



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad De Estudios Superiores Iztacala**

**“Participación de MIF en la expresión de MMP-2 y MMP-13 en Periodontitis Experimental, previo y durante la gestación en un modelo murino”**

T E S I S  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA  
P R E S E N T A  
**Karminne Navarrete Hernández**

**DIRECTOR: Mtra. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez**

**DICTAMINADORES: Dra. Miriam Rodríguez Sosa**

**Dr. José Luis Reyes Hernández**

**Esp. Guadalupe Trinidad Herrera Argüelles**

**Mtra. Imelda Juárez Avelar**

Los Reyes Iztacala, Edo de México, marzo 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



## **AGRADECIMIENTOS**

Carrera de Cirujano Dentista de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Clínica odontológica Acatlán, FES Iztacala, UNAM.

Clínica de Especialización en Endoperiodontología, FES Iztacala, UNAM.

Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED), Laboratorio 5, FES Iztacala, UNAM.

Durante la realización de la presente tesis de investigación se contó con una parte del apoyo de los proyectos:

Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) proyecto [FICDTEM-2021-072] Programa de Apoyo para Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)-UNAM, proyecto [IN-217021].

Agradezco la asesoría brindada a lo largo del desarrollo de la presente tesis de Licenciatura a mi comité:

Mtra. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez.

Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

Dr. José Luis Reyes Hernández.

Esp. Guadalupe Trinidad Herrera Argüelles.

Mtra. Imelda Juárez Avelar.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Agradezco a la Mtra. Betsaida Ortiz por creer en mí y brindarme la oportunidad de realizar este proyecto a su lado, ha sido un honor enorme.

Gracias por su apoyo, constancia y dedicación, por ser tan paciente, y orientarme cuando más perdida me sentía.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa por apoyarme y abrirme las puertas del Laboratorio 5 de UBIMED.

A mis Padres, Alfonso y Carmina, infinitas gracias porque me han orientado, brindado siempre su apoyo incondicional y amado más que nadie en la vida, lo son todo para mí.

A mis hermanos, Elinne y Alfonso, por nunca dejarme caer, son mi alegría y una motivación constante en mi vida.

A mis abuelitas, Bety y Nedy quienes me inspiran a dar siempre lo mejor de mí y a quienes amo con toda el alma.

A mis abuelitos, Pepe y Poncho quienes me guían desde el cielo.

A mi novio, Eduardo, gracias por escucharme, orientarme y motivarme a concluir éste gran proyecto, eres increíble.

A mis amigos, Fernanda, Moisés y Paco, gracias por estar ahí para mí en cada paso a lo largo de mi carrera universitaria, por compartir alegrías y tropiezos, soy afortunada de tenerlos en mi vida.

A Francisco, por motivarme siempre a ser mejor, a creer en mí y por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

A mis amigos Uriel, Zae y Lilo, gracias por escucharme y demostrarme que las amistades reales son para toda la vida.

A cada uno de mis compañeros y amigos durante la carrera, gracias por compartir conmigo risas, alegrías y tristezas, los llevo en mi corazón.

A mis amigos y compañeros de UBIMED, Mariana, Montse, Tony, Danae, Alexia, Mtra. Imelda Juárez, Dra. Christian gracias por permitirme aprender de ustedes, brindarme su apoyo y calidez y compartir un poco de su trabajo conmigo.

## **DEDICATORIA**

A mi familia que son el amor más puro y verdadero en mi vida.

Alfonso, Carmina, Elinne y Poncho, gracias por todo, los amo infinitamente.

“La ciencia trata de hacer las cosas muy sencillas para poder entender a la naturaleza”

Julieta Fierro

## ÍNDICE

I. FIGURAS	VII
II. ABREVIATURAS	VIII
III. RESUMEN	X
IV. ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Periodonto	1
1.2 Encía	1
1.2.1 División Anatómica de la Encía	1
1.2.2 Características Clínicas de la Encía	2
1.2.3 Características Histológicas de la Encía	3
1.3 Fluido Crevicular Gingival	4
1.4 Tejido Conectivo Gingival	5
1.5 Fibras Gingivales	9
1.6 Ligamento Periodontal	9
1.7 Cemento Radicular	11
1.8 Proceso Alveolar	12
1.9 Periodontitis	14
1.10 Gestación	16
1.11 Respuesta Inmunitaria en la Periodontitis	17
1.12 Metaloproteinasas	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo Principal	23
5.2 Objetivos Particulares	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Consideraciones Éticas	24
6.2 Animales	24
6.3 Inducción de Periodontitis	25
6.4 Eutanización	25
6.5 Zimogramas	25
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
8. RESULTADOS	27
8.1 Análisis Comparativo de la Expresión de MMP-2	27
8.1.1 La presencia de MIF favorece la expresión de MMP-2 activa en gestación, y la ausencia de MIF favorece la expresión de MMP-2 activa y como Pro-MMP-2 en PE y PPG	28
8.2 Análisis Comparativo de la Expresión de MMP-13	28
8.2.1 La ausencia de MIF favorece la expresión de MMP-13 activa y como Pro-MMP-13 en G, PE y PPG	28
9. DISCUSIÓN	30
10. CONCLUSIÓN	32
11. PERSPECTIVAS	32
12. BIBLIOGRAFÍA	33

## I. FIGURAS

Figura 1. Elementos que componen al periodonto.

Figura 2. Vista de la encía marginal con sonda periodontal.

Figura 3. Esquema y corte histológico del epitelio de la encía.

Figura 4. Figura esquemática que indica el flujo de líquido crevicular gingival a través de las células epiteliales en presencia de una biopelícula.

Figura 5. Inmunología adaptativa en la enfermedad periodontal. APC: Célula presentadora de antígeno, Th1: Célula T helper 1, Th2: Célula T helper 2, Tc: Célula T citotóxica, Pc: Célula plasmática.

Figura 6. A) Surco Histológico, B) Unión Epitelial, C) Unión de tejido conectivo, D) Grosor Biológico.

Figura 7. Fibras Gingivales (FG). 1. Fibras circulares (CF). 2. Fibras Dentogingivales. 3. Fibras Dentoperiósticas (DPF). 4. Fibras Transeptales (TF). Surco de la encía libre (GG).

Figura 8. Sinergia polimicrobiana y disbiosis en periodontitis.

Figura 9. Respuesta inmune innata y adaptativa de citocinas en presencia de periodontopatógenos.

Figura 10. Las células epiteliales expresan varias MMP en los tejidos periodontales inflamados, principalmente MMP 2,8,13 Y 3.

Figura 11. Diagrama de flujo de grupos experimentales.

Figura 12. Modelo de maxilar murino con inducción de periodontitis experimental.

Figura 13. Zimograma en Gel de Poliacrilamida de la actividad gelatinasa de las MMP-2 Activa (59 KDa) MMP-2 latente (72KDa).

Figura 14. Zimograma en Gel de Poliacrilamida de la actividad colagenasa de la MMP- 13 Activa (45 KDa) y MMP-13 latente (60 KDa).

Gráfica A y B. Gráfica A) pro-MMP-2. Expresión de Pro-MMP-2. La ausencia de MIF favorece la expresión de Pro-MMP-2 en los grupos G, PE, y PPG respecto a sus contrapartes WT. Gráfica B) MMP-2 activa. MIF favorece la activación de MMP-2 en el grupo de gestación WT, mientras que la ausencia de MIF favorece la activación de MMP-2 en PE y PPG.

Gráfica C y D. Gráfica C) Expresión de Pro-MMP-13. La ausencia de MIF favorece la expresión de Pro-MMP-13 en los grupos G, PE y PPG respecto a su contraparte WT Gráfica D) MMP-13 activa. La ausencia de MIF favorece la expresión de MMP-13 en los grupos G, PE y PPG respecto a su contraparte WT.

## II. ABREVIATURAS

D	Diente
S	Surco Gingival
ES	Epitelio del surco
EU	Epitelio de Unión
UCE	Unidad Cemento Esmalte
TC	Tejido Conectivo
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral - $\alpha$
EO	Epitelio Oral
EOE	Epitelio Oral Externo
TLRs	Receptores Tipo Toll
NETs	Trampas Extracelulares de Neutrófilos
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CPA	Células Presentadoras de Antígenos
LTC	Linfocitos T citotóxicos
Tregs	Linfocitos T reguladores
NK	Linfocitos Citolíticos Naturales
FG	Fibras Gingivales
FC	Fibras Circulares
DGF	Fibras Dentogingivales
DPF	Fibras Dentoperiósticas
TF	Fibras Transeptales
LPD	Ligamento Periodontal
IL	Interleucina
OC	Osteoclastos
PTH	Hormona Paratiroidea
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
CSF-1	Factor estimulante de colonias de macrófagos
RANKL	Ligando Receptor activado para el factor nuclear

BRU	Unidades de Remodelación Ósea
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RANK	Receptor Activador del factor nuclear
OPG	Osteoprotegerina
MMPs	Metaloproteinasas
<i>A. Actinomycetemcomitans</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>P. Gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. Intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
HA	Hueso Alveolar
Ig	Inmunoglobulina
PMNs	Polimorfonucleares
LPS	Lipopolisacáridos
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patógenos
TIMPs	Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas
ON	Óxido Nítrico
UCE	Unión cemento-esmalte
KO	Knock Out
MIF	Factor de inhibición de migración de macrófagos
<i>Mif</i> <sup>-/-</sup>	Deficiente de MIF
CTL	Control
G	Gestante
PE	Periodontitis Experimental
PPG	Periodontitis Previa a Gestación
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FCG	Fluido Crevicular Gingival

### III. RESUMEN

La periodontitis es un proceso inflamatorio que daña el periodonto de inserción (ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular). Afecta a más de 23% de mujeres en edades entre los 23 y los 54 años y está presente en el 56% de las mujeres (1). Los perfiles hormonales que experimentan las mujeres son capaces de alterar las respuestas de los tejidos periodontales produciendo cambios en las características fisiológicas del periodonto (2).

En la enfermedad periodontal la respuesta inflamatoria genera mediadores y productos enzimáticos que contribuyen al daño de tejidos. Las células inflamatorias de la inmunidad innata como mastocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares se combinan para formar un mecanismo de defensa antibacteriana. La respuesta inmune inflamatoria está determinada por las interleucinas (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferón (IFN)- $\gamma$ , mientras que durante la respuesta inmune antiinflamatoria se encuentran presentes las citocinas IL-4, IL-6, IL-10 (3). Durante la gestación se producen importantes fluctuaciones en los niveles de las hormonas sexuales femeninas (4). Por un lado, al final del tercer trimestre, la progesterona y los estrógenos alcanzan niveles plasmáticos máximos que son 10 y 30 veces, respectivamente, superiores a los observados durante el ciclo menstrual. Por otro lado, se han identificado receptores para estas hormonas en varios subconjuntos de células periodontales, lo que convierte a los tejidos periodontales en un posible objetivo (4). El factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) tiene un papel importante en las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas; ya que regula positivamente las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que causan la degradación de los tejidos blandos. La expresión de MMP-2 y MMP-13 aumenta en la presencia de periodontitis y se sobre expresa durante la gestación, sin embargo, la relación entre la expresión de MMP's y MIF durante la gestación no ha sido establecida. Se utilizaron ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c WT y genéticamente deficientes de MIF (Mif<sup>-/-</sup>) (Bioterio FES-I). Estudiamos 4 grupos experimentales con el propósito de establecer la relación de MIF con las MMPs: 1) Control (CTL), 2) Gestación (G), 3) Periodontitis Experimental (PE) y 4) Periodontitis Asociado a Gestación (PPG). Se obtuvieron las proteínas de los maxilares derechos, y se realizaron zimogramas en gel de acrilamida con sustrato de gelatina para MMP-2, o colágena para MMP-13, para identificar la presencia y expresión de las MMP's como pro-enzima o en su forma activa: MMP-2 Pro-enzima (~72 kDa), forma activa (~59-63 kDa), MMP-13 Pro-enzima (~ 57-60 kDa), forma activa (~56-45 kDa). La ausencia de MIF favoreció la expresión de Pro-MMP-2 (~ 57-60 kDa) en G, PE y PPG. Así como la presencia de MIF favoreció la sobreexpresión de MMP-2 activa (~59-63 kDa y ésta se vió afectada por la gestación; mientras que la ausencia de MIF favoreció la activación de MMP-2 activa en PE y PPG.

Sin embargo, la ausencia de MIF favoreció la sobreexpresión de MMP-13 en su forma Pro-enzima (~ 57-60 kDa) y activa (~56-45 kDa).

En conclusión, se encontró una relación entre la gestación y la sobreexpresión de MMP-2 en presencia de MIF. Mientras que en el modelo PPG la sobreexpresión de MMP-2 y MMP-13 en sus formas Pro-MMP-2 y activa fueron mayores en ausencia de MIF.

#### IV. ABSTRACT

Periodontal disease is an inflammatory process that damages the periodontal insertion (periodontal ligament, alveolar bone, and root cementum). It affects more than 23% of women between 23 and 54 years old and it is present in 56% of women (1). Hormonal profiles experienced by women are capable of altering periodontal tissues responses, producing changes in the physiological characteristics of the periodontium (2).

The inflammatory response in periodontal disease, generates mediators and enzymatic products that contribute to tissue damage. Inflammatory cells of innate immunity, such as mast cells, macrophages, and polymorphonuclear leukocytes, which coordinate to develop an antibacterial defence mechanism. The inflammatory immune response is determined by the interleukins (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$ , while during the anti-inflammatory immune response the cytokines IL-4, IL-6, IL-10 are present (3). During pregnancy female sex hormones levels are present as significant fluctuations (4). On one hand, at the end of the third trimester, progesterone and oestrogen reach maximum plasmatic levels, which increases 10 and 30 times, respectively, that those observed during the menstrual cycle. On the other hand, receptors for these hormones have been identified in various periodontal cells, making periodontal tissues a possible target (4). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) has an important role in acute and chronic inflammatory diseases as it positively regulates matrix metalloproteinases (MMPs) that cause soft tissue degradation. The expression of MMP-2 and MMP-13 increases in the presence of periodontitis and is overexpressed during pregnancy; however, the relationship between the expression of MMP's and MIF during pregnancy has not been established. Six- to eight-week-old female mice, BALB/c WT and Mif-/- from FES-Iztacala, UNAM animal facilities, were used. Experimental groups were established as follows 1) Control (CTL), 2) Pregnancy (G), 3) Experimental Periodontitis (PE) and 4) Pre-Gestational Periodontitis (PPG). Proteins from the right jaws were obtained, and zymograms were performed with acrylamide gel with gelatine substrate for MMP-2, or collagen for MMP-13, to identify the presence and expression of MMP's as pro-enzyme or its active form: MMP-2 Pro-enzyme (~72 kDa) active form (~59-63 kDa), MMP-13 Pro-enzyme (~57-60 kDa), active form (~56-45 kDa).

The absence of MIF favours the expression of Pro-MMP-2 (~57-60 kDa) in G, PE and PPG. Likewise, the presence of MIF also favours overexpression of active MMP-2 (~59-63 kDa) and this is affected by pregnancy; while the absence of MIF promotes the activation of MMP-2 in its active form in PE and PPG.

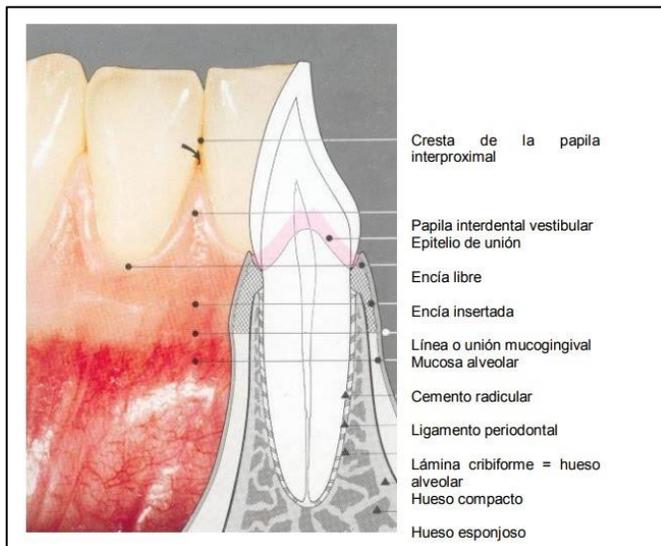
However, the absence of MIF favours the overexpression of MMP-13 in its Pro-enzyme (~57-60 kDa) and active (~56-45 kDa) forms.

In conclusion, a relationship was found between pregnancy and MMP-2 overexpression in the presence of MIF. While in the PPG model the overexpression of MMP-2 and MMP-13 in their Pro-MMP-2 and active forms were higher in the absence of MIF.

# 1. Introducción

## 1. Periodonto

Es uno de los componentes que integran al sistema estomatognático, se define como los tejidos de soporte de los dientes, comprende a dos tejidos blandos: encía y ligamento periodontal, y dos tejidos duros o mineralizados: cemento radicular y hueso alveolar. Las funciones del periodonto comprenden la inserción del órgano dental al alveolo, resistir y resolver las fuerzas generadas por la masticación, fonética y deglución, mantener la integridad de la superficie separada del medio (5, 6) (Fig. 1).



**Figura 3. Elementos que componen al periodonto.** El periodonto comprende a dos tejidos blandos: encía y ligamento periodontal, y dos tejidos mineralizados: hueso alveolar y cemento radicular Tomado de referencia (5) Lindhe, J. 2015.

### 1.2 Encía

Es la mucosa masticatoria que cubre el proceso alveolar y rodea a los dientes en su porción cervical, se extiende desde el margen de la encía marginal hasta la línea mucogingival (5).

#### 1.2.1 División Anatómica de la Encía

La encía se clasifica según su ubicación en tres zonas.

La encía insertada o adherida la cual se adhiere firmemente al hueso alveolar, la encía libre o marginal que se encuentra coronal a la encía insertada y corresponde a un borde de mucosa que rodea al diente, pero no se une a éste, y la encía interdental que se encuentra entre los dientes debajo del punto de contacto (7).

La línea mucogingival representa el límite de la encía insertada y la mucosa alveolar, la cual marca las diferencias entre la queratinización y translucidez entre la mucosa alveolar y la encía adherida (7). La línea mucogingival sigue un curso ondulado paralelo al contorno del

margen gingival, en la región palatina no existe ya que la encía marginal se une con la mucosa masticatoria del paladar (7).

### **Encía libre o marginal**

Se localiza en las zonas vestibular y lingual de los dientes y su límite superior es el margen gingival. En su porción interna forma al surco gingival, en el fondo del surco gingival se une al epitelio de unión (EU). Después de concluir la erupción dentaria, la encía libre o marginal se encuentra a 0.5 - 2mm coronal a la unión cemento esmalte (UCE) (Fig. 2) (5).



**Figura 4. Vista de la encía marginal con sonda periodontal.** Tomado de referencia (5) Lindhe J. 2015.

### **Encía Interdental**

Es la parte de la encía libre que se encuentra entre dientes adyacentes llenando los espacios interproximales. Su forma es piramidal y su vértice se encuentra en el área de contacto de los dientes. En las regiones premolares y molares se encuentra una concavidad llamada col la cual se ubica debajo del área de contacto (8).

### **Surco Gingival**

Se encuentra en la parte interna de la encía libre o marginal entre el tejido gingival del diente (9).

### **Encía Insertada**

Es encía unida fuertemente al periostio subyacente al hueso alveolar, de aspecto relativamente laxo y firme, se encuentra delimitado por la unión mucogingival, muestra con frecuencia un ligero puntilleo donde se interdigita el epitelio con el tejido conectivo subyacente (9).

### 1.2.2 Características Clínicas de la Encía

**Color.** El olor de la encía varía de un rosa pálido a un rosa coral, y depende de la vascularización, espesor del epitelio y pigmentaciones presentes.

**Forma.** La forma del margen gingival está íntimamente relacionada con la posición dentaria, y la posición y el trayecto de la unión cemento esmalte.

**Consistencia.** La consistencia es firme y resiliente lo cual le permite resistir a las fuerzas de masticación. Contiene una gran cantidad de fibras colágenas (8).

**Textura.** Presenta un puntilleo característico debido a la interdigitación del tejido conectivo (8).

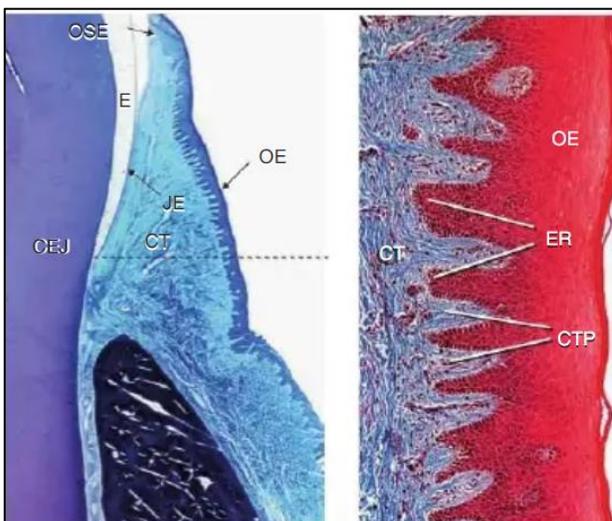
### 1.2.3. Características Histológicas de la Encía

#### Epitelio gingival.

**Epitelio oral externo:** Se extiende desde la porción más coronal de la encía marginal hasta la línea mucogingival; se puede encontrar ortoqueratinizado o para queratinizado (Fig. 3) (9).

**Epitelio del surco:** El cual se localiza en la pared blanda del surco gingival, se encuentra paraqueratinizado en su porción coronal y no queratinizado en su porción más apical (9).

**Epitelio de Unión:** Se deriva del epitelio reducido del esmalte y también se le conoce como epitelio de unión primario, rodea la porción cervical del diente siguiendo el curso de la unión cemento esmalte, la porción coronal corresponde al surco gingival (9)(Fig. 3).



**Figura 3. Esquema y corte histológico del epitelio de la encía.** OE(EO): Epitelio oral, CT (TC): Tejido conectivo, OSE (EOS): Epitelio oral del surco, E: Epitelio, CEJ (UCE): Unión cemento esmalte, CTP (PTC): Papilas de tejido conjuntivo, CT (TC): Tejido conectivo. Tomado de referencia (10) Niemiec BA, 2008.

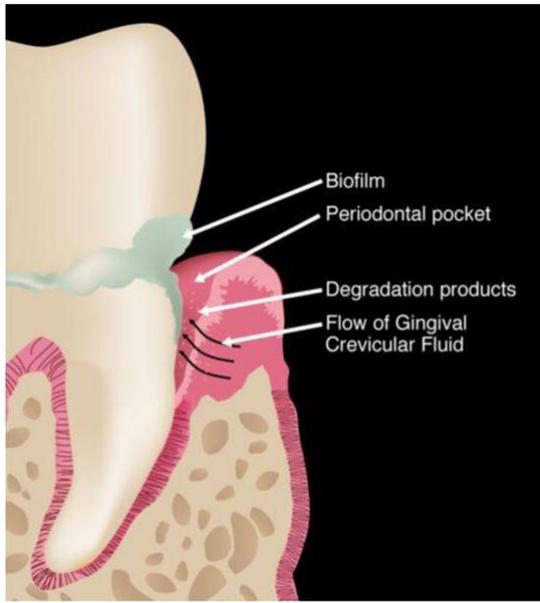
### 1.3 Fluido Crevicular Gingival

El Fluido Crevicular Gingival (FCG) es un líquido fisiológico que se origina en los vasos del plexo gingival de los vasos sanguíneos, fluye a través de la membrana basal externa y el epitelio de unión para alcanzar el surco gingival. Está compuesto por suero y componentes generados localmente, como productos de descomposición tisular, mediadores inflamatorios y anticuerpos en respuesta a los microorganismos orales presentes en el biofilm dental, por lo que ofrece un gran potencial para reflejar la respuesta que las células y los tejidos periodontales promueven para intentar recuperar la homeostasis (11).

Los principales componentes del FCG son: PMN, Eritrocitos, Fosfatasa Alcalina (FA), Catepsina B, MMP-8, MMP-9, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-4, IFN- $\gamma$ , IgA, IgG, IgM, osteoprotegerina, osteocalcina, PGE2, TIMPs, TNF- $\alpha$  (11). En el periodonto sano, el FCG representa el trasudado del líquido intersticial del tejido gingival producido por un gradiente osmótico. Sin embargo, se observan infiltrados leucocíticos en todo el EU y siempre se pueden encontrar PMN en el surco, incluso en situaciones clínicamente sanas donde el flujo de FCG es relativamente bajo (11).

El flujo de líquido hacia el surco gingival es típico de la inflamación y se acompaña de un aumento del infiltrado celular. Los neutrófilos, que se consideran el principal componente del sistema de defensa celular en el surco gingival, abandonan la red capilar en el tejido conjuntivo subyacente y migran a través del epitelio de unión hacia el espacio crevicular, donde se acumulan en la interfaz de la placa subgingival y el tejido gingival (11).

Al evaluar la patogenia de la enfermedad periodontal, los signos iniciales son visibles en la encía marginal que muestra cambios clínicos indicativos de inflamación concurrente con un avance apical de la formación de placa y un aumento en la masa de placa. Como respuesta inicial del huésped a la placa bacteriana, se puede observar un aumento de la permeabilidad vascular de los vasos sanguíneos subepiteliales, lo que permite el escape de plasma de la circulación, lo que lleva al edema gingival. A medida que este líquido escapa al surco gingival, a través del epitelio de unión, aumenta el FCG (11) (Fig. 4).



**Figura 4.** Figura esquemática que indica el flujo de líquido crevicular gingival a través de las células epiteliales en presencia de una biopelícula. Biofilm: Biopelícula, Periodontal pocket: bolsa periodontal, Degradation products: productos de degradación, Flow of gingival crevicular fluid: Fluido crevicular gingival. Tomado de referencia (11) Barros, Williams, 2016.

#### 1.4 Tejido Conectivo Gingival

El principal componente de la encía es el tejido conectivo o lámina propia, la cual está formada por células y una matriz extracelular la cual contiene una gran cantidad de fibras de colágena y sustancia fundamental amorfa que contiene agua, proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas de adhesión (12).

La matriz extracelular del tejido conectivo se encuentra conformada por fibras de colágeno tipo 1 y 3, así mismo se encuentran fibras de oxitalán, reticulinas y elásticas (12).

Las células más abundantes en el tejido conectivo gingival son los fibroblastos, los cuales abarcan el 65% de las células del tejido conectivo y predominan en la lámina propia de la encía sana, son células fusiformes o estrelladas con núcleo de forma ovalada, participan en la síntesis, resorción y degradación enzimática de la matriz extracelular y la sustancia fundamental. Las células cebadas o mastocitos son células inmunes que se encuentran en el tejido conectivo, derivan de la médula ósea, tienen abundantes gránulos citoplásmicos, están presentes en la piel y en el epitelio de las mucosas pueden ser activados por la unión de productos microbianos a los TLR, como parte de la inmunidad innata, o por un mecanismo especial dependiente de los anticuerpos. Los gránulos del mastocito contienen aminas vasoactivas, como la histamina, que producen vasodilatación y aumentan la permeabilidad capilar, así como enzimas proteolíticas que pueden matar bacterias o inactivar toxinas microbianas. Los mastocitos también sintetizan y secretan mediadores lipídicos (p. ej., prostaglandinas) y citocinas (p. ej. TNF- $\alpha$ ) que estimulan la inflamación. Los productos del mastocito también proporcionan una defensa contra los helmintos y son responsables de los síntomas de las enfermedades alérgicas, cumple la función de almacenar mediadores químicos de la respuesta inflamatoria (13).

La encía contiene principalmente fibras de colágena, tipo 1 y tipo 3, aunque se ha detectado la presencia de colágena tipo 5, la cual sigue un patrón filamentosos paralelo cubriendo a fibras densas de colágenos tipos 1 y 3. El tejido conectivo gingival también contiene colágena tipo 6 en forma de microfibrillas difusas en la lámina propia, alrededor de los vasos sanguíneos y nervios, cerca de la membrana basal (14).

### **Células inflamatorias en el tejido conectivo gingival**

El tejido conectivo gingival adyacente al epitelio de unión contiene un gran plexo vascular por donde las células inflamatorias como neutrófilos monocitos y linfocitos se extravasan continuamente en estado de salud, algunos neutrófilos y linfocitos pueden encontrarse dispersos entre las fibras sensitivas y el tejido conectivo gingival (8).

#### **Neutrófilos**

Constituyen la primera línea de defensa durante la inflamación y las infecciones, destruyen a los microorganismos principalmente por fagocitosis y mediante la liberación de sustancias antimicrobianas, así como la formación de redes extracelulares conocidas como trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), además producen citocinas, las cuales pueden influir en la respuesta inflamatoria e inmunológica (10).

#### **Macrófagos**

Células que derivan de los monocitos sanguíneos, los cuales migran hacia el tejido, pertenecen al sistema fagocítico mononuclear. Juegan un papel muy importante en la defensa del organismo, realizan fagocitosis, regulan la activación y proliferación de los linfocitos, son esenciales en el proceso de activación de linfocitos T en presencia de antígenos y células alogénicas (10).

#### **Linfocitos**

Los linfocitos son las células que reconocen los antígenos de manera específica y responden contra ellos, por lo que constituyen los mediadores de la inmunidad humoral y celular.

#### **Linfocitos T**

Células responsables de la inmunidad celular. Sus receptores de antígeno reconocen fragmentos peptídicos de antígenos proteínicos unidos y mostrados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y situadas en la superficie de células especializadas denominadas células presentadoras de antígenos (CPA), como macrófagos o células dendríticas (DCs). Los linfocitos T vírgenes necesitan reconocer antígenos proteínicos presentados por las DCs, las CPA más eficaces y especializadas, o profesionales, para iniciar su expansión clonal y diferenciación en células efectoras y de memoria (15).

Los linfocitos T efectoras diferenciados necesitan reconocer de nuevo a los antígenos, que pueden presentar varias CPA, para activar las funciones efectoras de los linfocitos T en las respuestas inmunitarias humoral y celular (16).

Se distinguen diferentes subtipos de linfocitos T con diferentes funciones:

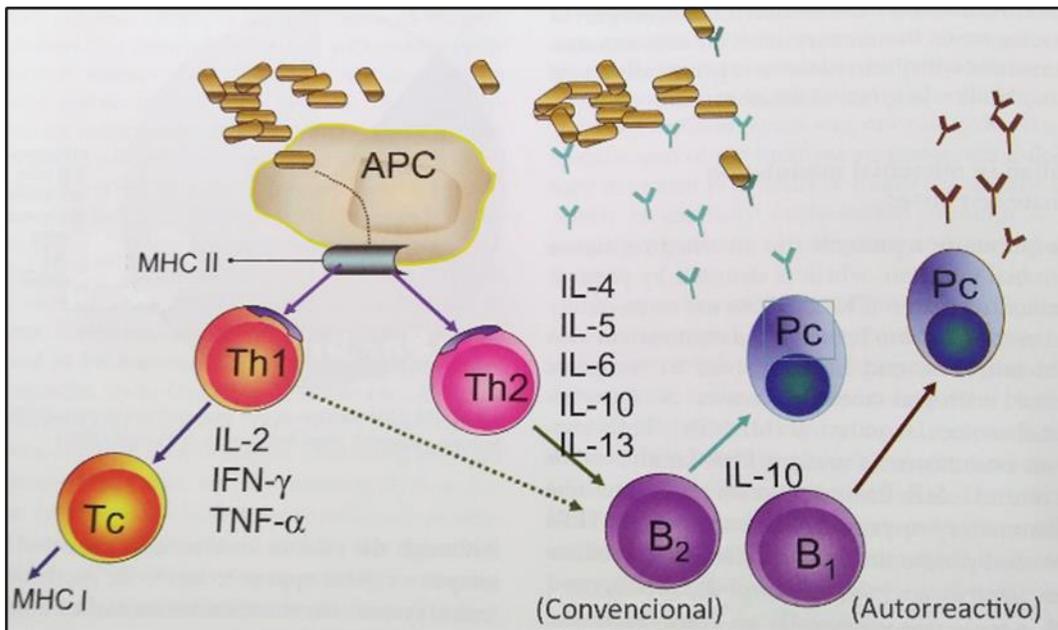
Los linfocitos CD4+ se denominan linfocitos T cooperadores (Th -helper), producen citocinas, las cuales activan a los linfocitos B, y a los macrófagos con lo que regulan la función cooperadora de este linaje (17).

Los linfocitos T CD8+ se conocen como linfocitos T citotóxicos (LTC), eliminan a las células infectadas por microorganismos intracelulares, viven poco tiempo y mueren cuando se elimina el antígeno (17).

Algunos linfocitos T CD4+ pertenecen a un subgrupo especial que impide o limita las respuestas inmunitarias; estos se llaman linfocitos T reguladores (Tregs) (17).

Los linfocitos del subtipo Tregs migran y se acumulan a nivel de tejidos inflamados, tal como los tejidos gingivales, que, en periodontitis presentan un infiltrado inflamatorio (17) (5) (Fig. 5).

Otra clase de linfocitos son los linfocitos citolíticos naturales (NK), que también matan células infectadas del huésped, pero, no expresan receptores para el antígeno. Los linfocitos NK son componentes de la inmunidad innata, capaces de atacar rápidamente a las células infectadas (17).



**Figura 5. Inmunología adaptativa en la enfermedad periodontal.** APC: Célula presentadora de antígeno, Th1: Célula T helper 1, Th2: Célula T helper 2, Tc: Célula T citotóxica, Pc: Célula plasmática, modificado de (5) Lindhe J., 2009.

## Linfocitos B

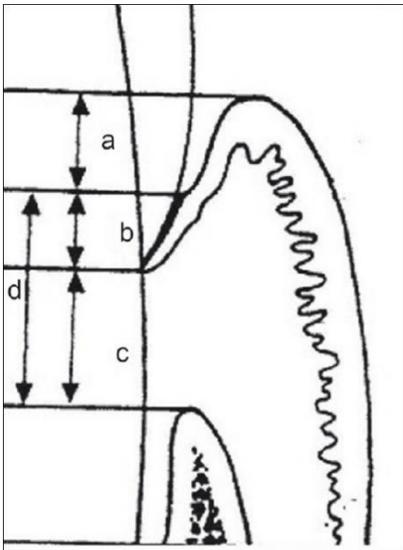
Son las únicas células capaces de producir anticuerpos, que son los mediadores de la inmunidad humoral adaptativa. Los antígenos solubles y los que están en la superficie de los microbios y otras células pueden unirse a los receptores del linfocito B para el antígeno, lo que inicia el proceso de activación del linfocito B. Esto conduce a la secreción de formas solubles de anticuerpos con la misma especificidad antigénica que los receptores de membrana (12).

Cuando los linfocitos vírgenes reconocen antígenos microbianos y, además, reciben señales adicionales inducidas por los microbios, los linfocitos específicos frente al antígeno proliferan y se diferencian en células efectoras y células de memoria (12). Las células de memoria se generan a partir de la descendencia de linfocitos estimulados por el antígeno, sobreviven largos períodos de tiempo sin el antígeno y únicamente se activan en presencia del antígeno a partir del cual se desarrollaron (12). Las células efectoras son la descendencia diferenciada de células vírgenes que tienen la capacidad de producir moléculas que actúan para eliminar antígenos (12).

Las células B efectoras son células secretoras de anticuerpos, llamadas células plasmáticas, y son linfocitos B diferenciadas, destacan por su habilidad de secretar inmunoglobulinas. Se producen en respuesta al estímulo antigénico en los órganos linfáticos periféricos, donde pueden estar y producir anticuerpos. Predominan en las lesiones gingivales inflamatorias las cuales se localizan en el tejido conectivo (8).

## Grosor biológico

También denominado unión dentogingival, que está constituida por el epitelio de unión y el tejido conectivo de inserción a la encía. Se relaciona también con el grosor de la encía, el biotipo periodontal y la profundidad del surco gingival (17) ( Fig. 6).



**Figura 6. a) Surco Histológico, b) Unión Epitelial, c) Unión de tejido conectivo, d) Grosor Biológico.** Tomado de referencia (17) Nugala, B. 2012.

## 1.5 Fibras Gingivales

Mantienen unida a la encía con el cemento radicular y proveen la rigidez necesaria para resistir las fuerzas masticatorias (13, 18).

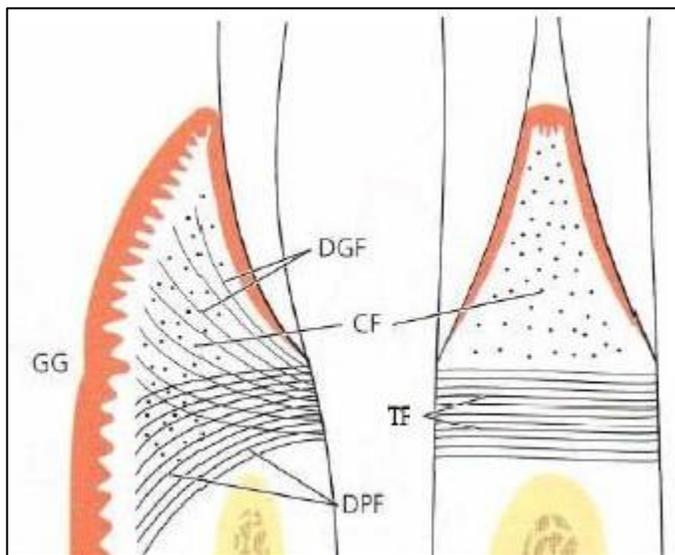
Dentogingivales: se ubican apicalmente al epitelio de unión (estructura que forma parte del periodonto de protección, siendo el medio de unión de la encía al diente) y desde la superficie cervical de las raíces se orientan hacia el margen gingival (18).

Dentoperiósticas: más apicales que las anteriores, desde la superficie radicular hasta la lámina perióstica del hueso alveolar (18).

Crestogingivales: insertas en la cresta alveolar se dirigen hacia la encía marginal.

Circulares: rodean a toda la corona dentaria.

Dentodentales: unen una raíz dentaria con otra raíz dentaria vecina, pasando a través de las papilas y el col o collado (18) (Fig. 7).



**Figura 7. Fibras Gingivales. 1. Fibras circulares (CF). 2. Fibras Dentogingivales (DGF). 3. Fibras Dentoperiósticas (DPF). 4. Fibras Transeptales (TF). Surco de la encía libre (GG).** Tomado de referencia (5) Lindhe, 2015.

## 1.6 Ligamento Periodontal

Es un tejido conectivo especializado, fibroso, vascularizado altamente celular, rodea las raíces de los dientes. Se encuentra entre el cemento radicular y el hueso alveolar, comienza a una distancia de uno a 1.5 mm apical de la UCE (15).

El ligamento periodontal (LPD) contiene fibras que son capaces de adaptarse a las continuas cargas sobre ellas, lo que permite su remodelación de manera continua (15).

Los extremos de las fibras principales del LPD están insertados en el cemento y el hueso. Estas porciones insertadas se denominan fibras de Sharpey (15). La sustancia fundamental es el principal constituyente del LPD y es un material amorfo que une tejidos y fluidos, lo que le permite la difusión de las sustancias metabólicas y gases (9). Su constitución es similar a la del tejido conectivo de la encía, pero con algunas variaciones en sus porciones: el dermatán sulfato es el principal glicosaminoglicano, la sustancia fundamental contiene 70% de agua, cuando el periodonto está sometido a una mayor carga de masticatoria, el ancho del ligamento periodontal puede aumentar hasta 50% y los haces de fibras principales también incrementan en grosor (15).

El colágeno es una proteína presente en las fibras gingivales y está compuesta de diversos aminoácidos entre los cuales se destacan la hidroxiprolina, glicina, la prolina y la hidroxilisina (14).

Las fibras principales se componen sobre todo de colágeno tipo I mientras que las fibras reticulares se componen de colágeno tipo III. Las fibras principales del ligamento se organizan en 6 grupos que se desarrollan de forma secuencial en la raíz en desarrollo:

1. Grupo transeptal: se extienden interproximalmente sobre la cresta del hueso alveolar y están incluidas dentro del cemento en los dientes adyacentes. Se reconstruyen incluso después de la destrucción del hueso alveolar ocasionado por la enfermedad periodontal.
2. Grupo de la cresta alveolar: las fibras de la cresta se extienden en sentido oblicuo desde el cemento justo por debajo del epitelio de unión hasta la cresta alveolar, previenen la extrusión del diente y resisten los movimientos laterales.
3. Grupo horizontal: se extienden en sentido perpendicular al eje longitudinal del diente desde el cemento hasta el hueso alveolar.
4. Grupo oblicuo: es el grupo más grande en el ligamento, se extienden desde el cemento en dirección coronal en sentido oblicuo respecto al hueso. Llevan la carga del estrés masticatorio vertical y lo transforman en tensión sobre el hueso alveolar.
5. Grupo apical: las fibras apicales están irradiadas de manera irregular desde el cemento hasta el hueso en la región apical del alveolo. No se encuentran en raíces que no están completamente formadas.
6. Grupo interradicular: se extienden en forma de abanico desde el cemento hasta el diente, en las áreas de la furcación de dientes multirradiculares. Aunque el LPD no contiene elastina madura pueden encontrarse dos formas inmaduras: oxitalán y elaunina. Las fibras de oxitalán se extienden paralelas a la superficie de la raíz en dirección vertical y se flexionan para insertarse en el cemento. Se cree que regulan el flujo vascular.

Las fibras principales son remodeladas por células del ligamento para adaptarse a las necesidades fisiológicas y en respuesta a diferentes estímulos (12).

## **Fibroblastos**

Las principales células del LPD son los fibroblastos, ocupan hasta el 25% del volumen del espacio del LPD. Su función es sintetizar y secretar la matriz extracelular, que incluye fibras colágenas y elásticas, proteoglicanos y glicoproteínas. Realizan el recambio de colágena, debido a que son capaces de sintetizarla y degradarla al mismo tiempo, se lleva a cabo gracias a las vacuolas digestivas de los fibroblastos las cuales contienen enzimas lisosomales. Otras de sus funciones son la contractibilidad y movilidad. Se encuentran alineados a lo largo de los haces de fibras colágenas y están unidos a ellas (14).

## **Células epiteliales de Malassez**

Son remanentes de la vaina epitelial radicular, conocidas como restos epiteliales Malassez. Estos se encuentran cerca del cemento, como grupos o cordones de células, formando una red epitelial. Se reconocen como restos celulares, ya que expresan la proteína bcl2, que es un inhibidor de la apoptosis durante toda su vida. Estos restos están distribuidos en todo el LPD (5).

## **Células mesenquimales indiferenciadas**

Un grupo importante de células del LPD son las células mesenquimales indiferenciadas o células troncales, se localizan perivascularmente en los espacios celulares contiguos y la mayoría de estas células se encuentran ubicadas en la parte central del LPD (19).

Fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1976 como células clonogénicas, derivadas de la médula ósea que se denominaron fibroblastos de unidades formadoras de colonias (CFU-F) (18).

Representan una terapia celular prometedora en odontología reconstructiva para el tratamiento del periodonto dañado. Por lo tanto, los investigadores han intentado identificarlas y revelar sus características. En la década de 1980, se informó que las células que exhibían un tamaño pequeño, una alta proporción nuclear/citoplasmática y una división celular lenta estaban localizadas en regiones adyacentes a los vasos sanguíneos. En 2004, las células que exhibían capacidades multipotentes y de autorrenovación se aislaron por primera vez del tejido del LPD (18).

### **1.7 Cemento Radicular**

Es el tejido mesenquimal calcificado y avascular que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica. Los dos tipos principales de cemento son: acelular (primario) y celular (secundario), consisten en una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas de colágeno. Las dos fuentes principales de fibras de colágeno en el cemento son: fibras de Sharpey (extrínsecas), que son la porción incluida de las fibras principales del ligamento y están formadas por fibroblastos y fibras que pertenecen a la matriz del cemento (intrínsecas producidas por cementoblastos) (16). El contenido inorgánico del cemento principalmente hidroxiapatita, es del 65% en peso y al igual que otros tejidos mineralizados contiene fibras colágenas incluidas en una matriz. La mayor proporción de la matriz orgánica del cemento está compuesta por colágenos tipo I (90%) y tipo III (alrededor del 5%) (20).

El cemento acelular es el primero en formarse, cubre el tercio cervical de la raíz y no contiene células. Este cemento se forma antes que el diente alcance el plano oclusal y su espesor oscila entre 30 y 230µm. Las fibras de Sharpey constituyen la mayor parte de la estructura del cemento acelular que tiene un papel principal en el apoyo del diente, su tamaño, número y distribución aumentan con la función (21).

El cemento celular, formado después de que el diente alcanza el plano oclusal es más irregular y contiene cementocitos en espacios individuales (lagunas) que se comunican entre sí mediante un sistema de canaliculos anastomosados. Las fibras de Sharpey ocupan una porción pequeña del cemento celular y están separadas por otras fibras que se encuentran organizadas paralelas a la superficie radicular o de un modo aleatorio (21).

### **Cementoblastos**

Están localizados dentro del LP, en estrecha proximidad con la superficie del cemento. Los cementoblastos activos tienen retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados, comparten características morfológicas similares con los osteoblastos, lo que sugiere que estos 2 tipos de células pueden originarse de una célula progenitora común localizada en el LPD y en los espacios medulares adyacentes al hueso alveolar (20).

### **Cementocitos**

Son cementoblastos que durante la formación del cemento quedaron atrapados dentro de las lagunas, sus procesos citoplasmáticos se extienden hacia la superficie del cemento a través de canaliculos tienen un volumen citoplasmático reducido (21).

## **1.8 Proceso Alveolar**

Es el hueso que limita a los alvéolos dentarios, denominado propiamente hueso alveolar, consta de tablas corticales externas formadas por hueso compacto, y hueso esponjoso en la porción central, en el hueso alveolar, se insertan las fibras del LPD. Se inicia a 2 mm apicales de la unión cemento-esmalte y corre a lo largo de la raíz terminando en el ápice de los órganos dentales; las tablas corticales están formadas de hueso laminar compacto constituido por osteonas, también llamados sistemas de Havers. (22).

### **Periostio y endostio**

Las superficies de las tablas corticales están cubiertas por tejido conectivo, el cual se denomina periostio. Éste posee una capa interna que está en contacto directo sobre la superficie ósea, que contiene células óseas, y una capa externa, rica en vasos sanguíneos, nervios, fibras de colágeno y fibroblastos. El periostio desempeña un papel esencial en la reparación y remodelación ósea, el endostio limita las cavidades internas del hueso y está compuesto de una sola capa de células óseas sin la capa externa fibrosa (23).

## **Hueso alveolar**

Constituye la pared ósea de los alvéolos y en él se insertan las fibras del ligamento periodontal. Se inicia a 2 mm de la UCE y corre a lo largo de la raíz y termina en los ápices dentarios, se forma durante el desarrollo y erupción de los órganos dentarios y se reabsorbe gradualmente cuando existe pérdida de estos. El hueso alveolar se forma a partir de las células del folículo dental, junto con el cemento radicular y el LP, presenta perforaciones a través de las cuales pasan numerosos vasos sanguíneos y fibras, así como vasos linfáticos y sanguíneos. Radiográficamente se observa como una línea radiopaca que rodea los órganos dentarios por lo que también se le denomina lámina dura (24). El hueso alveolar está formado por 2/3 de materia inorgánica constituida por minerales como calcio y fosfato en forma de sales y cristales de hidroxiapatita, y 1/3 de materia orgánica constituida en 95% por 1 componente fibrilar, predominante de colágena tipo I y III, así como 5% de un componente no fibrilar de las proteínas no colágenas y moléculas reguladoras (24).

## **Osteoblastos**

Son células que participan en la formación ósea se originan a partir de las células mesenquimatosas y monocitos sanguíneos, que primero se diferencian en células pre-osteoblásticas y luego en osteoblastos. Se encuentran en el endostio del hueso alveolar y en el LP sobre la superficie externa del alveolo (19).

Producen y secretan la matriz osteoide, constituida por fibras de colágena y sustancia fundamental. Los osteoblastos, presentan receptores para la parathormona, hormonas sexuales, glucocorticoides, prostaglandinas, citocinas como la interleucina (IL)-6 e IL-11 (19).

## **Osteocitos**

Durante el proceso de maduración y mineralización del tejido osteoide, algunos osteoblastos quedan atrapados en lagunas, convirtiéndose en osteocitos, los cuales tienen un tamaño menor y contienen un núcleo que ocupa la mayor parte de las células, emiten prolongaciones citoplasmáticas dentro de canalículos. Son los responsables de mantener los niveles de minerales dentro del hueso (12).

## **Osteoclastos**

Los OC son células de reabsorción ósea, migratorias móviles altamente especializadas, derivadas de células madre hematopoyéticas. Los osteoclastos son las principales células de reabsorción ósea, la estimulación local de su actividad es un requisito esencial para la pérdida de hueso alveolar (12).

Uno de los primeros eventos en la activación de los preosteoclastos es la contracción del citoesqueleto de actina y miosina de los osteoblastos en respuesta a influencias locales y sistémicas, por ejemplo, la estimulación de la hormona paratiroidea (PTH), el ácido retinoico y la vitamina D3. Esto aumenta el ancho de los espacios intercelulares, exponiendo más osteoide al líquido intersticial. Los osteoblastos también secretan colagenasa y activador del plasminógeno. Se ha demostrado que IL-1, TNF y el factor de crecimiento epidérmico

(EGF) desactivan los osteoblastos y aumentan la liberación de Factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1) y el Ligando receptor activador para el factor nuclear kappa  $\beta$  (RANKL) (25).

El ciclo de remodelación ósea opera continuamente ya que los osteoclastos eliminan constantemente el hueso maduro, mientras que los osteoblastos forman simultáneamente hueso nuevo. Esto ocurre en todo el esqueleto en unidades focales denominadas unidades de remodelación ósea (BRU), y cada unidad de actividad dura de tres a cuatro meses. Este proceso de varios pasos funciona en cuatro fases distintas de activación, reabsorción, inversión y formación. Diferentes mediadores como la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7 e IL-11, prostaglandina E (PGE<sub>2</sub>) y TNF- $\alpha$  pueden actuar como activadores de los osteoclastos. Otro sistema muy importante en la activación de los osteoclastos incluyen al receptor del activador del factor nuclear Kappa  $\beta$  (RANK), (RANKL), y la osteoprotegerina (OPG) (23).

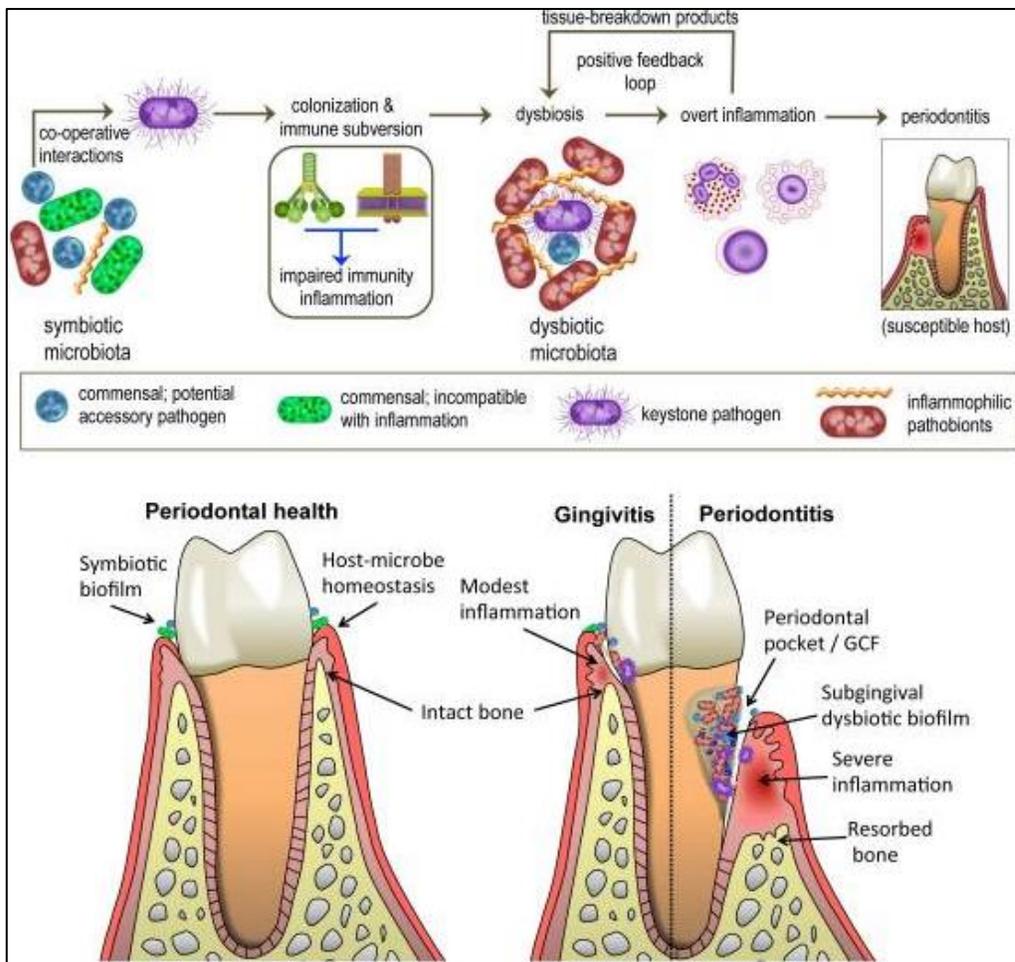
### 1.9 Periodontitis

Es una respuesta inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes inducida por microorganismos o grupos de microorganismos específicos que tiene como resultado la destrucción progresiva del LP y el hueso alveolar, con formación de bolsas periodontales, recesión gingival o ambas (26).

La respuesta inflamatoria se caracteriza por la secreción de los mediadores derivados del huésped y la descomposición del tejido. Entre dichos mediadores se incluyen IL-1 $\beta$ , IL-6, la PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , RANKL, metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), citocinas como IL-12, IL-18, así como quimiocinas (26).

El inicio y la progresión de la enfermedad periodontal se da a través de la disbiosis del microbioma oral que interactúa con el sistema inmune del huésped, lo que lleva a la inflamación y la enfermedad periodontal establecida (27). Las MMPs comprenden la vía más importante de destrucción asociada con la enfermedad periodontal debido a su papel en la descomposición patológica de la matriz extracelular dentro de los tejidos periodontales (28). La enfermedad periodontal afecta a las estructuras de soporte de los órganos dentales, encía, hueso, cemento y LPD, lo que conduce a la pérdida dentaria y contribuye a la inflamación sistémica (29).

Las bacterias asociadas al desarrollo de la enfermedad periodontal son: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Taenerella forsythia* (*T. forsythia*), y *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), las cuales actúan aumentan la respuesta inflamatoria y con ello la expresión de citocinas proinflamatorias, así como MMPs (6) (30) (Fig. 8).



**Figura 8. Sinergia polimicrobiana y disbiosis en periodontitis.** La periodontitis es inducida en huéspedes susceptibles por una comunidad polimicrobiana, en la que diferentes miembros cumplen funciones distintas que convergen sinérgicamente para causar una inflamación destructiva. Los patógenos clave, cuya colonización es facilitada por patógenos accesorios, inicialmente subvierten la respuesta del huésped que conduce a una microbiota disbiótica, en la que se sobre activa a los patobiontes, los cuales sobre activan la respuesta inflamatoria y se inicia la destrucción del tejido periodontal, incluida la reabsorción del hueso alveolar de soporte Tomado de referencia de (30) Hajishengallis, G. 2015.

También los productos bacterianos actúan sobre el tejido conectivo, provocando reacciones inflamatorias e inmunológicas en el huésped. Durante la respuesta inflamatoria se presenta la acumulación de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) que se asocian con la activación de procesos de destrucción de tejido conectivo, los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias actúan como endotoxinas sobre las células como macrófagos, linfocitos, fibroblastos y osteoblastos (30).

## 1.10 Gestación

Durante la gestación existe un aumento en la prevalencia de enfermedad periodontal y gingivitis. La severidad de estas alteraciones tiende a aumentar gradualmente hasta la semana 36 de la gestación. Las hormonas sexuales femeninas, especialmente la progesterona, juegan un papel importante en la regulación de varios procesos vitales durante la gestación, como la implantación del embrión, el mantenimiento de la gravidez, las respuestas inmunitarias gestacionales, la inducción del parto y la maduración cervical. De estos, las respuestas inmunitarias maternas son críticas no solo para proteger a la madre y al feto de patógenos externos, sino también para permitir que la mujer embarazada tolere al propio feto, ya que lleva ADN externo obtenido del padre y, por lo tanto, actúa como un aloinjerto (31).

La inmunidad Th1, caracterizada por respuestas proinflamatorias, se vuelve dominante durante el período de peri-implantación, y la inmunidad Th1 "controlada" beneficia a los trofoblastos invasores en lugar de dañarlos. Rápidamente después de la implantación placentaria, la inmunidad Th1 inflamatoria temprana se desplaza hacia una respuesta de tipo Th2. La inmunidad Th2 predominante, que anula la inmunidad Th1 en el sitio de implantación de la placenta, protege al feto al equilibrar la inmunidad Th1 y acomodar el desarrollo fetal y placentario. Las hormonas sexuales femeninas presentan fluctuaciones importantes, por un lado, al final del tercer trimestre, la progesterona y los estrógenos alcanzan niveles plasmáticos máximos que son 10 y 30 veces, respectivamente, superiores a los observados durante el ciclo menstrual. El estrógeno favorece la supresión del sistema inmune durante la gestación y la proliferación de los linfocitos T, reducen el número y la actividad de células NK, aumentan el número y la actividad de granulocitos y macrófagos, reducen la estimulación osteoclástica mediante la disminución de IL-1 y TNF- $\alpha$ , y disminuyen la presentación antigénica por parte de las células dendríticas (32).

Las hormonas sexuales participan en la respuesta inmune al biofilm durante la gestación, caracterizada por aumento en la permeabilidad capilar y flujo de líquido crevicular provocando los signos clínicos de inflamación, que muestran un edema ligero del tejido acompañado por enrojecimiento, así como de hiperplasia gingival (28). Existen también, incrementos en la población de *Prevotella intermedia*, los cuales aumentan en el segundo trimestre y se encuentran relacionados con un aumento en los signos clínicos de gingivitis (33). Por lo que se considera que la disbiosis oral contribuye al desarrollo de un embarazo anormal y a la relación de infección periodontal con el aumento y/o presencia de citocinas proinflamatorias (21). Existe evidencia de que los patógenos periodontales pueden trasladarse desde los tejidos periodontales a la unidad feto placentaria e iniciar una infección metastásica (21).

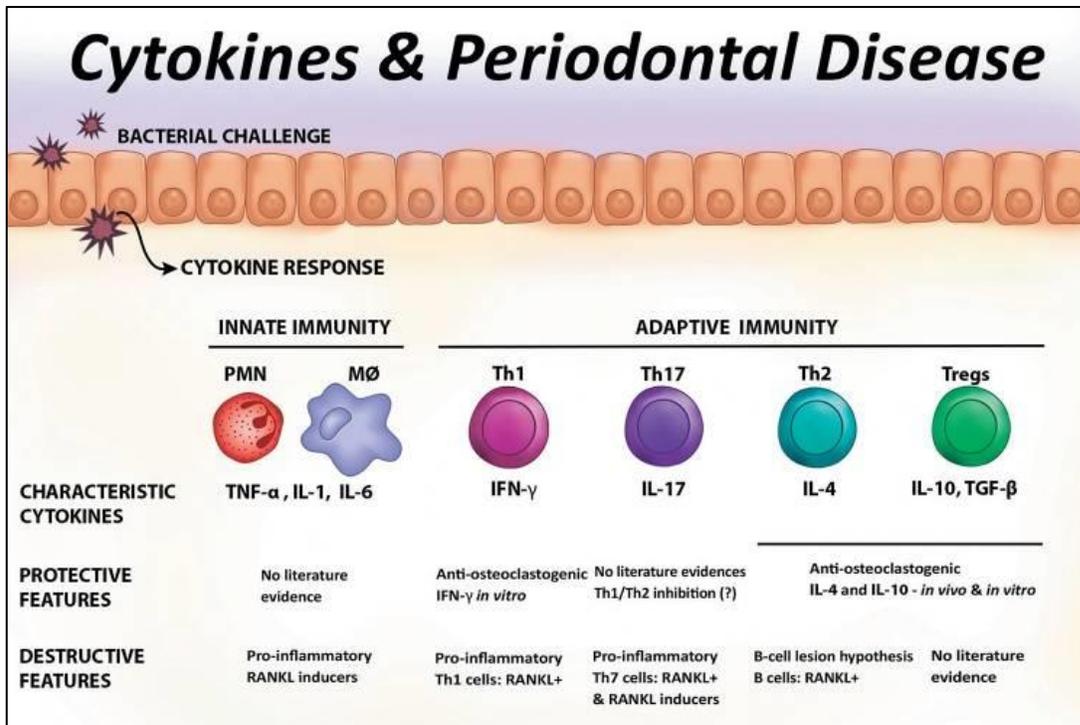
## 1.11 Respuesta Inmunitaria a la Periodontitis

La enfermedad periodontal es iniciada y sostenida por los microorganismos del microbioma periodontal, donde los componentes bacterianos como lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácidos nucleicos, proteasas y toxinas activan la respuesta inmune. Antígenos y antitoxinas liberados por las bacterias, agrupados como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) como los receptores tipo Toll (TLR), se encuentran en la superficie de las células residentes del tejido. Los TLR se unen a los PAMPs, e inician una serie de eventos intracelulares que conducen a la producción de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos a la par (34).

Células residentes como los mastocitos liberan aminas vasoactivas, y TNF- $\alpha$ , que aumentan la permeabilidad vascular, y la expresión de moléculas de adhesión que favorecen el infiltrado de células no residentes en los tejidos como neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Por lo tanto, se inicia un ambiente inflamatorio a nivel local que incluye prostaglandinas, MMPs, proteínas del complemento y citocinas. Las citocinas permiten la comunicación dentro del sistema inmune y la comunicación con otros sistemas de órganos y tejidos. En la enfermedad periodontal las citocinas involucradas en la respuesta inmunológica destructiva son IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 y TNF- $\alpha$  (35).

Una de las citocinas que tiene un papel importante en la inmunidad innata es el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), es una proteína multifuncional, es una citocina proinflamatoria que se expresa constitutivamente en diferentes células inmunes y no inmunes tales como eosinófilos, neutrófilos, granulocitos, macrófagos, linfocitos B y T. Su liberación ocurre a partir de preformados existentes en el ambiente intracelular; puede ejercer sus efectos biológicos en las células a través de diferentes vías de señalización celular. MIF se almacena y se libera rápidamente en respuesta a estímulos de LPS, señales proliferativas e hipoxia; funciona de forma paracrina y autocrina; promueve la activación de las células, así como la liberación de citocinas proinflamatorias y contrarresta los efectos de los glucocorticoides en los sitios de la inflamación. Activa en macrófagos funciones como fagocitosis, adherencia, motilidad y migración transendotelial. Los monocitos/macrófagos almacenan grandes cantidades de MIF preformado que son liberadas frente a estímulos con LPS, glucocorticoides, exotoxinas Gram positivas, citocinas y mediadores proinflamatorios, los cuales tienen un papel importante en la secreción local del MIF durante la respuesta inmune innata (34).

Estimula la liberación de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12, perpetuando así el ambiente inflamatorio por la retroalimentación positiva a la respuesta inflamatoria (36) (Fig. 9).



**Figura 9. Respuesta inmune innata y adaptativa de citocinas en presencia de periodontopatógenos.** Tomado de referencia (36) Silva, 2015.

Desempeña un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune innata, a través de la modulación de TLR4. La activación de TLR4 da como resultado la producción de mediadores proinflamatorios, incluyendo MIF, que induce el reclutamiento de células inflamatorias, entre ellas neutrófilos (36).

Las características proinflamatorias, quimios atrayentes de MIF lo convierten en una citocina con un papel importante tanto en el inicio, como en la progresión de la enfermedad periodontal. La presencia de MIF aumenta el ambiente proinflamatorio que promueve la sobreexpresión de RANKL, inductor de la activación directa de los osteoclastos (36).

La actividad osteoclastogénica de MIF en la enfermedad periodontal también se puede atribuir a la capacidad que tiene la citocina al activar vías de señalización como NF $\kappa$ B y NFAT en los precursores de osteoclastos que inician diferenciación y supervivencia en la célula (29), así como la posible facultad quimioatrayente de MIF al actuar como ligando del receptor de quimiocina CXCR4 en el reclutamiento de células precursoras de osteoclastos (36).

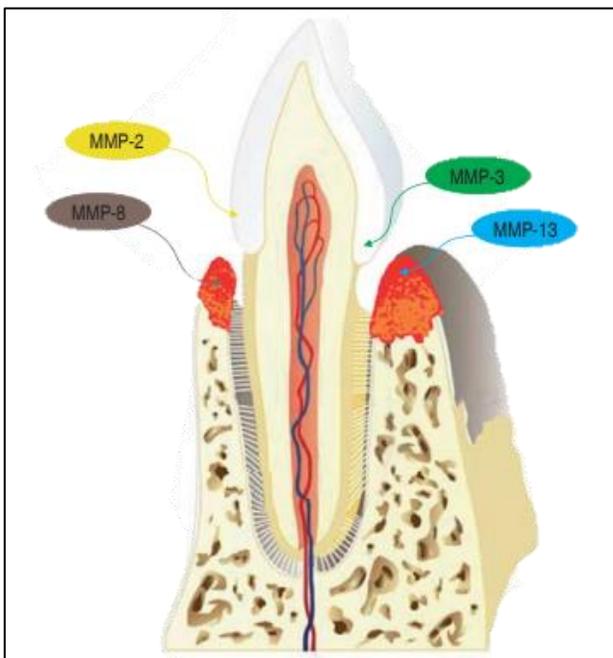
## 1.12 Metaloproteinasas

Componen un grupo de más de 25 endopeptidasas que contienen zinc, dependientes de calcio, secretadas o unidas a la superficie celular, las cuales actúan como mediadores moleculares también llamados biomarcadores, ya que se encuentran presentes en el fluido crevicular gingival, y la saliva. Al existir algún cambio en los biomarcadores se puede reconocer el estado de salud periodontal (26).

Las colagenasas MMP-1, -8 y -13 inician la degradación del colágeno I, II y III, los cuales continúan su degradación por otras MMPs y enzimas proteolíticas. Estas enzimas para ejercer su acción dependen de cofactores como el calcio y zinc. Las colagenasas intersticiales operan dividiendo el colágeno en fragmentos de colágena  $3/4$  y  $1/4$ , que, por sí solos son fácilmente desnaturalizados y transformados en gelatina. Cuando se convierten en gelatina, la MMP-2 y MMP-9 o gelatinasas (Fig. 10), la degradan en miles de fragmentos diminutos (37).

Un resultado crítico en la periodontitis es la degradación de la estructura de colágeno de los tejidos conectivos que forman el periodonto; por ello, las MMPs han sido implicadas en la progresión de esta enfermedad.

La actividad de las MMPs está modulada por los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs), que comprenden cuatro tipos. Un ejemplo de tal molécula es TIMP-1, secretada por neutrófilos, linfocitos y mastocitos que pueden inhibir la mayoría de las MMPs. Todos estos también son sintetizados por macrófagos y fibroblastos (37) (Fig. 10).



**Figura 10. Expresión de MMPs en los tejidos periodontales inflamados, principalmente MMP 2,-8,-13 y -3.** Tomado de referencia (38) Sapna, G. 2014.

Los niveles elevados de MMPs en el FCG y en las muestras de saliva, se asocian con la progresión de la enfermedad periodontal. Las MMPs participan en la destrucción de los tejidos periodontales asociada con periodontitis debido a su papel en la degradación de la matriz extracelular en los tejidos periodontales.

La expresión de MMP-13 en células epiteliales se asocia con la degradación de colágeno y la migración epitelial hacia el tejido conectivo en inflamación crónica, así como con el inicio de resorción ósea. A su vez MMP-2 es secretada principalmente por fibroblastos gingivales, degrada colágeno tipo IV presente en tejidos gingivales (39).

Adicionalmente, la expresión de MMPs también es modulada por hormonas como el estradiol, que, por ejemplo, disminuye la expresión de MMP-13 en condrocitos (37).

La degradación de la matriz extracelular puede presentarse por diferentes vías, por la activación de las MMPs desde la matriz. La liberación de radicales libres de oxígeno y la fagocitosis de los componentes de la matriz. La fagocitosis por células fagocitarias también es una importante vía de la degradación de la colágena en el recambio fisiológico y la remodelación de los tejidos conectivos periodontales (10).

Los radicales libres de oxígeno son especies moleculares altamente reactivas, las cuales pueden romper las proteínas celulares, ácidos nucleicos, y lípidos de membrana, así como causar despolimerización de los componentes de la matriz, entre ellos la colágena, el ácido hialurónico y los proteoglicanos (10).

MIF es una citocina proinflamatoria que estimula la liberación de otras citocinas durante la inflamación, como TNF- $\alpha$ , interferón Gama (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$ , IL-IL-8 e IL-12 (40).

También actúa en la modulación de la expresión de varias otras moléculas proinflamatorias como el óxido nítrico (ON) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la PGE<sub>2</sub>, perpetuando así el ambiente inflamatorio por la retroalimentación positiva en la respuesta inflamatoria. También desempeña un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune innata a través de la modulación del TLR4, su activación resulta en la producción de mediadores proinflamatorios, incluyendo el reclutamiento de células inflamatorias, entre ellas neutrófilos (41).

El papel fisiológico del MIF es contrarrestar los efectos inhibitorios de los esteroides sobre la respuesta inflamatoria e inmune (40).

## **2. Justificación**

La enfermedad periodontal es un problema de salud que afecta a la mayoría de la población mundial, un grupo que se considera vulnerable en la enfermedad periodontal son las mujeres gestantes, cuyo estado fisiológico se ha relacionado con el inicio o agravamiento de la enfermedad. Por otro lado, dado que la destrucción tisular en la enfermedad periodontal es causada por la respuesta inmune del hospedero ante los factores de patogenicidad de los microorganismos en el biofilm y esta respuesta es mediada principalmente por citocinas inflamatorias, muchas de ellas inducidas por MIF, y las MMPs en la enfermedad periodontal durante la gestación.

Éste estudio contribuirá a identificar la evolución de la enfermedad periodontal bajo diferentes condiciones hormonales e inmunes, provocadas por el desarrollo de la gestación en un modelo murino genéticamente deficiente para MIF (*Mif*<sup>-/-</sup>).

## **3. Planteamiento del Estudio**

Identificar la participación de MIF en la expresión de MMP-2 Y MMP-13 en el desarrollo de periodontitis experimental previo y durante la gestación de un modelo murino.

#### **4. Hipótesis**

MIF participa en el desarrollo de la enfermedad periodontal durante la gestación, al favorecer la destrucción tisular a través de la sobreexpresión de MMP-2 Y MMP-13 en un modelo murino. Por lo tanto, la periodontitis experimental será menos severa en el grupo de hembras gestantes *Mif*<sup>-/-</sup> en comparación con el grupo de hembras gestantes silvestres (WT).

## **5. Objetivos**

### 5.1 Objetivo Principal

Determinar la participación de MIF en la expresión de MMP-2 y MMP-13 en un modelo de periodontitis experimental en ratones hembra gestantes WT y *Mif*<sup>-/-</sup> BALB/c.

### 5.2 Objetivos Particulares

1. Se desarrollará el modelo de periodontitis experimental en grupos de ratones hembra gestantes.
2. Se determinará la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-13 por zimograma en ratones hembra gestantes.
3. Redactar los resultados en un informe técnico (tesis).

## 6. Materiales Y Métodos

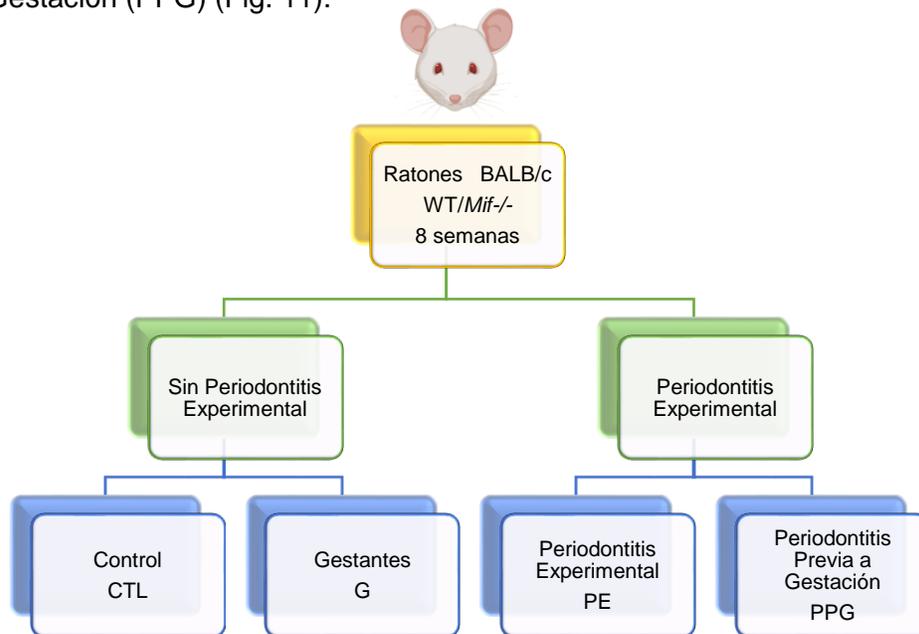
### 6.1 Consideraciones Éticas

El trabajo con animales de experimentación se llevó a cabo en el laboratorio 5 de la UBIMED. Todos los experimentos del proyecto que incluyeron animales de experimentación fueron realizados bajo estricto cumplimiento de las normas enunciadas en el “Marco Ético de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de Laboratorio” en apego a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. El manejo de Residuos Peligrosos Biológicos – Infecciosos se realizó en apego a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-2002. Este trabajo es parte del proyecto para la obtención del Doctorado en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Mtra. Betsaida J. Ortiz Sánchez, cuenta con la aprobación por la comisión de ética de FES-Iztacala No. CE/FESI/062017/1182, actualización CE/FESI/042022/1465 y por la Comisión de Bioseguridad de la FES-Iztacala en 8 de agosto del 2017 y enero 2022.

### 6.2 Animales

Se utilizaron ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c WT y Mif<sup>-/-</sup> (Bioterio FES-I). Fueron provistos de agua y alimento balanceado *ad libitum*. Se distribuyeron en 4 grupos:

Control (CTL), Gestación (G), Periodontitis Experimental (PE) y Periodontitis Previo a Gestación (PPG) (Fig. 11).



**Figura 11. Diagrama de flujo de grupos experimentales.** Se utilizaron ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c WT y Mif<sup>-/-</sup>. Se distribuyeron en 4 grupos: Control (CTL), Gestación (G), Periodontitis Experimental (PE) y Periodontitis Previo a Gestación (PPG).

### 6.3 Inducción de Periodontitis

El modelo de inducción consistió en la colocación de ligaduras con sutura Nylon 6-0 (Atramat) alrededor del segundo molar superior derecho (42-46) en ratones hembra WT y *Mif*<sup>-/-</sup>, bajo anestesia, se utilizó Xylazina (Porcin, Pisa) como preanestésico, con dosis ponderal de 10 mg/kg, con una dilución del 10%, y Ketamina (Anesket, Pisa) (Fig. 14), como anestésico, con dosis ponderal 10 mg/kg, dilución al 10% (47). El procedimiento se realizó con ayuda de una mesa de trabajo y separadores diseñados para facilitar la visibilidad, así como con el uso de microscopía quirúrgica (Microscopio Quirúrgico Carl Zeiss GmbH) ubicado en la clínica de Endoperiodontología (Fig. 12).



**Figura 12. Modelo de maxilar murino con inducción de periodontitis experimental.** Ligadura de sutura Nylon 6-0 (Atramat) alrededor del segundo molar superior derecho.

La permanencia de las ligaduras de sutura se verificó cada semana. Después de 2 semanas post-inducción se seleccionaron 3 hembras de manera aleatoria para ser apareadas con los machos, con la finalidad de que queden preñadas (verificadas con tapón positivo) y conformar el grupo de periodontitis previo a la gestación (PPG). Otro grupo de 3 ratones hembra se mantuvo sólo con periodontitis (PE). Otro grupo de 3 ratones hembra sin periodontitis fue apareado para formar el grupo gestante (G) y 3 ratones hembra conformaron el grupo control (CTL).

**6.4 Eutanimación.** Todos los grupos fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> después de 10 semanas, considerando el tiempo a partir de la inducción de periodontitis experimental. Los ratones control fueron sacrificados en los mismos tiempos que los grupos experimentales.

**6.5 Zimograma.** Se obtuvieron las proteínas de los maxilares derechos, y se realizaron zimogramas en gel de acrilamida con sustrato de gelatina (Sigma Aldrich) para MMP-2, o colágena (Collagen from calf skin - Sigma Aldrich) para MMP-13, para identificar la presencia y expresión de las MMP's como pro-enzima o en su forma activa: MMP-2 Pro-enzima (~72 kDa) forma activa (~59-63 kDa), MMP-13 Pro-enzima (~ 57-60 kDa), forma activa (~56-45 kDa) (48).

## 7. Análisis Estadístico

Las comparaciones de los niveles de citocinas entre los diferentes grupos considerados en este trabajo se llevaron a cabo mediante la prueba *t* de Student, U de Mann-Whitney: \* WT vs *Mif*<sup>-/-</sup>, y ANOVA No Paramétrica, utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95%. Se consideran significativas las comparaciones con valores de  $p < 0.05$ , utilizando GraphPad Prism 8 software.

## 8. Resultados

### 8.1 Análisis Comparativo de la Expresión de MMP-2

8.1.1 La presencia de MIF favorece la expresión de MMP-2 activa en gestación, y la ausencia de MIF favorece la expresión de MMP-2 activa y como Pro-MMP-2 en PE y PPG.

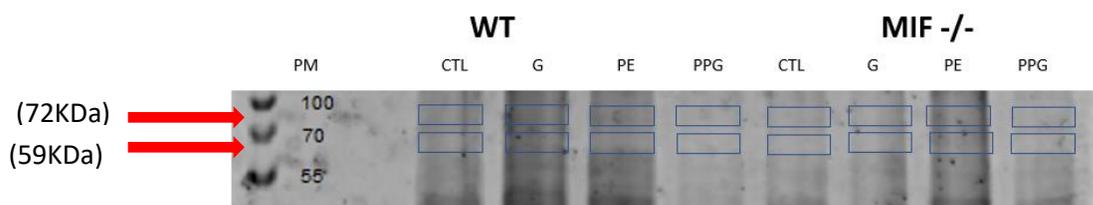
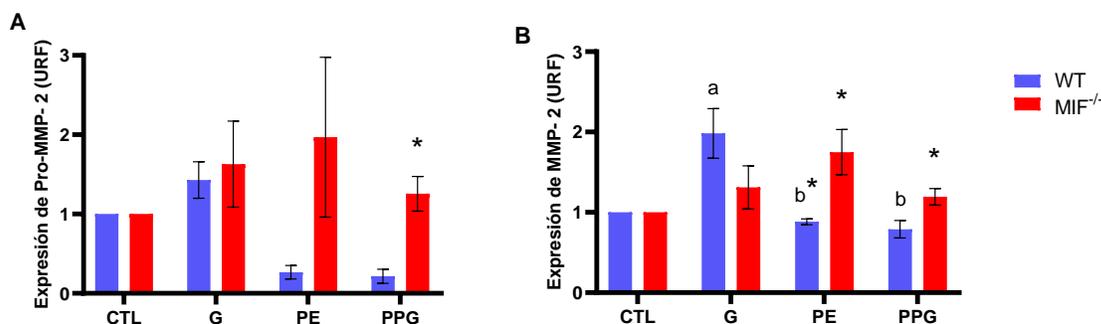


Figura 13. Zimograma en Gel de Poliacrilamida de la actividad gelatinasa de las MMP-2 Activa (59 KDa) y Pro-MMP-2 (72KDa).



**Gráfica A)** pro-MMP-2. Expresión de Pro-MMP-2. La ausencia de MIF favorece la expresión de Pro-MMP-2 en los grupos G, PE, y PPG respecto a sus contrapartes WT. **Gráfica B)** MMP-2 activa. MIF favorece la activación de MMP-2 en el grupo de gestación WT, mientras que la ausencia de MIF favorece la activación de MMP-2 en PE y PPG. a= vs CTL, b= vs G, c= vs PE. Los resultados se expresan en unidades de expresión relativas, contra muestra de referencia (\* $p \leq 0,05$ ).

En la gráfica A, se observa un aumento leve en la expresión de Pro-MMP-2 en el grupo G WT al compararlo con el grupo control; se observó una disminución en la expresión de Pro-MMP-2 en los grupos PE y PPG WT al compararlos contra el grupo control, aunque esto no fue significativo. Se observó un aumento en la expresión de Pro-MMP-2 en los grupos G y PE *Mif*<sup>-/-</sup> al compararlos contra el grupo control. Se obtuvo un leve aumento en la expresión de Pro-MMP-2 en el grupo PPG *Mif*<sup>-/-</sup> al compararlos contra el grupo control sin embargo no fue significativo (\* $p < 0,05$ ).

Al comparar WT vs *Mif*<sup>-/-</sup> no se observaron diferencias significativas entre los grupos CTL, G y PE, sin embargo, en el grupo PE se observa un aumento en la expresión de Pro-MMP-2 contra su contraparte WT, mientras que, al comparar el grupo PPG *Mif*<sup>-/-</sup> con su respectivo WT se observó un aumento significativo en la expresión de Pro-MMP-2 (\* $p = 0.0022$ ). La

ausencia de MIF amentó la expresión de Pro-MMP-2 en los grupos G, PE y PPG al compararlos con su contraparte WT.

Mientras que, en la gráfica B, se observa un aumento significativo en la expresión de MMP-2 activa en el grupo G WT al compararlo contra el grupo control, observamos una disminución en la expresión de MMP-2 la cual fue significativa en los grupos PE y PPG al compararlos con el grupo control.

Al comparar los grupos G, PE, PPG *Mif*<sup>-/-</sup> contra el grupo control se observó una tendencia al aumento de la expresión de MMP-2, sin embargo, esta no fue significativa.

La expresión de MMP-2 mostró un aumento en el grupo G WT en comparación con el grupo G *Mif*<sup>-/-</sup>. En contraste, en los grupos PE y PPG *Mif*<sup>-/-</sup> presentaron mayor expresión de MMP-2 que su contraparte WT para ambos casos y esta diferencia es significativa PPG WT vs *Mif*<sup>-/-</sup> (\*p=0.0303), PE WT vs *Mif*<sup>-/-</sup> (\*p= 0.0022). Por lo que la presencia de MIF en presencia de periodontitis podría inhibir la activación de la MMP-2, mientras que, en gestación, ésta se sobreexpresa.

## 8.2 Análisis Comparativo de la Expresión de MMP-13

### 8.2.1 La ausencia de MIF parece favorecer la expresión de MMP-13 activa y como Pro-MMP-13 en G, PE y PPG.

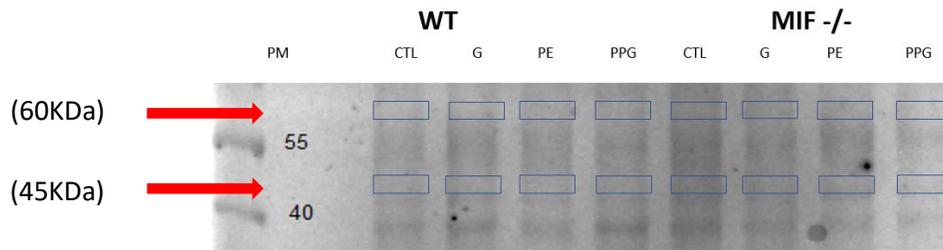
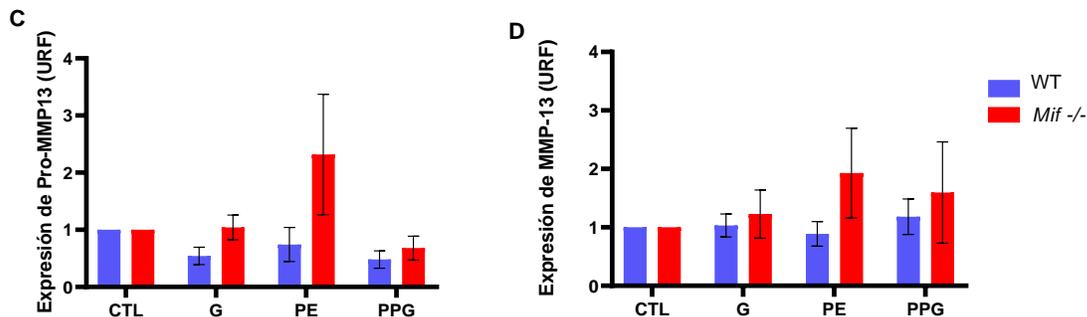


Figura 14. Zimograma en Gel de Poliacrilamida de la actividad colagenasa de la MMP-13 Activa (45 KDa) y pro-MMP-13 (60 KDa).



**Gráfica C)** Expresión de Pro-MMP-13 La ausencia de MIF parece favorecer la expresión de Pro-MMP-13 en los grupos G, PE y PPG respecto a su contraparte WT **Gráfica D)** Expresión de MMP-13 activa. La ausencia de MIF parece favorecer la expresión de MMP-13 en los grupos G, PE y PPG respecto a su contraparte WT. a= vs CTL, b= vs G, c= vs PE Los resultados se expresan en unidades de expresión relativas, contra muestra de referencia (\*p ≤ 0,05).

En la gráfica C, se observa una disminución de la expresión de Pro-MMP-13 en los grupos G, PE y PPG WT con respecto al grupo control. Al comparar la expresión de Pro-MMP-13 en grupos *Mif*<sup>-/-</sup> observamos que el grupo G *Mif*<sup>-/-</sup> no tuvo ninguna diferencia al compararlo contra el grupo control. Sin embargo, el grupo PE *Mif*<sup>-/-</sup> obtuvo un aumento en la expresión de Pro-MMP-13 al compararlo contra el grupo control, aunque no fue significativo. Por otro lado, se observó una disminución en la expresión de Pro-MMP-13 en el grupo PPG *Mif*<sup>-/-</sup> al compararlo contra el grupo control. Se identificó un aumento leve en la expresión de Pro-MMP-13 en el grupo PE *Mif*<sup>-/-</sup> al compararlo con su contraparte WT el cual no fue significativo. Al comparar la expresión de Pro-MMP-13 entre los grupos WT y *Mif*<sup>-/-</sup> se observó una tendencia al alza en los grupos G y PE *Mif*<sup>-/-</sup> sobre los WT.

Mientras que, en la gráfica D, se observa una disminución en la expresión de MMP-13 en el grupo PE WT al compararlo con el grupo control, mientras que no se observó ninguna diferencia al comparar el grupo G WT contra el grupo control, Se obtuvo un leve incremento en la expresión de MMP-13 en el grupo PPG WT al compararlo contra el grupo control. Observamos un aumento en la expresión de MMP-13 en los grupos G, PE y PPG *Mif*<sup>-/-</sup> al compararlos contra el grupo control. Sin embargo, al comparar los grupos G, PE y PPG tanto WT como *Mif*<sup>-/-</sup> no se observaron diferencias significativas.

## 9. DISCUSIÓN

La periodontitis es una infección bacteriana que genera una inflamación crónica de los tejidos, caracterizada por sangrado gingival, formación de bolsas periodontales, destrucción del tejido conectivo y reabsorción ósea alveolar. Los antígenos bacterianos, como LPS y/o endotoxinas, a través de la habilidad que poseen de ingresar en los tejidos periodontales, activar a los sistemas de defensa del huésped, e inducir cambios patológicos con relación a una respuesta inflamatoria crónica. Los tejidos periodontales inflamados producen cantidades significativas de citocinas proinflamatorias, principalmente IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> y TNF- $\alpha$ , los cuales, promueven la liberación de enzimas tisulares causando la destrucción de la matriz extracelular y del hueso alveolar.

No obstante, se ha mostrado que los patógenos periodontales son necesarios, pero no suficientes para que se produzca la periodontitis. La progresión de la periodontitis está relacionada con factores de riesgo basados en el huésped. La periodontitis es, en realidad, consecuencia de la interacción de factores genéticos, ambientales, microbianos y factores propios del huésped. Entre estos factores se encuentran las variaciones hormonales que experimentan las mujeres en situaciones fisiológicas, como ocurre durante el embarazo. Dichas variaciones hormonales producen cambios significativos en el periodonto, principalmente en presencia de inflamación gingival inducida por placa bacteriana preexistente.

Los mecanismos a través de los cuales las hormonas sexuales femeninas afectan el periodonto, especialmente durante el embarazo, es variada. El periodonto contiene receptores para estrógeno y progesterona y, por lo tanto, un incremento plasmático de estas hormonas resulta en un aumento y acumulación de ellas en los tejidos gingivales.

Los efectos del estrógeno y de la progesterona en la vascularización gingival podrían potencialmente explicar el aumento en el edema, eritema, y exudado de FCG.

Varios estudios clínicos han correlacionado altos niveles de FCG con la presencia de hormonas sexuales, lo que indica que estas hormonas afectan la permeabilidad vascular en el surco gingival.

De acuerdo con Hugoson (4) la cantidad de FCG en mujeres embarazadas se eleva en un 54% al compararlo con el nivel de FGC en mujeres posterior al parto. Por otra parte, Meikle y cols. (49) reportaron que la sobre expresión de MMP-2 en FCG de sujetos con periodontitis establecida es mayor que en sujetos sanos. Lo cual, tiene similitud con nuestros resultados, ya que observamos una sobreexpresión relativa de la MMP-2 activa (59 KDa) en el grupo con PE *Mif*<sup>-/-</sup> a diferencia con el grupo control.

Estudios previos de Barreriros (50), sugirieron que MMP-2 favorece la progresión de la lesión, y contribuye a la destrucción ósea en la periodontitis, promueve la reparación de heridas y la remodelación de tejidos, en condiciones fisiológicas, MMP-2 se expresa en las células del ligamento periodontal y actúa en respuesta a infecciones, remodelación de tejidos y lesiones (50). En nuestro estudio observamos que la expresión de MMP-2 era menor en los ratones WT que en los deficientes de MIF, con lo cual podemos sugerir que la presencia de MIF inhibe la expresión de MMP-2, en particular, se obtuvieron diferencias

significativas en la expresión de MMP-2 en el grupo G WT al compararlo con su contraparte *Mif*<sup>-/-</sup>.

El estudio realizado por Nguyen (51), reveló que la actividad de Pro-MMP-2 fue alta y estable a lo largo de la gestación lo cual coincide con nuestros resultados donde la actividad de Pro-MMP-2 incrementó considerablemente en los grupos G WT y *Mif*<sup>-/-</sup> al compararlos con los controles de ambos casos.

Los hallazgos de Hirschfeld (52) respaldaron un papel proinflamatorio de MIF en la inflamación periodontal. Sin embargo, no encontraron una relación directa entre MIF y MMP-2, que se cree que tiene un papel destructivo en la periodontitis. En nuestro estudio encontramos que la ausencia de MIF podría favorecer la expresión de MMP-2 en su forma activa (59KDa) y como Pro-enzima (72 KDa) ya que únicamente el grupo que presentó una sobreexpresión de MMP-2 en presencia de MIF fue el grupo G WT.

Por otro lado, en nuestro estudio la expresión de MMP-13 se incrementó considerablemente en el grupo con PE *Mif*<sup>-/-</sup> a diferencia del grupo control y G *Mif*<sup>-/-</sup>, lo cual coincide con el estudio de Nagasupriya, 2014 (53) donde al evaluar la expresión de MMP-13 por inmunohistoquímica en un grupo de sujetos diagnosticados con periodontitis y otro grupo con sujetos control, reportó el incremento en la expresión de MMP-13 en el grupo con periodontitis a diferencia del grupo control.

Finalmente, el estudio de Hernandez, Valenzuela (26), reportó que en periodontitis crónica la MMP-13 se expresa en FCG, lo cual coincide con nuestro resultado que, si bien no se evaluó el FCG si no el maxilar completo, es posible observar un aumento en la expresión relativa de MMP-13 en el zimograma en su forma activa (45KDa) y en la forma latente de MMP-13 (60KDa).

## **10. CONCLUSIÓN**

En el presente trabajo logramos destacar la asociación positiva que existe entre la gestación y la sobreexpresión de MMPs, así como también sugerimos que las hormonas femeninas favorecen la respuesta alterada de los tejidos periodontales por lo que se considera que la disbiosis oral contribuye al desarrollo de un embarazo anormal y a la relación de infección periodontal con el aumento y/o presencia de citocinas proinflamatorias (21).

Nuestros resultados y observaciones nos permitieron sugerir que la presencia de MIF podría inhibir la activación de la MMP-2 y MMP-13 ya que los grupos experimentales deficientes de MIF presentaron una expresión más elevada de las MMPs 2 y 13.

Finalmente, el presente estudio demostró la utilidad de la expresión de MMP-2 y MMP-13 como indicadores predictivos de la enfermedad periodontal pregestacional, y se destacó la influencia de la citocina proinflamatoria MIF en la expresión de estas.

## **11. PERSPECTIVAS**

Como perspectivas del estudio se sugiere evaluar el comportamiento de las MMPs a través de estudios como Western Blot, así como cuantificar las concentraciones de MIF localmente, a través de rt-PCR, y evaluar las concentraciones MMPs de FCG como un marcador de identificación de enfermedad periodontal.

Así como evaluar el efecto inflamatorio en el hueso alveolar a través de la expresión de RANKL.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol.* 1999;70(4):457-70.
2. Figuero-Ruiz E, Prieto Prieto I, Bascones-Martínez A. Cambios hormonales asociados al embarazo: Afectación gingivo-periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral.* 2006;18(2):101-13.
3. Enwonwu CO, Salako N. The periodontal disease-systemic health-infectious disease axis in developing countries. *Periodontol 2000.* 2012;60(1):64-77.
4. Hugoson A. Gingivitis in pregnant women. A longitudinal clinical study. *Odontol Revy.* 1971;22(1):65-84.
5. Lindhe J, Lang NP, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz M. *Clinical periodontology and implant dentistry.* Sixth edition. ed. Chichester, West Sussex ; Ames, Iowa: John Wiley and Sons, Inc.; 2015. p. p.
6. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:503754.
7. Otabe K, Muneta T, Kawashima N, Suda H, Tsuji K, Sekiya I. Comparison of Gingiva, Dental Pulp, and Periodontal Ligament Cells From the Standpoint of Mesenchymal Stem Cell Properties. *Cell Med.* 2012;4(1):13-21.
8. Papapanou PN. Periodontal diseases: basic concepts, association with systemic health, and contemporary studies of pathobiology. *Ann R Australas Coll Dent Surg.* 2012;21:33-42.
9. Ainamo J, Loe H. Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. *J Periodontol.* 1966;37(1):5-13.
10. Niemiec BA. Periodontal disease. *Top Companion Anim Med.* 2008;23(2):72-80.
11. Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):53-64.
12. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000.* 1997;13:91-120.
13. Barczyk M, Bolstad AI, Gullberg D. Role of integrins in the periodontal ligament: organizers and facilitators. *Periodontol 2000.* 2013;63(1):29-47.
14. Baek KJ, Choi Y, Ji S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol.* 2013;58(10):1282-92.
15. Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):85-96.
16. Ghani QP, Armitage GC, Hussain MZ. Biochemical alterations in inflammatory periodontal diseases I. Poly (ADP-ribose) synthetase activity in gingiva and gingival fibroblasts from humans with periodontitis. *J Periodontal Res.* 1996;31(7):445-52.
17. Nugala B, Kumar BS, Sahitya S, Krishna PM. Biologic width and its importance in periodontal and restorative dentistry. *J Conserv Dent.* 2012;15(1):12-7.
18. Del Fabbro M, Francetti L, Bulfamante G, Cribiu M, Misericchi G, Weinstein RL. Fluid dynamics of gingival tissues in transition from physiological condition to inflammation. *J Periodontol.* 2001;72(1):65-73.
19. Packeisen J, Buerger H, Krech R, Boecker W. Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. *J Clin Pathol.* 2002;55(8):613-5.
20. Shi J, Li J, Su W, Zhao S, Li H, Lei L. Loss of periodontal ligament fibroblasts by RIPK3-MLKL-mediated necroptosis in the progress of chronic periodontitis. *Sci Rep.* 2019;9(1):2902.
21. El-Awady AR, Messer RL, Gamal AY, Sharawy MM, Wenger KH, Lapp CA. Periodontal ligament fibroblasts sustain destructive immune modulators of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010;81(9):1324-35.

22. Sadat-Ali M, AlMasoud NA, Hegazi TM, Acharya S, Alsulaiman AA, Ahmed A, et al. Treatment of bisphosphonate induced osteonecrosis of jaw in rats using an angiogenesis factor (A-Heal) and ABMDO (Autologous Bone Marrow Derived Osteoblasts). *Saudi Dent J.* 2022;34(2):100-6.
23. Akin M, Baka ZM, Ileri Z, Basciftci FA. Alveolar bone changes after asymmetric rapid maxillary expansion. *Angle Orthod.* 2015;85(5):799-805.
24. Hathaway-Schrader JD, Novince CM. Maintaining homeostatic control of periodontal bone tissue. *Periodontol 2000.* 2021;86(1):157-87.
25. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1569-76.
26. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *Journal of periodontology.* 2006;77(11):1863-70.
27. Agueda A, Ramon JM, Manau C, Guerrero A, Echeverria JJ. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol.* 2008;35(1):16-22.
28. Liu YCG, Lerner UH, Teng YTA. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000.* 2010;52(1):163-206.
29. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17038.
30. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.
31. La Rocca C, Carbone F, Longobardi S, Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol Lett.* 2014;162(1 Pt A):41-8.
32. Bobetsis YA, Graziani F, Gursoy M, Madianos PN. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes. *Periodontol 2000.* 2020;83(1):154-74.
33. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol.* 2006;77(11):1863-70.
34. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991;26(3 Pt 2):230-42.
35. Xu S, Guo X, Gao X, Xue H, Zhang J, Guo X, et al. Macrophage migration inhibitory factor enhances autophagy by regulating ROCK1 activity and contributes to the escape of dendritic cell surveillance in glioblastoma. *Int J Oncol.* 2016;49(5):2105-15.
36. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):329-55.
37. Luchian I, Goriuc A, Sandu D, Covasa M. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3).
38. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral Dis.* 2014;20(6):538-50.
39. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilahti J, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):142-63.
40. Harris J, VanPatten S, Deen NS, Al-Abed Y, Morand EF. Rediscovering MIF: New Tricks for an Old Cytokine. *Trends Immunol.* 2019;40(5):447-62.
41. Du R, Li J, Wu YT. [Expression of SFRP1 and MIF in elderly patients with severe periodontitis and its correlation with cognitive function]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2020;29(1):97-101.

42. Labelle RE, Schaffer EM. The effects of cortisone and induced local factors on the periodontium of the albino rat. *Journal of periodontology*. 1966;37(6):483-90.
43. Bjornsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *J Periodontal Res*. 2003;38(6):543-50.
44. Benzen B, Grauballe MCB, Björnsson M, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, Holmstrup P. A comparison of two models of experimental periodontitis in rats. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*. 2005;32(2):73-80.
45. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013;394(1-2):49-54.
46. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 1999;26(6):335-40.
47. Hawk T, Leary SL, Morris TH. *Formulary for laboratory animals*. Blackwell Publishing. 2005.
48. Inanc S, Keles D, Oktay G. SDS-PAGE. *BioTechniques*. 2017;63(4):174-80.
49. Meikle MC, Hembry RM, Holley J, Horton C, McFarlane CG, Reynolds JJ. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) in human gingival tissues from periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 1994;29(2):118-26.
50. Barreiros D, Nelson PF, Paula-Silva FWG, Oliveira KMH, Lucisano MP, Rossi A, et al. MMP2 and MMP9 are Associated with Apical Periodontitis Progression and Might be Modulated by TLR2 and MyD88. *Braz Dent J*. 2018;29(1):43-7.
51. Nguyen TT, Shynlova O, Lye SJ. Matrix Metalloproteinase Expression in the Rat Myometrium During Pregnancy, Term Labor, and Postpartum. *Biol Reprod*. 2016;95(1):24.
52. Hirschfeld J, Howait M, Movila A, Parcina M, Bekerredjian-Ding I, Deschner J, et al. Assessment of the involvement of the macrophage migration inhibitory factor-gluocorticoid regulatory dyad in the expression of matrix metalloproteinase-2 during periodontitis. *Eur J Oral Sci*. 2017;125(5):345-54.
53. Nagasupriya A, Rao DB, Ravikanth M, Kumar NG, Ramachandran CR, Saraswathi TR. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase 13 in chronic periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2014;34(4):e79-84.