuerpos celulares y dendritas de osteocitos es crucial para mantener la morfología dendrítica (Tanaka-kamioka y cols. 1998).

Los osteocitos sanos o en proceso de muerte celular pueden reclutar osteoclastos a los sitios de remodelado. La apoptosis osteocítica puede ocurrir en sitios con microlesiones. Osteocitos apoptóticos liberan cuerpos apoptóticos que expresan RANKL para reclutar a los osteoclastos (Kogianni y cols. 2008). La muerte celular del osteocito puede ocurrir en asociación con condiciones patológicas tales como la osteoporosis y la osteoartritis, que conducen a un aumento de la fragilidad del esqueleto (Weinstein y cols. 2000). Tal fragilidad se considera que es debido a la pérdida de la capacidad de detectar las microlesiones y / o las señales de reparación.

La deficiencia de estrógenos aumenta las concentraciones del factor de necrosis tumoral (TNF-a) y la interleucina 1 (IL-1) y también la inducción de la apoptosis osteocítica.

La viabilidad del osteocito claramente desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y la integridad ósea (Bonewald 2011).

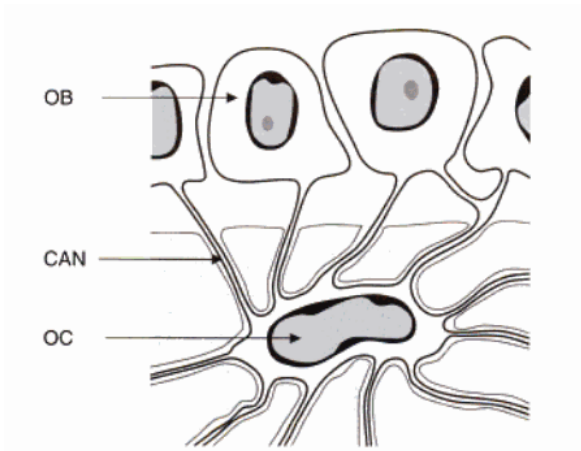


Figura A7. Muestra como los osteocitos (OC) del hueso mineralizado se comunican por medio de canalículos o conductillos (CAN) con los osteoblastos (OB) situados en la superficie del hueso.

*Los osteoclastos (OC)* son células grandes, multinucleadas, incapaces de reproducirse, son ricas en anhidrasa carbónica y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). Se originan a partir de la fusión de precursores mononucleares. Estos no son de origen mesenquimal, sino hematopoyético y están relacionados con la línea monocito-macrófago (Riancho y Gutierrez 2003). Se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos. Teniendo como precursor a los preosteoclastos que son células dotadas de un solo núcleo que se adhieren a las superficies óseas y al fusionarse entre sí dan lugar a los osteoclastos. Miden de 20 a 100  $\mu\text{m}$ . y pueden tener hasta 50 núcleos. Se desplazan por las superficies óseas reabsorbiendo la matriz en los sitios en que se deteriora o que no es necesaria. Están presentes en las superficies de reabsorción, que corresponden a bordes irregulares del hueso que en vez de ser una capa uniforme de células, presentan osteoclastos dispersos (Riancho y Gutierrez 2003).

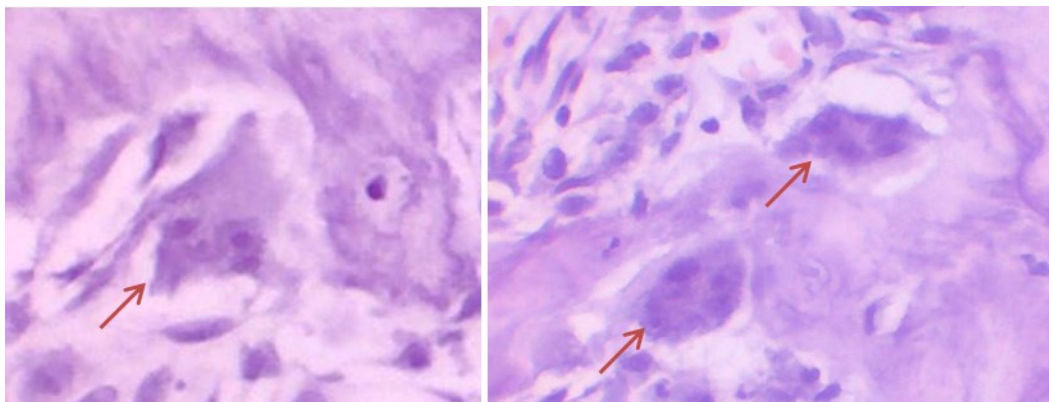


Figura A8. Osteoclastos en la periferia del hueso interradicular formando una laguna de reabsorción. 40x. Obsérvese el citoplasma translucido, el borde de cepillo, sus múltiples núcleos y dentro del núcleo el nucléolo.

Las Lagunas de Howship son pequeñas depresiones óseas, resultado de la absorción causada por el osteoclasto. En uno de los polos del OC se encuentra el llamado “borde de cepillo” donde la membrana celular se pliega varias veces formando prolongaciones digitiformes ramificadas que se introducen en la superficie ósea en la que se encuentra. Este “borde de cepillo” se encuentra rodeado por la zona de sellado “sealingzone”. Mediante la presencia de integrinas, se forma un compartimiento bajo el OC en el que se liberan grandes cantidades de hidrogeniones que disuelven los cristales de hidroxapatita, y enzimas lisosomales que degradan las proteínas de la matriz, dando lugar a la absorción ósea. La degradación de la matriz ósea mineralizada por parte de los OC se debe a una combinación de:

- 1) Descalcificación focal por parte de los ácidos orgánicos que se acumulan bajo los bordes arrugados de los OC (descalcificación focal ácida).
- 2) Digestión extracelular realizada por acidohidrolasas liberadas por exocitosis en tales bordes (degradación enzimática) (Riancho y Gutierrez 2003).



## *Biología ósea*

---

Una correcta salud ósea es indispensable para que el esqueleto pueda cumplir con sus tres funciones fundamentales: mecánica, como soporte del cuerpo; protectora, de los órganos internos que delimita y metabólica, como reserva de iones, principalmente calcio (Ca) y fósforo (P) (Canalis, 1980). La matriz ósea presenta un 90% de colágeno Tipo I, orientadas en haces paralelos, lo que le da al tejido una estructura laminar, es por ello que presenta resistencia a la tracción. El 10% restante del contenido orgánico es un componente amorfo de condroitin sulfato y ácido hialurónico. El hueso además de colágeno, presenta proteínas específicas tales como la osteonectina: proteína específica de los huesos que fija el colágeno de la matriz a los minerales, la osteocalcina: proteína fijadora del Ca. y la osteopontina: secretada por los osteoblastos, fosfoproteína con propiedades similares a las de la fibronectina.

### *Remodelado óseo*

De forma incesante, hay zonas del hueso que son destruidas para ser sustituidas por tejido óseo recién formado conduciendo al recambio de alrededor de un 7-10% del volumen total del esqueleto cada año. El remodelado se lleva a cabo por grupos de osteoblastos (OB) y osteoclastos (OC) que constituyen las llamadas “unidades de remodelado” o “unidades multicelulares básicas”.

En un determinado período de tiempo se estima que sólo el 10% de la superficie ósea se encuentra en remodelación, sin embargo los distintos tipos de hueso no poseen la misma actividad remodeladora. El 80% del esqueleto está formado por hueso cortical y sólo el 20% del volumen óseo por hueso trabecular, siendo este último el metabólicamente más activo y el que aporta el mayor porcentaje al recambio óseo de todo el esqueleto (Reynaga y Zeni 2009).

La actividad remodeladora de todo el esqueleto, puede evaluarse bioquímicamente a través de la medición de los marcadores bioquímicos del remodelado óseo (Reynaga y Zeni 2009). Los marcadores de formación (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina y propéptidos del colágeno tipo I amino y carboxilo terminal) provienen de la actividad de osteoblastos y los de resorción (fosfatasa ácida tartrato resistente 5b, telopéptidos carboxilo y amino

terminales, piridinolinas, hidroxiprolina y calciuria) provienen de los osteoclastos. La utilidad clínica de los marcadores consiste en determinar cambios en el remodelado óseo. (Reynaga y Zeni 2009).

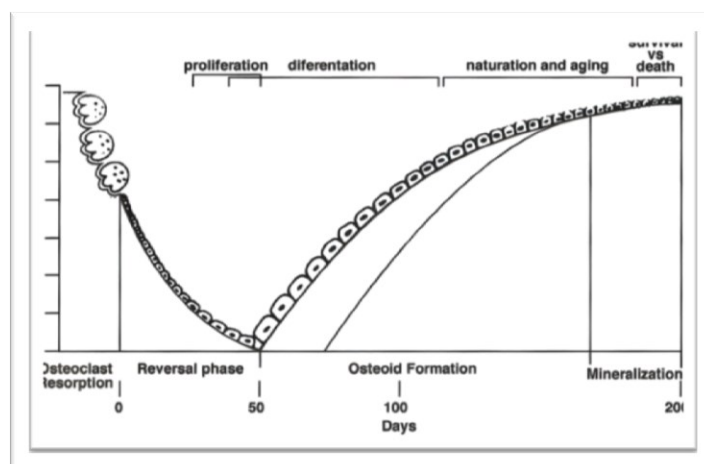


Figura A9. Ciclo del remodelado óseo humano (Hock y cols. 2001).

No se conoce con certeza qué desencadena el inicio de un nuevo ciclo de remodelado en un lugar y momento determinados. No obstante, se piensa que en ello desempeñan un papel importante los osteocitos, marcando el lugar donde debe producirse la activación de los precursores osteoclásticos para iniciar la resorción (Bonewald 2011). Es decir, los osteocitos pueden ser los sensores de situaciones inductoras del remodelado, como la aparición de microfracturas o la modificación de las fuerzas mecánicas a las que está sometido el esqueleto. De hecho, se piensa que la apoptosis de los osteocitos puede desencadenar el inicio del remodelado (Reynaga y Zeni 2009).

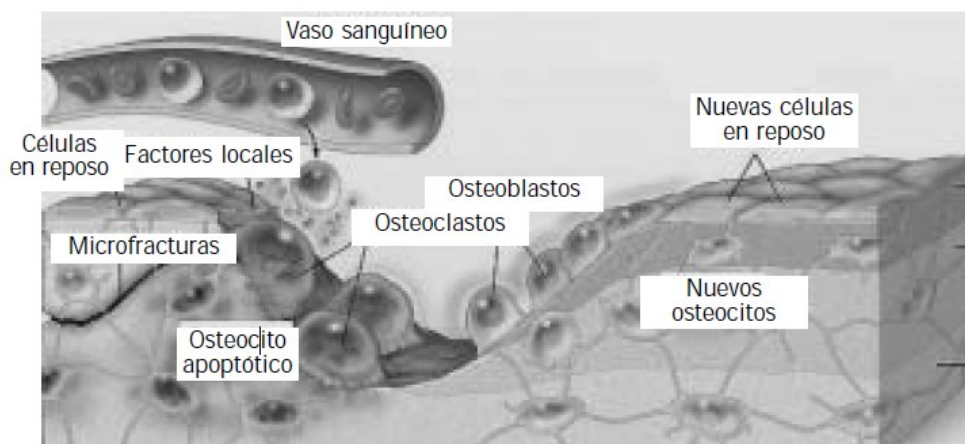


Figura A10. Unidad del remodelado óseo (Reynaga y Zeni 2009).

Los osteocitos no tienen conexiones físicas con las células de la médula. Por tanto, si actúan sobre los precursores osteoclastícos debe de ser a través de mecanismos humorales. De hecho, se ha demostrado que estas células producen diversos mediadores que pueden influir en la osteoclastogénesis, como óxido nítrico,  $TGF\beta$ , prostaglandinas o RANKL (Dallas y Bonewald 2010). Sin embargo, se desconoce si realmente esos productos de los osteocitos influyen directamente en la osteoclastogénesis. Otra posibilidad es que la activación de la osteoclastogénesis sea indirecta, a través de las células de revestimiento. De hecho, los osteocitos emiten prolongaciones citoplasmáticas que constituyen una espesa red que comunica cada osteocito con otros osteocitos vecinos, así como con las células de revestimiento de la superficie trabecular.

Células de estirpe osteoblástica producen diversos factores que ejercen un efecto quimiotáctico sobre los precursores de los osteoclastos. De hecho, la atracción de esos precursores debe ser un paso inicial esencial para el inicio de la resorción. Entre las moléculas quimiotácticas se encuentran el factor derivado de las células estromales (SDF) y la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1). Por otro lado, las células osteoblásticas sintetizan algunos factores que son esenciales para la diferenciación de los osteoclastos. Uno de ellos es el factor estimulante de las colonias de tipo monocito macrófago (M-CSF o CSF-1). Su importancia queda claramente de manifiesto en algunos modelos experimentales murinos, en los que se ha demostrado que la falta de M-CSF impide la formación de osteoclastos y conduce a la aparición de osteopetrosis (Raggatt y Partridge 2010).

Además de inducir la diferenciación de los precursores, el RANKL puede potenciar la actividad de los osteoclastos maduros e inhibir su apoptosis. El RANKL puede tener también un efecto quimiotáctico indirecto sobre los precursores. Los osteoblastos pueden sintetizar diversas citocinas que promueven la resorción de hueso. Es el caso de la IL-6 o el TNF. Es posible que su papel sea más importante en condiciones patológicas, como la pérdida brusca de la función gonadal o la destrucción ósea ligada a procesos inflamatorios, que en condiciones fisiológicas (Passeri y cols. 1993). Los osteoblastos también producen otras moléculas pequeñas, como el óxido nítrico, que puede tener efectos bifásicos sobre la actividad osteoclástica (Riancho y Gutierrez 2003). Hay que tener en cuenta que muchos de los efectos de las hormonas que regulan la resorción ósea no se deben a acciones directas sobre los osteoclastos. Por el contrario, están mediados por cambios en la síntesis de factores osteoblásticos que secundariamente actúan sobre los precursores osteoclásticos, de manera especial el RANKL y la osteoprotegerina. Es decir, estos sistemas moleculares son los traductores de los factores hormonales sistémicos a nivel del microambiente óseo (Riancho y Delgado-Calle 2011).

La osteoprotegerina (OPG) es un receptor trampa (decoy) que actúa como antagonista del RANKL. Es una proteína liberada por los osteoblastos en forma soluble para proteger al esqueleto de una excesiva resorción ósea. Al unirse al RANKL lo bloquea para su unión al RANK inhibiendo la diferenciación y activación del precursor osteoclástico y aumentando su apoptosis, por lo cual la relación RANKL/OPG es indicativa de la osteoclastogénesis en una serie de enfermedades del remodelamiento óseo (Reynaga y Zeni 2009).

La medición de OC no carboxilada es considerada un índice de deficiencia de vitamina K y podría jugar un rol, en el futuro, para predecir la masa ósea y el riesgo de fracturas.

<b>SECUENCIA DEL REMODELADO OSEO</b>	
<b>Precursor</b>	Llegada al hueso en una zona determinada
<b>Osteoclástico</b>	Diferenciación y reabsorción
<b>Osteoclasto</b>	Dos semanas después existe una pequeña cavidad (con forma de túnel en el hueso compacto y de laguna en el trabecular)
<b>FASE DE INVERSION</b>	
<b>Células mononucleares</b>	Tapizado de la cavidad
<b>Precursores osteoblásticos</b>	Proliferación y diferenciación
	Síntesis de osteoide en la cavidad
<b>FASE DE FORMACION DE HUESO</b>	
<b>2 -4 MESES</b>	
<b>Acoplamiento</b>	Aposición de hueso
	Renovación del hueso
	Modificaciones estructurales que permiten mejor adaptación a estímulos mecánicos, disposición de una cantidad de calcio y fósforo, permitiendo el mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica, y una calcemia normal

Tabla A2. Secuencia del remodelado óseo en humanos (Riancho y Gutierrez 2003).

### Inflamación diabetes y remodelado óseo

Un proceso inflamatorio localizado en el propio hueso o sus proximidades puede alterar el tejido óseo. Casi siempre esa alteración va a suponer una destrucción del tejido, es decir, una disminución de la masa ósea.

Existen mediadores que se producen en el foco inflamatorio y que promueven la actividad osteoclástica. Algunos, como la IL-8 (interleucina 8) o la MIP-1 (proteínas inflamatorias de macrófagos), ejercen efectos quimiotácticos y favorecen el reclutamiento de OC hacia la zona afectada. Otros favorecen la osteoclastogénesis o la actividad de los OC maduros. Entre ellos se incluyen tanto péptidos (IL-1, TNF, IL-6, RANKL) como factores no proteicos (óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos, radicales libres). Además, los

propios macrófagos pueden contribuir a la resorción de hueso, aunque no son capaces de resorber hueso en profundidad excavando auténticas lagunas, pero sí pueden llevar a cabo una cierta resorción superficial.

La inflamación promueve la destrucción del tejido óseo y ésta favorece la duración de la inflamación. Entonces posiblemente los fármacos que bloquean la resorción, como los bifosfonatos, podrían también reducir el proceso inflamatorio. En el caso de los procesos infecciosos algunos productos bacterianos pueden actuar directamente sobre los OB inhibiendo la síntesis de proteínas de la matriz ósea, como la colágena o la osteocalcina (Riancho y Gutierrez 2003).

En estudios anteriores se ha demostrado que los osteocitos del hueso alveolar responden a la hiperglucemia mostrando una disminución en su densidad. Como estas células están implicadas en la mecanotransducción que regula la osteogénesis en las zonas de tensión de la formación de hueso, las alteraciones tempranas de estas células causadas por la hiperglucemia pueden estar asociadas con la disminución de la formación ósea observada en los animales diabéticos sometidos a fuerzas ortodóncicas. (Villarino y cols. 2006)

El análisis de los efectos de la insulina sobre las células óseas ha demostrado que posee un claro efecto anabólico sobre a matriz y el mineral óseo.

En las ratas diabéticas por aloxan o estreptozotocina, la disminución en el crecimiento tiene un obvio impacto en todas las variables del tejido óseo. Las tasas de formación y reabsorción óseas están reducidas. El impacto de la diabetes sobre la masa ósea puede ser evaluado comparándola con la de los animales controles de la misma edad. Si la insuficiencia insulínica es leve (glucemias matutinas entre 1 y 3 mg/L) la masa ósea corporal no estará afectada.

Comparando la densidad mineral del hueso sin patología y con patología, entre la 6<sup>a</sup> y 11<sup>a</sup> semana de edad los animales diabéticos pierden aproximadamente el 49% de la densidad mineral en las áreas de reabsorción (García 2008).

La DM puede afectar el hueso mediante distintos mecanismos, por supuesto la hiperinsulinemia puede promover la producción ósea. Por otra parte los bajos niveles de insulina en la DM tipo 1 causan una reducción de la densidad mineral ósea y por lo tanto una disminución de la masa esquelética alterando las líneas de crecimiento, la composición corporal y la cicatrización de heridas.

Sin embargo en el sistema estomatognático no ha sido bien documentado el efecto de la DM sobre el metabolismo óseo y el crecimiento craneofacial.

El metabolismo óseo está afectado por la DM tipo 1 ya sea a través del efecto directo de la deficiencia insulínica, por la hiperglucemia o por el daño vascular a largo plazo.

Datos previos sugieren que la acción del osteoblasto puede ser corregido mediante el control glicémico, indicando que la hiperglucemia produce una discapacidad directa en el metabolismo óseo.

El hueso craneofacial es bien sabido que tiene un variado crecimiento a diferentes velocidades y una maduración a diferentes tiempos. La respuesta ante la interrupción del crecimiento craneofacial es más complejo que en el esqueleto apendicular. Puede esperarse que las diferentes partes del complejo craneofacial respondan de una manera distinta ante el mismo estímulo biomecánico y hormonal. La DM tipo 1 (DMT1) ha mostrado tener una afección en el crecimiento general en los pacientes diabéticos debido a la deficiencia insulínica y en consecuencia un retardo en la maduración esquelética. La aplicación de fuerzas ortodóncicas genera reacciones en el tejido que no solo están relacionadas a factores locales asociados con la oclusión dental si no también con factores sistémicos afines con el metabolismo general óseo de hormonas y citoquinas. Esto se ha visto en el metabolismo óseo teniendo un impacto significativo en la reacción de los tejidos así como en el movimiento dental durante el periodo de retención. Además es de suma importancia conocer el mecanismo del metabolismo óseo en casos de DM especialmente relacionado con el daño craneofacial (Abbassy y cols. 2008).

En el estudio de Claudino (2007), se demostró el aumento en la pérdida de hueso alveolar en ratas diabéticas, acrecentando el número de células inflamatorias después de 3 meses de ser inducidas con aloxan, además de una importante reducción en la densidad de las fibras de colágeno 6, 9 y 12 meses después. Estas fueron comparadas con un grupo control.

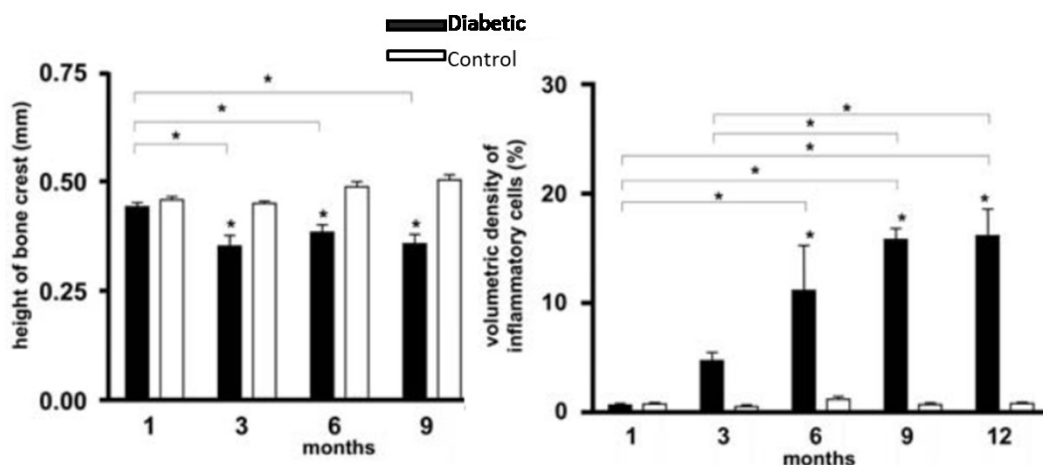


Figura A11. Cambios asociados con la pérdida de hueso alveolar en grupos de ratas diabéticas. Las ratas diabéticas presentaron una importante pérdida ósea alveolar, iniciando 3 meses después de la inyección de aloxan comparadas con el grupo control (Claudino y cols. 2007).

Shyng y cols. (2001) registran en un análisis histomorfométrico de hueso perdido de 40.9% en ratas diabéticas, mientras que en las ratas sanas se obtuvo un 54.3%.

Existen estudios experimentales sobre la calidad del hueso incluso cuando la diabetes no era tan significativa. Por lo tanto debería ser considerado que la actividad del hueso interradicular formado en animales diabéticos podría no ser el mismo en animales sanos, incluso cuando el volumen se mantiene intacto (Villarino y cols. 2011).

### *Movimiento Ortodóncico (estrés mecánico)*

Según la American Association of Orthodontists 1981:

“La ortodoncia es el área de la odontología que se ocupa de la supervisión, la guía y la corrección de las estructuras dentofaciales en crecimiento y maduras, incluidas aquellas situaciones que requieren el movimiento de dientes o la corrección de relaciones deficientes y malformaciones de estructuras, por medio del ajuste de las relaciones entre los dientes y de los dientes con los huesos faciales, por la aplicación de fuerzas exógenas y/o estimulación y reorientación de las fuerzas funcionales dentro del complejo craneofacial.



La ortodoncia es una terapia ortopédica. Estas fuerzas, que son controladas, generan respuestas biológicas en las células y los tejidos por procesos como la transducción y las señales intercelulares” (Frydman 2005).

Los estímulos mecánicos se traducen en una respuesta biológica. Este proceso se denomina Mecanotransducción, y consta de varios pasos:

1. Acoplamiento mecánico: las fuerzas mecánicas actúan como señales que son recogidas por células sensoriales.
2. Acoplamiento bioquímico: la señal mecánica recogida desencadena una vía de señalización que finalmente provoca un acontecimiento celular como la activación de un gen.
3. Transferencia de una señal desde una célula sensorial a las células efectoras.
4. Respuesta de las células efectoras (Llanos 2012).

Para que un diente se mueva deben formarse osteoclastos que puedan eliminar el tejido óseo de la zona adyacente a la parte comprimida del LPD. También se requiere la presencia de osteoblastos para formar nuevo tejido óseo en el lado sometido a tensión y para remodelar las zonas reabsorbidas en el lado de la presión. Los experimentos realizados con animales sugieren que sólo cuando las fuerzas se mantienen durante unas 4 horas comienzan a aumentar los niveles de nucleótidos cíclicos en el LPD lo que significa que la presión debe mantenerse para producir osteoclastos (de la segunda oleada) necesarios para estimular la diferenciación celular (Proffit y cols. 2009). Pueden pasar hasta 48 horas antes de que aparezcan los primeros osteoclastos en el LPD comprimido y sus alrededores. Estudios de cinética celular indican que llegan en dos oleadas, lo que quiere decir que algunos (la primera oleada) pueden derivar de una población celular local, mientras que otros (la segunda oleada, de mayor magnitud) proceden de zonas distantes y llegan a través del flujo sanguíneo. Estas células atacan la lámina dura adyacente, eliminando hueso mediante el proceso de “reabsorción frontal” y el movimiento dental empieza poco después, al mismo tiempo pero con algún retraso, de tal forma que el espacio del LPD aumenta de tamaño, los osteoblastos (reclutados localmente a partir de células progenitoras del LPD) forman tejido óseo en el lado de la tensión e inician la actividad remodeladora en el lado de la presión (Proffit y cols. 2009).

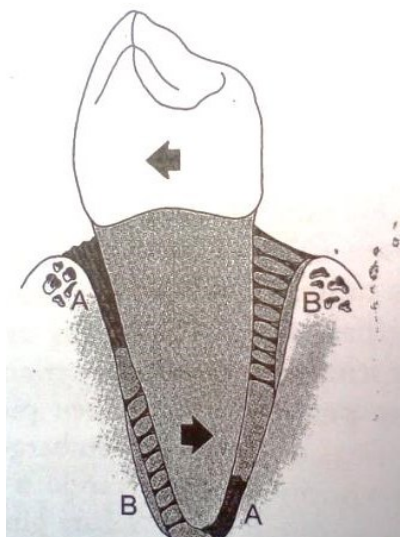


Figura A12. Esquema de la inclinación del diente que puede ocurrir en el movimiento ortodóncico. A medida que la corona del diente se desplaza hacia la izquierda, la raíz se mueve hacia la derecha. Los osteoclastos aparecen en las zonas A, que acompañan a la resorción ósea, mientras que los osteoblastos aparecerán en las zonas B con formación de hueso (Gaete 2006).

Las características histológicas que acompañan a las modificaciones generadas por las fuerzas ortodóncicas incluyen: cambios en el número y el tipo de células, alteraciones vasculares y en la matriz extracelular. En el movimiento dental ortodóncico interviene el mecanismo de transducción, es decir, la conversión de una fuerza física (mecánica, electrostática) en una respuesta biológica. Las señales iniciadoras de cambios metabólicos en las células y los tejidos periodontales son: alteración del flujo sanguíneo y linfático, cambios de presión y volumen en el espacio periodontal, distorsión de moléculas de la matriz, distorsión de la membrana plasmática y el citoesqueleto, efectos bioeléctricos generados por estrés (flexión del hueso) inducido mecánicamente en las fibras colágenas y en los cristales de hidroxapatita (las cargas electronegativas producen osteogénesis, mientras que las cargas positivas se perciben en las superficies convexas y dan lugar a resorción) influencias hormonales, fenómenos inflamatorios y otros acontecimientos nerviosos e inmunocelulares (Frydman 2005).

- A las 8 horas se nota un pico de preosteoblastos nuevos.
- A las 20 horas son evidentes niveles máximos de síntesis de DNA
- Hacia las 30 horas se nota un salto en la actividad mitótica
- Después de 35 horas se acumulan progresivamente nuevos osteoblastos marcados
- 40 a 48 horas después de la aplicación de la fuerza se inicia la formación de hueso nuevo.

Tabla A3. Secuencia cinética celular asociada con la inducción ortodóncica de formación de hueso nuevo (Graber 2003).

#### *Fenómenos en el lado de compresión*

Los monocitos, células circulantes de la sangre, salen de los vasos y se agregan para formar una célula multinucleada especializada en la resorción: el osteoclasto y crean espacio para el movimiento dental, por resorción ósea. Aparecen pocas horas después de iniciada la aplicación de la fuerza. En el ligamento ocurre además una proliferación vascular (mediada por factores de crecimiento como el factor endotelial de crecimiento vascular, VEGF) y alta actividad celular. Se produce el recambio de fibras colágenas periodontales; en este proceso, los fibroblastos también actúan como fibroclastos (Frydman. 2005).

#### *Fenómenos en el lado de tensión*

Aquí se produce un aumento de las células 30-40 horas después de la aplicación de la fuerza ortodóncica. Hay un gran recambio de elementos fibrosos por macrofagia y fagocitosis que realizan los fibroblastos/ fibroclastos y dilatación vascular.

A medida que las fibras se estiran, se deposita una matriz orgánica no mineralizada en estrecha relación con la pared alveolar: es el osteoide depositado por los osteoblastos del tercio osteógeno.

La mineralización del osteoide se produce en forma progresiva, en capas, desde las más profundas hasta las más superficiales. También puede observarse un depósito de cemento sobre la raíz (Frydman 2005).

### *Efectos de la presión ortodóncica en el Ligamento Periodontal*

Según la teoría de presión-tensión, la alteración del flujo sanguíneo en el seno del LPD se debe a la presión mantenida que obliga al diente a cambiar de posición en el espacio del LPD, comprimiéndolo en algunos puntos y tensándolos en otros. El flujo sanguíneo disminuye donde el LPD queda comprimido y suele mantenerse o aumentar en los puntos de tensión. Si se tensan excesivamente algunos puntos del LPD, el flujo sanguíneo puede disminuir de forma pasajera. Las alteraciones del flujo sanguíneo inducen rápidos cambios en el entorno químico. Por ejemplo, los niveles de oxígeno disminuirán en la zona comprimida, pero podrían aumentar en el lado sometido a tensión y también cambiaría la proporción relativa de otros metabolitos en cuestión de minutos. Estos cambios bioquímicos estimularían más adelante la diferenciación y las actividades celulares.

Cuanto más intensa sea la presión mantenida, mayor será la reducción del flujo sanguíneo a través de las zonas comprimidas del LPD (ligamento periodontal) hasta el punto en que los vasos quedan totalmente colapsados y deja de fluir la sangre por ellos. Esta secuencia teórica se ha podido confirmar en experimentos con animales: al aumentar la fuerza que actúa sobre un diente, disminuye la perfusión del LPD en el lado de la compresión (Proffit y cols. 2009).

Tiempo		Respuesta
Presión leve	Presión intensa	
< 1 seg.		El líquido del LPD no se comprime, el hueso alveolar se flexiona, se genera una señal piezoeléctrica.
1-2 seg.		Se exprime el líquido del LPD, el diente se mueve dentro del espacio del LPD.

3-5 seg.		Los vasos sanguíneos del LPD quedan parcialmente comprimidos en el lado de la presión y dilatados en el lado de la tensión. Hay distorsión mecánica de las fibras y células del LPD.
Minutos		Se altera el flujo sanguíneo, empieza a cambiar la tensión del oxígeno, se liberan prostaglandinas y citocinas.
Horas		Se producen cambios metabólicos: mensajeros químicos modifican la actividad celular, cambian los niveles enzimáticos.
~4 horas		Aumentan los niveles detectables de AMPc, comienza la diferenciación celular en el LPD.
~2 días		Comienza el movimiento dental al remodelar los osteoblastos/osteoclastos el alveolo óseo.
	3-5 seg.	Los vasos sanguíneos del LPD quedan ocluidos en el lado de la presión.
	minutos	Se interrumpe el flujo sanguíneo a la zona comprimida del LPD.
	Horas	Muerte celular en la zona comprimida
	3-5 días	Diferenciación celular en los espacios medulares adyacentes, comienza la reabsorción basal.
	7-14 días	La reabsorción basal elimina la lámina dura adyacente al LPD comprimido. Se produce el movimiento dental.

Tabla A4. Respuesta del tejido periodontal a la presión mecánica (Proffit y cols. 2009)

### *Efectos de la presión ortodóncica en el cemento radicular*

Investigaciones recientes han confirmado que cuando se aplican fuerzas ortodóncicas se suele producir una agresión contra el cemento de la raíz semejante al que sufre el hueso adyacente, pero también se produce una reparación de dicho cemento.

Rygh y cols. (2014), han demostrado que el cemento adyacente a las áreas hialinizadas (necróticas) del LPD queda “marcado” por este contacto y que los osteoclastos atacan este cemento cuando se repara el LPD.

Esta observación permite explicar porque una fuerza ortodóncica intensa y continuada puede dar lugar a una grave resorción radicular. Un examen cuidadoso de la superficie de las raíces de los dientes movilizados ortodóncicamente revela la existencia de zonas reparadas de reabsorción del cemento y la dentina de la raíz. Parece ser que el cemento y la dentina (si es que la reabsorción atraviesa el cemento) son eliminados de la superficie de la raíz mientras actúa la fuerza activa y posteriormente es restaurado durante los procesos de inactividad relativa (Brudvik y Rygh 1995).

### *Efectos de la presión ortodóncica en el hueso alveolar*

Por fortuna no es frecuente observar una pérdida excesiva de altura en el hueso alveolar como complicación del tratamiento ortodóncico. En una muestra importante de pacientes, la pérdida de altura del borde alveolar media fue inferior a 0.5mm y nunca fue superior a 1mm (Kennedy y cols. 1983).

También se observaron los niveles mínimos sobre los niveles de hueso alveolar en pacientes ortodóncicos seguidos a largo plazo. La causa radica en que la posición de los dientes determina la posición del hueso alveolar, cuando los dientes erupcionan o son movilizados, arrastran con ellos el hueso alveolar. La única excepción es el movimiento dental en presencia de trastorno periodontal activo, e incluso los pacientes que han sufrido pérdida ósea por un trastorno periodontal pueden recibir un tratamiento ortodóncico con una buena respuesta ósea, siempre que se llegue a controlar bien la patología periodontal (Proffit y cols. 2009).

### *Acontecimientos biológicos ante una fuerza intensa*

Cuando sucede que la fuerza mantenida que actúa sobre el diente es lo bastante intensa como para ocluir totalmente los vasos sanguíneos y cortar el suministro de una zona del LPD en vez del estímulo de las células de la zona comprimida del LPD para que se conviertan en osteoclastos, se produce una necrosis aséptica, en la zona comprimida. Debido a su aspecto histológico tras la desaparición de las células, se denominaba tradicionalmente “hialinizada” a esa zona avascular, aunque nada tiene que ver con la formación de tejido hialino, si no que representa la pérdida inevitable de todas las células al interrumpirse totalmente el aporte sanguíneo. Cuando se produce este fenómeno, células procedentes de zonas adyacentes intactas deben encargarse de remodelar el hueso adyacente a la zona necrosada.

Tras una demora de varios días, elementos celulares de zonas adyacentes intactas del LPD empiezan a invadir la parte necrosada (hialinizada), y lo que es más importante, aparecen osteoclastos en los espacios adyacentes de la médula ósea que empiezan a atacar la base ósea adyacente a la zona necrosada del LPD, este proceso recibe el adecuado nombre de “reabsorción basal” dado que el ataque se efectúa desde la parte inferior de la lámina dura. Cuando se producen la hialinización y la reabsorción basal se retrasa inevitablemente el movimiento dental (Proffit y cols. 2009).

Las fuerzas intensas dan lugar a una rápida aparición del dolor, a necrosis de los elementos celulares del ligamento periodontal y al fenómeno de reabsorción basal del hueso alveolar cercano al diente afectado (Proffit y cols. 2009).

# Metodología

## Consideraciones éticas y legales

Los animales utilizados en este proyecto fueron tratados de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO,<sup>1</sup>

1 NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Grupos	Día 0 Administración de STZ (*) / buffer de citratos(**)	Día 2 Medición de glucosa	Día 10 Colocación del aparato	Día 12 Sacrificio (48 horas post aparato.2D)	Día 14 Sacrificio (96 horas post aparato. 4D)	Día 16 Sacrificio (122 horas post aparato. 6D)
Experimental 1(E1)	*	*	*			*
Experimental 2 (E2)	*	*	*		*	
Experimental 3 (E3)	*	*	*	*		
Control 1 (C1)	**	*	*			*
Control 2 (C2)	**	*	*		*	
Control 3 (C3)	**	*	*	*		
Sana Buffer (N s/em)	**	*			*	
Diabética STZ (H s/em)	*	*			*	

Tabla M1. Diseño experimental para el modelo de estrés mecánico en ratas diabetizadas con estreptozotocina.

Se utilizaron 32 ratas tipo Wistar macho de 200-250gr. Distribuidas aleatoriamente en 3 grupos experimentales (4 en cada uno) y 1 grupo control formado por 12 ratas divididas en 3 grupos aleatoriamente. Fueron alojadas en el bioterio de la FES Iztacala durante 12-16 días, de 2 a 3 ratas por caja con aserrín que garantizó la absorción de orina, excremento y desperdicio de agua, favoreciendo su aislamiento térmico. Cada caja estuvo identificada mediante un tarjetón con los datos del proyecto. El alimento y el agua fueron de libre acceso, (*ad libitum*), la iluminación fue mediante luz artificial con cambios de ciclos cada 12 horas. La temperatura fue de 18° a 25°C. Con una humedad máxima de 54% y la mínima de 13%. Las ratas se marcaron para su identificación mediante marcadores de tinta



permanente libres de Xilol, no tóxicos de diferentes colores, formando anillos en la cola dependiendo de cada caso.



Figura M1. Aislamiento de las ratas dentro del bioterio e identificación por medio de tarjetones.

#### *Grupos experimentales*

Una vez seleccionados pesados y marcados los grupos, se indujo Diabetes Mellitus tipo 1 con la aplicación intraperitoneal de 65mg/Kg de peso de estreptozotocina (STZ) de la casa comercial Sigma Aldrich, tomando la medición de glucosa 2 días después de la administración. Mediante el dispositivo Accu Chek performa 300 (*ver ANEXO 1*).



Figura M2. Administración intraperitoneal de estreptozotocina para la inducción de diabetes mellitus tipo 1.

- Ocho días después de la inducción con estreptozotocina se colocó el aparato ortodóncico que consistió en un arco de Níquel Titanio 0.012". (Entre los 1ºs y 2ºs molares superiores).

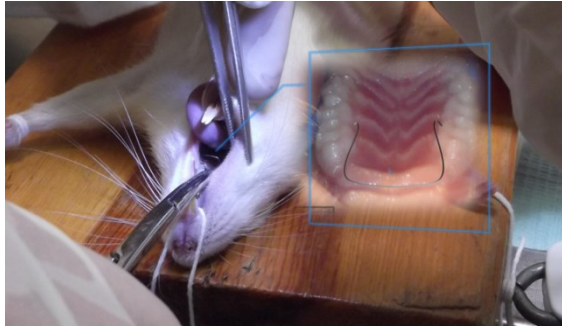


Figura M3. Colocación del aparato de ortodóncico entre los 1ºs y 2ºs molares superiores.

- Para obtener la anestesia general de la rata se utilizó como relajante Xilazina 7ml/kg aplicándola inicialmente, siguiendo con la administración de Ketamina 60ml/kg aplicándola de 5 a 10 minutos después de la Xilazina.

Logrando la relajación de la rata por medio de la Xilazina se disminuye la cantidad de anestésico a utilizar (Ketamina), además de un mejor manejo de la rata.

Durante el tiempo que la rata estuvo bajo anestesia se colocaron gotas de agua estéril en los ojos para mantenerlos hidratados. Las ratas fueron frotadas para reanimarlas una vez colocado el aparato ortodóncico.

- El grupo E1 fue sacrificado a los 6 días, el grupo E2 a los 2 días y el grupo E3 a los 4 días. Por medio de sobreexposición a CO<sub>2</sub>. Se extrajo el maxilar, y se fijaron los tejidos con paraformaldehído al 4% con un pH de 7.4 (*ver ANEXO 2*).



Figura M4. Sacrificio de la rata mediante sobreexposición a CO<sub>2</sub> y disección del maxilar.

*Grupos testigo (normoglicémica) con aparato*

- Aleatoriamente se hicieron 3 grupos de 4 ratas cada uno, C1,C2 y C3 haciendo referencia a los grupos experimentales. Las ratas fueron tratadas de la misma forma que los grupos experimentales a excepción de la administración de STZ.
- Se administró 1ml. /Kg de solución de buffer de citratos con un pH de 4.5 (ver ANEXO 3).

Testigo hiperglicémica-sin estrés mecánico (H s/em)

- Fueron tratadas con referencia a los grupos experimentales a excepción de la colocación del aparato ortodóncico. Fue sacrificada a los 4 días.

Testigo Normoglicémica-sin estrés mecánico (N s/em)

- Fue tratada con referencia a los grupos testigo a excepción de la colocación del aparato ortodóncico. Fue sacrificada a los 4 días.

### *Desmineralización*

---

(Ver ANEXO 4)

Una vez fijados los tejidos fueron desmineralizados mediante EDTA durante 1 semana, las muestras fueron colocadas en casetes con rejillas junto con la etiqueta de identificación, dentro de un vaso de precipitados con 300mL de EDTA, sobre el agitador magnético. Este procedimiento se revisó cada 48 horas durante 1 semana. Para corroborar que los tejidos habían sido completamente descalcificados se tomó una radiografía de las muestras, tomando como testigo un maxilar sin descalcificar.



Figura M5. Desmineralización de la muestra mediante EDTA y confirmación radiográfica.

### *Posfijación*

---

Una vez descalcificadas, las muestras fueron posfijadas con paraformaldehído, 1mL por cada 100mL de EDTA durante 24 horas.

### *Tren de alcoholes (deshidratación de la muestra)*

---

*(Ver ANEXO 5)*

- *Alcohol 70° ---- 1 hora*
- *Alcohol 80° ---- 1 hora*
- *Alcohol 90° ---- 1 hora*
- *Alcohol 96° ---- 1 hora*
- *Alcohol 100° (anhídrido) --- 1 hora*
- *Alcohol amílico ---30 min.*
- *Aceite ---- 24 horas*

### *Inclusión en parafina*

---

En un frasco etiquetado se fundió la parafina a 60° C. y se sumergieron las muestras dentro de los casetes.

- *Parafina con aceite (parafina I) ---- 1 hora*
- *Parafina I ----- 1 hora*
- *Parafina II ----- 1 hora*

Transcurridos estos tiempos se colocó la muestra dentro del cubo de inclusión orientándola horizontal, con las caras vestibulares de los molares hacia la base. Se vació parafina de inclusión hasta llenar el cubo. Finalmente se colocó la etiqueta de identificación. *(ver ANEXO 6).*

### *Cortes en micrótopo*

---

Se realizaron cortes en micrótopo (Leyka) a un grosor de 7 micras. Estirando y fijando la muestra mediante Ruyter. Una vez estirada y orientada la muestra se retiró el portaobjetos de la plancha, dejando secar el Ruyter a temperatura ambiente para evitar la formación de burbujas sobre la muestra. Ya seco el portaobjetos se colocó en la plancha a 47°C para su fijación.



Figura M6. Cortes en micrótopo y fijación de la muestra sobre el portaobjetos

### *Tinción Hematoxilina/Eosina*

---

(Ver ANEXO 7)

Previo a la tinción se desparafinaron las laminillas en el horno a 65° durante media hora. Para el estudio histológico de las muestras, fueron teñidas mediante tinción de Hematoxilina – Eosina de acuerdo a los siguientes tiempos:



Figura M7. Laminillas dentro del horno a 65°C para desparafinarse.

<b>Tiempos Eosina (HyE)</b>	<b>Hematoxilina-</b>
Xilol I	5 min.
Xilol II	5 min.
OH-100°	3 min.
OH- 90°	2 min.
OH-80°	2 min.
OH-70°	1 min.
Agua corriente	3 min.
Hematoxilina de Harris	7 min.
Agua corriente	1 min.
Alcohol acido	Lavado
Agua corriente	Lavado
Agua amoniacal	Lavado
Agua corriente	Lavado
Eosina alcohólica	5 min.
OH-70°	1 min.
OH-80°	2 min.
OH-90°	2 min.
OH-100° I	3 min.
OH-100° II	3 min.
Xilol I	5 min.
Xilol II	5 min.

Tabla M1. Tiempos para tinción HyE.

## *Montaje*

---

Para preservar permanentemente los cortes se montaron con entellán y se dejaron secar durante 24 horas.



Figura M8. Montaje para la preservación del corte.

## *Análisis microscópico*

---

Se utilizó microscopio óptico “MOTIC BA310” además del programa “IMAGES MOTIC 2.0”. Se tomaron fotografías y se realizó el conteo final utilizando la magnificación de 10X y 40X.

El estudio histológico se enfocó al septum interradicular de las raíces vestibulares de los primeros molares superiores, se contó el número de osteoclastos en un área de  $500 \times 800 \mu\text{m}$  utilizando un aumento de 40X. Mientras que para la medición de la laguna osteocitaria, los osteocitos se seleccionaron en un área de  $900 \times 700 \mu\text{m}$  con un aumento de 10X, solo aquellos que su forma fuese redonda para poder utilizar el software Motic. Images Plus 2.0



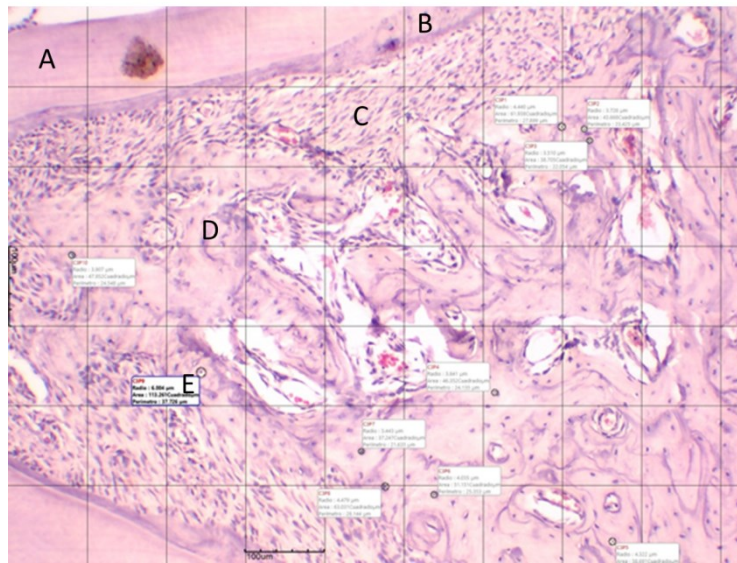


Figura M9. Zona de hueso interradicular. (A) Dentina, (B) Cemento radicular, (C) Ligamento periodontal, (D) Resultados de las mediciones de las lagunas osteocitarias. La barra representa 100 $\mu$ m.

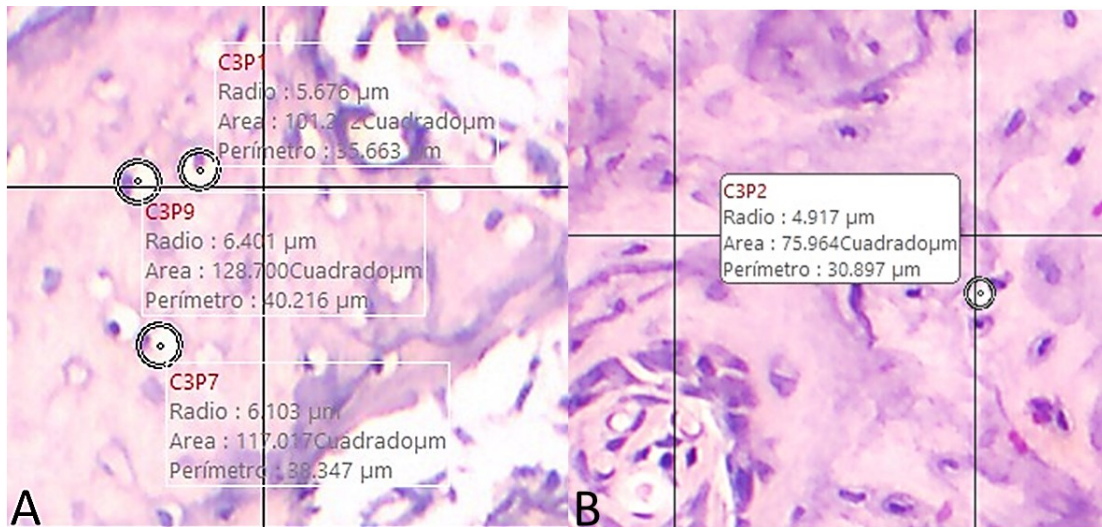


Figura M10. Medición del área de la laguna osteocitaria en hueso interradicular de rata E1(A) y C1 (B).

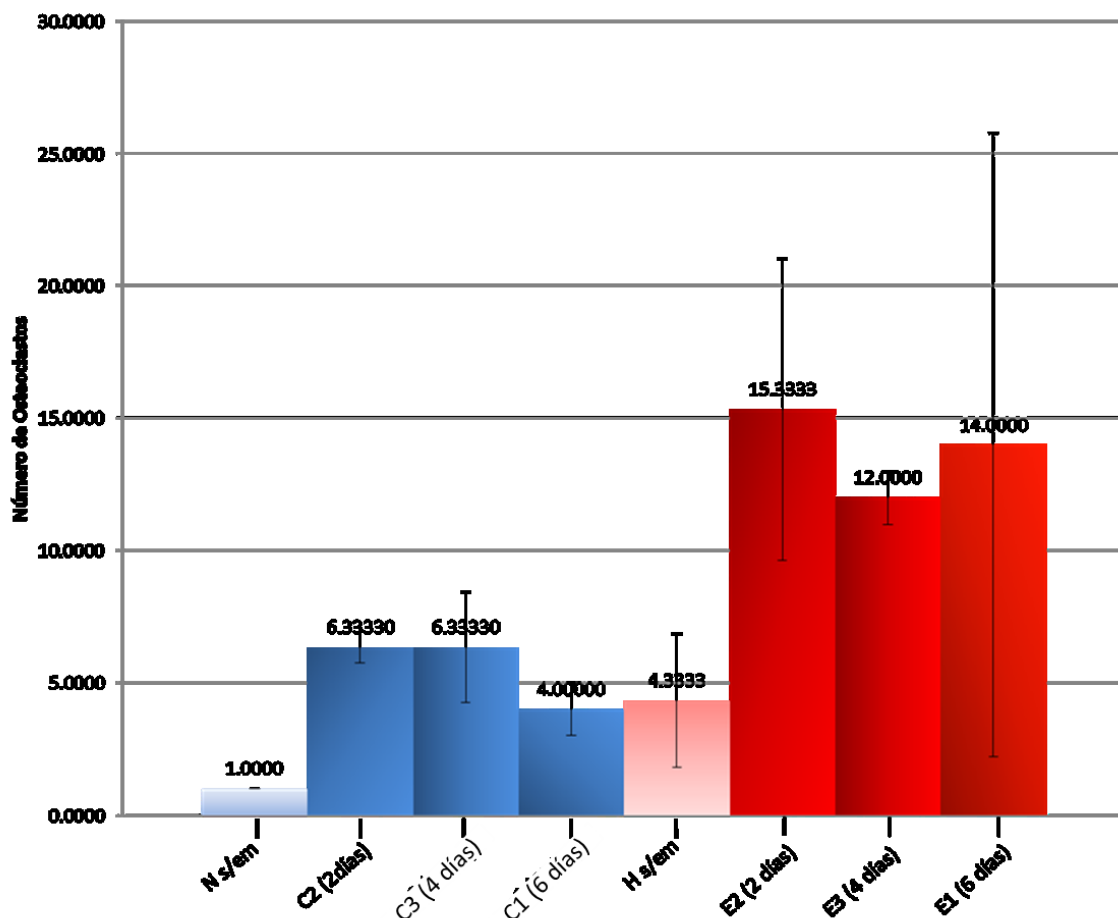
# Resultados

Osteoclastos:

En el grupo de especímenes a los que sólo se les administró buffer (N s/em) el número de osteoclastos es de  $1 \pm 0$ , mientras que en el grupo de ratas a las que se les administro la estreptozotocina (H s/em) es de  $4.3 \pm 2.5$ .

En los grupos testigo de especímenes sanos con estrés mecánico se obtuvieron los siguientes resultados: C2 tuvo  $6.3 \pm 0.5$  osteoclastos, las ratas del grupo C3 tuvieron  $6.3 \pm 2$  osteoclastos y el grupo C1 tuvo  $4 \pm 1$  osteoclastos.

Mientras que los grupos diabéticos experimentales con estrés mecánico del grupo E2 tuvieron  $15.3 \pm 5.6$  osteoclastos, el grupo E3 tuvo  $12 \pm 1$  osteoclastos y finalmente) el grupo E1 tuvo  $14 \pm 11.7$  osteoclastos. (Gráfica R1).



Grafica R1. En la gráfica se observa el número de osteoclastos de los grupos experimentales y testigos en los diferentes días de sacrificio. En los grupos a los que no se les aplicó estrés mecánico (N s/em, H s/em), el número de osteoclastos fue menor que en

los grupos con estrés mecánico. En los grupos hiperglicémicos con estrés mecánico (E1, E2, E3) fue mayor el número de osteoclastos en comparación con los grupos normoglicémicos (C1, C2 C3). Como se puede observar en los grupos diabéticos hay un notorio aumento del número de osteoclastos en el hueso alveolar interradicular con respecto a las ratas normoglicémicas.

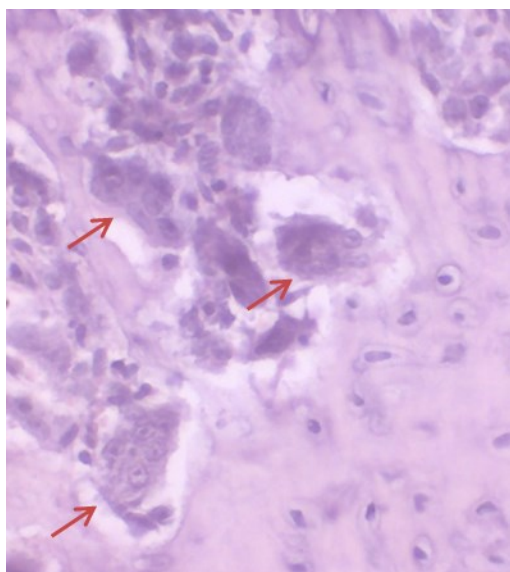


Figura R1. Osteoclastos en el hueso alveolar de ratas normoglicémicas sometidas a estrés mecánico. Obsérvense los osteoclastos multinucleados en la superficie ósea formando lagunas de resorción.

En las comparaciones entre el número de osteoclastos presentes en las superficies del hueso alveolar de los diferentes grupos utilizando el análisis de varianza (ANOVA) encontramos que existen diferencias entre el grupo sano sin estrés mecánico (N s/em) y los tres grupos diabéticos experimentales (E1, E2, E3).Tabla R1.

osteoclastos					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	569.167	7	81.310	3.529	.017
Intra-grupos	368.667	16	23.042		
Total	937.833	23			

Tabla R1. ANOVA, análisis de varianza del número de osteoclastos de los diferentes grupos.

El análisis post hoc de Tukey nos muestra que las diferencias estadísticamente significativas estuvieron entre los grupos diabéticos con estrés mecánico de 2 y 6 días (E2 Y E1).

No se encontraron diferencias significativas en el número de osteoclastos entre el grupo H s/em ( $4.3 \pm 2.51$ ) y el grupo N s/em ( $1 \pm 0$ ). Mientras que entre el grupo N s/em ( $1 \pm 0$ ) y los grupos C1, C2 y C3 las diferencias significativas fueron nulas. (Tabla R2).

Buffer sin estrés mecánico (N s/em) $1 \pm 0$		Media de osteoclastos	$p > 0.05$
	estrés+buffer 2D (C2)	$6.3 \pm 5.7$	0.192
	estrés+buffer 4D (C3)	$6.3 \pm 2$	0.192
	estrés+buffer 6D (C1)	$4 \pm 1$	0.455

Tabla R2. Análisis post hoc de la media de osteoclastos entre grupo normoglicémico sin estrés mecánico y grupos normoglicémicos con estrés mecánico

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos hiperglicémicos con estrés mecánico de 2 y 6 días (E2, E1) en comparación con los grupos normoglicémicos con estrés mecánico (C1, C2, C3) siendo más significativo el grupo E2 (Tabla R3 y R4).

estrés + diabetes 2D (E2) $15.3 \pm 5.6$		Media de osteoclastos	$p < 0.05$
	estrés+buffer 2D (C2)	$6.3 \pm 5.7$	0.036*
	estrés+buffer 4D (C3)	$6.3 \pm 2$	0.036*
	estrés+buffer 6D (C1)	$4 \pm 1$	0.011*

Tabla R3. Análisis post hoc de la media de osteoclastos entre el grupo E2 y C1, C2 y C3.

estrés + diabetes 6D (E1) $14 \pm 1$		Media de osteoclastos	$p < 0.05$
	estrés+buffer 6D (C1)	$4 \pm 1$	0.021*

Tabla R4. Análisis post hoc de la media de osteoclastos entre los grupos E1 y C1.

-En relación al área de las lagunas osteocitarias se encontraron los siguientes resultados:

En las ratas de los grupos N s/em e Hs/em, se encontró que el área de las lagunas osteocitarias de las ratas normoglicémicas en promedio fue de  $56.1 \mu\text{m}^2 \pm 21.9$  mientras que en las ratas hiperglicémicas es de  $112.3 \mu\text{m}^2 \pm 22.2$ .

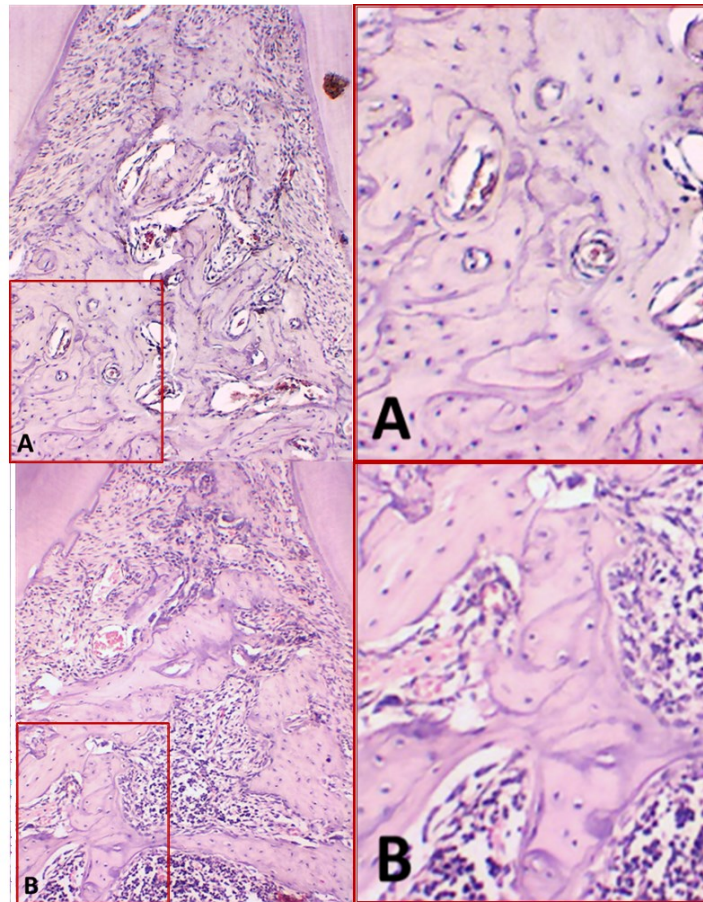


Figura R2. Distribución de osteocitos en sus lagunas en el hueso alveolar de ratas sin estrés mecánico. (A) N s/em (B) H s/em



En los grupos control C1, C2 y C3 se encontró que el área de la laguna osteocitaria en promedio es de  $90.3\mu\text{m}^2 \pm 2.8$  en las ratas del grupo C2, en el grupo C3 es de  $70.4\mu\text{m}^2 \pm 22.7$  y finalmente en las ratas del grupo C1 fue de  $67.0\mu\text{m}^2 \pm 24.2$ .

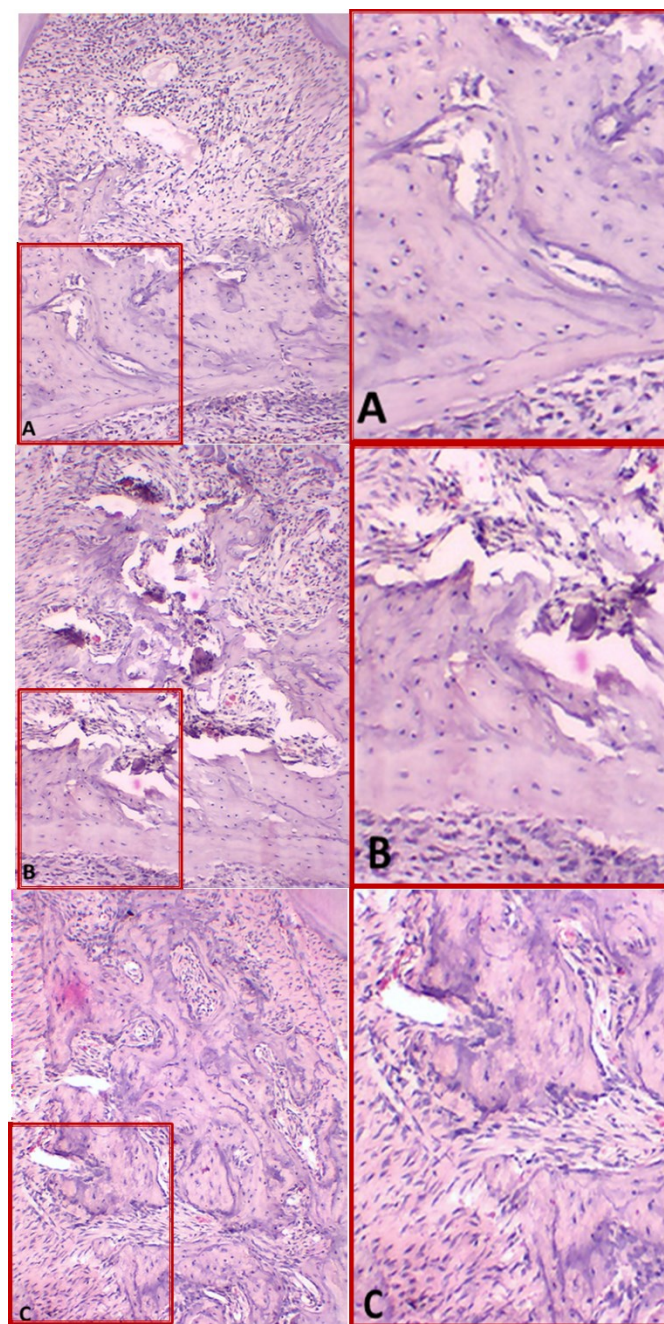


Figura R3. Distribución de osteocitos en sus lagunas en el hueso alveolar de ratas normoglicémicas con estrés mecánico. (A)C2, (B) C3, (C) C1.

En el grupo experimental E2 se encontró que el área de la laguna osteocitaria en promedio es de  $139.4 \mu\text{m}^2 \pm 46.7$ , en el grupo E3 es de  $114.4 \mu\text{m}^2 \pm 35.6$  y finalmente en el grupo E1 fue de  $126.2 \mu\text{m}^2 \pm 20.5$ .

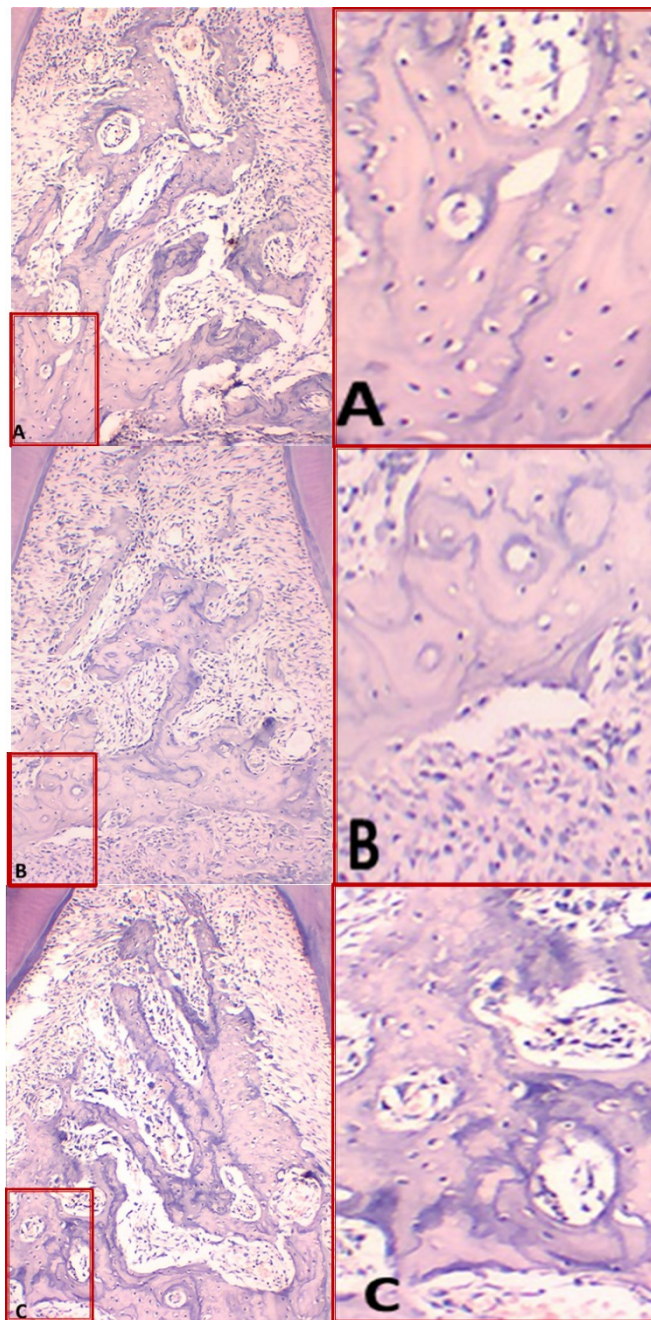
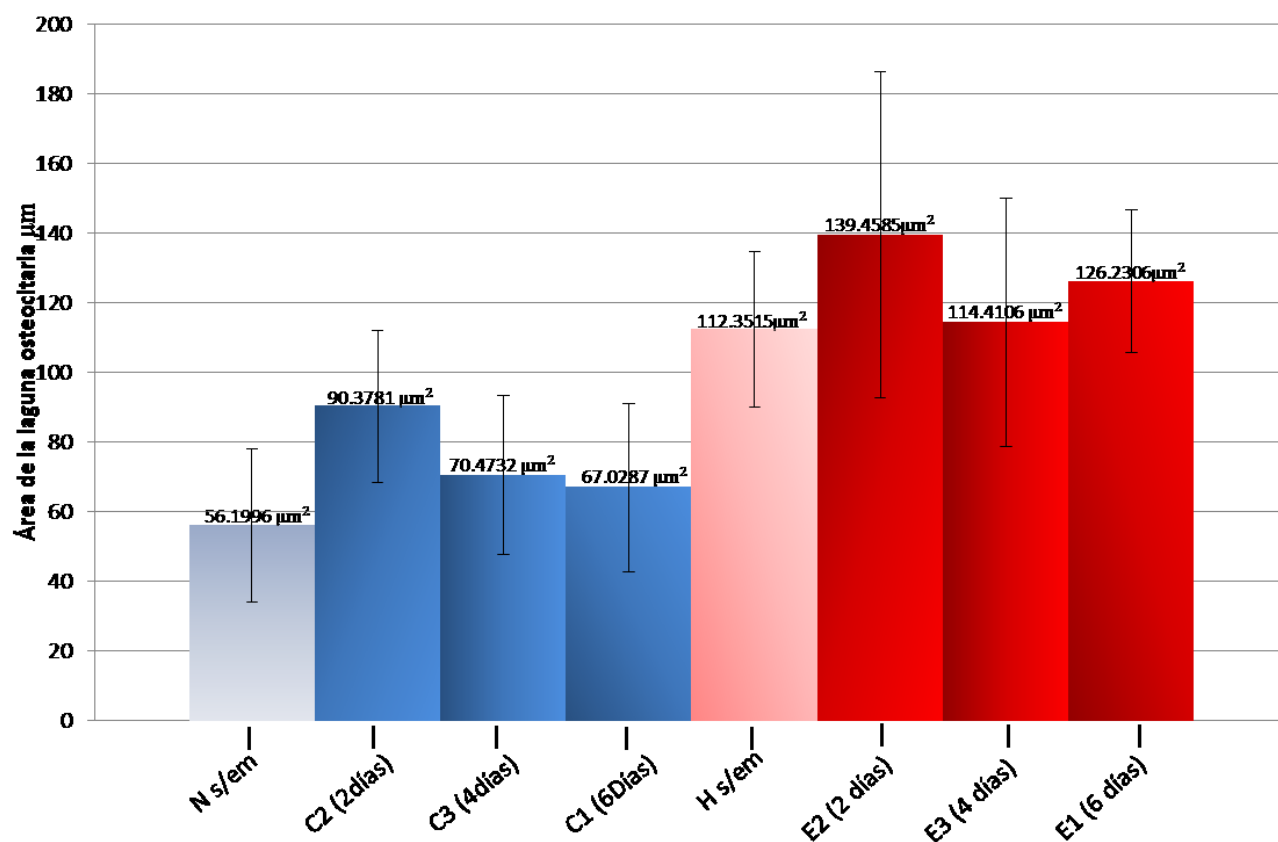


Figura R4. Distribución de osteocitos en sus lagunas en el hueso alveolar de ratas hiperglicémicas con estrés mecánico. (A) E2, (B) E3, (C) E1.



Gráfica R2. Media de las áreas de las lagunas osteocitarias de los grupos normoglicémicos e hiperglicémicos con y sin estrés mecánico a diferentes días de sacrificio. El área de la laguna osteocitaria fue mayor en los grupos hiperglicémicos con y sin estrés mecánico (H s/em, E1, E2, E3) en comparación con los grupos normoglicémicos (N s/em, C1, C2, C3).

En las comparaciones de los valores de las áreas de las lagunas osteocitarias entre los diferentes grupos utilizando el análisis de varianza (ANOVA) encontramos que existen diferencias significativas entre los grupos Hiperglicémicos y normoglicémicos con y sin estrés mecánico. (Tabla 5.)

ANOVA					
Área de la laguna osteocitaria					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	65063.867	7	9294.838	11.534	.000
Intra-grupos	58020.102	72	805.835		
Total	123083.969	79			

Tabla R5. ANOVA, análisis de varianza del área de las lagunas osteocitarias de los diferentes grupos.



El análisis post hoc de Tukey nos muestra que las diferencias estadísticamente significativas se encontraron en los siguientes grupos.

		Media del área de las lagunas osteocitarias	p< 0.05 (*)
Hiperglicémica (H s/em) 112.3 $\mu\text{m}^2 \pm 22.2$	Normoglicémica (N s/em)	56.1 $\mu\text{m}^2 \pm 21.9$	0.001*
	estrés +buffer 4D (C3)	70.4 $\mu\text{m}^2 \pm 22.7$	0.031*
	estrés +buffer 6D (C1)	67 $\mu\text{m}^2 \pm 24.2$	0.014*

Tabla R6. Análisis post hoc del área de la laguna osteocitaria entre el grupo H s/em contra los grupos N s/em, C3 y C1.

		Media del área de las lagunas osteocitarias	p< 0.05 (*)
Normoglicémica (N s/em) 56.1 $\mu\text{m}^2 \pm 21.9$	estrés+diabetes 2D (C2)	139.4 $\mu\text{m}^2 \pm 47.7$	0.0*
	estrés+diabetes 4D (C3)	114.4 $\mu\text{m}^2 \pm 35.6$	0.0*
	estrés+diabetes 6D (C1)	126.3 $\mu\text{m}^2 \pm 20.5$	0.0*

Tabla R7. Análisis post hoc del área de la laguna osteocitaria entre el grupo N s/em y los grupos C1, C2 y C3.

		Media del área de las lagunas osteocitarias	p< 0.05 (*)
estrés+diabetes 2D (E2) 139.4 $\mu\text{m}^2 \pm 47.7$	estrés+buffer 2D (C2)	90.3 $\mu\text{m}^2 \pm 21.8$	0.006*
	estrés+buffer 4D (C3)	70.4 $\mu\text{m}^2 \pm 22.7$	0.0*
	Estrés+Buffer 6D (C1)	67 $\mu\text{m}^2 \pm 24.2$	0.0*

Tabla R8. Análisis post hoc del área de la laguna osteocitaria entre el grupo E2 y los grupos normoglicémicos C1, C2 y C3.

estrés+diabetes 4D (E3) 114.4 $\mu\text{m}^2 \pm 35.6$		Media del área de las lagunas osteocitarias	p < 0.05 (*)
	estrés+ buffer 4D (C3)	70.4 $\mu\text{m}^2 \pm 22.7$	0.019*
	estrés+buffer 6D (C1)	67 $\mu\text{m}^2 \pm 24.2$	0.009*

Tabla R9. Análisis post hoc del área de la laguna osteocitaria entre el grupo E3 y los grupos normoglicémicos C3 y C1.

estrés+diabetes 6D (E1) 126.3 $\mu\text{m}^2 \pm 20.5$		Media del área de las lagunas osteocitarias	p < 0.05 (*)
	estrés+ buffer 4D (C3)	70.4 $\mu\text{m}^2 \pm 22.7$	0.001*
	estrés+buffer 6D (C1)	67 $\mu\text{m}^2 \pm 24.2$	0*

Tabla R10. Análisis post hoc del área de la laguna osteocitaria entre el grupo E1 y los grupos normoglicémicos C3 y C1.

## Discusión

---

El modelo de estrés mecánico (Igarashi y cols. 1998) que utilizamos induce efectivamente la formación de osteoclastos y además produce cambios en las poblaciones celulares que conforman el periodonto de los molares de la rata, la ventaja de utilizar un resorte en U es que no producimos hialinización en el ligamento periodontal (necrosis aséptica) ya que la fuerza se distribuye a otras estructuras como es la sutura palatina (Cova 2008; Martínez 2011).

Así también, el modelo de inducción de diabetes a partir de la administración de estreptozotocina por vía intraperitoneal produjo de manera confiable niveles elevados de glucosa en sangre en los animales de experimentación reproduciendo las características de la diabetes tipo I (Chatzigeorgiou y cols. 2009). Los niveles de glucemia a las 48 horas posteriores a la administración alcanzaron niveles en promedio de 517.2 mg/dL en comparación con los animales normoglicémicos que en promedio tuvieron 97.4mg/dL.

La resorción ósea es esencial para el movimiento ortodóncico, la generación de la célula que realiza esta función, los osteoclastos, es regulada principalmente por la expresión de RANKL, la osteoprotegerina y el factor estimulador de colonias de macrófagos en los osteoblastos (Henneman 2008).

Los osteocitos constituyen el tipo celular predominante del tejido óseo, formando más del 90 % de las células que están presentes en el hueso compacto y trabecular, presentando además la característica de ser células con un tiempo de vida que puede llegar a décadas dentro de la matriz ósea calcificada. El papel de los osteocitos en la biología ósea se ha tornado central para comprender la regulación de osteoblastos y osteoclastos así como el control del metabolismo de los fosfatos (Lerner 2012; Bonewald 2011).

En el presente estudio, el hueso alveolar de los animales diabetizados con estreptozotocina mostró una mayor actividad de resorción ósea a través del aumento en número de osteoclastos, así como signos de una mayor actividad de los osteocitos expresada a través del aumento de la dimensión de las lagunas osteocitarias en comparación con las de ratas normoglicémicas, la diferencia fue estadísticamente significativa.

Nuestros resultados coinciden con los datos del estudio de diabetes a corto plazo que reporta Villarino (2006), en los que describe una mayor actividad de resorción en el grupo tratado con estreptozotocina. También observó que cambió la morfología de las lagunas osteocitarias del grupo diabetizado, por lo que sugiere que hay una respuesta rápida de los osteocitos a la hiperglicemia antes de que ocurran mecanismos compensatorios sistémicos.

A diferencia de nuestros resultados, otro estudio en el que examinaron los efectos de la hiperglicemia inducida por estreptozotocina en el recambio óseo del hueso alveolar de ratas, reportaron una disminución del hueso formado y en el número de osteoclastos (Mishima y cols. 2002).

Después de aplicar la presión mecánica, el número de osteoclastos aumentó tanto en el grupo al que se administró la estreptozotocina y desarrolló hiperglicemia como en el grupo al que se le administró vehículo y su glicemia fue normal, aunque siempre fue mayor tanto el número de osteoclastos como el diámetro de las lagunas osteocitarias en las ratas diabetizadas.

Nuestros resultados no coinciden con los reportados por Villarino y cols. (2011) ya que este autor reporta disminución de las áreas de erosión cuando compara a las ratas diabéticas con las ratas testigo, aunque el tiempo en el que aplica el estrés ortodóncico es diferente, ya que lo hace a las seis semanas posteriores a la inducción de la diabetes con estreptozotocina, en cambio en nuestro estudio se colocó el resorte en “U” 8 días después de la detección de la hiperglicemia, por lo que los resultados que reportamos son los correspondientes a el efecto inicial de la diabetes.

El diámetro de las lagunas osteocitarias fue mayor en el grupo de ratas diabetizadas sin estrés mecánico en comparación con las ratas normoglicémicas.

Después de aplicar el estrés mecánico el diámetro de las lagunas osteocitarias tuvo su máxima dimensión en el día 2, tanto en el grupo de ratas diabetizadas como en las ratas normoglicémicas, lo que nos indica una mayor actividad del osteocito.

El aumento del diámetro de las lagunas osteocitarias implica la remodelación de la matriz perilacunar y puede ser atribuido a la expresión de marcadores de osteoclastos en los osteocitos como la fosfatasa ácida y la catepsina K, como fue reportado en ratas en condiciones de lactación (Qing y cols. 2010).

El agrandamiento de las lagunas osteocitarias ha sido reportado en diferentes condiciones como en pacientes con osteodistrofia renal (Bonucci y cols. 1975), en ratas enviadas al espacio (Iagodovskii y cols. 1977) y en el hueso alveolar de ardillas de Richardson después de la hibernación (Haller y col. 1977).

También se han descrito lesiones periosteocíticas en pacientes con raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (Glorieux y Marie 1983), así como la presencia de esferas de matriz hipomineralizada alrededor de las lagunas osteocitarias de ratas tratadas con prednisona (Lane y cols. 2006).

Evidencias actuales sugieren que los osteocitos son claves en la coordinación de la formación ósea y la resorción y en el microdaño como el inducido en nuestro modelo, estimula función de los osteocitos para inducir la diferenciación osteoclástica (Matsumoto y cols. 2013). Los osteocitos regulan la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos durante la remodelación inducida por carga mecánica (Yamashiro y cols 2001; Fujihara y cols 2006; Robling y cols 2008).

Estudios recientes han demostrado la importancia de los osteocitos en la osteoclastogénesis (Nakashima y cols. 2011; Xiong y cols. 2011).

Nakashima y cols. (2011) reportaron que la principal fuente de RANKL en la resorción ósea, proviene principalmente de osteocitos. Los osteocitos se comunican con los osteoblastos a través de la secreción de esclerostatina, un potente inhibidor y regulador negativo de la diferenciación de osteoblastos y de la formación ósea (Robling y cols. 2008). La supresión del gen de la esclerostatina en ratones induce aumento de la formación ósea y la densidad mineral (Li y cols. 2008).

El tratamiento con anticuerpos contra esclerostina revierte los efectos adversos de la diabetes tipo 2 en la masa y la solidez ósea y además mejora la regeneración de defectos óseos en ratas (Hamann y cols. 2013).

De acuerdo a lo anterior y con base en nuestros datos de aumento de las dimensiones de la laguna osteocitaria, podemos sugerir que, una de las moléculas que aumenta en las condiciones experimentales a las que fueron sometidos nuestros especímenes es la esclerostatina.

La osteocalcina (también conocida como proteína gla-ósea, es una proteína de 5 KDa, siendo además la más abundante de las proteínas no colágenas de la matriz ósea (Lian JB y cols. 1988). Es sintetizada por osteoblastos maduros y osteocitos (Arden y cols. 1966 ; Ducy y cols. 2006).

La osteocalcina se localiza principalmente en la matriz ósea y cantidades pequeñas se detectan en la sangre, y su concentración en el plasma se consideran marcadores de formación ósea (Delmas y cols. 2000).

Se ha postulado que la función de la osteocalcina es inhibir la mineralización (Ducy y cols. 2006), probablemente para prevenir que el osteocito quede completamente embebido en la matriz mineralizada (Kavukcuoglu y cols. 2009). Esta proteína también puede estar sobreexpresada en los animales diabetizados y conducir al aumento de las lagunas osteocitarias.

## Conclusiones

---

El modelo de estrés mecánico que utilizamos induce la formación de osteoclastos y el aumento del área de las lagunas osteocitarias en las ratas normoglicémicas.

Las ratas hiperglicémicas a las que se aplicó estrés mecánico mostraron un número significativamente mayor de osteoclastos cuando se comparó con las ratas normoglicémicas.

El área de las lagunas osteocitarias fue significativamente mayor en los grupos de ratas hiperglicémicas.

El número de osteoclastos y el área de las lagunas osteocitarias en las ratas normoglicémicas e hiperglicémicas fueron mayores en las ratas sacrificadas a las 48 horas posteriores a la colocación del resorte en “U”.

Finalmente, basados en nuestros datos, sugerimos que no es recomendable la aplicación de un tratamiento ortodóncico en pacientes diabéticos con mal control o nulo control glicémico, ya que el metabolismo óseo en términos de aumento del número de osteoclastos y del tamaño de las lagunas osteocitarias puede conducir a la pérdida del hueso alveolar.

## Referencias bibliográficas

- Aarden EM, Wassenaar AM, Alblas MJ, Nijweide PJ. «Immunocytochemical demonstration of extracellular matrix proteins in isolated osteocytes.» *Histochem Cell Bio* 106, n° 5 (1966): 495–501.
- Abbassy MA, Watari I, Soma K. «Effect of experimental diabetes on craniofacial growth in rats.» *Arch Oral Biol.* 53, n° 9 (2008).
- Aint, P. «Fodonto.» 2010.  
[http://www.fodonto.uncu.edu.ar/upload/Teorico\\_Periodonto\\_20101.pdf](http://www.fodonto.uncu.edu.ar/upload/Teorico_Periodonto_20101.pdf) (último acceso: 10 de 2013).
- American Diabetes Association.ADA. «Diagnosis and classification of diabetes mellitus.» *Diabetes Care* 35, n° 1 (2008): 55-60.
- Arnol, V. *Efectos de la glicosación avanzada y la metformina sobre el hueso.* 2012.  
[sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/.../Documento\\_completo.pdf?](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/.../Documento_completo.pdf?) (último acceso: 04 de 2014).
- Aschner P, King H, Triana de Torrado M, Rodriguez BM. «Glucosa Intolerante in Colombia A population based survey in an urban community.» *Diabetes care* 16, n° 1 (1992): 90-3.
- Bánóczy J, Albrecht M, Rigó O, Ember G, Ri . «Salivary secretion rate pH lactobacilli and yeast counts in diabetic women.» *Acta Diabetol Lat* 24, n° 1 (1987): 223–228.
- Bartholomew GA, Rodu B & Bell DS. «Oral candidiasis in patients with diabetes mellitus: a thorough analysis.» *Diabetes Care* 10, n° 1 (1987): 607–612.
- Baynes, J. «Role of oxidative stress in development of complications in diabetes.» *Diabetes* 40, n° 4 (1991): 405-412.
- Bensch L, Braem M, Willems G. «Orthodontic treatment considerations in patient with diabetes mellitus» *Am J Orthod Dentofacial Orthop* (2003);123:74-8.
- Bensch L, Braem M, Willems G. «Orthodontic Considerations in the Diabetic Patient.» *Semin Orthod* 10, n° 1 (2004): 252-258.
- Bonewald, LF. «The amazing osteocyte.» *J Bone Miner Res* 26, n° 2 (2011): 229-238.
- Bonucci E, Gherardi G, Mioni G, et al. «[Clinico-morphological correlations in uremic osteodystrophy of patients with conservative and hemodialytic treatment with special regard to the Itrastructure.» *Minerva Nefrol.* 2, n° 3 (1975): 99–108.
- Braga SMG, Taddei SR, Andrade I Jr, Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE, Teixeira MM, da Silva TA. «Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model.» *European Journal of Oral Sciences* 119, n° 1 (2011): 7–14.
- Brudvik P y Rygh P. «Transition and determinants of ortodontic root resorption-repair sequence.» *Eur J Ortod* 17, n° 3 (1995): 177-188.
- Burden D, Mullally B, Sandler J. «Orthodontic treatment of patients with medical disorders» *Eur J Orthod* (2001).23(4):363-72.
- Calliari LEP y Monte E. «Abordagem do diabetes melito na primeira infância.» *Arq Bras Endocrinol Meta* 52, n° 2 (2008): 243-9.
- Cano J, Campo TJ, Sánchez GJ, Bascones M. «Mecanobiología de los huesos maxilares.» *Avances en odontoestomatología* 24, n° 2 (2008): 227-237.
- Chang PC, Chien LY, Yeo JF, Wang YP, Chung MC, Chong LY, Kuo MY, Chen CH, Chiang HC, Ng BN, Lee QQ, Phay YK, Ng JR, Erk KY. «Progression of



- periodontal destruction and the roles of advanced glycation end products in experimental diabetes.» *J Periodontol* 84, n° 3 (2013): 379-88.
- Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. «The use of animal models in the study of diabetes mellitus.» *In vivo* 23, n° 2 (2009): 245-258.
- Chiego J. «Principios de histología y embriología bucal.» 138. España: Elsevier, 2007.
- Claudino M, Ceolin DS, Alberti S, Cestari TM, Spadella CT. «Alloxan-Induced Diabetes Triggers the Development of Periodontal Disease in Rats.» *Journal Pone* 2, n° 12 (2007): 1-2.
- Cody D. «Infant and toddler diabetes.» *Arch Dis Child* 92, n° 1 (2007): 716–719.
- Cova CN. «Estandarización de un modelo de disyunción palatina en ratas (descripción histológica).» *Tesis para obtener el título de Cirujana Dentista. FES Iztacala, UNAM*, 2008.
- de Ferraris G. «Histología y embriología bucal.» de Ferraris Gómez, 269-281. Panamericana, 2000.
- de Llanos H. «El Fenómeno de la Mecanotransducción y la Respuestas a las Cargas Oclusales.» *Universidad de Oviedo*. 2011 - 2012.  
<http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/5610/1/El%20Fenomeno%20de%20la%20Mecanotransducci%C3%B3n%20y%20la%20Respuestas%20a%20las%20Cargas%20Oclusales-H%C3%A9ctor%20de%20Llanos%20Lanchares.pdf> (último acceso: 04 de 2014).
- Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. «The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis.» *Osteoporos Int* 11, n° 6 (2000): 17.
- Dost A, Herbst A, Kintzel K, Haberland H, Roth CL, Gortner L, Holl RW. «Shorter remission period in young versus older children with diabetes mellitus type 1.» *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 115, n° 1 (2007): 33-7.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S. «Expression of Sclerostin.» *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, 2006: 354.
- Faulconbridge AR, Bradshaw WCL, Jenkins PA, Baum JD. «The dental status of a group of.» *Br Dent J* 151, n° 1 (1981): 253–255.
- Federation, International Diabetes. *IDF Diabetes Atlas*. 2014.  
<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/la-carga-mundial?language=es> 05.09.13 (último acceso: 02 de 2014).
- Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. «Buried alive: how osteoblasts become osteocytes.» *Dev Dyn*, n° 235(2006):176–190.
- Frydman J. «Ortodoncia en adultos, fundamentos biológicos e histológicos.» 2005.  
<http://media.axon.es/pdf/59699.pdf>.
- Fujihara S, Yokozeki M, Oba Y, Higashibata Y, Nomura S, Moriyama K. «Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress.» *J Bone Miner Res*. 21, n° 6 (2006): 956-964.
- Gaete, Marcia. 2006.  
<http://www.cemuc.cl/docman/apuntes/Primer%20semestre/Anatomia%20I/Capitulo%20I/Embriologia/Animaciones%20embrio/Apunt%20Clase%20Embriologia%20General%202006%20pdf.pdf> (último acceso: 2013).
- Ganda OP, Rossini AA, Like AA. «Studies on streptozotocin diabetes.» *Diabetes* 25, n° 7 (1976): 595-603.

- García F, Solís J, Luque E, Neyra L, Manrique H, Cancino R, Castillo O, del Pilar Cornejo S, Rodríguez E, Freundt J, Escudero R, Zacarias E. «Prevalencia de diabetes mellitus y factores de riesgo relacionados en una población urbana.» *Rev Soc Peru Med Interna* 20, n° 3 (2007): 90-94.
- García, MF. «Estudio de la dinámica ósea mandibular y de los procesos reabsortivos de la cresta alveolar en ratas diabéticas y controles.» *UNR Journal* 1, n° 1 (2008): 119.
- Glorieux y Marie. «Relation between hypomineralized periosteocytic lesions and bone mineralization in vitamin D-resistant rickets.» *Calcif Tissue Int* 35, n° 4-5 (1983).
- Graber TM. «Ortodoncia, principios generales y técnicas.» Panamericana, 2003.
- Gundberg CM, Anderson M, Dickson I, Gallop PM. «"Glycated" osteocalcin in human and bovine bone. The effect of age.» *J Biol Chem.* 261, n° 31 (1986): 14557-61.
- Guo D, Keightley A, Guthrie J, Veno PA, Harris SE, Bonewald LF. «Identification of osteocyte-selective proteins. » *Proteomics*.n° 10 (2010).
- Haller AC, Zimny ML. «Effects of hibernation on interradicular alveolar bone.» *J Dent Res* 56, n° 12 (1977): 1552–1557.
- Hamann C, Rauner M, Höhna Y, Bernhardt R, Mettelsiefen J, Goettsch C, Günther KP, Stolina M, Han CY, Asuncion FJ, Ominsky MS, Hofbauer LC. «Sclerostin antibody treatment improves bone mass, bone strength, and bone defect regeneration in rats with type 2 diabetes mellitus.» *JBMR* 28, n° 3 (2013): 627–638.
- Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. «Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factorbeta: enhancement by estrogen. » *J Cell Biochem.*; n° 85(2002):185–197.
- Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. «Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. » *Exp Cell Res.*; n°294(2004):458–468.
- Henneman, S, J. W. Von den Hoff and J. C. Maltha. «Mechanobiology of tooth movement.» *European Journal of Orthodontics* 30, n° 3 (2008): 299-306.
- Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. «Perspective osteoblast apoptosis and bone turnover.» *Journal of bone and mineral research* 16, n° 6 (2001): 4.
- Iagodovskii VS, Trifanidi LA, Gorokhova GP. «Effect of space flight on rat skeletal bones (an optical light and electron microscopic study.» *Kosm Biol Aviakosm Med* 11, n° 1 (1977): 14–20.
- Ichinose K, Kawasaki E, Eguchi K. «Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 and potential relevance to diabetic nephropathy.» *Am J Nephrol* 27, n° 6 (2007): 554-64.
- Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Saeki S, Mitani, H. «Diurnal variation in tooth movement in response to orthodontic force in rat.» *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.*, 1998: 8-14.
- INEGI. INEGI. 14 de 11 de 2010.  
[www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/.../diabetes0.doc](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/.../diabetes0.doc) (último acceso: 11 de 03 de 2014).
- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 2014.  
<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/la-carga-mundial?language=es> 05.09.13 (último acceso: 02 de 2014).
- JADA. «Factores Riesgo en el Desarrollo de la diabetes.» *JADA*, 2003.

- Karjalainen KM. *Periodontal diseases, dental caries, and saliva in relation to clinical characteristics of type 1 diabetes*. 04 de 05 de 2000.  
<http://urn.fi/urn:isbn:9514256395> (último acceso: 04 de 2014).
- Katsumata K, Katsumata K Jr, Katsumata Y. «Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats.» *Horm Metab Res*. 24, n° 11 (1992): 508-10.
- Kavukcuoglu NB, Patterson-Buckendahl P, Mann AB. «Effect of osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones.» *J Mech Behav Biomed Mater* 2, n° 4 (2009): 348–354.
- Kennedy DB, Joondeph DR, Osterberg SK, Little RM. «The effect of extraction and ortodontic treatment on dentoalveolar support.» *Am J Orthod* 84, n° 3 (1983): 183-190.
- Kjellman O, «Secretion rate and buffering action of whole mixed saliva in subjects with.» *Odontol Revy* 2 21, n° 1 (1970): 159–168.
- Kogianni G, Mann V, Noble BS. «Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. » *J Bone Miner Res*. n° 23 (2008):915– 927.
- Kume y cols., Kato S, Yamagishi SJI, Inagaki Y, Ueda S, Arima N, Okawa T, Kojiro M, Nagata K. «Advanced glycation endJproducts attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage and bone.» *J. Bone Miner. Res*. 20, n° 1 (2005): 1647–1658.
- Lane NE, Yao W, Balooch M, et al. «Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice.» *J Bone Miner Res* 21, n° 3 (2006): 466–476.
- Li X, Ominsky, M.S., Niu, Q.T. et al. «Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength.» *Journal of Bone and Mineral Research*. 23, n° 6 (2008): 860–869.
- Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin. «Biochemical considerations and clinical applications.» 226, n° 1 (1988): 267-91.
- Lima L. «Análisis cuantitativo de las células de los islotes pancreáticos en ratas bajo el efecto de Aloxana.» *RibeiraoPreto*, 2001: 308-314.
- Llanos. «RUO.» 07 de 2012. <http://hdl.handle.net/10651/5610> (último acceso: 04 de 2014).
- Mahía y Pérez. «La diabetes mellitus y sus complicaciones vasculares:un problema social de salud.» *Rev Cubana Angiología y Cirugía Vascular* 1, n° 1 (2000): 68-73.
- Mandell RL, Dirienzo J, Kent R, Joshipura K y Haber J. «Microbiology of healthy and diseased periodontal sites in poorly controlled insulin dependent diabetics.» *J Periodontol* 63, n° 1 (1992): 274–279.
- Martínez RJ. «Efecto del acido zoledrónico sobre la remodelación de la sutura palatina media en ratas.» *Tesis para obtener el título de especialista en ortodoncia. FES Iztacala, UNAM*, 2011.
- Matsumoto T, Iimura T, Ogura K, Moriyama K,. Yamaguchi A . «The role of osteocytes in bone resorption during orthodontic tooth movement.» *J Dent Res*, 2013: 340-345.
- McNamara TF, Ramamurthy NS, Mulvihill JE, Golub LM. «The development of an altered.» *Arch Oral Biol* 27, n° 1 (1982): 217–223.

- Mendoza CK, Márquez OR, Donado A, Echenique O, Mendoza M DL, Pérez CM, Macias VV. «Fundamentos biomoleculares de la diabetes mellitus.» *Revista de la Facultad de Ciencias de Salud*. 2, nº 2 (2005): 135-142.
- Mérida I. «Movimiento Ortodóntico y sus factores modificantes, Revisión bibliográfica» *Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría*.  
Fuente: <http://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2011/art26.asp> (último acceso 28.05.2014).
- Mishima N, Sahara N, Shirakawa M, Ozawa H. «Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat.» *Archives of Oral Biology* 47, nº 1 (2002): 843–849.
- Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, Taketomi S. «Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles.» *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, nº 1 (1997): 260–270.
- Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, et al. «Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. » *J Bone Miner Res.* nº 10(1995):231–242.
- Mogensen, CE. «Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes.» *N Engl J Med* 6, nº 1 (1984): 356-360.
- Mora H, Ángela C., ARAGÓN N., Diana M., Ospina G. «Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina.» *VITAE* 16, nº 1 (2009): 311-319.
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. «Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression.» *Nat Med.* 17, nº 10 (2011): 1231-1234.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. «Cloning and expression of RAGE: A cell surface receptor for AGEs.» *J Biol Chem* 267, nº 21 (1992): 14998-15004.
- Palacín. *La afectación ósea en la enfermedad de gaucher*. 2009.  
<http://www.ciberer.es/documentos/Libro%20La%20afectaci%C3%B3n%20de%20Gaucher%20de%20Giraldo%20.pdf>. (último acceso 03.2014).
- Peter S. «Trends in the incidence of type I diabetes mellitus worldwide.» *West Indian Med J* 56, nº 3 (2007): 264-9.
- Proffit WR, Henry W. Fields, Jr., David M. Sarver. «Ortodoncia contemporánea. Teoría y práctica.» En *Ortodoncia contemporánea. Teoría y práctica.*, de William R. Proffit. Harcourt., 2009.
- Qing H, Divieti Pajevic P, Barry K, Dusevich V, Wysolmerski J, Bonewald L. «PTHr1 in Osteocytes Plays a Major role in Perilacunar Remodeling through the Activation of “Osteoclastic” Genes in Osteocytes.» *Bone Min Res* 27, nº 5 (2010): 25.
- Riancho JA. y Gutierrez GE. «Factores reguladores de la Resorción Osea.» *RevMetabOseo* 1, nº 2 (2003): 51-56.
- Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. «Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin.» *J Biol Chem.*, 2008: 5866-5875.

- Rygh CB, Løkka G, Heljasvaara R, Taxt T, Pavlin T, Sormunen R, Pihlajaniemi T, Curry FR, Tenstad O, Reed RK. «Image-based assessment of microvascular function and structure in collagen XV- and XVIII-deficient mice.» *J Physiol.* 15, n° 592 (2014): 325-36.
- Rylander H, Ramberg P, Blohmé G, Lindhe J. «Prevalence of periodontal disease in young.» *J Clin Periodontol* 14, n° 1 (1986): 38-43.
- Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. «Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats.» *Osteoporos* 17, n° 1 (2006): 1514-1523.
- Sastrowijoto SH, van der Velden U, Steenbergen TJM, Hillemans P, Hart AAM, de Graaff J. «Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival.» *J Clin Periodontol* 17, n° 1 (1990): 233-242.
- Schneir ML, Ramamurthy NS, Golub LM. «Extensive degradation of recently synthesized collagen in gingival of normal and streptozotocin-induced diabetic rats.» *J Dent Res* 63, n° 1 (1984): 23-27.
- Schulze E, Witt M, Kasper M, Lowik CW, Funk RH. «Immunohistochemical investigations on the differentiation marker protein E11 in rat calvaria, calvaria cell culture and the osteoblastic cell line ROS 17/ 2.8.» *Histochem Cell Biol.* n° 111(1999):61-69.
- Schwab W, Schulze E, Witt M, Funk RH, Kasper M. «Immunohistochemical localization of the differentiation marker E11 in dental development of rats. » *Acta Histochem.* n° 101(1999):431-436.
- Seppälä B, Seppälä M, Ainamo J. «A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease.» *J Clin Periodontol* 20, n° 1 (1993): 161-165.
- Shyng YC, Devlin H, Sloan P. «The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat.» *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 30, n° 1 (2001): 70-74.
- Szkudelski, T. «The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas.» *Physiol Res.* 50, n° 6 (2001): 537-46.
- Tanaka-Kamioka K, Yamaguchi Y, Hakeda Y. «Isolated chick osteocytes stimulate formation and bone-resorbing activity of osteoclast-like cells.» *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* n° 13(1995):61-70.
- Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS. «Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. » *J Bone Miner Res.* n° 13(1998):1555-1568.
- Tenovuo J, Alanen P, Larjava H, Viikari J, Lehtonen O-P. «Oral health of patients with insulin-dependent diabetes mellitus.» *Scand J Dent Res* 94, n° 1 (1986): 338-346.
- Valcourt U, Merle B, Gineyts E, ViguetJCarrin S, Delmas PD, Garnero P. «Nonenzymatic glycation of bone collagen modifies osteoclastic activity and differentiation.» *J Biol Chem.* 287, n° 1 (2007): 5691-5703.
- Vernillo AT. «Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus.» *J Am Dent Assoc.* 134, n° 1 (2003): 24S-33S.
- Villarino ME, Sánchez LM, Bozal CB, Ubiosc AM. «Influence of short-term diabetes on osteocytic lacunae of alveolar bone. A histomorphometric study.» *AJO-DO Am J Orthod Dentofacial Orthop* 19, n° 1 (2006): 23-8.

- Villarino ME, Lewicki M, y Ubiosc AM. «Bone response to orthodontic forces in diabetic.» *AJO-DO Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 2011.
- Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. «Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. » *J Clin Endocrinol Metab.* n° 85 (2000) :2907–2912.
- Wetterwald A, Hoffstetter W, Cecchini MG, et al. «Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. » *Bone.* n° 18(1996):125–132.
- Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. «Matrix-embedded cells control osteoclast formation.» *Nat Med* 17, n° 10 (2011): 1235-1241.
- Yamashiro T, Fukunaga Kobashi N, Kamioka H, Nakanishi T, Takigawa M, et al. «Mechanical stimulation induces CTGF expression in rat osteocytes.» *J Dent Res* 80, n° 2 (2001): 461-465.
- Zhang L, Li X, Bi L-J. «Alterations of collagen-I, MMP-1 and TIMP-1 in the periodontal ligament of diabetic rats under mechanical stress.» *Journal of periodontal research* 46, n° 1 (2011): 448–455.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### *Inducción de diabetes mediante Estreptozotocina (STZ)*

Dosis:

65ml. STZ -- Kg. de peso (65mL --- 1000g.)

Vía intraperitoneal.

### ANEXO 2

#### *Paraformaldehido al 4%*

El paraformaldehido (polímero solido del formaldehido) es un fijador no coagulante que permite conservar detalles estructurales finos. Debe utilizarse lo más fresco posible. Con este fijador se obtiene muy buena preservación ultraestructural, es decir los resultados en la morfología son buenos pero en la preservación de la antigenicidad es pobre.

- Paraformaldehido (sigma) 4mg.
- PBS / H<sub>2</sub>O 80mL.

Disolver el formaldehido y calentar a 60° con agitación, al alcanzar la temperatura adicionar unas gotas de hidróxido de amonio (NaOH) al 1M acuoso hasta que se disuelva el paraformaldehido y deje enfriar. Ajustar el pH con ácido clorhídrico (HCL) 1 N o Hidróxido de Sodio (NaOH) 1N según sea el caso hasta ajustar el pH a 7.4 y aforar a 100mL guardar a 4°C.

### ANEXO 3

#### *Buffer de Citratos pH4.5*

- Ácido cítrico (solución A) al 0.1M -----33mL
- Citrato de sodio (solución B) al 0.1M ----- 17mL
- Ajustar pH a 4.2 y aforar a 100ml. con agua destilada

Dosis:

1mL buffer de citratos --- Kg de peso.

#### ANEXO 4

#### Descalcificación con EDTA ácido etilendiaminotetraacético

Colocar la muestra en un mínimo de 20 volúmenes de solución descalcificante. Hacer cambios de EDTA hasta lograr la descalcificación total de la muestra.

EDTA al 7% (100mL)

- EDTA sódico 7 gr.
- Agua destilada 80mL

Mezclar y poner en agitación, adicionar NaOH gradualmente hasta que se disuelva por completo el EDTA. Ajustar el pH con HCl a 7.4 y aforar a 100mL.

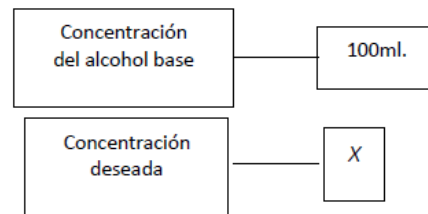
#### ANEXO 5

#### Preparación de alcoholes

Alcohol base: 95°

Aforar a 100mL con agua destilada

Concentración deseada	Cantidad de alcohol base	Aforar con
70	73ml.	27ml.
80	84ml.	16ml.
90	94ml.	6ml.



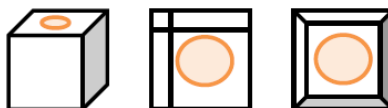
#### ANEXO 6

#### Cortes del cubo

Una vez incluida la muestra debe dejarse enfriar por completo.

Se realizan cortes con navaja de bisturí del número 15 de la siguiente manera:

1. Rebajar la cera hasta lo más próximo a la zona de corte sin llegar a tocarla.
2. Hacer un marcaje superficial alrededor de la muestra en forma rectangular de acuerdo al tamaño de la muestra.
3. Seccionar lado por lado aproximadamente hasta la mitad de la muestra y eliminar la cera excedente.
4. A partir de la mitad de la muestra hacer cortes en cada lado formando una pirámide.





## *ANEXO 7*

### *Preparación Hematoxilina-Eosina*

#### HEMATOXILINA DE HARRIS

- Hematoxilina 5 gr
- Alcohol 70° 50mL
- Alumbre de amonio o potasio 100gr
- Oxido de mercurio rojo 2.5gr
- Agua destilada 1000mL

Disolver la hematoxilina en el alcohol, y el alumbre de potasio en el agua destilada bajo calor. Una vez disuelto mezclar ambas soluciones y poner a hervir lo más rápido posible (limite el calor a menos de 1 minuto y agite). Retirar del calor y agregar el rojo oxido muy lentamente. Recalentar a fuego lento hasta que tome color púrpura retirar del fuego y coloque el recipiente dentro de uno con agua fría hasta que se enfríe. La adición de 2-4 mL de ácido glacial por 100mL de solución incrementa la precisión de la tinción nuclear.

Filtrar y guardar en frasco ámbar. Se puede usar cuando este enfríe, dura varios meses. Cuando se observe que la tinción de las muestras es baja agregar ácido acético.

#### EOSINA ACIDIFICADA STOCK

- Eosina Amarillenta 20gr 2gr
- Agua destilada 500mL 50mL
- Ácido clorhídrico 10mL 1mL
- Alcohol 96% 1000mL 100mL

#### Solución Stock

Mezclar la eosina en agua destilada, agregar el ácido lentamente por las paredes del recipiente y dejar asentar toda la noche. Decantar y lavar el precipitado con varios cambios de agua pasándolo por el papel filtro. Secar el papel en el horno a 60 °C durante 24 horas, o hasta que las tejas estén secas. Macerar las tejas hasta hacerlas polvo. Agregar poco a poco 1000mL de alcohol de 96°. Guardar en un frasco de color ámbar.

#### Solución de trabajo

- Solución de eosina stock 100mL
- Alcohol de 70° 200mL

Disolver poco a poco y guardar en un frasco de color ámbar.