



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS EN
PERIODONTITIS EXPERIMENTAL, PREVIO Y DURANTE LA GESTACIÓN EN UN
MODELO MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BETSAIDA JULIETA ORTIZ SANCHEZ

TUTORA PRINCIPAL: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
DIVISION DE INVESTIGACION Y POSGRADO. FES IZTACALA. UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. CYNTHIA GEORGINA TREJO IRIARTE
CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA. FES IZTACALA. UNAM
DR. JORGE MORALES MONTOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS. UNAM

MÉXICO, CD. MX. FEBRERO, 2017



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.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de octubre de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ORTIZ SÁNCHEZ BETSAIDA JULIETA** con número de cuenta 93535087, con la tesis titulada "**Estudio comparativo de las características histopatológicas en periodontitis experimental, previo y durante la gestación en un modelo murino**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA**:

Presidente: DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY
Vocal: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Secretario: DRA. CYNTHIA GEORGINA TREJO IRIARTE
Suplente: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
Suplente: DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de enero de 2017.

M. del Coro Arizendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

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

Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Asuntos del Personal Académico en su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**), **proyecto IN212215**.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), **proyecto 152224**.

Beca **CONACyT No. 385836**.

Apoyo PAEP para asistencia a Congreso

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

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Dr. Jorge Morales Montor

Agradecimientos a título Personal

Agradezco a la Mtra. Imelda Juárez Avelar por su apoyo y asesoría en el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco a la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro por su apoyo y asesoría para el análisis de Inmunofluorescencia.

Armando, Esther, Armando, Isaac, Sacky, Isa y Bere, mi amada familia, son mi guía, mi soporte e inspiración, mi amor incondicional.

Dra. Miriam, gracias por su apoyo, paciencia, orientación y visión para lograr este objetivo, por guiarme y alentarme cuando las cosas se complicaban, gracias.

Mtra. Imelda, por todo tu apoyo y amistad, por enseñarme desde soportar los ratones, hasta todas esas horas interminables en el micrótopo, gracias.

Dra. Norma por su apoyo y ayuda, por ayudarme a realizar el análisis con el microscopio confocal, por ayudarme y enseñarme, gracias.

Alejandro, Salvador, Enrique gracias mil... sin ustedes no lo habría logrado, gracias por su dedicación, los tres son invaluable, gracias.

A mis amigos, compañeros de vida... Dra. Vero, gracias mil por apoyar mis locuras y ser parte importante de los logros eres parte de mi "red de seguridad" y ser mi mano derecha en tantas áreas de mi vida, SNR, gracias por ser y estar.

Rosario, Jorge, Betty, Cynthia, Fernando, Lupita por ser de las personas que colaboran, somos parte de un gran equipo, es genial estar con ustedes, han pasado de ser compañeros a ser amigos, los quiero.

Alicia, Víctor, Tonathiu, Thalía, Dunia, Sandra, Dánae, gracias compañeros y amigos, por compartir, por viajar, por vivir esta aventura que se llama ciencia.

Dedicatoria

A mi familia que siempre me ha brindado su amor y apoyo.

Armando, Esther, Armando, Isaac y Sacky los amo inmensamente.

“... Si fragmentamos un organismo vivo, aislando sus distintas partes, es sólo para facilitar el análisis y en ningún modo para pensar que son cosas separadas. De hecho, cuando queremos dar a una cualidad fisiológica su valor y su verdadero significado debemos referirnos siempre a este conjunto y deducir las conclusiones finales únicamente en relación con sus efectos en el todo.”

Claude Bernard (1865).

INDICE

Índice de figuras	XI
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Periodonto	4
1.2 Encía	5
1.2.1 Características Clínicas de la Encía	7
1.2.2 Fibras Gingivales	7
1.3 Epitelio de Unión	8
1.4 Cemento Dentario	9
1.4.1 Características Histológicas y Morfológicas	10
1.5 Hueso Alveolar	11
1.5.1 Constituyentes del Alvéolo	12
1.5.2 Clasificación	13
1.5.3 Células y Matriz Intercelular.	13
1.6. Ligamento Periodontal	15
1.6.1 Células epiteliales	17
1.6.2 Células Mesenquimatosas Indiferenciadas	17
1.6.3 Células de Hueso y Cemento	17
1.7. Periodontitis	18
1.7 Hormonas presentes en la gestación	20
1.8 Metaloproteinasas	24
1.9 Modelos animales	25

1.10 Análisis histométrico	25
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo General	30
4.2 Objetivos Particulares	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Consideraciones Éticas	31
5.2 Animales	31
5.3 Inducción de Periodontitis	32
5.4 Obtención de Suero	34
5.5 Método ELISA	35
5.6 Sacrificio y Obtención de Maxilares	36
5.7 Análisis Histopatológico	36
5.8 Análisis Estadístico	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Signos Clínicos entre los Grupos Experimentales	39
6.2 Determinación de la Progresión de la Periodontitis	39
6.3 Determinación de Fibras de Colágeno	43
6.4 Determinación de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-13, por inmunofluorescencia	46
6.5 Niveles de citocinas Inflamatorias y Anti-inflamatorias en Suero	50
7. CONCLUSIÓN	54
8. ANEXO 1	55

8.1 Análisis Histopatológico	55
8.2 Tren de Deshidratación e Inclusión el día 18	55
8.3 Cortes Histológicos	56
8.4 Tinción H&E	56
8.5 Tinción Tricrómica de Masson	57
8.6 Técnica de Inmunofluorescencia	58
8.7 Citocinas	59
9. Bibliografía	60

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Vista clínica y diagrama de los principales elementos del periodonto.	4
Fig. 2. Mucosa oral	5
Fig. 3. Dibujo esquemático de un corte histológico	6
Fig. 4. Se pueden diferenciar dos partes de la encía	7
Fig. 5. Fibras gingivales	8
Fig. 6. Epitelio de unión	9
Fig. 7. Corte de un diente humano	10
Fig. 8. Corte histológico de periodonto	11
Fig. 9 Cresta ósea normal	11
Fig. 10. Componentes organizacionales óseos	12
Fig. 11. Cuerpo mandibular	13
Fig. 12. Organización de las fibras de colágeno en hueso laminado	14
Fig. 13. Componentes del periodonto	15
Fig. 14. El ligamento periodontal es un tejido conectivo altamente celular y vascularizado	16
Fig. 15. Microfibrillas, fibrillas, fibras y haces de colágeno	17
Fig. 16. Patrón molecular relacionado con la microbiota (MAMP) de microorganismos en la biopelícula dental activa las respuestas inflamatorias de los tejidos periodontales.	20
Fig. 17. Diagrama de Flujo de grupos experimentales	31
Fig. 18. Inducción de periodontitis experimental	32
Fig. 19. Inducción de periodontitis experimental	33
Fig. 20. Fotografías de ligaduras Nylon 6-0 colocadas en el segundo molar superior	33
Fig. 21. Metodología	34
Fig. 22. Obtención de suero	35
Fig. 23. ELISA	36

Fig. 24. Análisis histométrico de un corte histológico (10x) representativo de periodontitis experimental	37
Fig. 25. Características clínicas de tejidos periodontales, representativo de periodontitis experimental	39
Fig. 26. Comparación del nivel de inserción	42
Fig. 27. Comparación del nivel de inserción	43
Fig. 28. Características del colágeno.	45
Fig. 29. Expresión de MMP-2	47
Fig. 30. Expresión de MMP-2	48
Fig. 31. Expresión de MMP-13	49
Fig. 32. Expresión de MMP-13	50
Fig. 33. Concentración de IL-6 en suero	51
Fig. 34. Concentración de IL-10 en suero	51
Fig. 35. Concentración de TNF- α en suero	52
Fig. 36. Concentración de INF- γ en suero	53

ABREVIATURAS

μl	Microlitro
Aa	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
AECF	Cemento acelular extrínseco
AG	Encía adherida
ANEST	Anestesia
AO	Anticonceptivos orales
AP	Hueso alveolar
BI	<i>Bacteroides forsythus</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
C/L	Con ligadura
CF	Fibras circulares
CTL	Control
DGF	Fibras dentogingivales
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPF	Fibras dentoperiósticas
E2	Estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunológico ligado a enzimas
EMC	Matriz extracelular
FG	Encía libre
Fig.	Figura
G	Gestante
GI	Gingiva
GLT	Fibra granular de Tomes

H&E	Hematoxilina y eosina
HGC	Hormona gonadotrofina coriónica humana
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
LPD	Ligamento periodontal
mL	mililitro
MMP	Metaloproteinasa
N/G	No gestante
ng	Nanogramo
NK	Células asesinas naturales (“natural killer”)
MHCI	Complejo mayor de histocompatibilidad I
HLA-G	Antígenos leucocitarios Humanos G
HLA-E	Antígenos leucocitarios Humanos E
nm	Nanómetro
PAMP	Patrón molecular de patógeno
PBS	Solución reguladora de fosfatos
PE	Periodontitis experimental
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PgE ₂	Prostaglandina E ₂
Pi	<i>Prevotella intermedia</i>
PIBF	Factor de inhibición inducido progesterona
PL	Ligamento periodontal
PMNs	Polimorfonucleares
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones

PTH	Hormona paratiroidea
RC	Cemento radicular
rpm	Revoluciones por minuto
S/L	Sin ligadura
Tc	Linfocito T citotóxico
TF	Fibras trans-septales
Th	Linfocito T helper
TNF	Factor de necrosis tumoral
UCE	Unión cemento-esmalte
MAMP	Patrones moleculares relacionados con la microbiota
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear (NF) kappa B
KC	Queratinocitos
Mac	Macrófagos
GF	Fibroblasto gingival
PDL	Fibroblastos del ligamento periodontal
OB	Osteoblastos
OC	Osteoclastos
EC	Célula endotelial
Mon	Monocitos
LPS	Lipopolisacáridos

RESUMEN

La periodontitis (PE) es una enfermedad crónica inflamatoria causada por bacterias (biofilm oral) que afecta a los tejidos de soporte del diente (periodonto), produciendo sangrado y pérdida ósea gradual. Esta afecta cerca del 23% de las mujeres en edad reproductiva y se incrementa hasta el 56% en mujeres embarazadas. El embarazo modifica aspectos clínicos, citológicos y microbiológicos, debido a hormonas sexuales capaces de alterar las respuestas tisulares al biofilm oral. La relación entre las citocinas expresadas en mujeres embarazadas y el desarrollo de la periodontitis no se ha establecido de manera puntual. Niveles elevados de citocinas Th2 como IL-6 e IL-10 encontrados en mujeres embarazadas, podrían favorecer el progreso de la enfermedad. En este estudio, usando ratones hembra BALB/c de 8 semanas, estudiamos 5 grupos experimentales, con el fin de establecer la relación embarazo-periodontitis; 1) Control (CTL), 2) Control anestesia, 3) Gestante sin PE (Gest –Lig), 4) PE en ratones No gestantes (No Gest –Lig) y 5) Gestante con PE Gest +Lig). Registramos los cambios clínicos e histológicos en todos los grupos y medimos los niveles séricos de citocinas Th1 y Th2. Asociamos el desarrollo de periodontitis y su severidad con el perfil de expresión de citocinas. Se observaron alteraciones histológicas severas en la integridad del epitelio de unión en ratones hembras gestantes con PE en comparación con ratones hembras no gestantes con PE. Los grupos con periodontitis experimental (gestantes y no gestantes) presentaron niveles elevados de IL-6 e IFN- γ , comparado con los grupos control y gestantes sin periodontitis. No se observaron diferencias en la expresión de IL-10 y TNF- α entre los grupos. Así como la expresión de MMP-2 y MMP-13 aumenta en la presencia de periodontitis pero disminuye durante la gestación. En conclusión, el perfil de citocinas desarrollado debido a las condiciones del embarazo favorece la severidad de la periodontitis experimental en un modelo murino.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by bacteria (oral biofilm) that affects dental support tissues (periodontium), producing bleeding and gradual bone loss. This affects over 23% women in reproductive age, and increases up to 56% in pregnant women. Pregnancy modifies clinical, cytological and microbiological aspects due to sexual hormones which are able to alter tissue responses to oral biofilm. The relationship of cytokine expression in pregnant women and periodontitis development has not been established punctually. Elevated levels of Th2 cytokines as IL-6 and IL-10 found in pregnant women could favor disease progression. In this study, using 8 weeks old BALB/c female mice, we studied 5 experimental groups to establish the pregnancy-periodontitis relationship; 1) Control (CTL), 2) Control Anesthesia (Ct Anest) 3) pregnant non-EP (Pregnant -Lig), 4) Non Pregnant with PE (No Pregnant +Lig), 5) Pregnant with PE (Pregnante +Lig). We register clinical and histological changes in all groups and measured serum levels of Th1 and Th2 cytokines. We associated periodontitis development and severity with cytokine profile expression. Severe histological alterations in junction epithelium integrity in EP-pregnant mice were observed compared with EP non-pregnant mice. The EP groups (pregnant or not) had higher levels of IL-6 and IFN- γ compared to controls (pregnant or not without EP). Non differences in IL-10 and TNF- α , expression were observed between groups. We also found overexpression of MMP-2 and MMP-13 in periodontitis, but it's down regulated during pregnancy. In conclusion, the cytokine profile developed due pregnancy condition favors the severity of experimental periodontitis in a murine model.

1. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una de las infecciones más comunes en el mundo(1). 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 gestantes(2). La enfermedad periodontal es provocada por bacterias, su curso y progresión son modificados por una serie de factores como enfermedades o condiciones sistémicas (3, 4). La gestación, así como los tratamientos con anticonceptivos propician condiciones sistémicas que influyen en aspectos clínicos, citológicos y microbiológicos en las mujeres. Si bien, las hormonas sexuales femeninas no son suficientes para producir cambios gingivales por sí mismas, si son capaces de alterar las respuestas de los tejidos periodontales a la placa microbiana; ya que se han observado cambios en los microorganismos presentes en los grupos de mujeres gestantes y usuarias de anticonceptivos orales (AO's) comparadas con grupos de mujeres no gestantes (5). Por lo que indirectamente la carga hormonal contribuye a la enfermedad periodontal (6). En esta condición de "compromiso sistémico" los tejidos gingivales presentan una respuesta exagerada a los irritantes. Los rangos de inflamación fluctúan de edema ligero y enrojecimiento, a inflamación severa con sangrado e hiperplasia gingival. Por otro lado, la carga hormonal de mujeres usuarias de AO's, difiere de la condición hormonal de la gestación, y favorece en mayor cantidad el exudado en los tejidos gingivales inflamados (7).

El perfil de citocinas en la respuesta inmune se ha organizado en dos grandes grupos: Th1 que se caracteriza por expresar interleucina 1α (IL- 1α), IL- 1β , IL-8, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferón γ (IFN- γ), mientras que el perfil Th2 por IL-4, IL-6 e IL-10. En la enfermedad periodontal la síntesis de citocinas y mediadores inflamatorios es un proceso altamente controlado, desde las descripciones clásicas de Page y Schroeder(8) y la caracterización del infiltrado inflamatorio por Lindhe (9), la naturaleza y la asociación con diferentes tipos de respuesta inflamatoria o la progresión de la enfermedad a partir de la resorción ósea, se han debatido. El perfil de citocinas en la enfermedad periodontal varia, e incluye ambos tipos Th1 y Th2, la expresión de las citocinas del perfil Th1 se han detectado en macrófagos de tejidos gingivales inflamados(10). Mientras que el perfil Th2, también se han encontrado en tejidos con enfermedad periodontal(11), asimismo se ha relacionado con una alteración en la señalización de IL-10. La relación de la expresión de citocinas en la enfermedad periodontal es compleja y cambia a partir de las variaciones sistémicas y locales, además las citocinas pueden tener efectos redundantes, dichas interacciones no se han establecido de manera puntual.

1.1 Periodonto

El periodonto, se define como los tejidos de soporte de los dientes, comprende el cemento radicular, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y la encía, principalmente la unión dentogingival (12). Los elementos del periodonto son estructuras altamente especializadas y la función del periodonto sucede gracias a la interacción e integridad de sus componentes (Fig. 1).

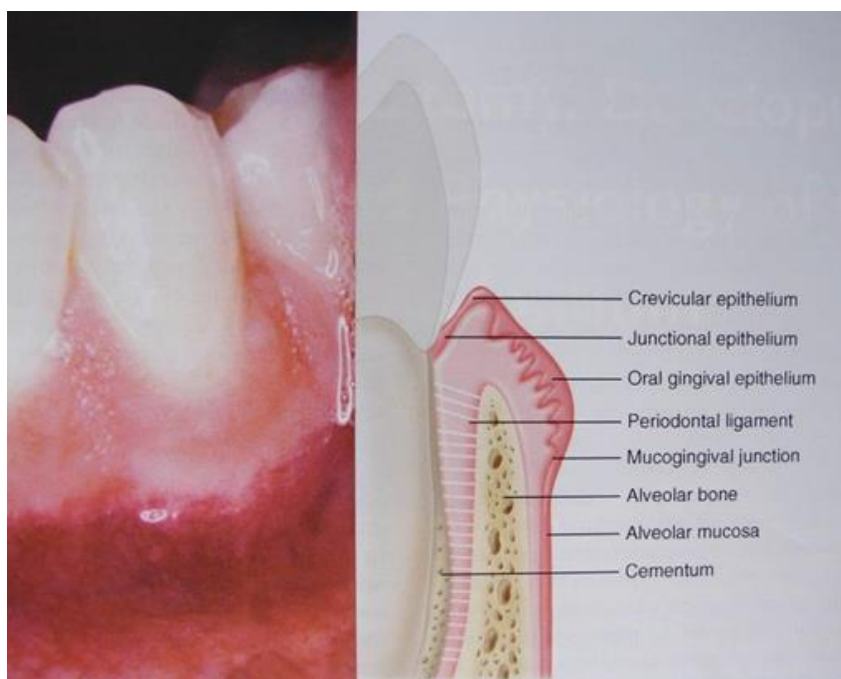


Fig. 1. Vista y diagrama de los principales elementos del periodonto. A la derecha de la fotografía se presenta un diagrama de cómo se vería el corte bucal-lingual de la vista clínica. La escala se encuentra exagerada para ilustrar las regiones más delgadas del periodonto (Tomado de Referencia 7. Rose L, 2000).

El germen dentario se origina del ectodermo del primer arco faríngeo y del ectomesenquima de las crestas neurales. Las células ectomesenquimáticas, migran para formar la lámina dental primaria, que se divide en lámina vestibular y lámina dental, de ésta última, se forma al germen dentario, el cual tiene tres componentes: órgano del esmalte, papila dental y folículo dental, la primera forma al esmalte, formación radicular y adherencia epitelial primaria; la papila dental, forma dentina y pulpa, y el folículo dental forma cemento, ligamento periodontal y el hueso alveolar(13).

1.2 Encía

La mucosa bucal se conforma de tres zonas:

1. La encía y el revestimiento del paladar duro, *mucosa masticatoria*.
2. El dorso de la lengua, cubierto de mucosa especializada
3. La membrana mucosa que recubre el resto de la cavidad bucal.

La encía es la parte de la mucosa bucal que cubre los rebordes alveolares y rodea el cuello de los dientes, en dirección oclusal termina en el margen gingival o cuello clínico del diente, en dirección apical se continúa con la mucosa vestibular delimitada por la línea mucogingival (12).

La encía está formada histológicamente por tejido epitelial y tejido conectivo (Fig. 2).

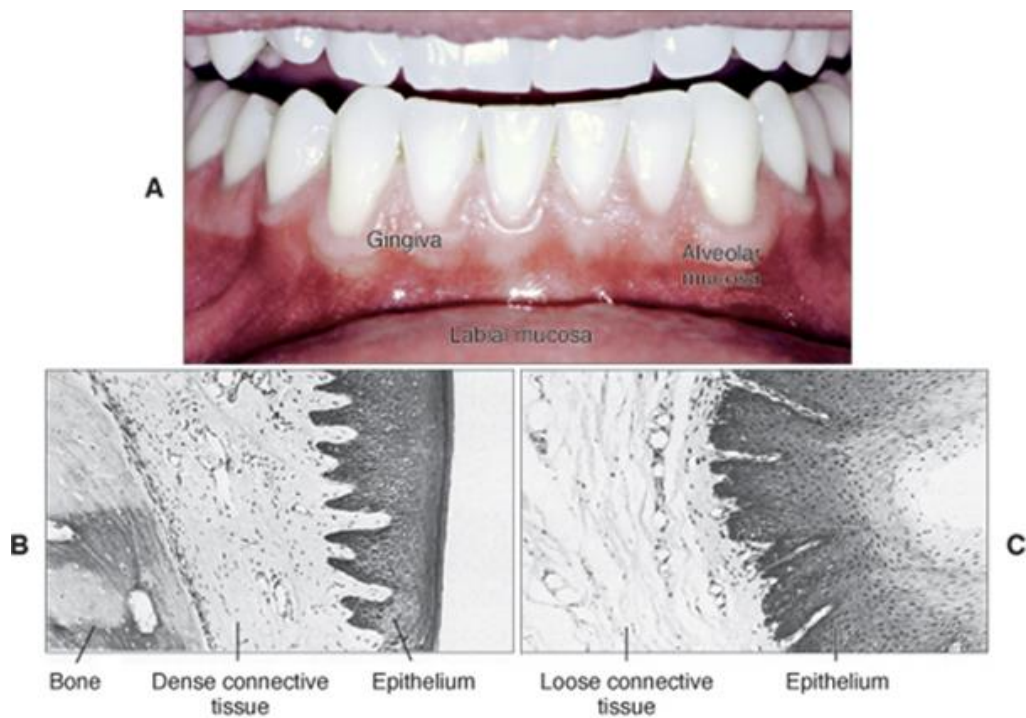


Fig. 2. Mucosa Oral. A. Diferencias entre la mucosa alveolar y la encía bucal B y C. En cortes histológicos el epitelio gingival se observa firmemente unido al hueso por tejido conectivo denso, mientras que el epitelio del surco esta soportado por tejido conectivo laxo. (Tomado de referencia 17. Ten Cate, 2008).

Encía libre o marginal. Es el margen terminal o borde de la encía que rodea los dientes a manera de collar. Aproximadamente en el 50% de los casos, está delimitada de la encía insertada por el surco marginal. La encía marginal suele tener 1 mm de ancho y forma la pared de tejido blando del surco gingival.

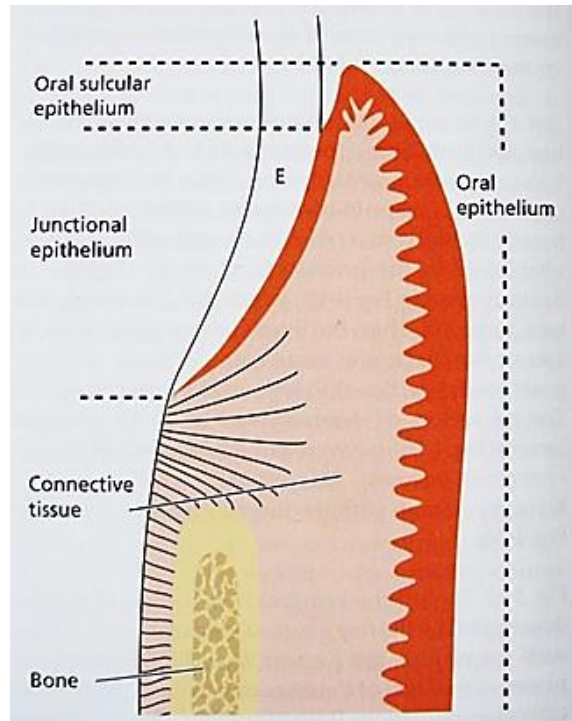


Fig. 3. Dibujo esquemático de un corte histológico describiendo la composición de la gingiva y el área de contacto entre la gingiva y el esmalte (E) Epitelio de Unión. (Tomado de referencia 9. Lindhe, 2008).

Surco gingival. Es el espacio o surco alrededor del diente que está conformado por la superficie dental y el revestimiento epitelial del margen libre de la encía. Tiene forma de “V” y permite apenas la entrada de una sonda periodontal, la medición de éste surco clínicamente normal es de 2–3 mm. En este espacio normalmente se encuentra el fluido gingival, que tiene características parecidas al plasma sanguíneo, este se filtra desde los tejidos conjuntivos de la encía, hacia este espacio contando también con la presencia de neutrófilos, linfocitos, monocitos y células descamadas de los epitelios que se encuentran a su alrededor, dándole características de defensas contra el ataque de los microorganismos presentes en la cavidad bucal (Fig. 3).

Encía Adherida o Insertada. Se encuentra a continuación de la marginal y está firmemente unida a la superficie del periostio del hueso alveolar. La superficie vestibular de la encía insertada se extiende hasta la mucosa alveolar, delimitada por la unión mucogingival.

1.2.1 Características Clínicas de la Encía

La encía marginal tiene en condiciones normales un color rosado, es lisa y brillante, posee una consistencia blanda pero firme.

La encía insertada posee características diferentes a la libre como son el color rosa pálido, debido a la presencia de mayor cantidad de fibras que la fijan o insertan al periostio del hueso alveolar y a la menor irrigación de la zona, lo que a la vista la hace parecer a la superficie como cáscara de naranja (Fig. 4).

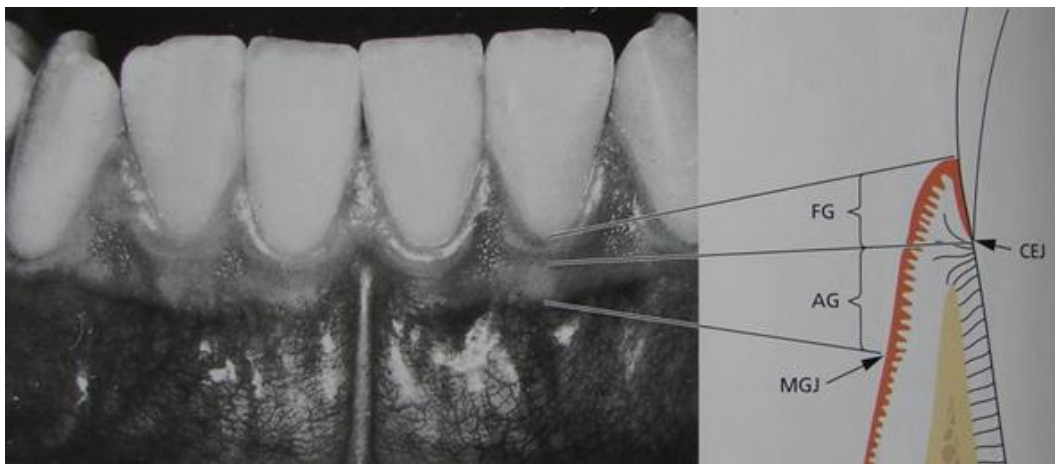


Fig. 4. Encía. Se pueden diferenciar dos partes de la encía: 1) Encía libre (FG), 2) Encía adherida (AG), 3) Unión Cemento Esmalte (CEJ), Línea mucogingival (MGJ) (Tomado de referencia 9. Lindhe, 2008).

1.2.2 Fibras Gingivales

La encía posee fibras en su estructura, lo que determina su forma, consistencia y color. Estas se clasifican de la siguiente manera (Fig. 5):

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 la raíces se orientan hacia el margen gingival.

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

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.

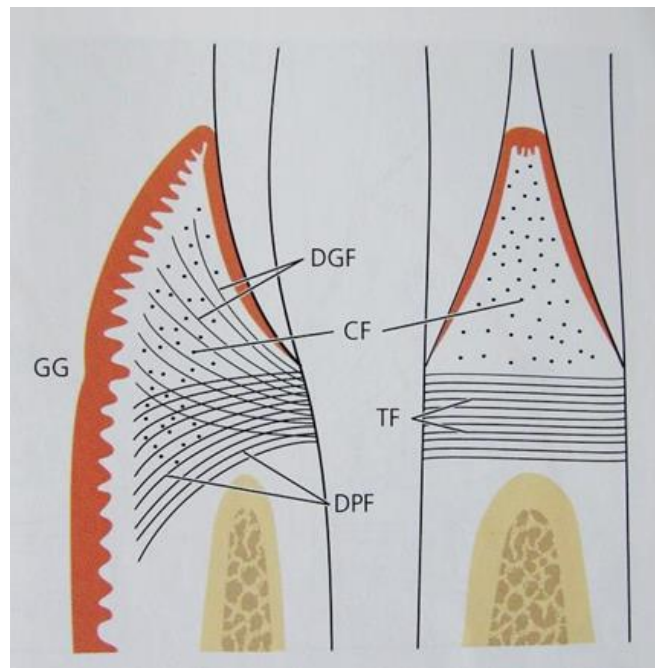


Fig. 5. Fibras Gingivales. A pesar de que varias de las fibras de colágeno en la gingiva y el ligamento periodontal se encuentran distribuidas irregularmente, la mayoría tienden a distribuirse en grupos de haces con distinta orientación. De acuerdo a su inserción y el trayecto en el tejido, los grupos se dividen en: 1) Fibras circulares (CF). 2) Fibras dentogingivales (DGF). 3) Fibras dentoperiósticas (DPF). 4) Fibras trans-septales (TF), surco de la encía libre (GG). (Tomado de referencia 9. Lindhe, 2008).

1.3 Eptelio de Unión

También denominada unión dentogingival, es el mecanismo de cierre del periodonto de protección, o sea, la forma en que la encía marginal se adhiere a la superficie del diente para sellar la comunicación entre la cavidad bucal y los tejidos del periodonto de inserción(14).

Este epitelio es la continuación del epitelio dental de la encía marginal en su porción más apical, sin un verdadero límite entre ambos. Tiene una forma triangular con su base hacia el epitelio dental de la encía marginal y su vértice ubicado hacia el ápice, dejando de esta forma los dos lados del triángulo o vertientes, una hacia el corion de la encía marginal denominada lámina basal externa y la otra vertiente hacia la estructura del diente, llamada lámina basal interna. Esta vertiente o lámina basal interna se une a la superficie del elemento dentario a través de hemidesmosomas (Fig. 6).

Cabe aclarar, cuando nos referimos a que la encía marginal migra apicalmente, el epitelio de unión también lo hace, adoptando distintas posiciones con respecto a las estructuras dentales a la cual se une. Lo hace íntegramente sobre el esmalte cuando el diente recién erupciona, al lograr su ubicación en la arcada, se relaciona con el límite amelocementario (unido sobre el esmalte).

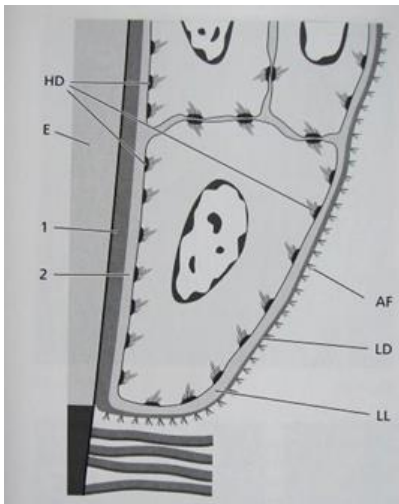


Fig. 6. Epitelio de Unión. Dibujo esquemático de la célula posicionada más apicalmente en el epitelio de unión. Esmalte (E), lámina densa (LD), lámina lúcida (LL), fibras de Anclaje (AF). (Tomado de referencia 9. Lindhe, 2008).

1.4 Cemento Dentario

El cemento es el tejido mesenquimatoso calcificado avascular que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica. Los dos tipos principales de cemento son el acelular (primario) y celular (secundario). Ambos constan de una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas de colágeno. El cemento celular estratificado permite la reestructuración del cemento para compensar las alteraciones fisiológicas, mientras que el cemento acelular únicamente ancla el ligamento periodontal (13) (Fig. 7).

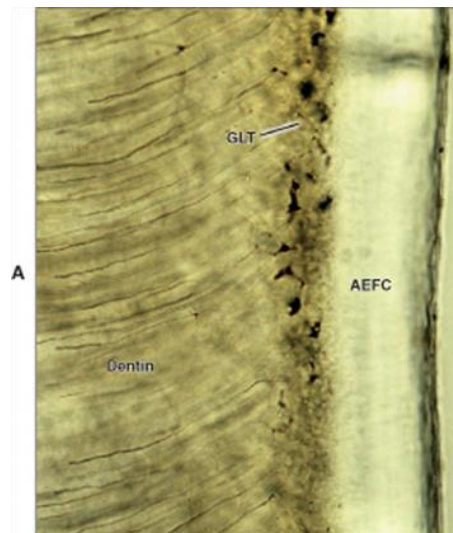


Fig. 7. Corte de un diente humano. Se ilustran: cemento acelular extrínseco (AEFC), Fibra granular de Tomes (GLT) (Tomado de referencia 17. Ten Cate, 2008).

1.4.1 Características histológicas y morfológicas.

CEMENTOBLASTOS. Estas células formadoras de cemento se ubican en la parte externa del tejido al lado del ligamento periodontal: zona cementógena del cemento

CEMENTOCITOS. Son cementoblastos incluidos en el cemento mineralizado dentro de cavidades denominadas cementoblastos.

CEMENTOCLASTOS. Son células que tienen capacidad de reabsorción de tejidos duros. Están ausentes en condiciones normales. En condiciones patológicas aparecen en la superficie externa del cemento.

MATRIZ EXTRACELULAR. Los cristales de hidroxiapatita forman el principal componente inorgánico. Se alojan entre las fibras colágenas o dentro de ellas. La matriz orgánica está formada por colágeno tipo I.

Hay dos clases de fibras:

Intrínsecas: formadas por cementoblastos que luego se remineralizan y forman cemento.

Extrínsecas: son fibras del ligamento periodontal que buscan anclaje en el cemento (fibras de Sharpey) (Fig. 8).

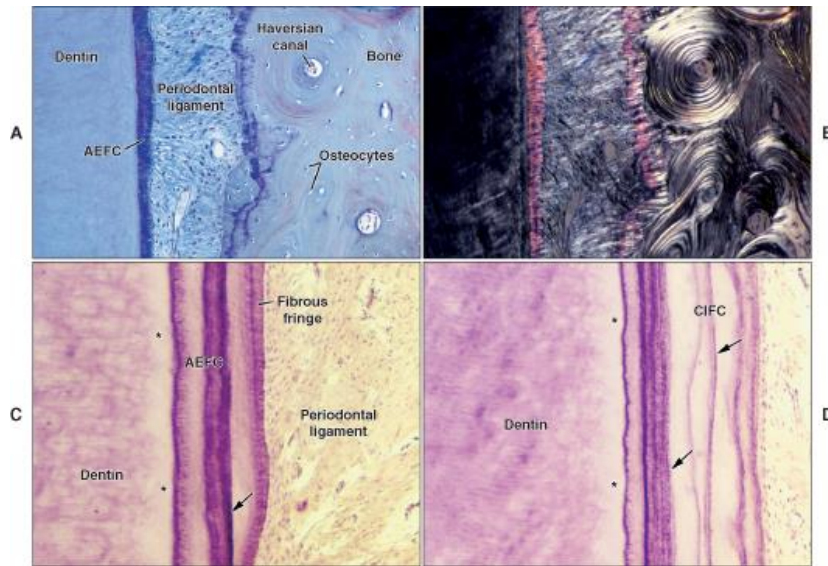


Fig. 8. Corte histológico de periodonto. Fueron examinados por: luz transmitida (A) y polarizada (B). La microscopía polarizada revela estrías en la capa de cemento. C y D, líneas longitudinales (flechas) y perpendiculares son visibles con algunas tinciones histológicas. Las capas longitudinales pueden aparecer como líneas delgadas o gruesas, denotando esencialmente la interfaz entre capas sucesivas de cemento (Tomado de referencia 17. Ten Cate, 2008).

1.5 Hueso Alveolar

El proceso alveolar es la porción maxilar y mandibular que forma y sostiene los alveolos dentarios. No hay un límite anatómico preciso entre la porción basal o cuerpo de los huesos maxilar y mandibular, y las apófisis alveolares pero sí hay grandes diferencias de origen y función. Se forma cuando el diente erupciona para proporcionar inserción ósea al ligamento periodontal en formación, desaparece gradualmente después de que se pierde el diente. “El hueso alveolar nace, crece y vive solamente por los dientes”. El tamaño, la forma, la ubicación y la función de los dientes determinan su morfología(15) (Fig. 9).

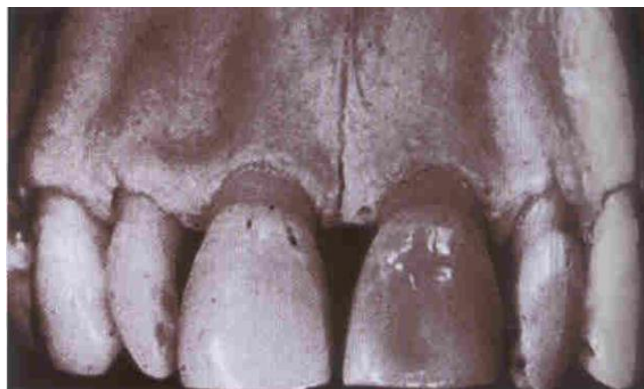


Fig. 9 Cresta ósea normal. (Tomado de referencia 15. Carranza, 2010).

1.5.1 Constituyentes del Alvéolo

1. Una tabla externa de hueso cortical formado por hueso haversiano y laminillas óseas compactadas (Fig. 10).
2. La pared interna del alveolo, integrada por hueso compacto delgado llamado hueso alveolar, desde el punto de vista histológico, contiene una serie de aperturas, lámina cribiforme, que permiten la unión con el ligamento periodontal y el componente central del hueso alveolar (hueso esponjoso), mediante paquetes neurovasculares.

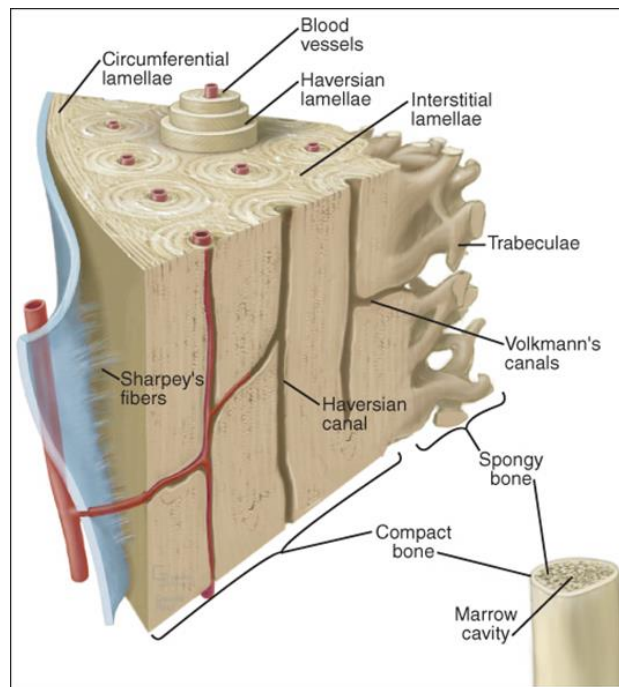


Fig. 10. Componentes organizacionales óseos (Tomado de referencia 17. Ten Cate, 2008).

3. Trabéculas esponjosas, entre las dos capas compactas, que actúan como hueso alveolar de soporte. El tabique interdental consta de hueso esponjoso de soporte envuelto en un borde compacto.

El proceso alveolar se divide en áreas separadas a partir de su base anatómica, pero funciona como una unidad; todas las partes se interrelacionan con el soporte de los dientes. Casi todas las porciones vestibular y lingual de los alveolos están formadas por hueso compacto, el hueso esponjoso rodea la cortical alveolar en las zonas apical, apicolingual e interradicular.

1.5.2 Clasificación

Hueso compacto. Se halla en la parte más externa del alvéolo, forma las corticales interna y externa. En forma de cáscara protege al hueso esponjoso y cambia permanentemente (Fig. 11).

Hueso esponjoso. Limitado por las corticales externa e interna se continúa con el cuerpo de los maxilares. Resiste muy bien las fuerzas (Fig. 11)

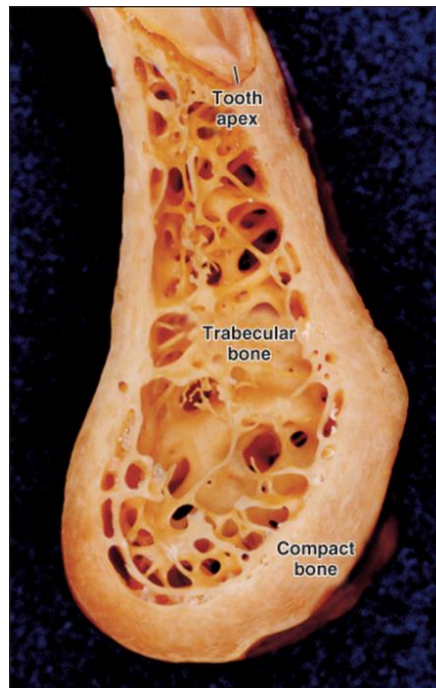


Fig. 11. Cuerpo mandibular. Se puede distinguir claramente la capa externa de hueso compacto y la red interna de hueso trabecular (Tomado de referencia 17. Ten Cate, 2008).

1.5.3 Células y Matriz Intercelular.

Células osteoprogenitoras

Osteoblastos. Células formadoras de hueso, sintetizan proteínas y mineralizan el osteoide. Son derivados de las células foliculares pluripotenciales. El hueso alveolar se forma durante el crecimiento fetal por medio de osificación membranosa, consta de una matriz calcificada con osteocitos encerrados dentro de espacios llamados lagunas.

Osteocitos. Cuando quedan atrapados mientras segregan matriz ósea, reducen su tamaño y función. El número depende de la velocidad de formación. Más velocidad, más osteocitos. Los

osteocitos emiten prolongaciones hacia los canalículos que se irradian desde las lagunas. Los canalículos forman un sistema de anastomosis por medio de la matriz intercelular del hueso, que lleva oxígeno y nutrimentos a los osteocitos a través de la sangre y elimina los productos de desecho metabólicos.

Osteoclastos. Células mucho más grandes, encargadas de la reabsorción del hueso. Se originan a partir de tejido hematopoyético, y se forman por la fusión de células mononucleares. Cuando los osteoclastos están activos, poseen un borde ondulado, y provocan una superficie ósea con apariencia erosionada, llamadas lagunas de Howship.

El crecimiento óseo se da por aposición de una matriz orgánica depositadas por los osteoblastos. Los sistemas haversianos (osteones) son los mecanismos internos que dan suministro vascular a los huesos que son muy gruesos para ser abastecidos por los vasos superficiales. Éstos se encuentran, principalmente en las tablas corticales y la cortical alveolar (Fig. 12).

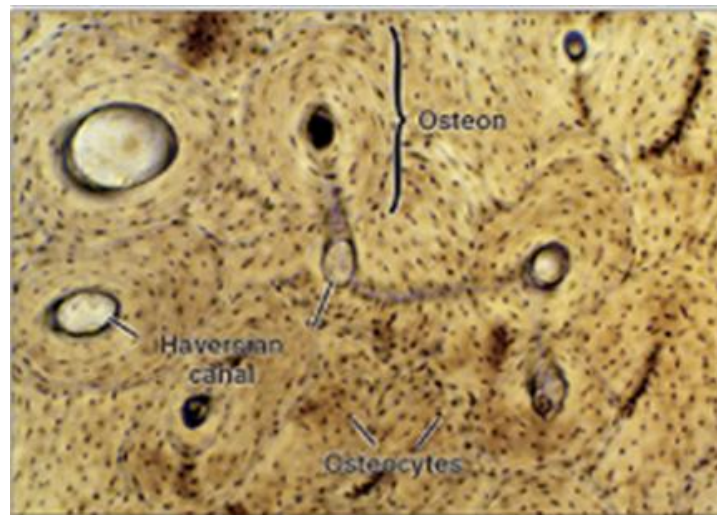


Fig. 12. Organización de las fibras de colágeno en hueso laminado, la osteona es la unidad organizacional del hueso laminado, principalmente evidente en hueso compacto. Consiste en capas concéntricas de hueso alrededor de un canal vascular – conducto de Havers (Tomado de referencia 17. Ten Cate, 2008).

El hueso está integrado por un tercio de matriz orgánica y dos tercios de materia inorgánica formada principalmente por calcio y fósforo, también contiene hidroxilo, carbonatos, citrato y otros iones como sodio, magnesio y flúor. Las sales se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita y constituyen casi dos terceras partes de la estructura ósea.

La matriz orgánica está formada, por colágeno tipo I (90%) con pequeñas cantidades de proteínas no colágenas como son: osteocalcina, osteonectina, proteína morfogenética, fosfoproteínas y proteoglicanos. La osteopontina y la sialoproteína ósea son proteínas de adherencia celular que son importantes para la adherencia de osteoblastos y osteoclastos.

La regulación de la remodelación ósea es un proceso complejo que incluye hormonas y factores locales que actúan en forma autocrina y paracrina sobre la regeneración y la actividad de células óseas diferenciadas. El hueso contiene 99% de los iones de calcio, es la principal fuente de liberación del calcio al disminuir sus niveles en sangre, la glándula paratiroides regula a partir de la secreción de hormona paratiroidea (PTH) la degradación ósea para obtener calcio, y la glándula tiroides a través de la hormona calcitonina para favorecer la aposición ósea y por lo tanto disminuir las concentraciones de calcio en sangre.

1.6. Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal (LPD) es el tejido conectivo, muy vascularizado y celular, que ocupa el espacio comprendido entre el hueso alveolar y la superficie radicular. Es un tejido conectivo fibroso especializado producido principalmente por fibroblastos, con un mínimo de componentes vasculares y nerviosos. En sentido coronario, el LPD se continúa con la lámina propia de la encía y está separando de ésta por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta del hueso alveolar con la raíz (fibras de la cresta alveolar) (Fig. 13).

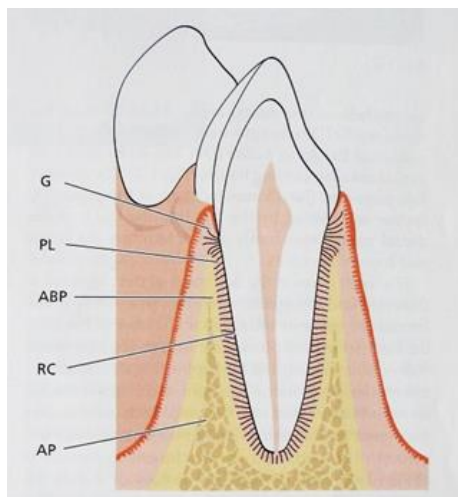


Fig. 13. El periodonto comprende los siguientes tejidos: Encía (G), ligamento periodontal (PL), cemento radicular (RC) borde del hueso alveolar (ABP), hueso alveolar (AP). (Tomado de referencia 9. Lindhe, 2008).

El espacio del LPD tiene la forma de un reloj de arena, más estrecho a nivel radicular medio. El LPD es un tejido blando especializado situado entre el cemento que cubre la superficie radicular y el hueso que forma la pared alveolar. Este tiene un grosor que varía entre los 0.15 a 0.38 mm, con su porción más ancha alrededor del tercio medio radicular(16).

Como cualquier otro tejido conectivo, el LPD consta de células y compartimientos extracelulares de fibras y sustancia fundamental. Las células incluyen osteoblastos y osteoclastos (técnicamente en el ligamento pero funcionalmente asociados con el hueso), fibroblastos, restos epiteliales de Malassez, macrófagos, células mesenquimatosas indiferenciadas y cementoblastos (también técnicamente asociados con el ligamento pero funcionalmente con el cemento), células epiteliales y células nerviosas. El compartimiento extracelular consiste en fibras de colágena bien definidas embebidas con sustancia fundamental. Variantes de las fibras elásticas, elauina y oxitalán también se encuentran en el LPD. La sustancia fundamental contiene glucosaaminoglicanos, glucoproteínas y glucolípidos (Fig. 14).

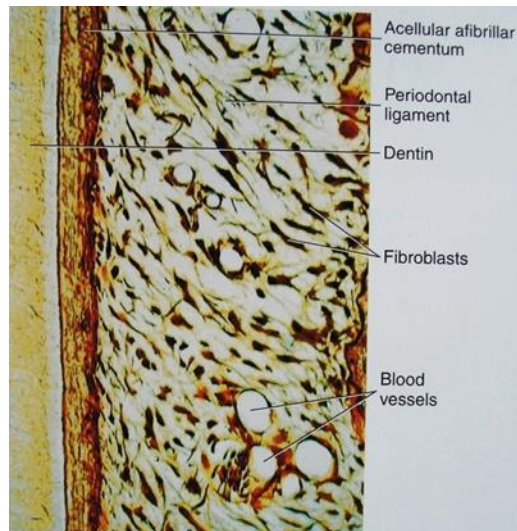


Fig. 14. El ligamento periodontal es un tejido conectivo altamente celular y vascularizado. (Tomado de referencia 17. Ten Cate, 2008).

El LPD se compone, principalmente de fibrillas colágenas dispuestas en haces (Fig. 15), la colágena representa alrededor del 50% del peso seco del LPD; en dientes erupcionados por completo, alrededor del 90% de la colágena es insoluble. Interacciones sumamente específicas entre las células, sus matrices extracelulares y factores de crecimiento de polipéptidos, regulan el crecimiento, forma y funciones celulares (Fig 15).

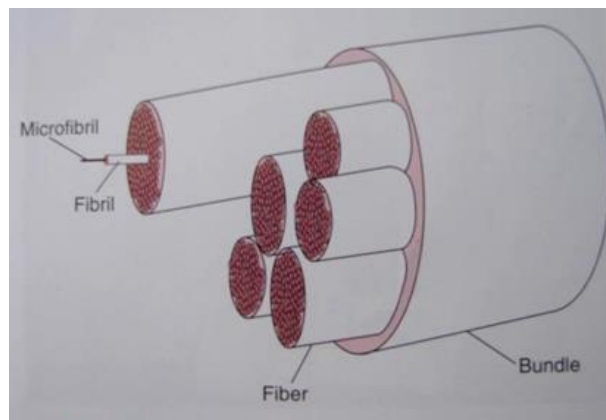


Fig. 15. Microfibrillas, fibrillas, fibras y haces de colágeno (Tomado de referencia 15. Carranza, 2010)

1.6.1 Células epiteliales

Las células epiteliales en el LPD son remanentes de la vaina epitelial de Hertwing. Estas se encuentran como lazos dispersos cerca de la superficie cementaria y son fácilmente reconocidos con tinciones de hematoxilina y eosina, debido a que su núcleo se encuentra de frente y por lo tanto se tiñe profundamente. Son conocidos como *epitelio de Malassez*.

1.6.2 Células mesenquimatosas indiferenciadas

Un importante componente del LPD son las células mesenquimatosas indiferenciadas o células madre. Estas tienen una localización perivascular a 5 μm de los vasos sanguíneos. Si bien ha sido demostrado que son la fuente de células nuevas para el LPD, es sabido que una célula madre origina células hijas que se diferencian en fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos. El hecho de que células nuevas son producidas por el LPD, aunado al hecho de que las células del ligamento se mantienen estáticas, significa que la producción de células nuevas debe mantenerse balanceada por la migración de células fuera del ligamento o su muerte. La supresión selectiva de células del ligamento ocurre por apoptosis, para permitir un recambio(17).

1.6.3 Células de hueso y cemento

Aunque técnicamente se encuentran en el LPD, las células de hueso y cemento se encuentran asociadas a los tejidos duros que forman.

Los *osteoblastos* delimitan la superficie ósea del ligamento y pueden encontrarse funcionales o en reposo, dependiendo del estado funcional del ligamento. Los *osteoclastos* también pueden ser encontrados contra el hueso donde ocurra resorción. Esta variación en la distribución de células óseas a lo largo de la pared alveolar refleja el constante estado de flujo del alvéolo.

Generalmente se asume que los *cementoblastos* delimitan la superficie del cemento acelular y celular, pero la evidencia no es certera. Al examinar la superficie del cemento acelular no revela que éste sea siempre el caso, a menos que los fibroblastos del LPD asuman una relación muy cercana con la superficie del cemento.

1.7. Periodontitis

La periodontitis es una de las enfermedades más comunes, es una alteración inflamatoria que afecta los tejidos periodontales, tiene una prevalencia del 60% de la población, 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 gestantes. La enfermedad periodontal es provocada por bacterias del biofilm subgingival, su curso y progresión son modificados por una serie de factores como la propia respuesta inmune o enfermedades no relacionadas o condiciones sistémicas.

La periodontitis es una enfermedad con etiología heterogénea, que abarca el desarrollo bacteriano subgingival, factores sociales y hábitos, retos genéticos y epigenéticos, los cuales son modulados y controlados por las respuestas inmune e inflamatoria del hospedero(18, 19). Las bacterias anaerobias gram negativas más importantes y prevalentes en el área subgingival son el *Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aa)*, *Porphlyromonas gingivalis (Pg)*, *Prevotella intermedia (Pi)* y *Bacteroides forsythus (Bf)* (20). Como resultado de la maduración del biofilm, las especies patogénicas se desarrollan dentro de las bolsas periodontales liberando factores de virulencia que interactúan con el sistema inmune.

El diagnóstico se realiza a partir de la examinación clínica de los tejidos blandos, la profundidad al sondeo periodontal y considerando la pérdida ósea alrededor de los dientes a través de un examen radiográfico. La enfermedad periodontal generalmente inicia con gingivitis, la cual no afecta los tejidos de soporte y es reversible, sin embargo, puede progresar y provocar la destrucción de los tejidos de soporte, favoreciendo la destrucción de las fibras de tejido conectivo y provocando la formación de bolsas periodontales y pérdida de soporte óseo. La valoración de la

progresión de la enfermedad se realiza a través del sondeo periodontal, que permite medir la profundidad de las bolsas periodontales, las profundidades mayores a 3 mm son consideradas como alteradas, sangrado al sondeo se considera enfermedad activa, y bolsas mayores a 7 mm se considera riesgo de pérdida del órgano dentario(21).

El microbioma periodontal es complejo, a pesar de la atención que se ha brindado a la composición del microbioma humano, la caracterización de los mecanismos subyacentes y las interacciones que llevan a enfermedades inflamatorias como la periodontitis aún continúa poco definido (22), sin embargo, se ha caracterizado un cambio en la presencia de bacterias gram positivas hacia gram negativas en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Las bacterias, por ejemplo *Porphyromonas gingivalis*, es una bacteria que se detecta de manera poco frecuente en salud, y con mayor frecuencia en enfermedad periodontal, éste microorganismo presenta diferentes factores de virulencia, incluyendo fimbrias, enzimas degradativas, cápsula de exopolisacáridos así mismo posee proteasas que presentan actividad proteolítica (gingipains) que se han asociado con la degradación de proteínas del hospedero y por lo tanto asociadas con daño tisular y alteración inmune, también se ha reportado que provoca alteraciones en la carga bacteriana y puede provocar inflamación ya que interacciona con el sistema del complemento(23). Los mecanismos de las diferentes comunidades bacterianas y su asociación a la salud y enfermedad, así como la composición y los mecanismos que favorecen los cambios en la microbiota son poco claros.

La identificación de las bacterias por el hospedero contribuye a la fisiopatología de la periodontitis(24). Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) de las células inmunes del hospedero identifican los patrones moleculares de patógenos (PAMPS), como lipopolisacáridos (LPS). La identificación específica de los PAMPs provoca la activación de la respuesta inmune, la activación y reclutamiento celular a través de citocinas y quimiocinas. El reconocimiento permite la homeostasis entre la microbiota oral y el sistema inmune(25)(Fig. 16).

Las células inmunes típicas en la periodontitis son neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, células T, linfocitos B y células plasmáticas, con altas concentraciones de inmunoglobulina G (IgG). La interacción provoca inflamación crónica con la expresión de mediadores proinflamatorios y citocinas, Interleucina 1 (IL-1), TNF- α , Interferón gamma (IFN- γ), Interleucina 6 (IL-6), etc (26).

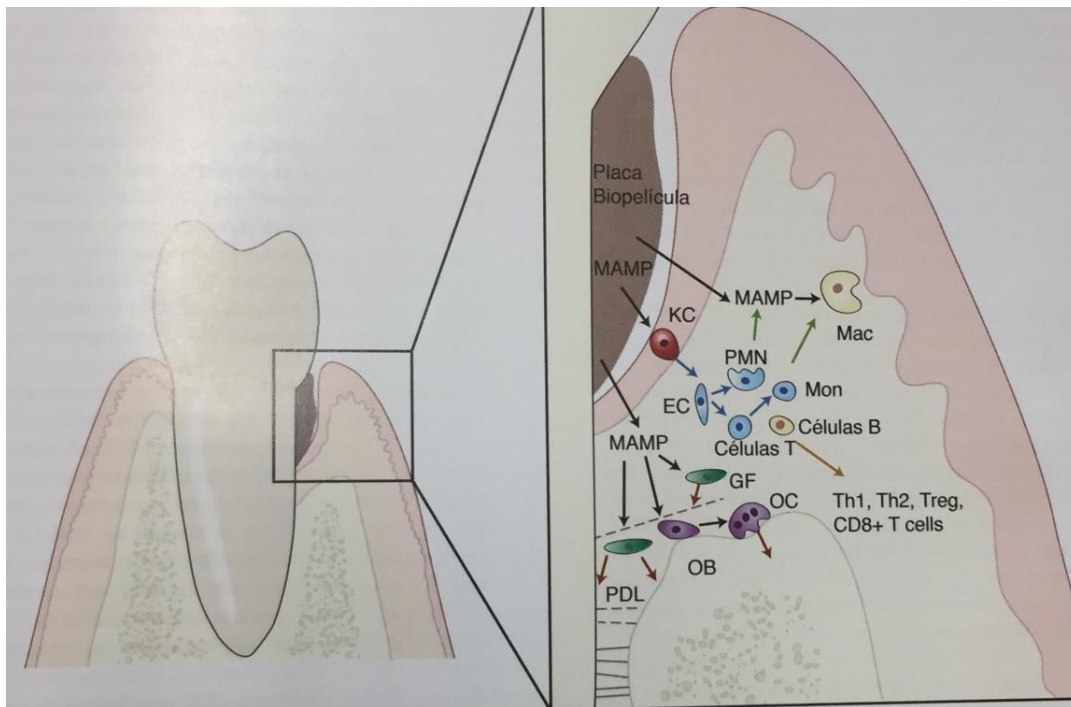


Fig. 16. Patrón molecular relacionado con la microbiota (MAMP) de microorganismos en la biopelícula dental activa las respuestas inflamatorias de los tejidos *periodontales*. Los mediadores biológicos afectan las células vecinas (*flechas azules*) mediante la inducción de la expresión de otros mediadores (Ej. RANKL) o por quimiotaxis desencadenante (*flechas verdes*). El daño directo a los tejidos periodontales también puede resultar tras la estimulación de MAMP (*flechas rojas*), como la secreción de Metaloproteinasas por fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal. MAMP, Patrones moleculares relacionados con la microbiota; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear (NF) kappa B; KC, queratinocitos, Mac, macrófagos, GF, fibroblasto gingival ; PDL, fibroblastos del ligamento periodontal, OB, osteoblastos; OC, osteoclastos, EC, célula endotelial; PMN, neutrófilos polimorfonucleares; Mon, monocitos; Células T, Linfocitos T, Células B, linfocitos B. (Tomado de referencia 15. Carranza, 2010)

1.7 Hormonas presentes en la gestación

Es ampliamente aceptado que la enfermedad periodontal se asocia con la gestación, sin embargo el mecanismo no se encuentra delimitado. Se ha propuesto que el aumento de estrógeno y progesterona tiene efecto sobre el periodonto. También se ha reportado que las hormonas sexuales pueden modular la función de células inmunes(27).

Se ha reportado que el estradiol a 0.04 ng/mL o mayor, así como la progesterona a 0.1 ng/mL provoca la inhibición de la secreción de IL-1 y TNF- α inducidas por lipopolisacáridos (LPS) en monocitos(28).

El estrógeno 17 β estradiol posee efectos anabólicos al mediar el metabolismo del colágeno y al estimular la angiogénesis. Dicha hormona aumenta la incorporación de prolina dentro de la molécula que va a ser sintetizada en fibroblastos cultivados de piel (29), y favorece la supresión del sistema inmune durante la gestación ya que disminuye la respuesta y la proliferación de los linfocitos T(30). La progesterona, a las concentraciones que se encuentran en la placenta, bloquea los canales de potasio (K⁺), contribuye de esta manera a la inmunoregulación materna (31). Esta inmunidad mediada por células, que está disminuida durante la gestación, puede contribuir a la respuesta alterada de la encía hacia la placa(32). Ya que se ha observado inflamación gingival aumentada a pesar de la ausencia de cambios en los niveles de placa, esto se atribuye a la disminución de la respuesta inmune al mismo reto bacteriano.

Los efectos de las hormonas sexuales en la microbiología subgingival durante el embarazo han sido documentadas previamente(33, 34). Se ha reportado un rango aumentado de bacterias anaerobias-aerobias subgingivales, así como la proporción de *Bacteroides melaninogenicus* y *Prevotella intermedia* (2.2-10.1%). El estradiol y la progesterona son acumulados selectivamente por la *P. intermedia* como un sustituto de la vitamina K, por lo que se ha postulado que las hormonas constituyen un factor de crecimiento de dicho microorganismo(35). Se ha reportado que la población de especies de *Bacteroides* presenta un aumento de 55 veces sobre el control en mujeres embarazadas y 16 veces en las que utilizan AO's. Los incrementos concomitantes de *P. intermedia* se reportan más pronunciados en el segundo trimestre de la gestación y correlacionados con un aumento en los signos de gingivitis(36).

Por otro lado, es claro que la interacción madre-feto y el desarrollo de placenta, inician eventos que estimulan respuestas supresoras, principalmente a nivel de linfocitos. La supresión de los linfocitos T-colaboradores (del inglés –T helper –Th) y T-citotóxicos (Tc) disminuye la secreción de interleucina 2 (IL-2), interferon γ y del TNF- β . Además, las funciones de algunos leucocitos polimorfonucleares también se ven alteradas, como la quimiotaxis y la adherencia que se observan disminuidas en el principio del segundo trimestre y continúan durante la gestación(37). Aunque este fenómeno no se ha comprendido completamente, parece que se debe a la activación

de neutrófilos, esta depresión de las funciones leucocitarias durante la gestación puede explicar la susceptibilidad a ciertas infecciones (38, 39).

La condición de gestación implica condiciones de cambios mayores, que permitan la “tolerancia inmune” del huevo a desarrollarse, como la aparición de células nuevas como es el caso del trofoblasto. El trofoblasto es un grupo de células que forman la capa externa del blastocisto, que provee nutrientes al embrión y se desarrolla como parte importante de la placenta. Se forma durante la primera etapa de la gestación y son las primeras células que se diferencian del huevo fertilizado. Durante la gestación, el trofoblasto es inerte y para el tiempo del parto, es rechazado inmunológicamente tanto por la madre como por el feto. Además la parte externa secreta la hormona gonadotrofina coriónica humana (HGC o GCH), que permite detectar la gestación en las pruebas de orina y sangre(40).

La presencia del trofoblasto tiene una relación estrecha con el sistema inmune de la madre que permite la implantación y posterior desarrollo del huevo fertilizado. Por ejemplo, el trofoblasto expresa HLA-G polimórfico 100, que tiene múltiples funciones incluyendo supresión inmune y la inducción de la producción de citocinas que promueven el crecimiento celular. Esta condición de “inmunosupresión” hace que la placenta sea un órgano de cierta manera privilegiado, con pocas probabilidades de sufrir daño inmune por linfocitos, anticuerpos citotóxicos y complejos antígeno-anticuerpos. El trofoblasto es capaz de emitir señales y de reclutar la migración de linfocitos a la decidua uterina. Estos a su vez, tienen una variedad de funciones que favorecen el crecimiento y estimulan algunos linfocitos capaces de liberar factores supresores que restringen actividades de linfocitos T citotóxicos. Además, el trofoblasto induce una variedad de anticuerpos en la madre que son capaces de dirigir la reactividad inmune materna a aloantígenos paternos. Estos anticuerpos regulan células Natural Killer (NK) citotóxicas a través de la unión del receptor Fab de las inmunoglobulinas.

El sistema inmune juega un papel importante en el embarazo normal o en algún estado patológico. La respuesta inmune debe ser modulada para permitir el establecimiento y mantenimiento de un embarazo viable, aceptando tejidos alógenicos sin rechazo(38). El perfil inmunológico longitudinal a lo largo de un embarazo humano, no se ha definido, complicando los esfuerzos por caracterizar la modulación normal del sistema inmune e identificar los parámetros asociados con patologías reproductivas y sus consecuencias(39). Se encuentran niveles elevados

de citocinas Th2, IL-6 e IL-10 en sueros de mujeres embarazadas, mientras que niveles de citocinas Th1, IFN- γ , se encuentran elevados en mujeres con pérdidas de embarazos recurrentes.

Los efectos sistémicos de la tolerancia fetal son regulados por hormonas inmunoactivas, ej. progesterona(41). Las concentraciones adecuadas de progesterona son indispensables para el mantenimiento del embarazo. El estrés psicoemocional inhibe el sistema reproductor femenino a través de la inhibición de progesterona(42). Localmente en la interfase materno-fetal, existen numerosos mecanismos que se encuentran ínterconectados: la expresión de MHC I (Complejo mayor de histocompatibilidad I) se encuentra disminuida así como la expresión de HLA-G (Antígenos leucocitarios Humanos) y HLA-E pueden bloquear la actividad citolítica de las células NK(43, 44).

La supresión de las células NK y su actividad citolítica, así como el cambio de Th1 a Th2, parece estar bajo el control de una proteína conocida como factor de inhibición inducido por progesterona (PIBF), el cual es secretado por células T, principalmente TCR $\gamma\delta$ y CD8+, a través del receptor de progesterona(45).

La placenta sintetiza estrógeno a partir de precursores fetales y maternos y los libera hacia la circulación materna. Al término de la gestación, el estradiol, se encuentra a ~ 0.1 mM en suero materno y a ~ 0.25 mM en sangre intervellosa, valor ~ 250 veces mayor que lo que presentan mujeres no gestantes a medio ciclo ovárico(46).

La progesterona es principalmente producida por el cuerpo lúteo, después por el trofoblasto. Las concentraciones de corticoesteroides, corticoesterona, también se encuentran aumentadas mientras la gestación progresa. Parecen tener una participación importante en el tráfico y funciones de las células B y T. También parecen participar en la supresión de las respuestas inmunes(47).

Offenbacher menciona que infecciones primarias en sistemas distantes pueden guiar a un embarazo a un término anormal (48), por lo tanto, al considerarse a la periodontitis como un proceso en el cual existe infección de los tejidos periodontales, además de un aumento en la presencia de prostaglandinas y citocinas proinflamatorias(11), se ha sospechado de una posible relación entre ambos factores, sin embargo, no existen evidencias sólidas que soporten esta presunción y los resultados reportados hasta ahora no han sido claramente concluyentes.

1.8 Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas (MMP) son una familia de endopeptidasas neutras dependientes de zinc y calcio, encargadas de degradar las proteínas integrantes de matriz extracelular (EMC)(49). Son requeridas en procesos relacionados con el desarrollo, la regeneración y la enfermedad. La degradación de proteínas extracelulares es esencial para que cualquier célula individual pueda interactuar con su ambiente circundante y para que los organismos multicelulares funcionen y se desarrollen. Las MMP también degradan moléculas de la superficie celular y proteínas pericelulares, reguladoras del comportamiento celular en diversas vías(49, 50).

Las metaloproteinasas se han clasificado según su especificidad en: colagenasas, gelatinasas y estromelinasas. En el periodonto se reconocen por su importancia: colagenasas (MMP-1, MMP-2, MMP-13), gelatinasas (MMP-2, MMP-9), estromelinasas (MMP-3, MMP-10)(51-53).

Se ha reportado la activación y sobreexpresión de MMP por patógenos periodontales como *Actinobacillus gingivalis* y *Phorphyromonas gingivalis* así como por citocinas inflamatorias. MMP-13 se ha visto que se expresa en el epitelio del surco y en los fibroblastos gingivales, sin embargo su papel no está bien delimitado(54).

La expresión de MMP también es modulada por hormonas como el estrógeno, que disminuye la expresión de MMP-1 en condrocitos. Asimismo se ha reportado la disminución de la expresión de MMP-13 en presencia de Estradiol (E2) en condrocitos(55).

MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18, su función es la degradación de colágeno tipos I, II y III, iniciadores de la destrucción extracelular de la matriz(56).

MMP-13 expresada en células epiteliales indiferenciadas, asociada con la degradación de colágeno y migración epitelial hacia el tejido conectivo en inflamación crónica, y con el inicio de resorción ósea.

El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz extracelular en los tejidos periodontales (encía, ligamento y hueso alveolar), su destrucción es una de las claves en las lesiones severas. Las principales MMPs asociadas con la enfermedad periodontal son MMP-8, MMP-13, mientras que la MMP-1 se ha relacionado con la transformación del tejido periodontal(57).

MMP-2 y MMP-9 son gelatinasas, MMP-2 es secretada principalmente por fibroblastos gingivales y MMP-9 es secretada principalmente por polimorfonucleares (PMN's) y degradan colágeno tipo IV presente en tejidos gingivales(53).

1.9 Modelos animales

El modelo de periodontitis experimental inducida por ligadura, posee la ventaja de poder iniciar la enfermedad en un tiempo conocido, al que le siguen una serie de eventos los cuales culminan predeciblemente en la pérdida de hueso. El tiempo en el que se presenta la enfermedad es variable y depende del modelo a estudiar. Mientras que para perros (*Beagle*) y monos (*Mecca fascicularis* y *Mecca mulata*) habrán de pasar varias semanas, en el caso de ratas y ratones ocurre al cabo de pocos días (58-60).

El modelo de ratón con periodontitis inducida por ligadura, ha sido utilizado muy poco en comparación con animales de mayor tamaño, es posible que la razón sea lo complejo que resulta colocar la ligadura en una cavidad oral tan relativamente pequeña. La técnica consiste en pasar sutura de seda 0 – 5 por los espacios interdentes del segundo molar superior, realizando un nudo en su porción palatina(21).

1.10 Análisis histométrico

Las metodologías utilizadas para cuantificar la progresión de la periodontitis inducida por ligadura varían considerablemente. Semenoff (61)*et al*, en 2008 realizaron un análisis histométrico en ratas con periodontitis inducida por ligadura. Las muestras histológicas fueron teñidas con la técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina (H-E). Se midió la distancia entre la unión cemento – esmalte (UCE) y la cresta alveolar, y entre el punto UCE y el ligamento periodontal; en las cuales, las del grupo con enfermedad periodontal (EP) fueron sumamente mayores a las de su grupo control(61).

Las tinciones tricrómicas se utilizan para el estudio del tejido conectivo, músculo y fibras colágenas. Estas últimas principalmente para diferenciar las fibras colágenas del tejido muscular(62).

La tinción de Masson se utiliza para diferenciar entre el colágeno y el músculo o para demostrar un cambio en la cantidad de colágeno presente. Generalmente utiliza un mordente como el Bouin y se caracteriza por la tinción de los núcleos por acción de la Hematoxilina férrica de Weigert. Los tejidos citoplásmicos y conectivo se tiñen en un solo paso con una solución de ácido fosfotúngstico/ácido fosfomolibdico seguida de tinción con cromotropo R2 (se tiñen las fibras citoplásmicas y musculares) y Fast Green FCF o azul anilina (se tiñen las fibras de colágeno). Su lavado en ácido acético después de la tinción hace que los tonos sean más delicados y transparentes(24, 25).

En 2011 Sunita *et al*, demuestran con la tinción tricrómica de Masson que los tejidos en relación al periodonto de molares humanos ricos en colágeno, presentan una coloración azul intensa. Mencionan también que el ligamento periodontal se une a los tejidos mineralizados por medio de las fibras de Sharpey, y a medida que se acercan al cemento adyacente o al hueso, forman una capa orgánica rica en colágeno, por lo que se percibe con un tono azul intenso(63).

2. Justificación

La tolerancia inmune durante la gestación parece influir en infecciones primarias como la periodontitis. En este contexto se ha sugerido una interacción bidireccional embarazo-periodontitis, sin embargo no existen evidencias sólidas que soporten esta presunción. Esto debido a que clínicamente no es posible controlar todas las variables y establecer una correlación entre las variaciones hormonales, inmunitarias e histológicas durante la gestación.

La etiología multifactorial de la enfermedad periodontal y las diversas variables que participan en las modificaciones que suceden durante la gestación en los humanos resulta compleja, por lo que se han utilizado modelos animales para comprender la patogenia de la enfermedad periodontal y evaluar su evolución de la enfermedad-gestación(64).

El modelo de periodontitis experimental inducida por ligadura, posee la ventaja de poder iniciar la enfermedad en un tiempo conocido, al que le siguen una serie de eventos que culminan predeciblemente en la pérdida de hueso. El tiempo en el que se presenta la enfermedad es variable y depende del modelo a estudiar. Mientras que para perros (*Beagle*) y monos (*Mecca fascicularis* y *Mecca mulata*) habrán de pasar varias semanas, en el caso de ratas y ratones ocurre al cabo de pocos días(58-60).

El modelo de ratón con periodontitis inducida por ligadura, ha sido utilizado muy poco en comparación con animales de mayor tamaño, es posible que la razón sea lo complejo que resulta colocar la ligadura en una cavidad oral pequeña. La técnica consiste en pasar sutura de seda 0 – 5 por los espacios interdetales del segundo molar superior, realizando un nudo en su porción palatina(21).

Las ratas y ratones han sido ampliamente utilizadas debido a la similitud en la arquitectura periodontal, su bajo costo, la facilidad de manejo, y la posibilidad de disponer de diferentes estados inmunológicos y microbiológicos(65). En modelos animales es de suma importancia establecer el momento en que se establece la patología e identificar los factores externos que podrían influir en el progreso de la enfermedad. Un ejemplo es la dieta que se ha sospechado afecta el desarrollo de la enfermedad periodontal en ratas de laboratorio(66), también hay evidencia de que la consistencia de la dieta puede tener efectos similares(67).

Por lo tanto, en este estudio buscamos identificar la relación de la periodontitis experimental con las modificaciones hormonales e inmunes, provocadas por el desarrollo de la gestación en un

modelo murino. Con este trabajo contribuiremos 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.

3. Hipótesis

La severidad de la periodontitis experimental es dependiente del perfil hormonal e inmunológico presentes durante la gestación en un modelo murino.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General:

Determinar el perfil de citocinas sistémicas y su impacto en el desarrollo de periodontitis experimental en ratones hembras gestantes BALB/c.

4.2 Objetivos Particulares:

1. Identificar los signos clínicos de inflamación provocado por periodontitis experimental por Nylon 6-0 entre los grupos de ratones hembras BALB/c gestantes con respecto al grupo de ratones no gestantes.
2. Observar histológicamente por tinciones H&E y tricrómica de Masson las diferencias de las características histopatológicas de la periodontitis experimental por ligadura de Nylon 6-0
3. Identificar por ELISA la expresión de citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL-6, e IL-10.
4. Identificar por inmunofluorescencia la presencia de metaloproteínasas MMP-2, MMP-13.

5. Materiales y Métodos:

5.1 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. El proyecto fue aprobado por la comisión de ética de FES-Iztacala No. CE/FESI/082014/1031, y por la Comisión de Bioseguridad de la FES-Iztacala en septiembre del 2014.

5.2 Animales. Se utilizaron ratones hembras de 8 semanas de edad de la cepa BALB/c WT obtenidos del Bioterio FES-I, los cuales fueron mantenidos en grupos de 5 animales por jaula, provistos de agua y alimento balanceado *ad libitum*.

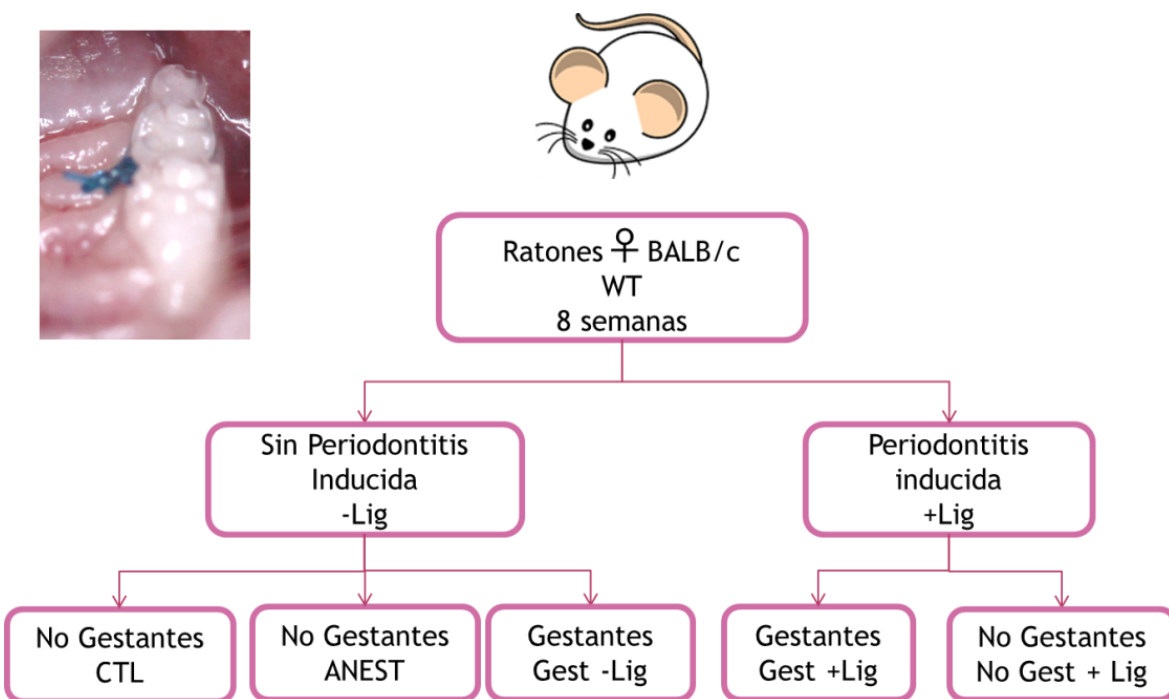


Fig. 17. Diagrama de Flujo de grupos experimentales. Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 8 semanas. Se separaron en dos grupos: 1) Sin Periodontitis Experimental (-Lig): a) Control (CTL), b) Anestesia (ANEST), c) Gestantes (Gest -Lig), 2) Con Periodontitis Experimental (+Lig), No Gestantes (Gest +Lig) y Gestantes (Gest +L).

5.3 Inducción de periodontitis. Se valoró periodontalmente bajo anestesia general (Anestesia, Xylacina: pre-anestésico, dosis ponderal 10 mg/kg, dilución 10%, 20 mg/1ml, 0.2mg/20g, I.M. Ketamina: anestésico, dosis ponderal 100 mg/kg, dilución 10%, 2 mg / 1 ml, 0.1mg/ 20 g I.M.(41). Para asegurar así que no presentaran signos de inflamación periodontal clínica. Posteriormente, se separaron en grupos, de 5 especímenes cada uno.

Dos grupos principales: 1) Sin periodontitis experimental (sin ligadura -Lig) y 2) con periodontitis experimental (con ligadura +Lig). El primer grupo sin ligadura se separó en tres bloques de 5 ratones cada uno: a) no gestante (CTL), b) Control anestesia (Anest), para determinar si los anestésicos tenían algún efecto en el desarrollo de la periodontitis, c) Gestante (Gest-Lig), para el segundo grupo, para inducir la periodontitis experimental, se colocó una sutura Nylon 6-0 (Ethicon) como variante a la técnica tradicional con seda 5-0 (60), como ligadura alrededor del segundo molar superior derecho, se separaron en 2 bloques de 5 ratones cada uno: a) hembras no gestantes con periodontitis inducida (No Gest +Lig) y b) Gestantes con periodontitis inducida (Gest +Lig) (Fig. 17).

Para la inducción de la periodontitis se colocaron ligaduras de sutura Nylon 6-0 (Ethicon) alrededor del segundo molar superior derecho (60, 67-69) bajo anestesia con xylacina y ketamina con ayuda de una mesa de trabajo y separadores diseñados para facilitar la visibilidad así como con el uso de magnificación (lupas, Heine, 2.3X), se esperó durante 2 semanas para que se estableciera la periodontitis, las ligaduras se verificaron cada semana (Fig. 18, 19, 20).



Fig. 18. Inducción de periodontitis experimental. a. Fotografía de los separadores de tejido, b. mesa de trabajo y posición de trabajo en la que se fijaba la orientación del cuerpo del ratón hembra para facilitar la visibilidad y manipulación, c. fotografía de la vista al estar los separadores colocados para proveer visibilidad directa.



Fig. 19. Inducción de periodontitis experimental. a. Material, pinzas, tijeras, sutura, mesa de trabajo, campos de trabajo, gotas lubricantes para ojos b. Fotografía que muestra la posición de trabajo: la cabeza del ratón colocada hacia el operador a las 12:00 h, sosteniendo extremidades con cinta de micropore (3M), la apertura oral se mantuvo con ligas de ortodoncia (ormco).

Fueron seleccionadas hembras con periodontitis establecida por dos semanas, fueron apareadas con los machos con la finalidad de que quedaran preñadas, se consideró la gestación a partir del tapón positivo (+) a 3 días. Otro grupo sin periodontitis también fue apareado, para formar los grupos gestantes (Gest +Lig y Gest -Lig).

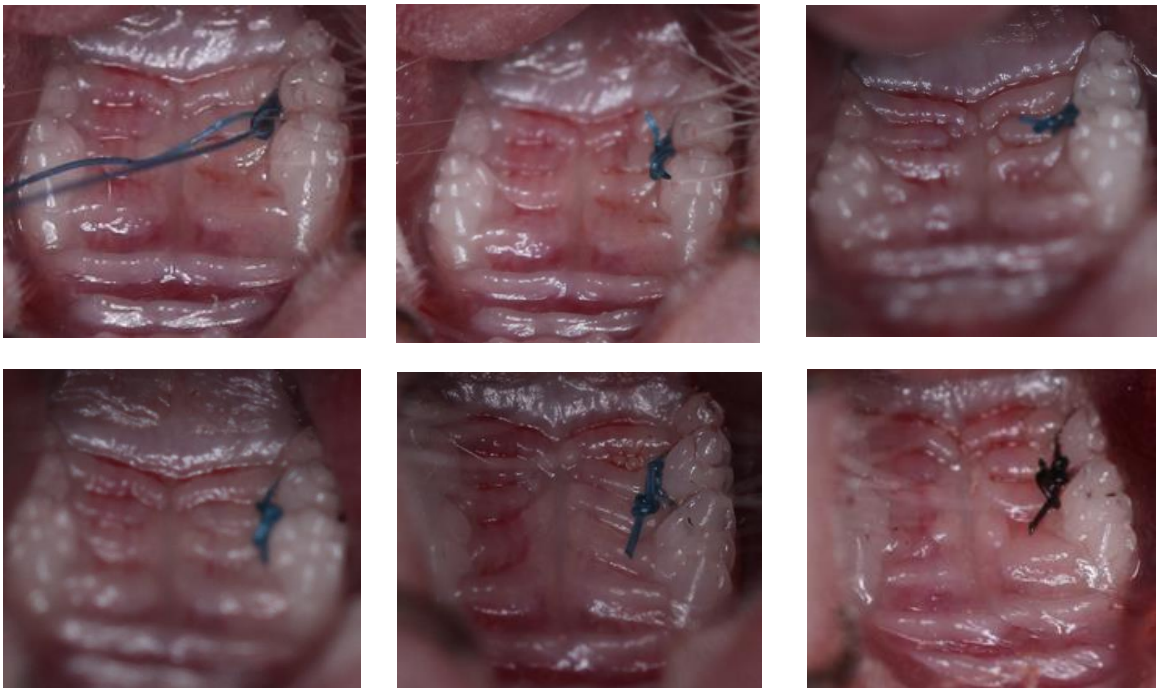


Fig. 20. Fotografías de ligaduras Nylon 6-0 colocadas en el segundo molar superior. Con el ratón anestesiado con ketamina y xylacina, se colocó en una mesa de trabajo y separadores especialmente diseñados para permitir la visibilidad, con ayuda de magnificación. La sutura se colocó de palatino a vestibular por distal y de vestibular a palatino por mesial, se anudó en palatino.

El tiempo de gestación en ratones que es de 19-21 días, entre 18.5 y 19.5 días en las hembras primíparas, y entre 19 y 21 en las múltíparas(70). Considerando las dos semanas de espera para el establecimiento de la periodontitis así como el tiempo de gestación y la lactancia, es decir, un total de 10 semanas, para todos los grupos, se tomaron muestras sanguíneas cada semana a todos los grupos experimentales (Fig. 21).

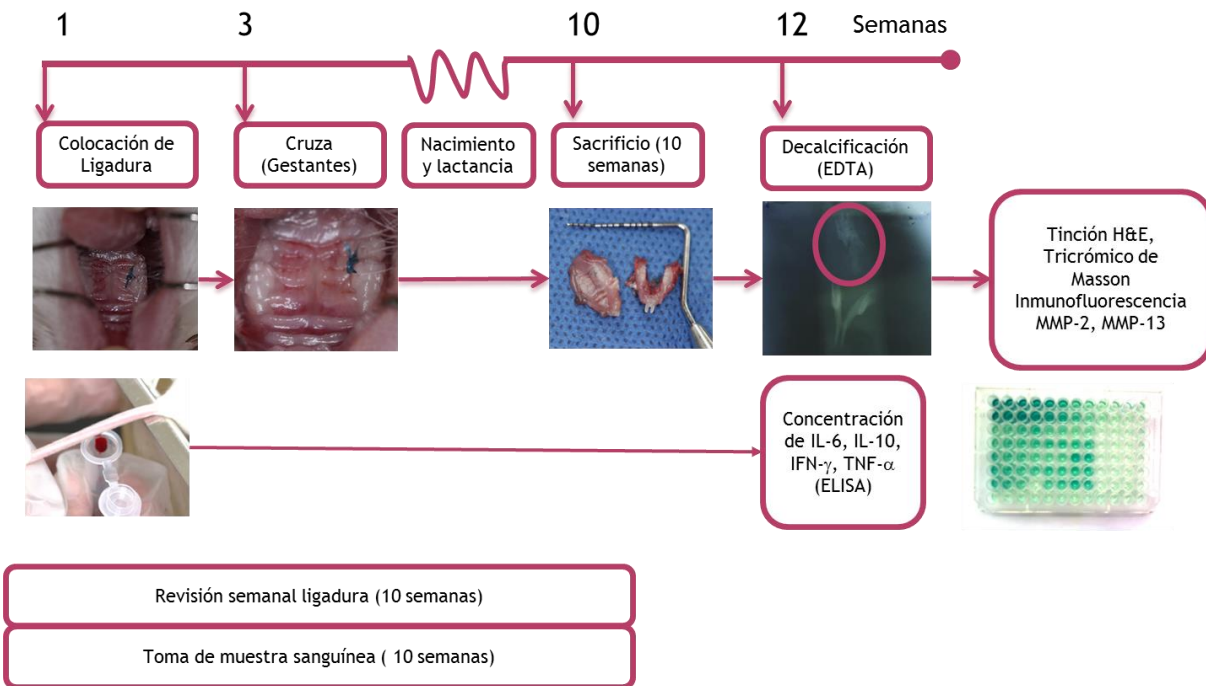


Fig. 21. Metodología. Línea del tiempo y metodología, todos los ratones hembra BALB/c de 8 semanas, fueron separados en grupos de 5 especímenes. A los grupos con ligadura se les colocó la sutura en la semana 1, se esperó 2 semanas para que se estableciera la periodontitis, en la semana 3 se inició la cruce de los grupos gestantes. Después de la gestación y la lactancia, o la décima semana para los grupos no gestantes, se realizó el sacrificio, se obtuvieron las maxilas, se realizó la fijación y decalcificación para después preparar los tejidos para realizar cortes de 5 micras, para tinciones H&E, Tricrómica de Masson e inmunofluorescencia. Cada semana se revisó la ligadura, y obtuvieron muestras sanguíneas por dilatación de vena caudal.

5.4 Obtención de Suero. A todos los grupos se les extrajo sangre *in vivo* por dilatación de la vena caudal una vez a la semana. La sangre se recuperó en microtubos de 1.5 ml, que fueron centrifugados a 2500 rpm, se recuperó el suero, se repitió el centrifugado, se recuperó nuevamente suero y se mantuvo en refrigeración a -70°C para su posterior utilización, las muestras se utilizaron para determinar las concentraciones de IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, por la técnica de ELISA (Peprotech-México) (Fig. 22).



Fig. 22. Obtención de Suero: a. Se obtuvo sangre venosa a través de la dilatación de vena caudal por goteo en un microtubo de 1.5 ml, b. Centrifugado a 2500 rpm de sangre total para separación de suero, al recuperar el sobrenadante de ratones BALB/c, c. Sueros que se utilizaron para medir citocinas IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ por ELISA.

5.5 Método ELISA. Se determinó la concentración de citocinas por medio de ELISA-sándwich en los sueros obtenidos de los ratones BALB/c (ELISA Development Kit para TNF- α (900-K54), IL-10 (900-K53), IL-6 (900-K50), IFN- γ (900-K98), PEPROTECH) Las placas de 96 pozos (nunc) se sensibilizaron con 50 μ l del anticuerpo de captura a una concentración de 2 μ g/ml de solución de Na₂HPO₄ (JT Baker) de pegado en cada pozo, se incubaron toda la noche a 4^o C, después de la incubación se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05%, posteriormente se bloqueó con PBS-BSA 1% en cada pozo con 100 μ l y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, terminado ese tiempo se lavaron 5 veces las placas con PBS-Tween 0.05%, posterior a ello se colocaron las citocinas con recombinante murino para realizar las curvas por duplicado en las dos primeras filas de pozos en la placa de ELISA, con una concentración inicial de 2000 pg/ml, se hicieron diluciones seriadas 1:2 y se dejó el ultimo pozo como blanco (22 pozos y 2 blancos).

En el mismo proceso en el resto de los pozos, se colocaron las muestras de sueros, en cada pozo se colocaron un mínimo de 25 μ l de muestra para cubrir el fondo de dicho pozo, se incubaron toda la noche a 4^o C, después de la incubación se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05% y se procedió a diluir el segundo anticuerpo, anticuerpo-biotinilado con PBS-BSA 1% a una concentración de 1 μ g/ml y se adicionaron 100 μ l en cada pozo y se incubó 1 hora a 37^oC, transcurrida la incubación se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05% y a cada pozo se le agregaron 100 μ l de cromóforo estreptavidina/peroxidasa (INC Biomedicals) diluida 1:1500 en PBS-BSA 1%, se incubó a temperatura ambiente 30 minutos, después se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05% y se reveló con el sustrato peróxido de hidrogeno ABTS (INC Biomedicals) con 100 μ l en cada pozo durante 30 min. Se leyeron las placas en un lector para ELISA (Mertertech S960) a una absorbancia de 405 nm,

todas las muestras se analizaron por duplicado. El desarrollo de color fue proporcional a la concentración de citocinas (Fig.23).

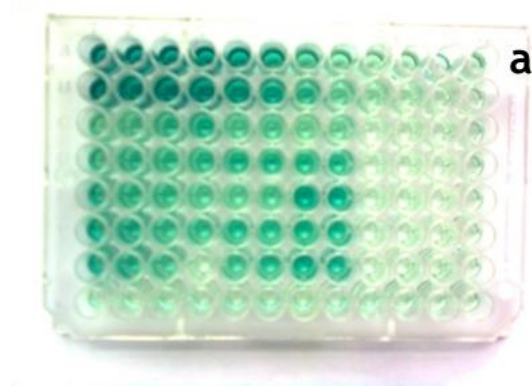


Fig. 23. ELISA: a Fotografía representativa de placa de ELISA, que muestra la reacción colorimétrica para determinar la concentración de citocinas IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , donde se observa en las primeras dos filas la curva de concentración por duplicado, gradientes 1:2 al blanco.

5.6 Sacrificio y obtención de maxilares.

Para poder unificar el tiempo entre los grupos con periodontitis, gestantes y no gestantes. Los grupos con periodontitis, con o sin gestación, así como el grupo sin periodontitis gestante, fueron sacrificados después de 10 semanas, considerando el tiempo a partir de la colocación de la ligadura. Los ratones control fueron sacrificados en los mismos tiempos que los grupos experimentales. El grupo de anestesia fue sacrificado una semana después de haber recibido anestesia. Al término de estos periodos se realizaron los sacrificios y se obtuvo una última muestra sanguínea a través de punción cardiaca.

5.7 Análisis histopatológico. Las maxilas fueron recuperadas y fijadas en solución de formol fresco al 4% (Sigma-Aldrich), descalcificadas en una solución de EDTA al 4% (Sigma –Aldrich), durante 18 días, posteriormente desecadas y embebidas en parafina, para realizar cortes de 5 micras. Se realizaron cortes secuenciales en la zona del segundo molar, aproximadamente 20 cortes. Se seleccionaron la laminilla 1 y 10 de cada uno de los especímenes de cada grupo y fueron teñidas con hematoxilina y eosina (Sigma-Adlrich), las siguientes fueron teñidas con la técnica tricrómica de Masson (Sigma-Adlrich).

Las laminillas fueron observadas en un microscopio óptico marca Carl Zeiss Axio Vert.A1, para hacer un análisis descriptivo de las características tisulares: epitelio del surco, células, vasos sanguíneos, fibras gingivales, fibras periodontales (principalmente crestales), presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio, altura e integridad de la cresta alveolar, considerando como referencia la unión cemento–esmalte.

Para determinar la pérdida del nivel de inserción, en las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina. Las laminillas fueron observadas en un microscopio. El análisis histométrico fue realizado con el programa ZEN 2 Blue edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011), considerando como referencia anatómica la unión cemento–esmalte y el punto más cercano de la cresta alveolar, se trazó una línea y se obtuvo la distancia entre ambos puntos, por vestibular y palatino, como fue referido por Semenoff (61).

Los cortes secuenciales siguientes de cada grupo fueron procesados para inmunofluorescencia para identificación de MMP-2 y MMP-13.

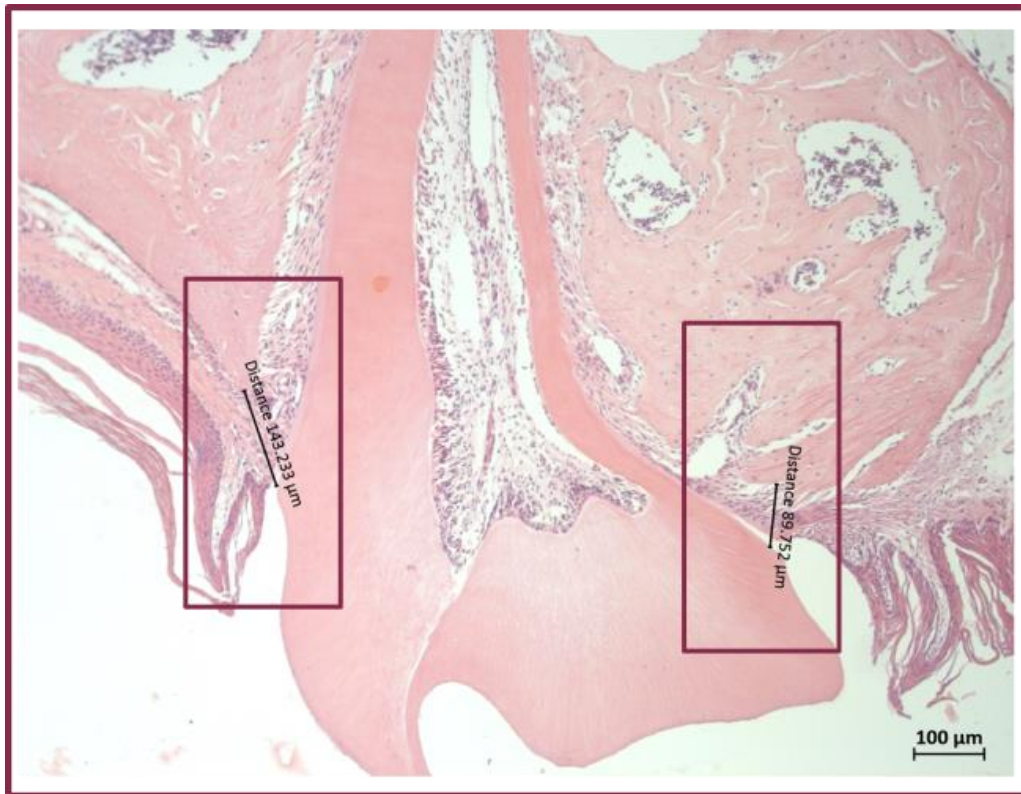


Fig. 24. Análisis histométrico de un corte histológico (10x) representativo de periodontitis experimental. En los cortes histológicos teñidos con H&E, se trazó una línea entre la UCE y la cresta alveolar, para obtener la distancia entre ambos puntos. En los diferentes grupos: a. Control (CTL), b. Anestesia (ANEST), c. Sin Ligadura Gestante (Gest -Lig), d. Con ligadura No Gestante (No Gest +Lig), e. Con ligadura Gestante (Gest +Lig)

5.8 Análisis estadístico: Las comparaciones de los niveles de citocinas, la pérdida de inserción y la fluorescencia de MMP-2 y MMP-13 entre los diferentes grupos considerados en este trabajo se llevaron a cabo mediante la prueba de ANOVA no paramétrico, además del post-test de Dunn, con el software Graphpad Prisma) utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95%. Se consideran significativas las comparaciones con valores de $P < 0.05$.

6. Resultados y discusión.

6.1 Signos clínicos entre los grupos experimentales.

Debido al tamaño de los tejidos, no fue posible evaluar los cambios clínicos de manera cuantitativa, sin embargo se pudo observar en los grupos con ligadura (Fig 25) cambios de coloración, edema, profundización del surco y sangrado, la foto de la derecha es normal.

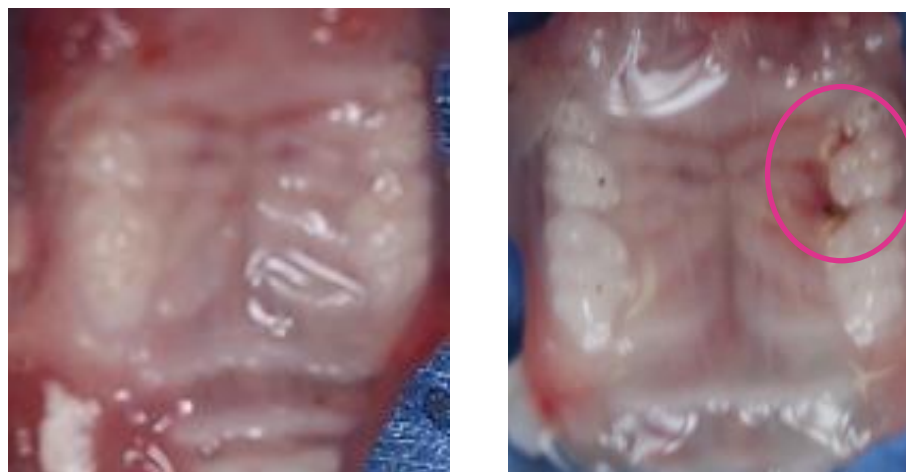


Fig. 25. Características clínicas de tejidos periodontales, representativo de periodontitis experimental. Se colocó una sutura nylon 6-0 alrededor del segundo molar superior derecho en ratones hembra BALB/c, durante 10 semanas, después fueron sacrificados y se obtuvo el maxilar, al retirar la sutura, fotografía de la izquierda, se observan los cambios clínicos de inflamación.

6.2 Determinación de la progresión de la periodontitis, histología con tinción eosina & hematoxilina.

El análisis descriptivo de las características tisulares fue:

Control (CTL), en este corte con aumento de 10X se observó el epitelio del surco, las fibras gingivales, las fibras periodontales, principalmente crestales, integras. El epitelio de unión se observó sin alteraciones, la cresta alveolar bien definida (Fig. 24a 10X). Se seleccionó la zona bajo el recuadro para verificar la integridad de los tejidos se observó a 40X y a 100X. Con el aumento de 40X se observaron las fibras de colágeno alineadas con núcleos, continuando de la papila hacia el ligamento periodontal. Con el aumento de 100X se observaron las zonas de inserción de las fibras de colágeno al cemento radicular, fibras de Sharpey, y los núcleos celulares bien definidos, sin cambios estructurales en la anatomía de la zona (Fig. 26 a 40X y 100X).

Control Anestesia (ANEST), en este corte, las características de los tejidos periodontales se observaron similares al control en los tres aumentos 10X, 40 X y 100 X (Fig. 26b), lo cual implica que la anestesia no generó ninguna alteración en las características histológicas del periodonto.

Sin Ligadura Gestante (Gest –Lig), en este corte con el aumento de 10X se observaron alteraciones leves en las características del epitelio del surco, sin cambios en la integridad en el grosor biológico y sin modificaciones en las características de la cresta ósea o en el grosor biológico, con el aumento de 40 X se observó integridad de la cresta ósea y distribución normal de las fibras de colágeno. Con 100X se observan características normales de fibras, núcleos alargados y menos definidos (Fig. 26c 10X, 40 y 100X).

Con Ligadura no Gestante (No Gest +Lig), con el aumento de 10X se observó la ligadura en la periferia de la corona anatómica y la pérdida de continuidad del margen gingival, no se observó el epitelio de unión y se encontraron alteraciones en el grosor biológico. Se identificó la pérdida de las crestas óseas, así como alteración en las características estructurales en el ligamento periodontal. Se observaron bolsas periodontales (Fig. 26d. 10X). Con el aumento de 40X se observó una distribución irregular de las fibras de colágeno, pérdida de la cresta ósea, invasión del tejido epitelial. Con el aumento 100X no se observan núcleos en todo el campo (Fig. 24d 40X y 100X)

Con Ligadura Gestante (Gest +Lig), a 10X, aunque no se observó la ligadura, se identificaron zonas de destrucción tisular, se observaron alteraciones estructurales causadas por la pérdida de integridad, pérdida del grosor biológico y la adherencia epitelial, migración apical y formación de bolsas periodontales (Fig. 26e 10X). A 40 X se observaron fibras con distribución irregular, la cresta ósea irregular en una posición apical. En el aumento 100X se observó la migración de tejido epitelial en contacto con el cemento radicular y las fibras paralelas a la raíz así como la ausencia de núcleos. (Fig. 24 e 40X y 100X)

Para determinar el nivel de inserción (figs. 26a – 26e 10X recuadro), se trazó una línea considerando como referencia la unión cemento–esmalte a la cresta alveolar, para obtener la distancia en las zonas palatina y vestibular, en todos los cortes analizados, 2 por espécimen, el primero y el décimo, de cada muestra y 5 muestras por grupo.

Se determinaron las distancias y fueron analizados en el software Graphpad Prisma 6 por ANOVA no paramétrica y post-test de Dunn.

No hubo diferencias significativas entre los grupos control, anestesia y gestación sin ligadura, en ambas mediciones palatina y vestibular, lo cual concuerda con las características histológicas, que no muestran alteraciones en las estructuras periodontales, posición de la adherencia epitelial y el grosor biológico (Fig. 27).

Sin embargo, en palatino para el grupo no gestante con ligadura obtuvieron diferencias significativas: con respecto al grupo control, con una diferencia en distancia de la cresta alveolar a la UCE entre ambos grupos de 23.23 nm para una diferencia significativa de $P=0.01^{**}$, con el grupo Anestesia un diferencial de 22.35 nm para una diferencia significativa con $P=0.05^{*}$ y con el grupo Gestante con ligadura una diferencia de 25.20 nm para una diferencia significativa con una $P=0.01^{**}$ como se observa en las gráficas (Fig. 27).

En vestibular, el mismo grupo No gestante con ligadura tuvo diferencia significativa con una $P=0.0001^{****}$ en comparación con el grupo control, mientras que con el grupo de Anestesia tuvo una diferencia significativa de $P=0.01^{**}$, y con respecto al grupo Gestante con Ligadura una diferencia significativa de $P=0.05^{*}$ (Fig. 27).

Histológicamente se apreció un aumento en la distancia de la UCE y la cresta alveolar en presencia de la ligadura, lo cual representa la pérdida de inserción, independientemente de la gestación o no. Al comparar los grupos con ligadura, se observó una menor pérdida de inserción durante la gestación. Esto puede deberse a que la periodontitis expresa un perfil infamatorio (Th1) mientras que la gestación expresa un perfil anti-inflamatorio (Th2).

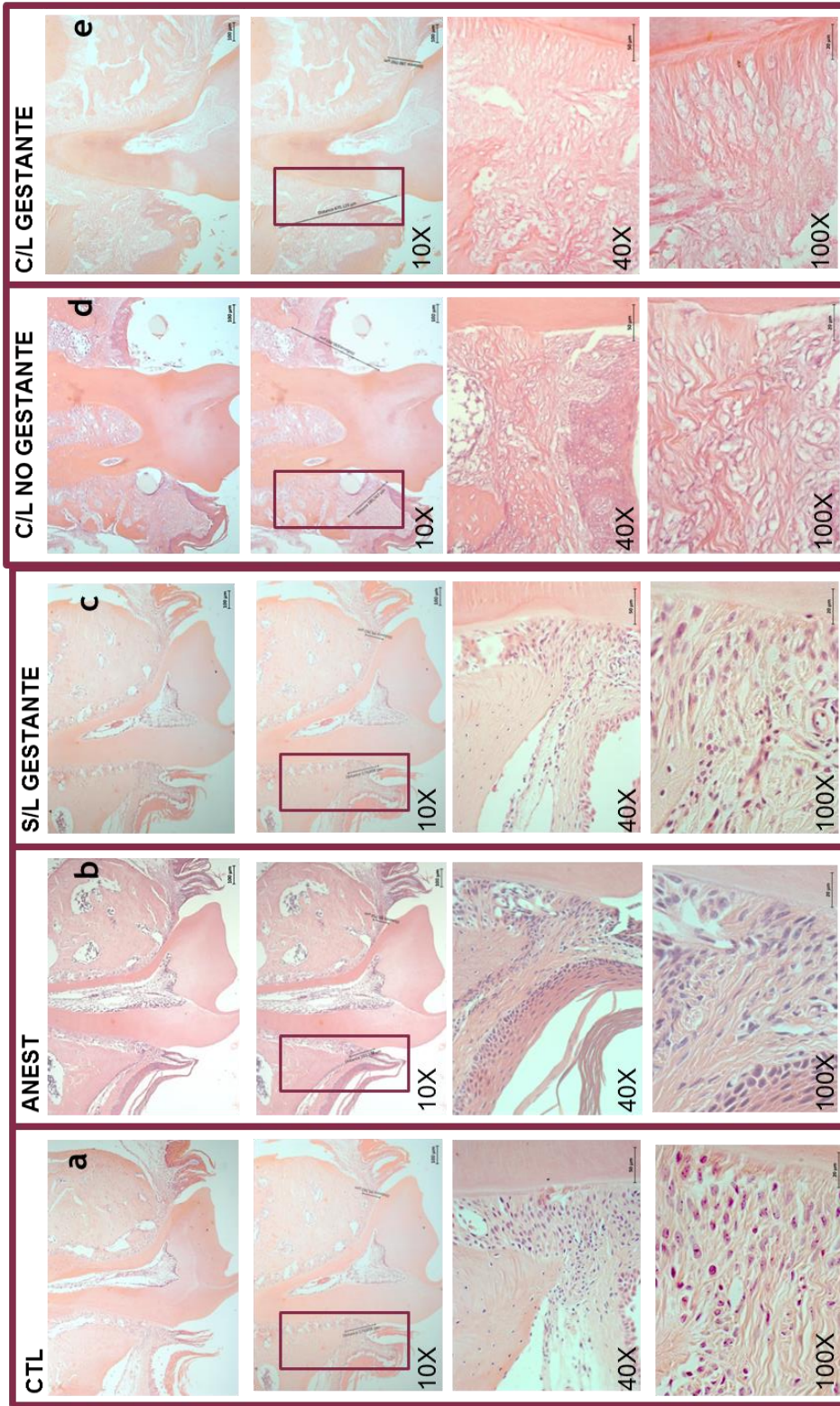


Fig. 26. Comparación del nivel de inserción. Cortes histológicos teñidos con H&E. Se obtuvieron los maxilares de ratones con y sin la colocación de ligadura de nylon 6.0 alrededor del segundo molar, la medición del nivel de inserción se muestra en la fila superior, al trazar una línea de la UCE a la cresta ósea a 10X a. CTL, b. ANEST, c. Sin Ligadura Gestante (Gest -Lig) d. Con ligadura No Gestante (No Gest +Lig), e. Con ligadura Gestante (No Gest +Lig).

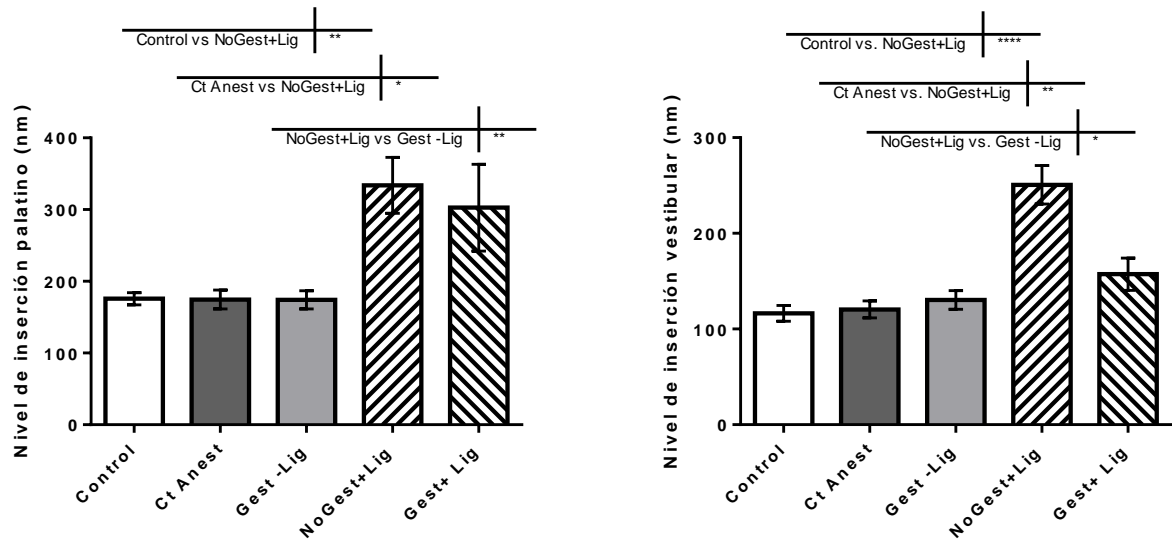


Figura 27. Comparación del nivel de inserción, palatino y vestibular. Se obtuvieron los maxilares de ratones con y sin la colocación de ligadura nylon 6-0 alrededor del segundo molar la medición del nivel de inserción, se muestran los datos obtenidos de la medición de la distancia al trazar una línea de la UCE a la cresta ósea. a. Control, b. Anestesia (Ct Anest), c. Gestante sin ligadura (Gest -Lig), d. No Gestante con ligadura (Gest +Lig), e) Gestante con ligadura (Gest + Lig).

6.3 Determinación de fibras de colágeno, histología con tinción tricrómica de Masson.

El análisis descriptivo de las características tisulares fue:

En laminillas de las series, 2 y 11, los cortes fueron teñidos con la técnica de Masson, (Figs.28 a – e superior), observados y fotografiados a aumento de 10X. Se identificaron las zonas representativas, señaladas en el recuadro. Posteriormente se observaron a un aumento de 40X y 100X (figs. 28a – e inferior), en las que se observaron las características del colágeno denso (azul), laxo (verde) y núcleos en negro, queratina y epitelio (rojo).

En la figura 28a a 10X, puede apreciarse que el grupo control (CTL) se mantuvo sin alteraciones la disposición del epitelio, se observa el tejido epitelial en el surco y la encía marginal, respetando los límites anatómicos, a 40X se observó las fibras de colágeno denso en el tejido conectivo en la inserción del grosor biológico, con una disposición perpendicular al eje longitudinal del diente las cuales se continúan hacia el ligamento periodontal, a 100X se observan los núcleos celulares bien distribuido (en color negro) (Fig. 28 inf).

En el grupo con anestesia (ANES) se observó una distribución del tejido similar al grupo CTL. A 10X se observa la distribución del tejido conectivo y epitelial respetando los límites anatómicos. A 40 X se observan las fibras de colágeno denso (azul) bien definidas, a 100X se observa la presencia de núcleos abundantes (negro) e integridad del grosor biológico (Fig. 28b)

En el grupo Gestante sin ligadura (Gest –Lig) a 10X se observó una distribución irregular del surco, con una aparente profundización del mismo, a 40X se observó menor cantidad de fibras de colágeno denso (azul), y mayor proporción de fibras de colágeno laxo (verde) con una distribución irregular, a 100X se observó una distribución de fibras y núcleos irregular, al comparar las características de las figuras con periodontitis experimental sin alteraciones en la constitución y anatomía de los tejidos (Fig. 28c inf).

En el grupo No Gestante Con Ligadura (No Gest –Lig), a 10 X se observó pérdida de la integridad del tejido, pérdida de inserción, migración apical del epitelio, así como de las características estructurales normales, a 40X se observó disminución en la proporción de colágeno denso (azul) con respecto a la cantidad de colágeno laxo (verde), así como una distribución irregular de las fibras del ligamento, a 100X no se observaron núcleos (negro), y se observó tejido epitelial en la periferia del tejido conectivo (fig. 28d).

En el grupo Con Ligadura Gestante (C/L G) a 10 X se observó la presencia de bolsa periodontales profundas, sin unión entre periodonto y raíz, por otro lado se observó la migración apical del epitelio (rojo), a 40X no se observaron fibras de colágeno con distribución normal, se observó fragmentado y separado del tejido radicular, a 100X no se observaron núcleos, se observó tejido epitelial rodeando al tejido conectivo. (Fig. 29e). Las características estructurales son las más alteradas de todos los grupos.

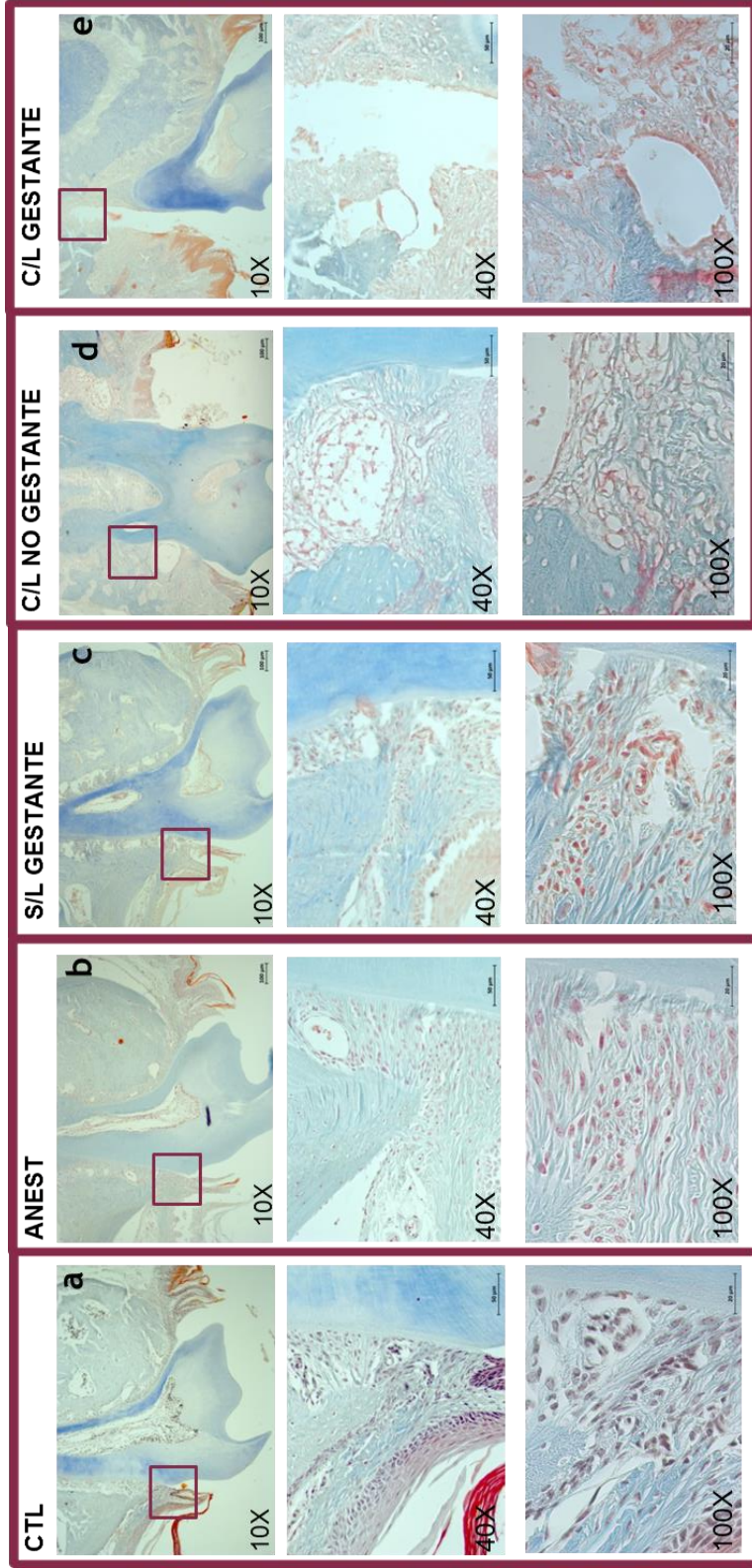


Fig. 28. Características del Colágeno. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico, en cortes seriados de los 5 grupos experimentales, se identificaron zonas representativas a 10 X, fig. 10a – e superior, señaladas en el recuadro, dichas zonas se observaron a 40X, para identificar: colágeno denso (azul), colágeno laxo (verde), queratina (rojo) y núcleos (negro), queratina y epitelio (rojo).

6.4 Determinación de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-13, por inmunofluorescencia

Una vez que se identificó la diferencia en la calidad de colágeno en los cortes con ligadura, se escogieron 2 enzimas degradantes de matriz celular: MMP-2 y MMP-13. Se realizaron con los cortes secuenciales siguientes (3 Y 7) las inmunofluorescencia para MMP-2 (K-20: sc-8835 Santa Cruz Biotechnology) y MMP-13 Antibody (NBP1-45723 Novus Biologicals), en ambas se utilizó la tinción de HOTCH, para identificar núcleos y se analizaron con el microscopio Confocal (Leica, SP2), se marcaron 20 áreas para determinar la fluorescencia expresada en las diferentes muestras, para realiza un análisis estadístico.

Estudios previos Hernández 2006 (54), Sapna 2014(53) refieren, que MMP-2 se encuentra expresada a niveles bajos en tejidos sanos, y se expresa mayormente durante la embriogénesis e inclusive durante la odontogénesis, además participa en la reparación de heridas. Lo que nosotros observamos es que no existe diferencia en la expresión de MMP-2 entre los grupos CTL y Anest (Figs 29a-b, Fig 30).

Se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de MMP-2 en el grupo Gestante sin ligadura (Gest –Lig), al compararlo con los grupos Control con una $P=0.001^{***}$ y Anestesia con una $P=0.01^{**}$, se observa la mayor expresión de MMP2 (fig 29c y 30).

La expresión de MMP-2 disminuyó en el grupo Gestante Con Ligadura (Gest +Lig) y presentó diferencias significativa con una $P =0.0001^{****}$ al compararlo con los grupos No Gestante Con Ligadura (Gest +Lig) y Gestante sin Ligadura (Gest –Lig), también presentó diferencia significativa de $P=0.001^{***}$ al compararlo contra el grupo Control, todos tuvieron una mayor expresión de MMP-2, (Fig 29 d, Fig 30).

El aumento en la expresion de MMP-2, se esperaba en la presencia de la ligadura, sin embargo la disminución de su expresión con el doble estímulo ligadura – gestación podría explicarse por la presencia de hormonas sexuales, las cuales se encuentran aumentadas durante la gestación. Sin embargo, no tenemos los datos de las variaciones hormonales.

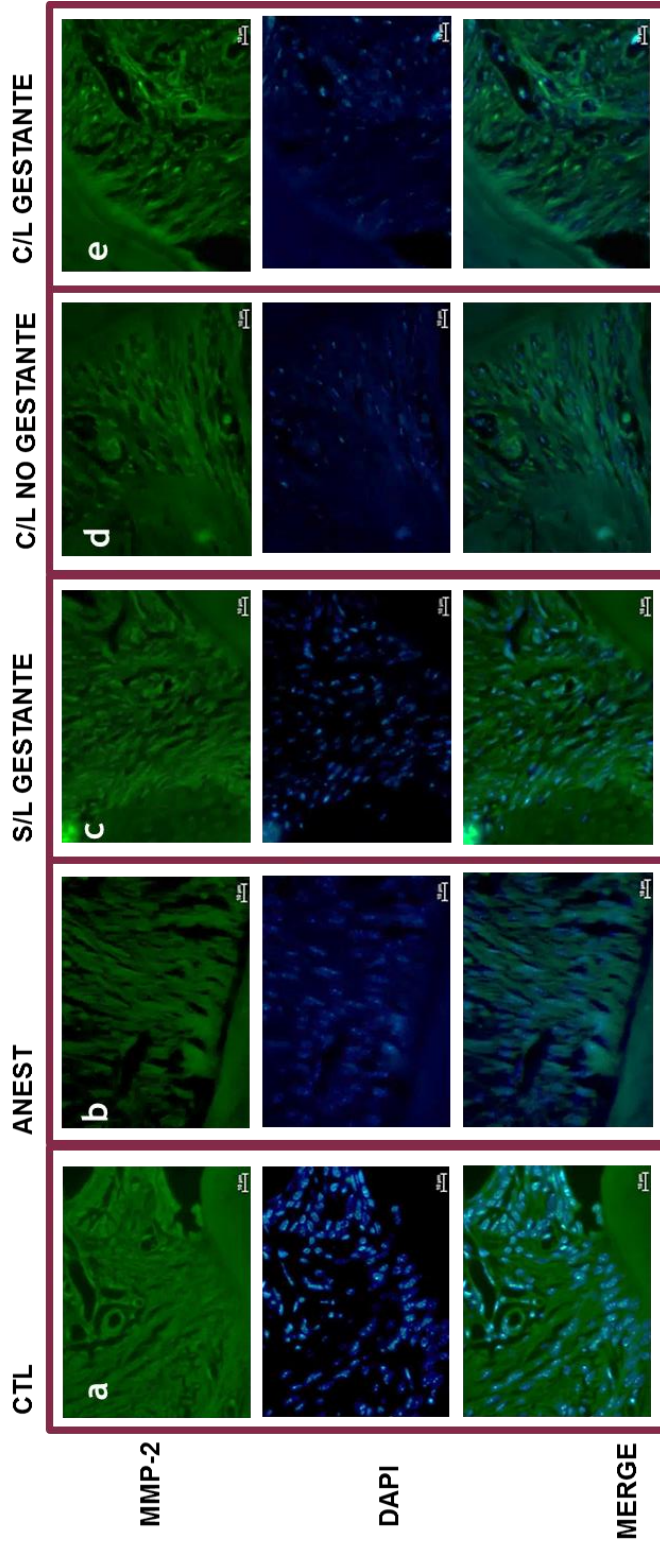


Fig. 29. Expresión de MMP-2. Una vez identificadas las características de colágeno, se analizó la expresión por fluorescencia de MMP2. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico, en cortes seriados de los 5 grupos experimentales, a. Control (CTL), b. Anestesia (ANEST), c. Gestante Sin Ligadura (Gest -Lig), d. No Gestante Con ligadura (No Gest +Lig), e. Gestante Con ligadura (Gest +Lig). Se observa la expresión de MMP-2, núcleos con DAPI y Merge.

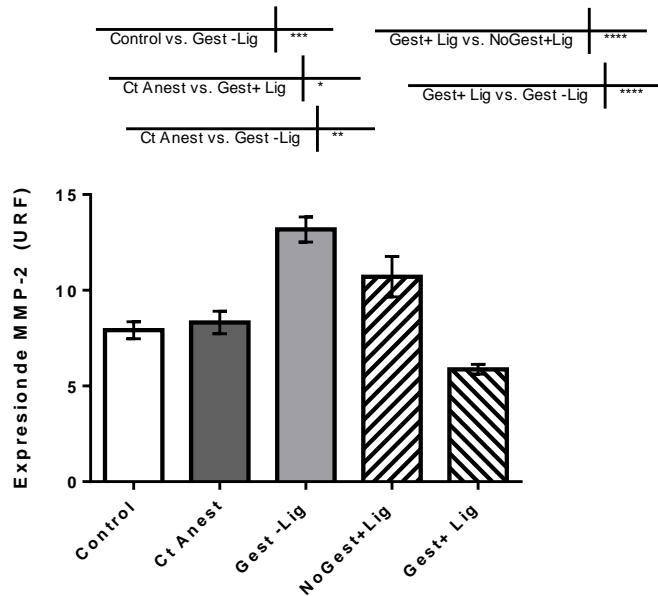


Fig. 30. Expresión de MMP-2. Cuantificación de la expresión de MMP-2 por medio de la fluorescencia relativa, comparación entre grupos. Control (CTL), Anestesia (ANEST), Gestante Sin Ligadura (Gest –Lig), No Gestante Con ligadura (No Gest +Lig), Gestante Con ligadura (Gest +Lig). Se observa la expresión de MMP-2. La diferencia entre los grupos *P=0.05, **P=0.01, *** P=0.001, ****P=0.0001

La expresión de MMP-13 en otros estudios ha sido reportada como aumentada en enfermedad periodontal activa, Sapna, 2014(53). En el caso de MMP-13, observamos diferencias entre los grupos Control (CTL) y Anestesia (ANEST) con una P=0.05 (Fig. 31 a-b, Fig 32).

Observamos un aumento en la expresión de MMP-13 con una diferencia significativa de P=0.001**** en el grupo No Gestante sin ligadura (No Gest -Lig), comparada con los grupos Control, Gestante con Ligadura (Gest +Lig) y Gestante sin Ligadura (Gest –Lig), al igual que Hernández(54), nosotros observamos este incremento en el grupo con ligadura (Fig. 31 c, Fig 32).

Por otro lado la disminución de la expresión de MMP-13 durante la gestación, puede relacionarse a lo reportado por Liang, 2016 (55), quien reporta disminución de la expresión de MMP-13 en presencia de estrógeno E2 e IL-1β. Sin embargo, se requiere de la determinación de la expresión de los genes de MMP-2 y MMP-13 a través de qRT-PCR con niveles normalizados de GADPH así como los niveles hormonales.

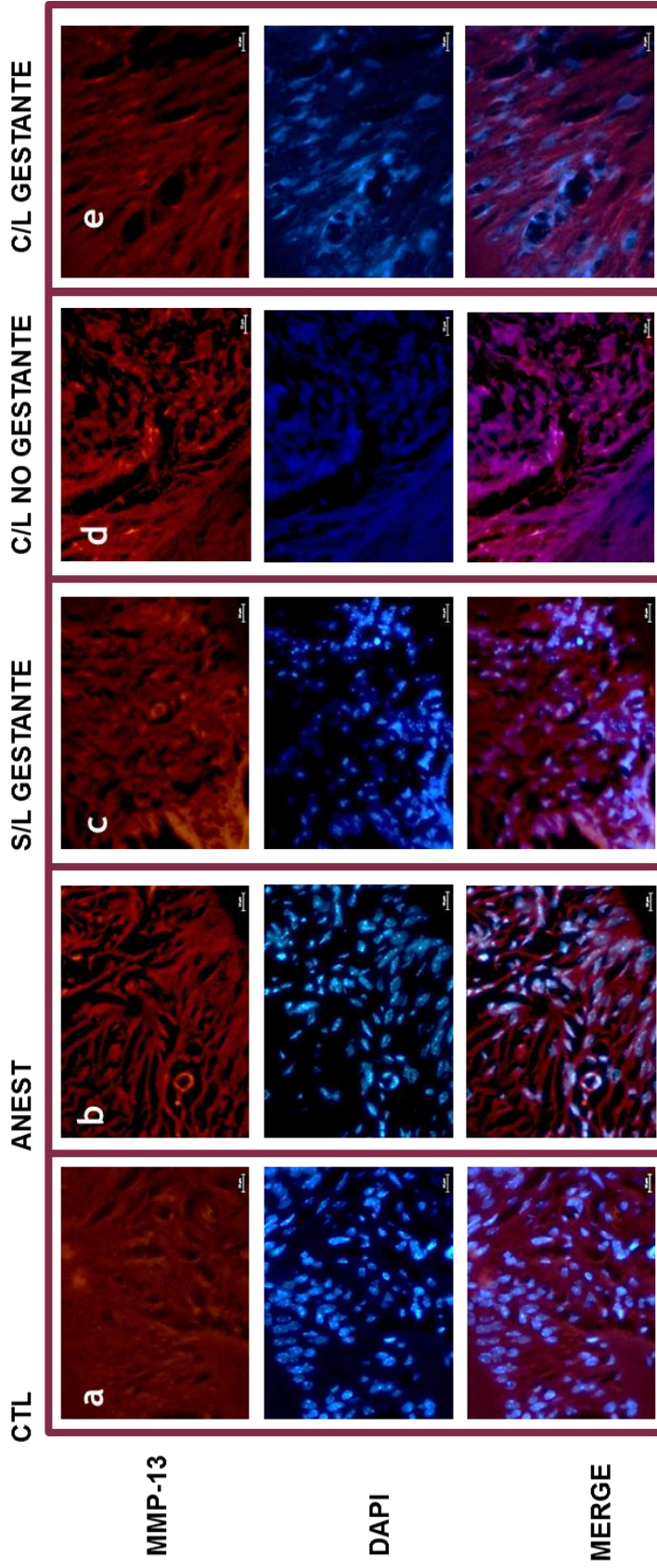


Fig. 31. Expresión de MMP-13. Una vez identificadas las características de colágeno, se analizó la expresión por fluorescencia de MMP13. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico, en cortes seriados de los 5 grupos experimentales, a. Control (CTL), b. Anestesia (ANEST), c. Gestante Sin Ligadura (Gest -Lig), d. No Gestante Con ligadura (No Gest +Lig), e. Gestante Con ligadura (Gest +Lig). Se observa la expresión de MMP-13, núcleos con DAPI y Merge.

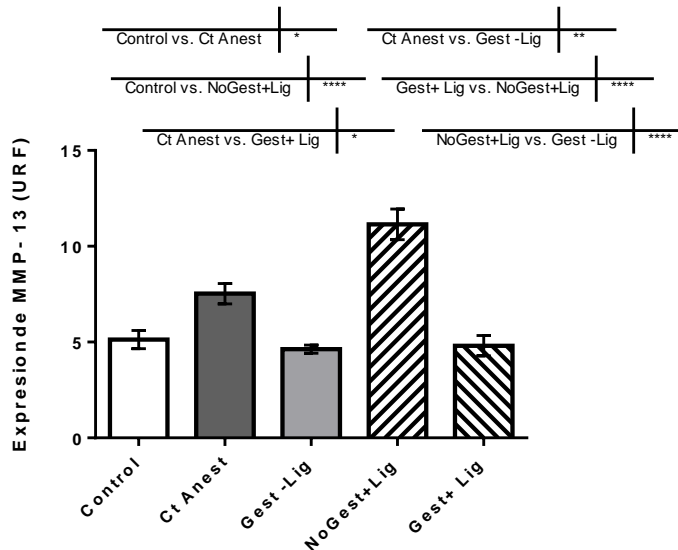


Fig. 32. Expresión de MMP-13). Cuantificación de la expresión de MMP-13 por medio de la fluorescencia relativa, comparación entre grupos. Control (CTL), Anestesia (ANEST), Gestante Sin Ligadura (Gest -Lig), No Gestante Con ligadura (No Gest +Lig), Gestante Con ligadura (Gest +Lig). Se observa la expresión de MMP-2. La diferencia entre los grupos *P=0.05, **P=0.01, *** P=0.001, ****P=0.0001

6.5 Niveles de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en suero, por el metodo de ELISA.

Los niveles de las citocinas IL-6, TNF- α , INF- γ e IL-10 fue determinado en los sueros de los grupos experimentales. Para los grupos gestantes se recolectaron y analizaron los sueros en 2 momentos durante la gestación y después de la gestación (Fig. 33 - 36).

La IL-6 se observó sin diferencias entre los grupos control y anestesia, sin embargo se encontró aumentada más del doble en el grupo No Gestante con ligadura (No Gest +Lig) con una diferencia de P=0.05* en comparación al grupo control (CTL), con respecto al grupo Gestante con Ligadura durante presenta una diferencia significativa con una P=0.05*, y con respecto al grupo Gestante ligadura después presenta una diferencia significativa con una P=0.001***. Por el contrario se observó disminuida en el grupo con Ligadura gestante (C/L G). El aumento de la IL-6 en el grupo con ligadura está claramente asociado a la inflamación generada por la misma. Sin embargo la presencia de la ligadura en el grupo gestante no impactó en el aumento de ésta citocina, posiblemente por la carga hormonal durante la gestación asociada a un perfil anti-inflamatorio (Fig. 33).

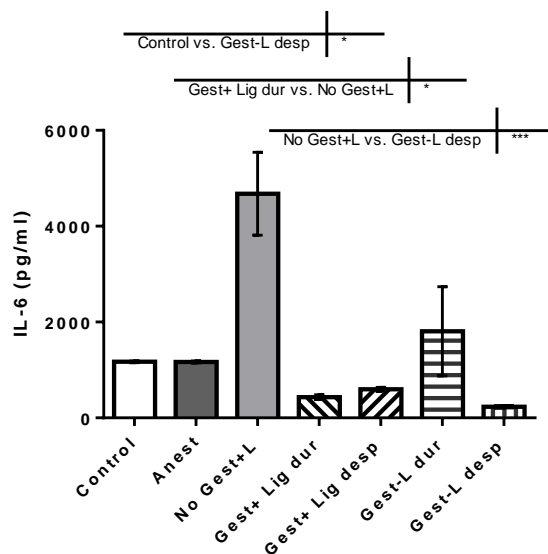


Fig. 33. Concentración de IL-6 en suero. Cuantificación de la concentración de IL-6 y comparación entre los cinco grupos. Control (CTL), Anestesia (ANEST), Gestante Sin Ligadura (Gest –Lig), No Gestante Con ligadura (No Gest +Lig), Gestante Con ligadura (Gest +Lig). Los grupos Gestantes en dos momentos: Durante la gestación y Después de la gestación. La diferencia entre los grupos *P=0.05, *** P=0.001.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de la IL-10, de ninguno de los grupos, aunque se observó una tendencia al aumento de la concentración en el grupo sin Ligadura Gestante durante y al final de la gestación. Sin embargo, con la ligadura, la expresión de IL-10 se mantuvo cercana a los niveles basales. Los niveles similares a los CTL en presencia de la Ligadura podrían explicarse por el desarrollo de la periodontitis experimental que favorece la inflamación (Fig.34).

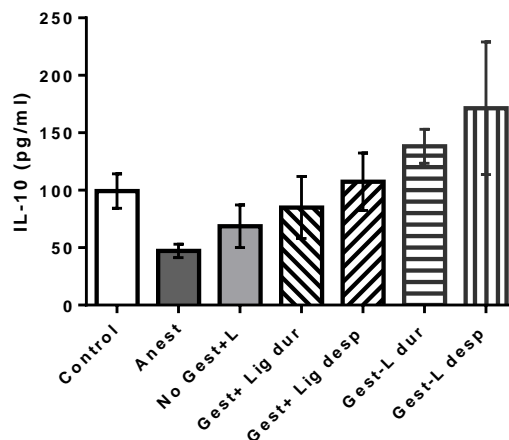


Fig. 34. Concentración de IL-10 en suero. Comparación de la concentración de IL-10 en el suero de los diferentes grupos Control (CTL), Anestesia (ANEST), Gestante Sin Ligadura (Gest –Lig), No Gestante Con ligadura (No Gest +Lig), Gestante Con ligadura (Gest +Lig). Los grupos Gestantes en dos momentos: Durante la gestación y Después de la gestación.

En cuanto a TNF- α , no se obtuvo una diferencia significativa, sin embargo, observamos cierta tendencia al aumento de su expresión al final de la gestación sin ligadura, la expresión de TNF- α , en el grupo con ligadura, es ligeramente mayor al control y se mantiene con la gestación (Fig. 35).

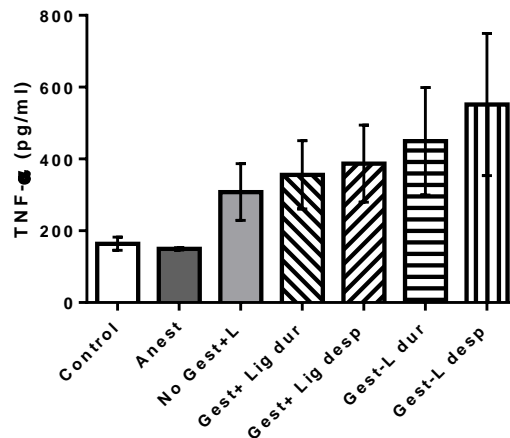


Fig. 35. Concentración de TNF- α en suero. Comparación de la concentración de TNF- α en el suero de los diferentes grupos Control (CTL), Anestesia (ANEST), Gestante Sin Ligadura (Gest -Lig), No Gestante Con ligadura (No Gest +Lig), Gestante Con ligadura (Gest +Lig). Los grupos Gestantes en dos momentos: Durante la gestación y Después de la gestación.

En relación a IFN- γ no se observaron diferencias entre los grupos control y anestesia, aunque se observó una tendencia al aumento en la expresión de IFN- γ , solamente se obtuvieron diferencias significativas con relación al grupo Gestante Con Ligadura durante (Gest +Lig durante) en comparación con los grupos Control y Anestesia con una $P=0.05$. La tendencia elevada en el grupo de Con Ligadura Gestante se mantiene después de la gestación, por lo tanto mantiene la inflamación, mientras que en el grupo Sin Ligadura Gestante la concentración aumenta durante la gestación, pero disminuyó considerablemente al final de la gestación (Fig. 36).

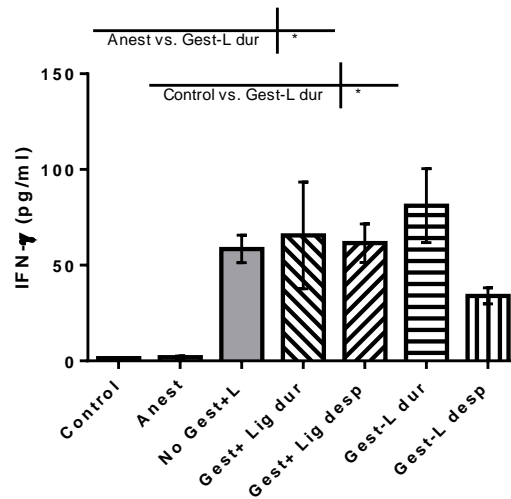


Fig. 36. Concentración de INF- γ en suero. Comparación de la concentración de INF- γ en el suero de los diferentes grupos Control (CTL), Anestesia (ANEST), Gestante Sin Ligadura (Gest -Lig), No Gestante Con ligadura (No Gest +Lig), Gestante Con ligadura (Gest +Lig). Los grupos Gestantes en dos momentos: Durante la gestación y Después de la gestación. La diferencia entre los grupos *P=0.05.

7. CONCLUSION:

En el presente trabajo logramos establecer la periodontitis experimental de manera efectiva con una modificación de la técnica reportada por Abe, 2013 (60), colocando una sutura de nylon 6-0 en lugar de la sutura de seda 5-0 tradicionalmente utilizada, con la utilización del Nylon logramos los mismos resultados de manera constante.

La colocación de la ligadura nos permitió establecer parámetros de destrucción muy similares a los reportados por Semenoff, 2008 (61). La presencia de la ligadura tuvo una influencia importante sobre el desarrollo y severidad de la periodontitis experimental. El análisis histológico de los diferentes grupos mostró que no hubo diferencia entre los grupos control, Anestesia y Gestantes sin ligadura.

En nuestras observaciones y resultados la presencia de la ligadura mostró diferencias significativas y destrucción mayor que en los grupos Control y Anestesia independientemente de la gestación. Sin embargo, estos cambios se observaron menores en el grupo Gestación con Ligadura.

Esto podría estar asociado a lo reportado por Sapna, 2014 (53) quien reportó una sobre-expresión de la metaloproteinasa MMP-2 y MMP-13 en enfermedad periodontal. Posiblemente la severidad de la periodontitis estuvo influida por el perfil de citocinas anti-inflamatorias al inicio y durante la gestación. Se requiere profundizar en el patrón de citocinas ya que nosotros no obtuvimos diferencias significativas en los perfiles sistémicos, por lo que se podría realizar la determinación local de las citocinas y de MMP's por qRT-PCR con niveles normalizados de GADPH e identificar el perfil hormonal, para tratar de relacionar estos cambios con la gestación.

8. ANEXO 1

8.1 Análisis histopatológico:

Al final de la gestación, cuatro semanas después, las madres fueron sacrificadas en cámara de CO₂, las maxilas fueron recuperadas y fijadas en solución de formol fresco al 4% (Sigma-Aldrich), descalcificadas en una solución de EDTA al 4% (Sigma –Aldrich), desecadas y embebidas en parafina, para realizar cortes de 5 micras. Se realizaron cortes secuenciales en la zona del segundo molar, aproximadamente 20 cortes. Se seleccionaron la laminilla 1 y 10 de cada uno de los especímenes de cada grupo y fueron teñidas con hematoxilina y eosina (Sigma-Adlrich), así como con la técnica tricrómica de Masson (Sigma-Adlrich).

8.2 Tren de deshidratación e inclusión el día 18

Alcohol 60% (Macron Fine Chemicals)	40 min
Alcohol 70% (Macron Fine Chemicals)	40 min
Alcohol 80% (Macron Fine Chemicals)	40 min
Alcohol 90% (Macron Fine Chemicals)	40 min
Alcohol 96% (Macron Fine Chemicals)	40 min
Alcohol amílico	20 min
Aceite de cedro	2 días
Tren de Inclusión	
Parafina- aceite	12 hrs
Parafina refinada de histología I (Paramex)	12 hrs
Parafina refinada de histología II (Paramex)	12 hrs
Parafina de inclusión Paraplast (Leica)	

8.3 Cortes Histológicos

Se realizaron cortes con el micrótopo (Leica), de 5µm de espesor, se colocaron en portaobjetos con Poly-L lisina y fijando con Ruyter, con dos cortes cada uno, secuenciales, en los cuales se realizó la observación al microscopio para ubicar el área interproximal entre el tercer y segundo molar, se obtuvieron 20 portaobjetos de cada bloque, se iniciaron tinciones de manera escalonada 1 y 11 con hematoxilina y eosina (Sigma-Adlrich) y siguiente de cada serie con tinción de Masson (Sigma-Adlrich).

8.4 Tinción H&E

Xilol I (JT Baker)	5 min
Xilol II (JT Baker)	5 min
Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals)	5 min
Alcohol etílico 96% (Macron Fine Chemicals)	5 min
Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals)	5 min
Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals)	5 min
Agua destilada	5 min
Hematoxilina de Harris (Hycel Reactivos Químicos)	5 min
Agua corriente	10 seg
Alcohol ácido: Alcohol al 70% (Macron Fine Chemicals) + 1% de HCl (JT Baker) Pasteur)	10 seg (chorreo con pipeta)
Agua destilada	Enjuagar
Agua amoniacal: H2O destilada + 1% hidróxido de amonio (JT Baker)	30 seg
Agua destilada	Enjuagar
Eosina	2 min
Agua destilada	Enjuagar
Alcohol etílico 96% (Macron Fine Chemicals)	Lavar por chorreo con pipeta Pasteur
Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals)	30 seg

Xilol (JT Baker)	5 min	
Montar con resina entellán (Merck KGaA)		
8.5 Tinción tricrómica de Masson		
Xilol I (JT Baker)	5 min	
Xilol II (JT Baker)	5 min	
Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals)	5 min	
Alcohol etílico 96% (Macron Fine Chemicals)	5 min	
Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals)	5 min	
Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals)	5 min	
Agua destilada	5 min	
Bowin ambiente	48hrs	temperatura
Agua corriente (x2)	2.5 min (enjuagar en agitación)	
Hematoxilina de Weigert	8 min	
Agua destilada	5 min	
Rojo escarlata (Sigma-Adrich)	8 min	
Agua destilada	5 min	
Ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico (Sigma-Aldrich)	8 min	
Azul anilina (Sigma-Aldrich)	8 min	
Ácido acético (JT Baker)	3 min (cambiar cada uso)	
Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals)	30 seg	
Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals)	30 seg	
Alcohol etílico 96% (Macron Fine Chemicals)	30 seg	
Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals)	15 seg	
Xilol (JT Baker)	5 min	
Montar con resina entellán (Merck KGaA)		

8.6 Técnica de inmunofluorescencia

Xilol I (J.T. Baker)	3 min
Xilol II (J.T. Baker)	1 min
Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals)	1 min
Alcohol etílico 90% (Macron Fine Chemicals)	1 min
Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals)	1 min
Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals)	1 min
Agua destilada	3 min
PBS 1X (3 veces)	1 min
PBS-Tritón X-100 (0.5%)	5 min
PBS 1X (2 veces)	1 min
Albumina sérica bovina 1X en PBS	120 min
Lavar con PBS-Tritón X-100 (0.5%) (3 veces)	1 min
PBS 1X (2 veces)	1 min
Incubar con 1er anticuerpo	Dejar toda la noche a 4°C
PBS 1X (2 veces)	1 min
Incubar con 2º anticuerpo fluoresceinado	2 hrs a 37°C
PBS 1X (2 veces)	1 min
Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals)	1 min
Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals)	1 min
Alcohol etílico 90% (Macron Fine Chemicals) (2 veces)	1 min
Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals)	1 min
Xilol I (J.T. Baker)	3 min
Xilol II (J.T. Baker)	5 min
Montar con resina entellán (Merck KGaA)	

8.7 Citocinas

ELISA Development Kit para TNF- α (900-K54), IL-10 (900-K53), IL-6 (900-K50), IFN- γ (900-K98), PEPROTECH.

MMP-13 Antibody (NBP1-45723) Novus Biologicals

MMP-2 (K-20): (sc-8835) Santa Cruz Biotechnology

Rhodamine Red X-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IGG (H+L) Jackson ImmunoResearch

Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey anti-Goat IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch

Bibliografía

1. Slavkin HC. Does the mouth put the heart at risk? *J Am Dent Assoc.* 1999 Jan;130(1):109-13.
2. Webb DA, Mathew L, Culhane JF. Lessons learned from the Philadelphia Collaborative Preterm Prevention Project: the prevalence of risk factors and program participation rates among women in the intervention group. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014 Nov 01;14:368.
3. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996 Oct;67(10 Suppl):1041-9.
4. Enwonwu CO, Salako N. The periodontal disease-systemic health-infectious disease axis in developing countries. *Periodontol 2000.* 2012 Oct;60(1):64-77.
5. Jensen J, Liljemark W, Bloomquist C. The effect of female sex hormones on subgingival plaque. *J Periodontol.* 1981 Oct;52(10):599-602.
6. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol 2000.* 2003;32:59-81.
7. Rose L, Genco R, Cohen W. *Periodontal Medicine. Periodontal Medicine and the female patient.* BC Decker Inc Canada. 2000:162-5.
8. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976 Mar;34(3):235-49.
9. Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontal Res.* 1975 Nov;10(5):243-55.
10. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology.* 1992 May;76(1):42-7.
11. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med.* 1994 Sep;23(8):347-53.
12. Lindhe J, Lang N, Karring T. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Blackwell Publishing. 2008;1,2.
13. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000.* 2000 Oct;24:9-27.
14. Melfi R, Alley K. *Permar's Oral embryology and microscopic anatomy.* Lippincott Williams & Wilkins. 1994.
15. Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. *Carranza Periodontología clínica.* Mc Graw Hill. 2010.
16. Bartold PM, Narayanan AS. *Biology of the Periodontal Connective Tissues.* Quintessence Publishing Co, Inc. 1998.
17. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology. Development, Structure, and Function.* Mosby Elsevier. 2008.
18. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol.* 1999 Apr;70(4):457-70.
19. Liu YCG, Lerner UH, Teng YTA. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000.* 2010;52(1):163-206.
20. 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.
21. Khan SA, Kong EF, Meiller TF, Jabra-Rizk MA. Periodontal Diseases: Bug Induced, Host Promoted. *PLoS Pathog.* 2015 Jul;11(7):e1004952.

22. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013 May;7(5):1016-25.
23. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 2011 Nov 17;10(5):497-506.
24. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009 Sep;54 Suppl 1:S2-10.
25. Ebersole JL, Dawson DR, 3rd, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, Gonzalez OA. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontol 2000.* 2013 Jun;62(1):163-202.
26. Diabetes and periodontal diseases. Committee on Research, Science and Therapy. American Academy of Periodontology. *J Periodontol.* 2000 Apr;71(4):664-78.
27. Mariotti A, Mawhinney M. Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Periodontology 2000.* 2013;61(1):69-88.
28. Wu M, Chen S-W, Su W-L, Zhu H-Y, Ouyang S-Y, Cao Y-T, et al. Sex Hormones Enhance Gingival Inflammation without Affecting IL-1 β and TNF- α in Periodontally Healthy Women during Pregnancy. *Mediators of inflammation.* 2016;2016.
29. Sultan C, Loire C, Kern P, Fenard O, Terraza A. [Collagen and steroid hormones]. *Ann Biol Clin (Paris).* 1986;44(3):285-8.
30. Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Hakansson L. Lymphocyte subsets and mitogen stimulation of blood lymphocytes in normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1996 Feb;35(2):70-9.
31. Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, Neben AL, Fanger CM, Khoury RM, et al. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine.* 1998;188(9):1593-602.
32. O'Neil TC. Plasma female sex-hormone levels and gingivitis in pregnancy. *J Periodontol.* 1979 Jun;50(6):279-82.
33. Kornman KS, Loesche WJ. The subgingival microbial flora during pregnancy. *Journal of periodontal research.* 1980;15(2):111-22.
34. Garcia RI, Henshaw MM, Krall EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontology 2000.* 2001;25(1):21-36.
35. Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity.* 1982;35(1):256-63.
36. Knight G, Bryan Wade A. The effects of hormonal contraceptives on the human periodontium. *Journal of periodontal research.* 1974;9(1):18-22.
37. Urteaga Mamani N, Challapa Licio W, Cortez J. Inmunología de la Implantación. *Revista SCientífica.* 2006;4:48.
38. Raghupathy R, editor. *Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm.* Seminars in immunology; 2001: Elsevier.
39. Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, Waters TP, Mathew L, Chung EK, et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine.* 2011;53(2):170-7.
40. Rico-Rosillo M, Robledo G. Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obs Mex.* 2012;80(5):332-40.
41. Hawk T, Leary SL, Morris TH. *Formulary for laboratory animals.* Blackwell Publishing. 2005.

42. Matalaka KZ, Ali DA. Stress-induced versus preovulatory and pregnancy hormonal levels in modulating cytokine production following whole blood stimulation. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12(6):366-74.
43. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*. 1990 Apr 13;248(4952):220-3.
44. King A, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, Verma S, et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *European journal of immunology*. 2000;30(6):1623-31.
45. Szekeres-Bartho J, Chauat G, Kinsky R. A progesterone-induced blocking factor corrects high resorption rates in mice treated with antiprogesterone. *Am J Obstet Gynecol*. 1990 Oct;163(4 Pt 1):1320-2.
46. Varner MW, Meehan RT, Syrop CH, Strottmann MP, Goplerud CP. Pregnancy in patients with systemic lupus erythematosus. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1983;145(8):1025-40.
47. Brazao V, Kuehn CC, dos Santos CD, da Costa CM, Junior JC, Carraro-Abrahaoo AA. Endocrine and immune system interactions during pregnancy. *Immunobiology*. 2015 Jan;220(1):42-7.
48. Offenbacher S, Lieff S, Boggess KA, Murtha A, Madianos P, Champagne C, et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Annals of periodontology*. 2001;6(1):164-74.
49. Cascales Angosto M, Angel Alvarez-Gomez J, editors. *Metalloproteinases, extracellular matrix and cancer*. ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA; 2010: REAL ACAD NACIONAL FARMACIA FARMACIA, 9 Y 11, MADRID, SPAIN.
50. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
51. Kinane DF. Regulators of tissue destruction and homeostasis as diagnostic aids in periodontology. *Periodontology 2000*. 2000;24(1):215-25.
52. Butler GS, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of signaling molecules to regulate inflammation. *Periodontol 2000*. 2013 Oct;63(1):123-48.
53. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral Dis*. 2014 Sep;20(6):538-50.
54. 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.
55. Liang Y, Duan L, Xiong J, Zhu W, Liu Q, Wang D, et al. E2 regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes. *Arthritis research & therapy*. 2016;18(1):1.
56. Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *MEDICINA (Buenos Aires)*. 2012;72(6):495-502.
57. Sorsa T, Tervahartiala T, Leppilahti J, Hernandez M, Gamonal J, Tuomainen AM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. *Pharmacological research*. 2011;63(2):108-13.
58. Martuscelli G, Fiorellini JP, Crohin CC, Howell TH. The effect of interleukin-11 on the progression of ligature-induced periodontal disease in the beagle dog. *J Periodontol*. 2000 Apr;71(4):573-8.
59. Tariq M, Iqbal Z, Ali J, Baboota S, Talegaonkar S, Ahmad Z, et al. Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. *Int J Pharm Investig*. 2012 Jul;2(3):106-22.

60. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013 Aug 30;394(1-2):49-54.
61. Semenoff TA, Semenoff-Segundo A, Bosco AF, Nagata MJ, Garcia VG, Biasoli ER. Histometric analysis of ligature-induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes. *J Appl Oral Sci*. 2008 Jul-Aug;16(4):251-6.
62. Horobin RW, J.A. K. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine. Garland/BIOS Scientific Publishers. 2002.
63. Ho SP, Kurylo MP, Fong TK, Lee SS, Wagner HD, Ryder MI, et al. The biomechanical characteristics of the bone-periodontal ligament-cementum complex. *Biomaterials*. 2010;31(25):6635-46.
64. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 1999;26(6):335-40.
65. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*. 1991 Jan;62(1):59-73.
66. Heijl L, Wennstrom J, Lindhe J, Socransky SS. Periodontal disease in gnotobiotic rats. *J Periodontal Res*. 1980 Jul;15(4):405-19.
67. 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 Dec;38(6):543-50.
68. 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.
69. 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.
70. Gordillo Aguilar AG. Validación de un método para la detección de la gestación mediante la determinación del peso corporal en ratones de la cepa Balb/C. 2013.