



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL EFECTO DEL
OMEGA-3 EN UN MODELO DE PERIODONTITIS
MURINA

TESIS DE LICENCIATURA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:
SOLIS SUÁREZ DIANA LAURA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. GARCÍA HERNÁNDEZ ANA LILIA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	4
ACRÓNIMOS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCION	8
1.1. PERIODONTITIS.....	9
1.1.2. <i>Epidemiología</i>	9
1.1.3. <i>Clasificación</i>	9
1.1.4. <i>Etiopatogénesis</i>	11
1.2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA INMUNE EN LA PROGRESIÓN DE LA PERIODONTITIS	13
1.3. MECANISMOS DE DESTRUCCIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA PERIODONTITIS.....	18
1.4. AGENTES FARMACOLÓGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN PERIODONTAL	20
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	23
2.1. ÁCIDOS GRASOS O3 Y PERIODONTITIS	23
HIPÓTESIS	26
JUSTIFICACIÓN.....	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. ANIMALES	28
3.2. SUPLEMENTO ALIMENTICIO CON OMEGA 3	29
3.3. CEPA BACTERIANA	29
3.4. INDUCCIÓN DE PERIODONTITIS.....	29
3.5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	30
3.6. MEDICIÓN DE LA PÉRDIDA ÓSEA ALVEOLAR	30
3.7. HISTOLOGÍA	31
3.8. IDENTIFICACIÓN DEL GRADO INFLAMATORIO.....	32
3.9. EVALUACIÓN DE LAS FIBRAS DE COLÁGENA Y VASOS SANGUÍNEOS.....	33
3.10. INMUNODETECCIÓN DE METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.....	34
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	36
4.1. EL SUPLEMENTO ALIMENTICIO CON O3 DISMINUYE LA DESTRUCCIÓN ÓSEA ALVEOLAR	36

4.2. EL O3 REDUCE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS INFLAMATORIAS EN LA PERIODONTITIS.....	36
4.3. EL O3 EVITA LA DEGRADACIÓN EXCESIVA DE LAS FIBRAS DE COLÁGENA.....	40
4.4. SUPLEMENTAR LA DIETA CON O3 REDUCE EL EDEMA Y PROMUEVE LA REPARACIÓN PERIODONTAL.....	43
4.5. EL SUPLEMENTO ALIMENTICIO CON O3 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE MMP-9.....	46
4.6. EL O3 INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE MMP-2.	49
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Clasificación de la Periodontitis AAP, 1999.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Modelo de etiopatogénesis de la PC propuesto por Kornman, (1997).</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3. Mecanismos que participan en la inflamación periodontal (Elaboración propia).</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4. Esquema que resume la metodología utilizada.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 5. Microfotografías de los hemimaxilares teñidos con H y E.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 6. Microfotografías de los cortes teñidos con Sirius Red. Para la evaluación de las fibras de colágena42</i>	
<i>Figura 7. Microfotografías representativas de la caracterización del estado de los vasos sanguíneos en los diferentes grupos.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 8. Microfotografías representativas de la expresión de MMP-9 en los diferentes grupos de estudio. .</i>	<i>48</i>
<i>Figura 9. Microfotografías representativas de la expresión de MMP-2 en los diferentes grupos de estudio ..</i>	<i>51</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Puntos de referencia para la medición de la pérdida ósea alveolar</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 2. Escala de Inflamación histológica.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 3. Parámetros para la evaluación de fibras de colágena.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4. Anticuerpos utilizados para la IHQ</i>	<i>35</i>

ÍNDICE DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1. Cambios en la destrucción ósea alveolar.</i>	<i>38</i>
<i>Gráfico 2. Incidencia del estado de inflamación periodontal.</i>	<i>40</i>
<i>Gráfico 3. Incidencia de la calidad de las fibras de colágena.</i>	<i>43</i>
<i>Gráfico 4. Cambios en el estado de los vasos sanguíneos. El grupo con PC presenta una mayor cantidad de número de vasos sanguíneos y congestiónamiento de estos en comparación con grupo Sano.</i>	<i>46</i>
<i>Gráfico 5. Intensidad de expresión de MMP-9 en el periodonto.</i>	<i>49</i>
<i>Gráfico 6. Intensidad de la expresión de MMP-2.....</i>	<i>52</i>

ACRÓNIMOS

AAP	Academia Americana de Periodontología
ALA	Ácido Alfa Linoléico
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EP	Enfermedad Periodontal
H & E	Hematoxilina y Eosina
LGC	Líquido gingival crevicular
LPS	Lipopolisacáridos
MEC	Matriz Extracelular
MMP's	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
N/A	No Aplica
O3	Omega 3
O6	Omega 6
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Periodontitis Agresiva
PC	Periodontitis Crónica
PDB	Placa dentobacteriana
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PMN	Polimorfonucleares
PUFA's	Polyunsaturated Fatty Acids (Ácidos Grasos Poliinsaturados)
RvE1	Resolvina E1
Treg	Linfocitos T reguladores
VEGF	Factor de crecimiento Vascular

RESUMEN

Introducción: La periodontitis crónica (PC) es un padecimiento inflamatorio de origen multifactorial, iniciado por la proliferación de bacterias patógenas y sus productos, no obstante, se ha señalado que los mediadores inflamatorios producidos de forma excesiva por la activación de la respuesta inmune del huésped son los principales responsables de la destrucción severa de los tejidos periodontales. En múltiples estudios se ha reportado que gran parte del daño periodontal, es causado por las metaloproteinasas de la matriz (MMP's) entre las que destacan en el periodonto la MMP-2 y MMP-9, cuya constante activación acelera la degradación de la matriz extracelular. En años recientes, se ha establecido la necesidad de modular el proceso inflamatorio como parte fundamental del tratamiento periodontal a través de terapias que busquen no solo disminuir la destrucción de los tejidos de soporte del diente, sino que permitan su óptima recuperación. En este sentido se ha estudiado el uso de ácidos grasos omega-3 (O3) los cuales son obtenidos de la dieta y que se ha visto poseen potentes propiedades inmunoreguladoras. Por esta razón es importante evaluar si su uso tiene algún efecto sobre la expresión de la MMP-2 y MMP-9 así como en la destrucción de los tejidos periodontales. **Objetivo:** Evaluar histológicamente el efecto de los ácidos grasos omega-3 (n-3 PUFA) en la destrucción e inflamación periodontal en un modelo de periodontitis murina. **Metodología:** 24 ratones C57BL/6 fueron divididos en 4 grupos: Sanos (S), Sanos con suplemento alimenticio con O3 (O3), Periodontitis crónica (PC) y con PC con suplemento alimenticio con O3 (PC+O3), a los ratones que les correspondía el suplemento alimenticio se les administraron ácidos grasos O3 (DHA+EPA) por 70 días, a los grupos correspondientes se les indujo PC realizando una ligadura en los segundos molares superiores adjunto con la inoculación de *Porphyromonas gingivalis*. Se analizó la destrucción de hueso alveolar por medio de tinción con azul de metileno. Se realizaron cortes histológicos y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H & E) para determinar el grado inflamatorio, se realizó la tinción con Sirius Red para evaluar las fibras de colágena y de los vasos sanguíneos. Por último, se realizó inmunohistoquímica para MMP-2 y MMP-9. **Resultados:** El suplemento alimenticio con O3 reduce la pérdida del hueso alveolar durante la periodontitis, así como el infiltrado inflamatorio en los tejidos adyacentes a los segundos molares. Evitó la degradación excesiva de las fibras de colágena en el periodonto y disminuyó el edema y promovió la reparación tisular. Disminuyó la expresión de MMP-9 y aumentó la expresión de MMP-2 en el periodonto. **Conclusiones:** El suplemento de la dieta con O3 reduce la inflamación y la destrucción de los tejidos en la periodontitis murina.

ABSTRACT

Introduction: Chronic periodontitis (CP) is an oral inflammatory disease of multifactorial origin, initiated by the proliferation of pathogenic bacteria and their products. However, it has been noted that the inflammatory mediators produced excessively during the immune host response, are the main responsible for the severe destruction of the periodontal tissues. In multiple studies, it has been reported that most of the damage suffered by tissues during CP, is caused by matrix metalloproteases (MMP's), among which MMP-2 and MMP-9 are the most common and whose constant activation accelerates the degradation of the extracellular matrix. In recent years, the necessity of modulating the inflammatory process has been established as a fundamental part of periodontal treatment, through therapies that seek not only to decrease the destruction of the supporting tissues of the tooth but also to allow its optimal recovery. In this sense, the use of omega-3 (O3) fatty acids which are obtained through diet has been studied and have demonstrated powerful immunoregulatory properties. For this reason, it is important to evaluate if its use has any effect on the expression of MMP-2 and MMP-9 as well as on periodontal tissues destruction. **Objective:** To evaluate histologically the effect of omega-3 fatty acids (n-3 PUFA) in periodontal inflammation and destruction in a periodontitis murine model. **Method:** 24 C57BL / 6 mice were divided into 4 groups: healthy (S), healthy with food supplement with O3, chronic periodontitis (PC) and with PC and dietary supplement with O3 (PC + O3). S+O3 and Pc+O3 groups, received O3 fatty acids nutritional supplement (DHA + EPA) for 70 days. Ligatures were placed in the upper second molars together with the inoculation of *Porphyromonas gingivalis* in PC and PC+O3 groups. The destruction of alveolar bone was analyzed by staining with methylene blue. Hematoxylin and Eosin stains (H & E) were used to determine the inflammatory degree, Fast Green with Sirius Red to evaluate the state of the collagen fibers and blood vessels. Immunohistochemistry to observe MMP-2 and MMP-9 expression. **Results:** Omega-3 dietary supplement reduces alveolar bone loss during periodontitis and inflammatory infiltrate in second molar adjacent tissues. Prevents excessive degradation of periodontal fibers, decreases edema and promotes tissue healing. Enhances MMP-2 expression and reduces MMP-9 in periodontium **Conclusions:** O-3 dietary supplement reduces inflammation and destruction of periodontal tissues.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) es una patología crónica de la cavidad oral que comprende un grupo de condiciones inflamatorias, mismas que afectan las estructuras de soporte de los tejidos dentales (1). Es provocada inicialmente por la presencia de bacterias patógenas y sus productos en la superficie dental.

LA EP se divide en dos grupos principales: la gingivitis y la periodontitis. La primera, se considera un estado inicial, limitado a los tejidos blandos. El tratamiento oportuno de la gingivitis es reversible y tiene un pronóstico favorable. Por otro lado, la periodontitis, es un estado avanzado e irreversible, caracterizado por la destrucción de múltiples estructuras del periodonto como el hueso alveolar, que conlleva a la pérdida de los dientes.

El impacto de la placa dental y los biofilms sobre la etiología de las enfermedades que afectan el periodonto ha sido estudiado ampliamente a lo largo de los años. Es decir, durante décadas la periodontitis se ha considerado como una consecuencia de la acción de grupos de bacteria específicos, y se han diseñado protocolos que se basan ampliamente en la remoción de las bacterias patógenas y terapias antibióticas.

Sin embargo, los descubrimientos recientes han llevado a los investigadores a cuestionar si la proliferación de bacterias en contacto con los tejidos periodontales es la única causa para el desarrollo de la periodontitis; particularmente la evidencia que demuestra que la respuesta inmune inflamatoria del huésped juegan un papel importante en el desarrollo y progreso de la enfermedad (2).

En otras palabras, existe un impacto simbiótico entre la susceptibilidad de la respuesta inmune de cada persona, y la acción de los microorganismos tanto comensales como patógenos sobre dicha respuesta, lo anterior lleva a la destrucción de los tejidos periodontales, incluyendo la pérdida de hueso alveolar (2).

1.1. PERIODONTITIS

La periodontitis es un padecimiento de la cavidad oral de origen multifactorial que incluye procesos infecciosos e inflamatorios crónicos, estos afectan los tejidos de soporte del diente tales como las encías, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar; es decir, la placa dentobacteriana (PDB) inicia y mantiene la inflamación; y la continuidad del proceso inflamatorio favorece la formación de bolsas periodontales, la pérdida de inserción de las fibras periodontales y por último la destrucción del hueso alveolar ocasionando la pérdida eventual de los órganos dentarios (3, 4).

1.1.2. Epidemiología

La periodontitis crónica es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como la segunda enfermedad bucal con mayor prevalencia a nivel global, y aparece como la sexta enfermedad inflamatoria crónica más común en cabeza y cuello en el reporte *The Global Burden of Disease* (4).

Pese a la falta de cifras exactas, se estima que entre el 10 % y el 15% de la población adulta mundial padece algún tipo de periodontitis (5).

En términos generales, la periodontitis representa un problema de salud pública a nivel mundial y pese a que se han promovido múltiples estrategias para su prevención, la influencia de diversos factores como la edad, las adicciones, el estrés, los cambios hormonales, el sexo, una higiene oral deficiente, entre otros, aumentan de manera significativa el riesgo de padecer periodontitis (6).

Adicionalmente, la periodontitis guarda una estrecha relación con enfermedades sistémicas como la obesidad, la diabetes mellitus e hipertensión lo cual puede agravar el estado de quien la padece (7).

1.1.3. Clasificación

La Academia Americana de Periodontología (AAP) en 1999, introdujo la clasificación para la periodontitis, misma que hoy en día se ha usado ampliamente para el diagnóstico de

esta enfermedad. Dicha clasificación propone dos principales grupos para la enfermedad: periodontitis crónica (PC) y periodontitis agresiva (PA) (Figura 1) (8).

La PC es la forma más común de este padecimiento y se presenta principalmente en adultos. El término crónico hace referencia a la lenta progresión de la patología; esta forma se subclasifica en localizada o generalizada dependiendo el porcentaje de sitios que presentan la enfermedad (<30% vs >30% respectivamente), y su severidad se determina con base en la pérdida de la inserción clínica del ligamento periodontal, que se designa como leve (1-2 mm), moderada (3-4 mm) o severa (>5 mm) (9).

En el caso de la PA existe una rápida evolución de la enfermedad con destrucción severa de los tejidos periodontales en pacientes con escasos agentes causales locales o sistémicos. Se subclasifica de igual forma que la PC (10).

El sistema de clasificación de la AAP toma en consideración factores como la edad de establecimiento de la enfermedad, la apariencia clínica de la misma, la tasa de progresión de la enfermedad, la flora microbiana patógena y las enfermedades sistémicas. La figura 1

muestra las subdivisiones de la PC, según la AAP.

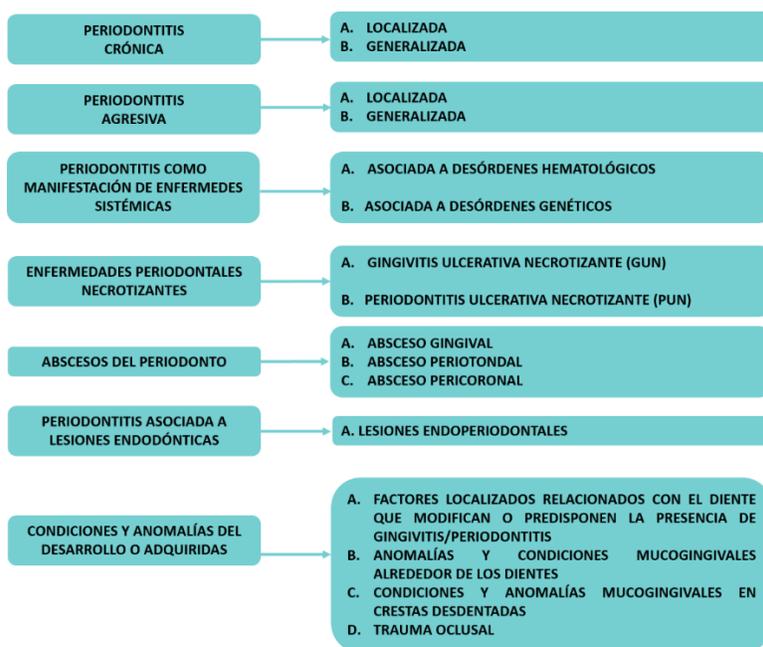


Figura 1. Clasificación de la Periodontitis AAP, 1999.

1.1.4. Etiopatogénesis

La PC es el resultado de un ambiente de disbiosis provocado por el aumento de bacterias anaerobias de tipo Gram negativo como la *Porphyromonas gingivalis*, el *Treponema denticola*, la *Prevotella intermedia*, el *Fusobacterium nucleatum*, el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, entre otras, que contribuyen a la persistencia de una respuesta inflamatoria exacerbada en el periodonto (9).

Estudios tempranos sobre la periodontitis proponían la hipótesis de que la acumulación de bacterias adyacentes al margen gingival, provocaba la formación de placa dentobacteriana (PDB), conocida hoy en día como biofilm, y consecuentemente provocaba inflamación gingival seguida de la destrucción periodontal (11).

Por otro lado, se ha considerado que la participación de los microorganismos por si solos son insuficientes para explicar la destrucción periodontal; es por esto que factores del huésped como la respuesta inmune, los factores ambientales, los genéticos y los sistémicos, son igualmente importantes para determinar y desarrollar la enfermedad(12).

La figura 2 muestra la intervención de los factores genéticos y ambientales en la destrucción de los tejidos periodontales.

En las últimas décadas diversos autores se han enfocado en la compleja interacción de la EP y la han catalogado como una enfermedad multifactorial; por esto, la importancia del sistema inmune en el desarrollo de enfermedades crónicas como la periodontitis, ha captado la atención de las investigaciones enfocadas a prevenir y tratar dichas enfermedades.

Por ejemplo, en condiciones normales de salud, en donde no existen factores que modifiquen el proceso inflamatorio, este entra a un ciclo de resolución programado y el sistema inmune del huésped es capaz de promover la eliminación del agente causal, para proceder a la reparación de los tejidos (6).

Por el contrario, en la PC, estas vías de resolución de la inflamación se encuentran alteradas, dando como resultado una respuesta inflamatoria crónica que conlleva a la destrucción de los tejidos (9).

La respuesta inflamatoria en la PC se caracteriza por el incremento en la proliferación de células del sistema inmune, que a su vez se encargan de producir excesivas cantidades de citocinas proinflamatorias como las interleucinas IL-1 β , IL-6, TNF- α y otros mediadores inflamatorios como la prostaglandina E₂ (PGE₂), dichas moléculas favorecen inicialmente la síntesis de enzimas que degradan el tejido conectivo de soporte como las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP's) (13).

Posteriormente en fases avanzadas, las MMP's provocan la activación de la resorción ósea mediada por osteoclastos a través de la unión del receptor activador de NF- κ B (RANK) y su ligando RANK-L (14).

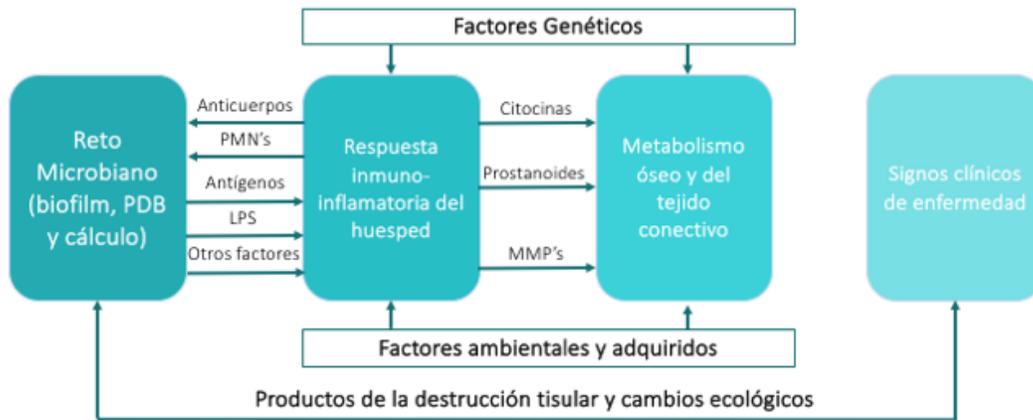


Figura 2. Modelo de etiopatogénesis de la PC propuesto por Kornman, (1997).

1.2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA INMUNE EN LA PROGRESIÓN DE LA PERIODONTITIS

La inflamación en el periodonto es una respuesta del sistema inmune que comprende una defensa compleja y organizada, la cual involucra una serie de cambios vasculares y celulares cuyo fin es la limitar el daño, eliminar el agente causal y permitir la reparación de los tejidos (15).

Durante este proceso participan los mecanismos de la inmunidad innata, que se caracteriza por ser una reacción rápida e inespecífica, mientras que en la inmunidad adaptativa participan sistemas de reconocimiento específicos que activan células y moléculas que amplifican la respuesta contra un agente dañino (16).

Comúnmente se trata a la inmunidad innata y adaptativa como eventos aislados, sin embargo, ambos operan en conjunto, complementándose mutuamente para regresar los tejidos a su estado de homeostasis habitual (11).

La progresión de la periodontitis se divide en cuatro fases: lesión inicial, lesión temprana, lesión establecida y lesión avanzada (11). A continuación, se describen brevemente cada una de ellas.

Con la formación del biofilm en las superficies de los dientes, hay un aumento de bacterias patógenas y sus productos tóxicos entran en contacto con la primera barrera de defensa: el epitelio bucal y la saliva (6). Este proceso surge en un lapso de 1 a 4 días y corresponde a la **lesión inicial**. Aunque clínicamente no se aprecian cambios considerables, a nivel celular y molecular suceden múltiples eventos (Figura 3 A y B) (17).

Una vez iniciada la respuesta inflamatoria, las células epiteliales producen una serie de citocinas de tipo proinflamatorio como la IL-1, IL-6 y TNF- α , con el fin de promover la activación de las distintas células de defensa y amplificar la respuesta inflamatoria (15).

Los mastocitos o células cebadas se encargan de liberar aminas vasoactivas, principalmente histamina, lo que provoca el incremento de la permeabilidad vascular de los capilares gingivales, vasodilatación y la activación del endotelio vascular (11).

Este último evento contribuye al reclutamiento de grandes cantidades de neutrófilos y otros leucocitos PMN hacia el surco gingival por medio del gradiente quimiotáctico (15).

A pesar de que los neutrófilos también actúan en el periodonto en condiciones de salud, sus mecanismos de defensa parecen ser insuficientes para controlar la disbiosis (18).

La siguiente etapa es la **lesión temprana**, la cual se desarrolla en 4-10 días y participan los mismos mecanismos de la lesión inicial. Ante la continua multiplicación de las colonias bacterianas, estas son capaces de corromper el epitelio y penetrar en el tejido conectivo subyacente en donde pequeñas cantidades de colágena y otros componentes de la matriz extracelular comienzan a ser degradadas. Los neutrófilos y células residentes producen otro tipo de citocinas como la IL-8 e IL-2 de forma excesiva para activar otras células de defensa como macrófagos y linfocitos (Figura 3 C y D)(11).

Los macrófagos responden ante una variedad de productos bacterianos por lo que constituyen una de las fuentes principales de moléculas inflamatorias con alto potencial destructivo, como el TNF- α , la PGE₂ y una gran variedad de MMP's como la MMP-2 y MMP-9, estas últimas responsables de la degradación de la colágena (18).

Clínicamente se puede percibir un ligero aumento en la producción de líquido gingivo crevicular, edema, cambios en el contorno y coloración de las encías además de sangrado leve a moderado al sondear. Aunque estos cambios no parecieran ser alarmantes, recibir un tratamiento oportuno en esta etapa es fundamental ya que, hasta este punto, la enfermedad periodontal es reversible y la recuperación de los tejidos aún es posible (19).

Al haber transcurrido 2-3 semanas, se considera una **lesión establecida**. En esta etapa, la PDB se extiende por debajo del surco gingival dando lugar a la formación de la bolsa periodontal; proporcionando un mayor acceso a los agentes patógenos, mismos que

invaden el tejido conectivo subyacente, e incrementando al mismo tiempo el infiltrado de células inmunitarias (Figura 3 D)(17).

En esta etapa las células dendríticas, viajan al nódulo linfático más cercano, para presentar los antígenos bacterianos a los linfocitos T. Como respuesta, los linfocitos proliferan de forma clonal dando lugar a la respuesta inmune celular dependiente de la activación de los linfocitos T cooperadores (TH) como los Th1, Th2, Th17 o T reguladoras (Treg) (14).

El infiltrado inflamatorio en este punto está representado entonces por abundantes cantidades de linfocitos T y B, estos producen citocinas involucradas en la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos para las bacterias causantes de la periodontitis (15).

Hasta este punto una gran parte de la destrucción periodontal es causada por las enzimas activadas por las diferentes células del sistema inmune como las MMP-2 y MMP-9 (20).

Clínicamente es evidente el edema, la pérdida de inserción de las fibras periodontales y profundización de las bolsas (19).

Al no existir un control de la infección, el proceso inflamatorio es perpetuado, dando lugar a una **lesión avanzada**. Esta fase se caracteriza por la disrupción de los mecanismos encargados de la remodelación ósea, en donde la resorción se ve favorecida por una activación continua de los osteoclastos mediante la vía RANKL-RANK (15).

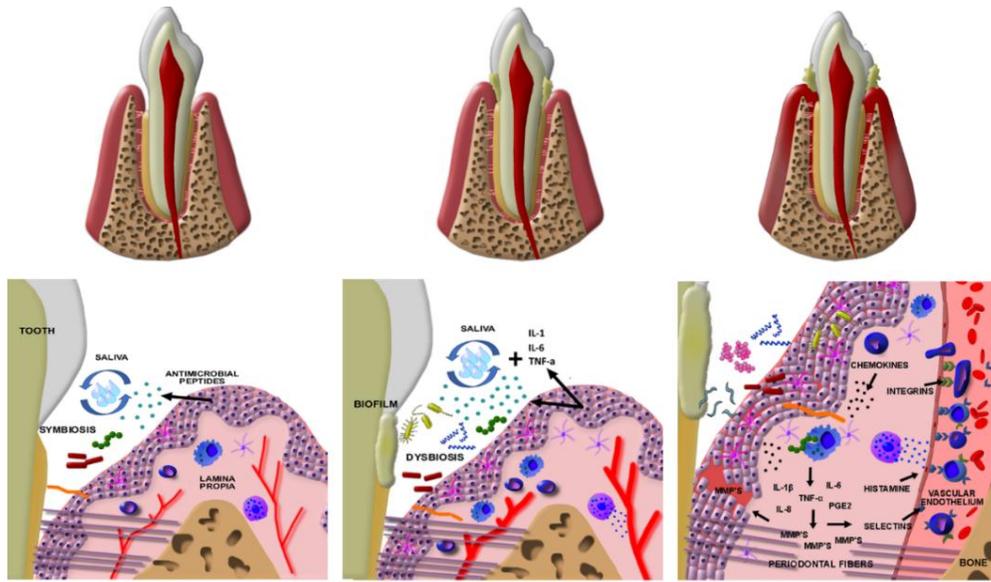
A la exploración clínica se observa que además de la formación de bolsas periodontales, los tejidos se observan ulcerados y con supuración. La pérdida ósea puede provocar movilidad dental hasta causar la pérdida del órgano dentario (Figura 3 E) (17).

La Figura 3 muestra las diferentes etapas de la evolución de la periodontitis crónica.

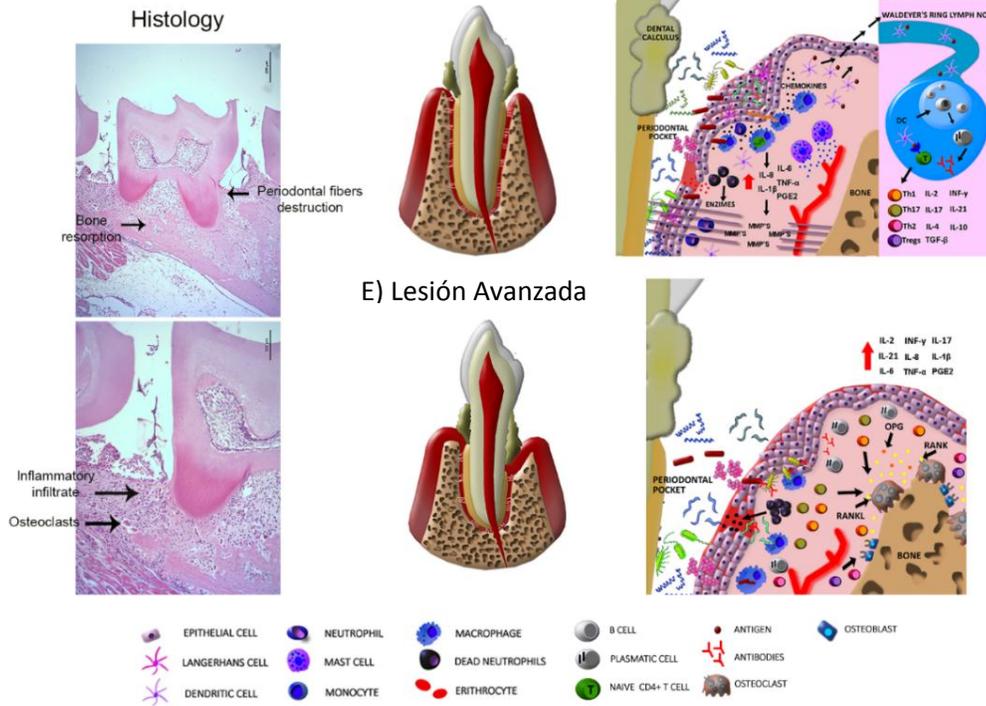
A) Periodonto Sano

B) Lesión Inicial

C) Lesión Temprana



D) Lesión Establecida



E) Lesión Avanzada

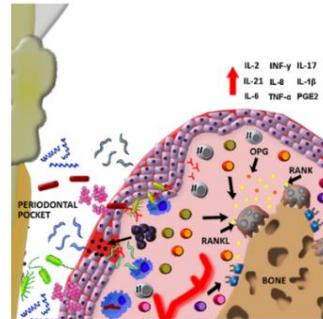


Figura 3. Mecanismos que participan en la inflamación periodontal (Elaboración propia).

Para el estudio de los mecanismos de respuesta del huésped, se han propuesto múltiples modelos, el más usado es el propuesto por Page y Schroeder en 1976 (18), el modelo se basa en las características clínicas e histológicas de los tejidos humanos y de animales a los cuales se les ha inducido la enfermedad, o la han adquirido de forma natural.

El modelo de Page y Schroeder ha sufrido modificaciones con el paso del tiempo, con el fin de profundizar en los mecanismos inmunitarios y su relación con las enfermedades (12).

1.3. MECANISMOS DE DESTRUCCIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA PERIODONTITIS

Las MMP's son las proteasas clave involucradas en las enfermedades periodontales destructivas. Son una familia de más de 25 proteasas dependientes del zinc, su estructura está compuesta por un pro-dominio auto inhibitorio para la latencia enzimática con un dominio catalítico, una región bisagra y un dominio tipo hemopexina (21).

Comúnmente, las MMP's son expresadas como zimógenos inactivos, y el pro-dominio debe desprenderse de la región catalítica para su activación, lo anterior lo hace por medio de la acción de una cisteína (22).

La función de las MMP's es degradar las proteínas que integran la matriz extracelular (MEC), activando al mismo tiempo diferentes moléculas señal; y el desbalance en su producción repercute en la progresión de diversas enfermedades como la periodontitis (21)

Las MMP's se dividen en cuatro subclases, dependiendo de la especificidad del sustrato en el que actúan: A) colagenasas (MMP-1 y MMP-8, MMP-13 y MMP-18); B) gelatinasas (MMP-2 y MMP-9); C) estromelinas (MMP-3, MMP-10 o MMP-11 y MMP-7) y D) las recientemente descubiertas MMP's transmembranales (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17 y MT1-MMP) (23).

La MMP-2 y la MMP-9, son de las proteasas más comunes en lesiones periodontales avanzadas, ya que se encargan de degradar primordialmente la colágena tipo IV, aunque también degradan colágena tipo I, III, V, XI y lamininas, en menores cantidades. Lo anterior es consecuencia de sus dominios de fibronectina tipo II, estos les permiten adherirse a las gelatinas de la MEC (24).

También se ha reportado que la MMP-2 es capaz de activar a la MMP-9 y MMP-13 a través de un sistema de cascadas proteolíticas (21).

En la cavidad oral, la principal fuente de MMP-2 y MMP-9 son las células PMN, los fibroblastos, las células epiteliales y endoteliales (24). Ante la presencia de microorganismos patógenos, la producción masiva de citocinas de tipo proinflamatorio por parte de estas células es capaz de inducir la síntesis de MMP's, por lo que es considerado uno de los mecanismos indirectos de la destrucción de los tejidos de soporte del diente (22).

La expresión de la MMP-2 es constitutiva, es decir que participa en procesos fisiológicos y puede ser inducida por diferentes moléculas entre las que destacan factores de crecimiento como el TGF- β y citocinas como la IL-8 y el INF- γ . De manera similar la MMP-9 es inducida por diversos factores como el EGF, TGF- β 1, el TNF- α , la IL-1 β y el INF- γ , por lo que tiene una participación importante durante el proceso inflamatorio (25).

Un balance entre la activación de MMP's y sus inhibidores endógenos (TIMP's) es fundamental para el mantenimiento de la estructura de los tejidos, por lo que cualquier desbalance en este proceso conlleva a la destrucción patológica tisular como es el caso de la PC (24).

1.4. AGENTES FARMACOLÓGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN PERIODONTAL

El tratamiento convencional de la PC ha sido enfocado a la eliminación y control del componente bacteriano, para lo cual se han establecido técnicas mecánicas, quirúrgicas y farmacológicas.

Sin embargo, el uso de agentes farmacológicos para el tratamiento de la enfermedad periodontal conlleva una serie de efectos secundarios, tales como la resistencia antimicrobiana y la citotoxicidad por el uso prolongado de algunos fármacos. Lo anterior ha llevado a los investigadores a buscar nuevas estrategias para el tratamiento de la inflamación crónica.

En los últimos años la búsqueda de agentes terapéuticos para la modulación del huésped, la llamada inmunoterapia, ha tomado mayor relevancia en el tratamiento de las enfermedades crónicas inflamatorias (26).

En el aspecto farmacológico, se han propuesto el uso de tres clases de agentes: A) los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), utilizados por su potente acción para disminuir la síntesis de mediadores proinflamatorios como la PGE₂. B) Las tetraciclinas de que además de poseer propiedades antimicrobianas, tienen la capacidad de inhibir la actividad de diferentes MMP's, y C) los bifosfonatos utilizados para enfermedades caracterizadas por la resorción ósea (27).

En cuanto los AINE's, es bien sabido que poseen potentes mecanismos que contribuyen al bloqueo de la producción de las ciclooxygenasas COX-1 (constitutiva) y COX-2 (inducida por la activación enzimática y la inflamación) (12).

A pesar de su efectividad, su uso crónico conlleva a complicaciones en el tracto gastrointestinal y promueven el riesgo de eventos de hemorrágicos, por lo que representan una opción poco viable (6, 28).

Las tetraciclinas constituyen un grupo de agentes de amplio espectro, eficaces contra muchas especies Gram negativas incluyendo también bacterias periodontopatógenas.

La doxiciclina y la minociclina son hoy en día, las tetraciclinas más utilizadas en el tratamiento de la EP. Estudios recientes han demostrado que el uso de doxiciclina o minociclina en bajas dosis puede reducir la expresión de MMP's en LGC y en los tejidos de pacientes con periodontitis, y disminuyendo la profundidad de las bolsas periodontales y de la pérdida ósea alveolar (27).

No obstante, debido a las cantidades excesivas de bacterias y MMP's presentes durante la progresión de la PC, el uso de dosis bajas puede resultar insuficiente y el consumo de cantidades mayores podría llevar a una resistencia antibiótica (11).

Los bifosfonatos son agentes farmacológicos usados con frecuencia para el tratamiento de la osteoporosis y otros padecimientos en donde exista resorción ósea patológica, por su capacidad para inhibir la activación de osteoclastos.

No obstante, se han publicado diversos estudios que reportan osteonecrosis y un efecto anti-angiogénico cuando es administrado vía intravenosa e incluso por vía oral. Otros efectos adversos incluye, alergia a los bifosfonatos e intolerancia gastrointestinal (29).

Otra opción prometedora para el tratamiento dirigido a la modulación del huésped es la terapia anticitocinas, la cual ya ha sido usada para el tratamiento de enfermedades de carácter inflamatorio. La mayoría de estos agentes actúan contra la IL-1 β y el TNF- α , por lo que se ha visto ayudan a disminuir la infiltración de neutrófilos, además de reducir los niveles de óxido nítrico e inhibir la apoptosis (30).

Uno de los mayores inconvenientes de esta opción terapéutica, es el principio de redundancia funcional de las citocinas, el cual permite activar a una citocina alterna con la misma función que la que se inhibe, además la terapia con estos agentes es sumamente costosa para su administración (12).

De forma interesante, se ha estudiado el uso de ácidos grasos O3, ya que han demostrado poseer un gran valor antiinflamatorio en el tratamiento de enfermedades como la artritis, la colitis ulcerativa, le asma, la esclerosis múltiple, etc. En contraste con las opciones anteriores, los efectos adversos del O3 son mínimos (28).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. ÁCIDOS GRASOS O3 Y PERIODONTITIS

La resolución de la inflamación es un proceso modulado por mediadores endógenos como agonistas inflamatorios. Por lo que el promover la síntesis de estos agonistas se ha vuelto un blanco terapéutico atractivo para el control de enfermedades inflamatorias como la PC. En este sentido se ha propuesto el uso de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) O3 (6).

Los ácidos grasos O3 poseen un doble enlace a partir del tercer átomo de carbono del grupo metilo terminal, lo cual determina su nomenclatura. Se consideran ácidos grasos esenciales ya que nuestro organismo no es capaz de sintetizarlos, por lo tanto, se deben adquirir a través de la dieta, de alimentos como el pescado y algunas semillas como la chía (31).

A partir de los alimentos mencionados, se obtiene el ácido alfa linolénico (ALA), que es el precursor de la familia de ácidos grasos n-3 y que es metabolizado mediante dos procesos: la adición de dobles enlaces (desaturación vía Δ^5 y Δ^6 desaturasas) y por el alargamiento de la cadena del grupo acilo (elongación a través de las elongasas) (32).

De esta forma el ALA se convierte en ácido estearidónico por acción de la Δ^6 desaturasa; posteriormente este es elongado y se convierte en ácido eicosatetraenoico, el cual es convertido en ácido eicosapentaenoico (EPA) por la Δ^5 desaturasa. El EPA es metabolizado entonces en ácido docosahexaenoico (DHA) o en eicosanoides a través de la vía de las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas (32).

La conversión de EPA a DHA involucra la adición de dos carbonos por las elongasas para formar ácido docosapentaenoico, al cual de igual forma se agregan dos carbonos más para producir ácido tetracosapentaenoico. Mediante la Δ^6 desaturasa, se forma ácido tetracosahexaenoico. Finalmente se remueven dos carbonos por la β -oxidación y se obtiene el DHA (32).

En mamíferos, el proceso de desaturación y elongación de los ácidos grasos n-3 ocurre principalmente en el hígado (32).

Los ácidos grasos son constituyentes importantes de la membrana celular de todas las células eucariotas, ahí tienen un papel importante en el aseguramiento de un ambiente apropiado para el funcionamiento de las proteínas de membrana, para el mantenimiento de la fluidez de la membrana, la regulación de las vías de señalización celular, la expresión de genes además de que sirven como sustrato para la síntesis de mediadores lipídicos (33).

El EPA y el DHA son precursores de las resolvinas y protectinas, las cuales poseen potentes propiedades antiinflamatorias e inmunoregulatoras. Se ha reportado que limitan la proliferación de neutrófilos, promueven la fagocitosis de células apoptóticas para limpiar el sitio de la lesión, y regulan la producción de mediadores proinflamatorios siendo una opción prometedora para el tratamiento de la inflamación en la periodontitis (34).

Investigaciones recientes, reportan que los efectos biológicos del O3 se atribuyen a diferentes mecanismos: (A) a la competencia bioquímica entre los ácidos grasos O3 y los O6 por los las enzimas necesarias para la biosíntesis de mediadores inflamatorios, (B) a la unión con el receptor PPAR- γ , (C) a la inhibición de receptores tipo toll (TLR2/3/4), y (D) a la síntesis de metabolitos que actúan a favor de la resolución del proceso inflamatorio (31).

En ratas a las que se les suplementó la dieta con n-3 PUFA y se les inoculó con *p. gingivalis* mostraron una resorción alveolar significativamente menor comparadas con grupos de ratas con una dieta suplementada con aceite vegetal y con el grupo control (28, 35).

Más aún, se ha visto que una dieta rica en ácidos grasos como el DHA y EPA ayuda a disminuir los niveles de colesterol, triglicéridos y a modular los mediadores pro y antiinflamatorios en sangre (6).

Además estudios *in vitro* de cultivos de osteoclastos aislados de ratones y estimulados con distintas concentraciones de DHA, mostraron que este ácido graso fue capaz de suprimir

la proliferación de células precursoras de osteoclastos y atenuar la activación del RANKL además de promover la apoptosis de osteoclastos (36).

En un estudio realizado en nuestro laboratorio¹ se evaluaron los efectos del suplemento alimenticio con ácidos grasos O3 en ratones de la cepa C57bl/6 con periodontitis inducida por ligadura y *p. gingivalis*, y se encontró que el O3 reducía la pérdida de hueso alveolar, al comparar los ratones que tomaban el suplemento contra los que no.

Además, se correlacionó las concentraciones de citocinas proinflamatorias IL-2 y TNF- α , disminuyendo la producción de estas. Al mismo tiempo se observó un aumento de la producción de la citocina antiinflamatoria IL-5.

Otro efecto de la interrelación del O3 y la periodontitis se observó en el mismo estudio sobre las poblaciones de células inmunológicas presentes en los nódulos cervicales de los ratones con dieta suplementada y que tenían menor porcentaje de células dendríticas CD103⁺, CD11c⁺ y MHCII⁺, sin embargo, no se observaron modificaciones en las poblaciones de linfocitos T y B (37).

Aunque que el uso de ácidos grasos O3 como una opción viable para el tratamiento periodontal, ya ha sido estudiada, la mayoría de los estudios se han enfocado en la medición de la pérdida ósea vertical, dejando de lado el estudio de los posibles mecanismos inmunoreguladores locales y cambios histológicos provocados por el O3.

¹ Laboratorio de Investigación Odontológica, Sección de Inmunidad Oral y Regulación ósea, FES Iztacala, UNAM.

HIPÓTESIS

El suplemento alimenticio con ácidos grasos O3 disminuirá la inflamación y la destrucción periodontal a través de disminuir el infiltrado inflamatorio, la destrucción de las fibras de colágena y la expresión de MMP-2 y/o MMP-9 en un modelo de periodontitis murina.

JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de terapias profilácticas y/o coadyuvantes que se enfoquen en la modulación del proceso inflamatorio característico de la periodontitis es fundamental para brindar un tratamiento integral de este padecimiento. Una de las propuestas más prometedoras es el uso de ácidos grasos O3 ya que se ha reportado contribuyen a la regulación de los niveles de mediadores proinflamatorios, promover la resolución de la inflamación y por lo tanto a la disminución de la destrucción ósea. No obstante, aún falta analizar los cambios provocados por el O3 directamente en los tejidos periodontales para entender por completo los mecanismos mediante los que ayuda a reducir la destrucción de los tejidos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar histológicamente el efecto de los ácidos grasos omega-3 (n-3 PUFA) en la destrucción e inflamación periodontal en un modelo de periodontitis murina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En ratones C57BL/6 a los que se les indujo periodontitis y fueron tratados con ácidos grasos O3 y sus controles, ratones con periodontitis sin O3 y ratones sin periodontitis con O3:

- Medir la destrucción ósea alveolar.
- Identificar el estado inflamatorio de los tejidos periodontales.
- Identificar la remodelación y destrucción de fibras de colágena mediante su grosor y la Inmunoidentificación de MMP-2 y MMP-9.
- Identificar la reparación del periodonto o edema mediante el aumento en el número de vasos sanguíneos y su congestión.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, la Figura 4, muestra la estrategia experimental que se utilizó en el presente estudio.

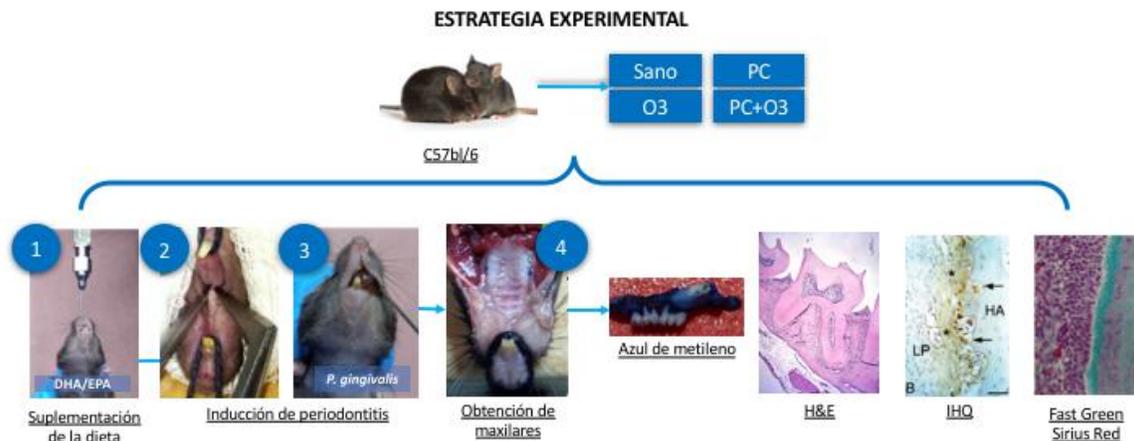


Figura 4. Esquema que resume la metodología utilizada.

3.1. ANIMALES

Para el experimento se utilizaron 24 ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 6 semanas de edad, de entre 18 y 21 gramos de peso; los cuales fueron mantenidos bajo condiciones de bioterio. Los ratones se dividieron en 4 grupos: ratones sanos (Sano), ratones sanos con suplemento alimenticio (S+O3) ratones con periodontitis crónica (PC) y ratones con periodontitis crónica y suplemento alimenticio (PC+O3) cada grupo de 6 ratones. Los grupos fueron tratados y alimentados de la siguiente manera:

- Sanos + Rodent Diet 5001 Autoclavable (S)
- Sano + Autoclavable Rodent Diet 5001 + GNC Fish Oil 1000mg (S+O3)
- PC + Autoclavable Rodent Diet 5001 (PC)
- PC + Autoclavable Rodent Diet 5001 + GNC Fish Oil 1000mg (PC+O3).

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (Número: CE/FESI/062015/1047) y se realizó de acuerdo con las recomendaciones mencionadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la

producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y la NOM-012-SSA3-2012, “Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud”.

3.2. SUPLEMENTO ALIMENTICIO CON OMEGA 3

El suplemento alimenticio, fue administrado vía intragástrica con una dosis de 352.7 mg/kg de peso de DHA/EPA, lo cual es equivalente a 2 g/kg de peso en humano de conformidad con las dosis recomendadas para el suplemento.

Esto se realizó diariamente a partir del día 1 del experimento hasta las 12 horas antes del sacrificio, por lo que cada ratón recibió un total de 70 dosis.

3.3. CEPA BACTERIANA

Para inducir la infección periodontal, se utilizó cepa de *P. gingivalis* de ATTC (No. 53977). Las bacterias fueron cultivadas en condiciones estándar indicadas por el proveedor en agar sangre. La pureza de la cepa se verificó mediante la caracterización de las colonias de bacterias en forma abultada, color negro, también se realizó la tinción gram negativa para identificarlas. Las bacterias se cultivaron y se midió la densidad óptica a 600nm para obtener 10^9 bacterias /mL

Para la inducción de la periodontitis se preparó una solución en gel (2% carboximetilcelulosa) que contenía 10^9 unidades formadoras de colonias bacterianas vivas en 100µl de vehículo por cada ratón.

3.4. INDUCCIÓN DE PERIODONTITIS

En el día 48 se inició la administración de antibioticoterapia profiláctica a todos los grupos mediante la colocación de 15 ml de Bactrim® (Sulfametoxazol/trimetoprima de 200 mg/40 mg/ 5mL) en 300 ml de agua en un periodo de 12 días.

Posteriormente se interrumpió la administración del antibiótico y se esperaron 4 días para su eliminación. Al día 63 a los grupos PC y PC+O3, se les anestesió con una solución de ketamina (10mg/ml) y xilacina (1mg/ml) vía intraperitoneal (0.1ml/10g de peso de ratón).

La ligadura se colocó conforme a lo establecido por Abe et. al. (2013) (38).

Brevemente, se colocó una ligadura en los segundos molares superiores comenzando a insertar la sutura a través de los espacios interproximales y anudando la ligadura por la cara vestibular del segundo molar usando sutura de seda 6-0 (Atramat®)

A las 24 horas se realizó la primera inoculación con 1×10^9 de *P. gingivalis* resuspendida en 100µl de carboximetilcelulosa al 2%, colocando 50µl en el pliegue mucogingival adyacente a la ligadura de cada molar. Se dejaron transcurrir 48 horas entre la primera y segunda inoculación, continuando con las inoculaciones cada 24 horas durante 3 días seguidos (28).

3.5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

En el día 71 del experimento, se sacrificaron a todos los ratones mediante sobredosis de anestesia (ketamina / xylacina) y se recuperaron los maxilares. Posteriormente fueron divididos a partir de los incisivos centrales. Unos hemimaxilares se tomaron para su análisis morfométrico mientras que la otra mitad se usó para análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

3.6. MEDICIÓN DE LA PÉRDIDA ÓSEA ALVEOLAR

La medición de la pérdida ósea se realizó conforme a lo establecido por Hasturk et. Al (2006) (39).

Brevemente, los hemimaxilares se hirvieron durante 10 minutos para facilitar la remoción de los tejidos blandos, seguido de ello, se blanquearon durante 5 minutos en cloro concentrado y se sumergieron durante 15 minutos en una solución de eosina 0.5% y azul de metileno 1%. Finalmente se lavaron y cepillaron por 5 minutos en agua corriente para remover el exceso de colorante.

Después del procedimiento anterior, se midió la pérdida ósea alveolar tomando como referencia inicial la unión cemento-esmalte y hasta la cresta ósea alveolar en la superficie bucal y palatina de los tres molares presentes. Esto se realizó con ayuda de un explorador endodóntico al cual se le colocó un tope de silicón y que fue posicionado tanto en los surcos como en las cúspides (Tabla 1).

La distancia obtenida fue transportada a un calibrador vernier analógico de precisión 0.02mm y expresada en milímetros (14394, TRUPER®).

Tabla 1. Puntos de referencia para la medición de la pérdida ósea alveolar

ÓRGANO DENTARIO	SUPERFICIES DE REFERENCIA (CÚSPIDES)	SUPERFICIES DE REFERENCIA (SURCOS)
PRIMER MOLAR	Cúspide mesiopalatina Cúspide mesiovestibular Cúspide palatina Cúspide vestibular Cúspide distopalatina Cúspide distovestibular	Surco mesiopalatino Surco mesiovestibular Surco distopalatino Surco distovestibular
SEGUNDO MOLAR	Cúspide mesiopalatina Cúspide mesiovestibular Cúspide distopalatina Cúspide distovestibular	Surco palatino Surco vestibular
TERCER MOLAR	Cúspide palatina Cúspide vestibular	N/A

Fuente: elaboración propia.

3.7. HISTOLOGÍA

Los hemimaxilares restantes se colocaron en frascos individuales para ser fijados con paraformaldehído al 4% durante 48 horas a partir de su obtención. Transcurrido este tiempo se lavaron con agua corriente y se descalcificaron con EDTA sódico al 7%. Por último, se incluyeron en Paraplast Plus® (P3683, for tissue embedding SIGMA-ALDRICH®) y se realizaron cortes seriados de 4μ de grosor en el micrótopo.

La evaluación histológica se llevó a cabo con los protocolos de tinción de Hematoxilina y Eosina (H & E) para determinar el grado de inflamación; y con la tinción de Sirius Red para evaluar el estado de las fibras de colágena del periodonto.

Además, se realizaron estudios de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de proteínas colagenasas utilizando los anticuerpos primarios MMP-2 y MMP-9. El análisis de las muestras fue verificado por un patólogo ajeno al experimento.

La observación de las laminillas se hizo en microscopio óptico (Axio Lab.A1, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) y se tomaron microfotografías con las magnificaciones 5x, 10x y 40x de la zona de los tres molares (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA).

3.8. IDENTIFICACIÓN DEL GRADO INFLAMATORIO

En breve, se desparafinaron e hidrataron las laminillas para su posterior incubación en Hematoxilina de Harris (H9627, SIGMA-ALDRICH®) durante 5-8 minutos. Se lavaron con agua destilada y se realizaron baños en alcohol ácido y agua amoniacal. Las laminillas se sumergieron en Eosina alcohólica (Eosin Y- C.I. 45380, SIGMA-ALDRICH®) y finalmente se deshidrataron para montarse con resina Entellan® (Rapid Mounting Medium for Microscopy, MERCK®).

El análisis del infiltrado inflamatorio se realizó con base al método usado por Cantley, et. al. (2011) (40).

Con las microfotografías de la magnificación 40x, las cuales fueron divididas en cuatro cuadrantes. Se contabilizaron todas las células observadas en cada fotografía y se obtuvo el porcentaje de las células de tipo inflamatorio (linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos y macrófagos). Según el porcentaje de las poblaciones celulares, se otorgaron los siguientes valores listados en la Tabla 2.

Tabla 2. Escala de Inflamación histológica

Tejido normal	< 5 % de células inflamatorias	0
Inflamación leve	5-20% de células inflamatorias	1
Inflamación moderada	20-50% de células inflamatorias	2
Inflamación severa	>50% de células inflamatorias	3

Fuente: elaboración propia.

3.9. EVALUACIÓN DE LAS FIBRAS DE COLÁGENA Y VASOS SANGUÍNEOS

Después de desparafinar e hidratar las laminillas, estas se incubaron durante 30 minutos con una solución saturada de ácido pícrico con Fast Green FCF al 0.2% (C.I. 42053 for microscopy Certistain®) en frascos protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Se lavaron las laminillas 5 minutos en agua destilada y se incubaron 15 minutos en una solución saturada de ácido pícrico con Fast Green al 0.04% y Sirius Red F3B al 0.1 % (CI 35780, Direct red 80, SIGMA-ALDRICH®). Por último, se lavaron las laminillas por 5 minutos con agua destilada y se deshidrataron previo a su montaje con Entellan®.

Las laminillas se observaron en microscopio óptico y se evaluaron las fibras de colágena adyacentes al segundo molar maxilar de los distintos casos, según el grosor de la estructura de las fibras (Tabla 3). Las fibras de mayor tamaño y densas se tiñen de guinda-negrusco, mientras que las de menor calibre rojas. El hueso alveolar tiñe rojo para el colorante debido a su matriz extracelular compuesta de colágena.

Tabla 3. Parámetros para la evaluación de fibras de colágena

	Fibras Densas
	Fibras Delgadas
Fibras Mixtas	Predominantemente Densas
	Predominantemente Delgadas
N/A	Tejido Insuficiente para evaluar

Fuente: elaboración propia.

Para el análisis de los vasos sanguíneos se utilizaron microfotografías de la magnificación 40x y se evaluó si había congestión o no de los vasos, si había formación o no de nuevos vasos y si su tamaño era grande o pequeño.

3.10. INMUNODETECCIÓN DE METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Al igual que en las tinciones anteriormente mencionadas, las laminillas se desparafinaron, rehidrataron y se lavaron con agua corriente e ImmunoDNA washer 1X (Bio SB, Inc.).

Para la recuperación del antígeno se sumergieron las muestras en Buffer de citratos (0.06 M; pH 6) y se utilizó una olla de presión eléctrica durante 15 minutos en alta potencia. Las muestras se colocaron en una solución bloqueadora de peroxidasa (0.3% H₂O₂/Metanol absoluto) durante 20 minutos, para su posterior incubación con BSA-PBS (Tween 20) al 2% (Bovine Serum Albumin, A2058 SIGMA-ALDRICH®) durante 30 minutos. Se incubaron las laminillas con los anticuerpos primarios MMP-2 y MMP-9 a 4°C toda la noche.

Las diluciones y los anticuerpos utilizados se enlistan en la Tabla 4.

La reacción se reveló con el kit Mouse/Rabbit ImmunoDetector Biotin HRP Label, Bio SB, Inc., de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las laminillas se sometieron a múltiples lavados entre cada paso.

Una vez que el cromógeno del kit hacía efecto se verificaba en el microscopio óptico, para posteriormente detener la reacción con agua destilada. Finalmente, se contratiñó con Hematoxilina de Mayers (C.I. 75290, SIGMA-ALDRICH®) y se deshidrataron las muestras para su montaje con resina Entellan®.

La lectura de la expresión de proteínas por medio de inmunohistoquímica se realizó con base a la intensidad de la reacción y se les asignó un número entre 0 y 3. Donde “0” corresponde a células negativas para la reacción de peroxidasa, “1” corresponde a células parcialmente positivas, con una intensidad media para la reacción de peroxidasa y un porcentaje del 50% de células positivas en la zona evaluada, “2” corresponde a células positivas, con una intensidad media para la reacción de peroxidasa y un porcentaje del 75% de células positivas en la zona evaluada y “3” que corresponde a células altamente

positivas, con una alta intensidad para la reacción de peroxidasa y un porcentaje mayor al 50% de células positivas en la zona evaluada.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para la IHQ

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CLON	MANUFACTURA	TIPO DE REACCIÓN
MMP-9	1:100	H-76	Santa Cruz Biotechnology (SC-10736)	-Heterogénea - Expresión citoplasmática
MMP-2	1:100	H-129	Santa Cruz Biotechnology (SC-10737)	-Heterogénea - Expresión citoplasmática

Fuente: elaboración propia.

Se realizó en análisis histológico de las siguientes estructuras periodontales: epitelio, tejido conectivo subyacente al epitelio, fibroblastos, células similares a osteoclastos, células inflamatorias, células similares a osteoclastos y células endoteliales.

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron con una “n” de 6 y los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey con ayuda del programa Graph Pad versión 6.0.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. EL SUPLEMENTO ALIMENTICIO CON O3 DISMINUYE LA DESTRUCCIÓN ÓSEA ALVEOLAR

En las fotografías de los maxilares teñidos con azul de metileno se observa menor pérdida del tejido óseo en los grupos que fueron tratados con O3. Lo anterior se pudo corroborar en las gráficas obtenidas a partir del registro de las mediciones llevadas a cabo en los tres molares, en donde se aprecia que el grupo PC+O3 tuvo menor destrucción ósea en la superficie vestibular del segundo y tercer molar en comparación al grupo PC, mientras que en la superficie palatina la pérdida ósea fue similar entre los grupos con periodontitis, (*) $p \leq 0.05$ cuando los grupos se compararon con el grupo Sano y (&) $p \leq 0.05$ cuando se compararon con el grupo de PC (Gráfico 1 A y B).

4.2. EL O3 REDUCE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS INFLAMATORIAS EN LA PERIODONTITIS.

El análisis inflamatorio reveló el estado inflamatorio del tejido conectivo adyacente a la raíz del segundo molar maxilar. Los casos en que no se contó con tejido suficiente para el análisis histológico se les asignó un no aplica (N/A).

Del grupo Sano (S), se evaluó la totalidad de los casos (6/6). Se muestran los tejidos epiteliales y óseos con una estructura conservada y una inserción a nivel de la unión cemento-esmalte. La mayoría de los casos presentó inflamación nula (4/6; 67%) o escasa (2/6; 33%) lo que indica que los tejidos se encuentran en condiciones normales (Figura 6 A, B y C).

En el grupo S+O3 (4/6), el estado de los tejidos periodontales coincide con la descripción del grupo Sano, sin embargo, la mitad del grupo (3/6; 50%) presentó inflamación ligera ya que se notó mayor presencia de células inflamatorias, principalmente leucocitos PMN. De este grupo, se eliminaron 2 muestras ya que el tejido no era suficiente para llevar a cabo el análisis (2/6; 33%) (Figura 6 D, E y F).

Interesantemente, aunque el infiltrado inflamatorio es mayor en el grupo S+O3 comparado con el grupo Sano, no se observó destrucción tisular significativa en las muestras estudiadas.

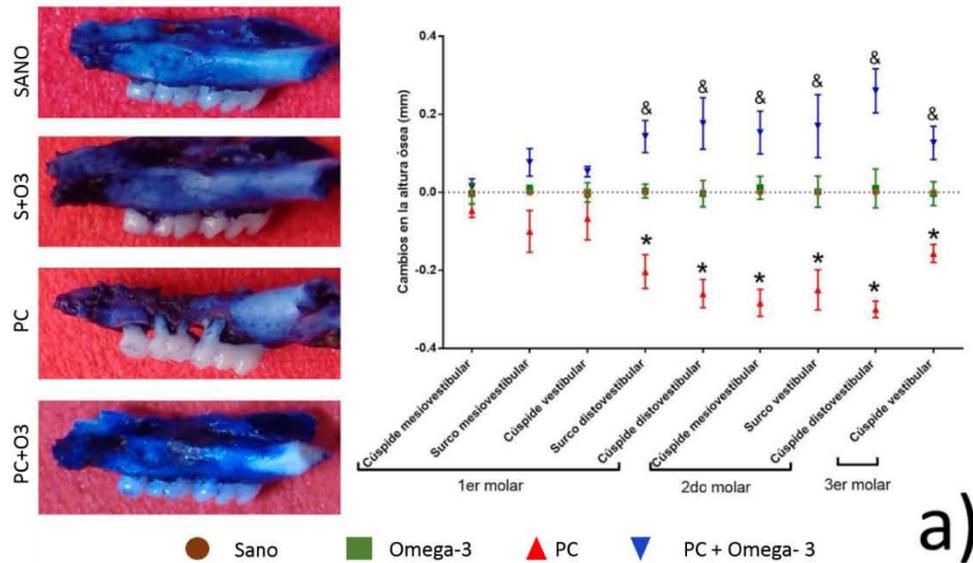
Se analizaron todas las muestras del grupo PC (6/6), en donde los tejidos presentaron cambios evidentes: se perdió la arquitectura del epitelio y la inserción de las fibras periodontales además de que disminuyó la altura del hueso alveolar. En el borde del tejido óseo se detectaron células multinucleadas, grandes con prolongaciones citoplasmáticas, similares a osteoclastos.

Se determinó que había inflamación moderada en todos los casos (6/6; 100%); el infiltrado inflamatorio de este grupo estaba representado principalmente por macrófagos, células plasmáticas y linfocitos PMN (Figura 6 G, H, I).

El grupo PC+O3 (6/6), mostró destrucción de los tejidos periodontales, sin embargo, esta fue menor comparada con la destrucción observada en el grupo PC. El tipo de inflamación observada en este grupo fue ligero (5/6; 83%) en la mayoría de los casos y uno de los casos presento inflamación moderada (1/6; 17%) (Figura 6 J, K y L).

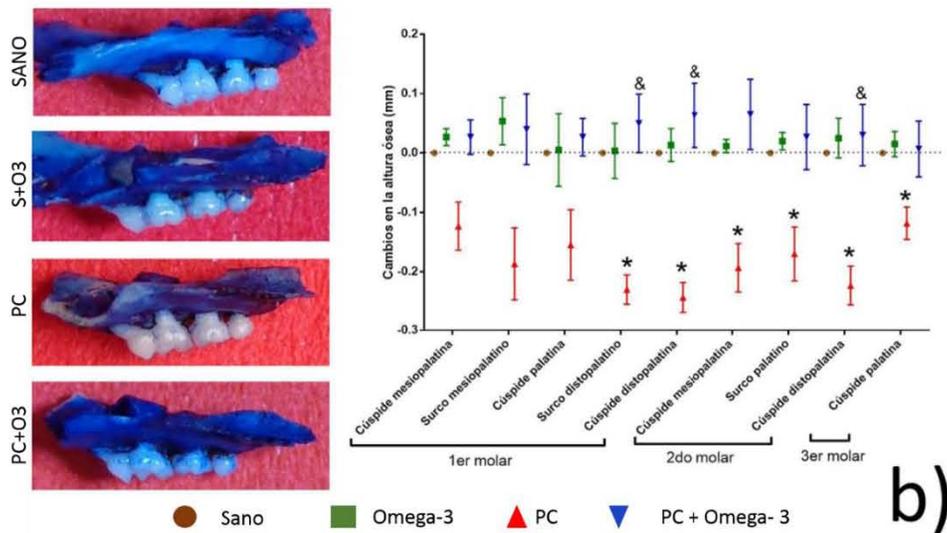
El análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre el grupo Sano y PC (sin inflamación vs inflamación moderada). También existieron diferencias entre los grupos PC y PC+O3 (inflamación moderada vs inflamación ligera) (Gráfico 2).

Superficie vestibular



a)

Superficie palatina



b)

Gráfico 1. Cambios en la destrucción ósea alveolar.

Mediciones realizadas a partir de la tinción de los hemimaxilares con azul de metileno. Se observa menor destrucción ósea de la superficie vestibular que en la palatina del segundo y tercer molar maxilar del grupo PC+O3 en comparación al grupo PC.

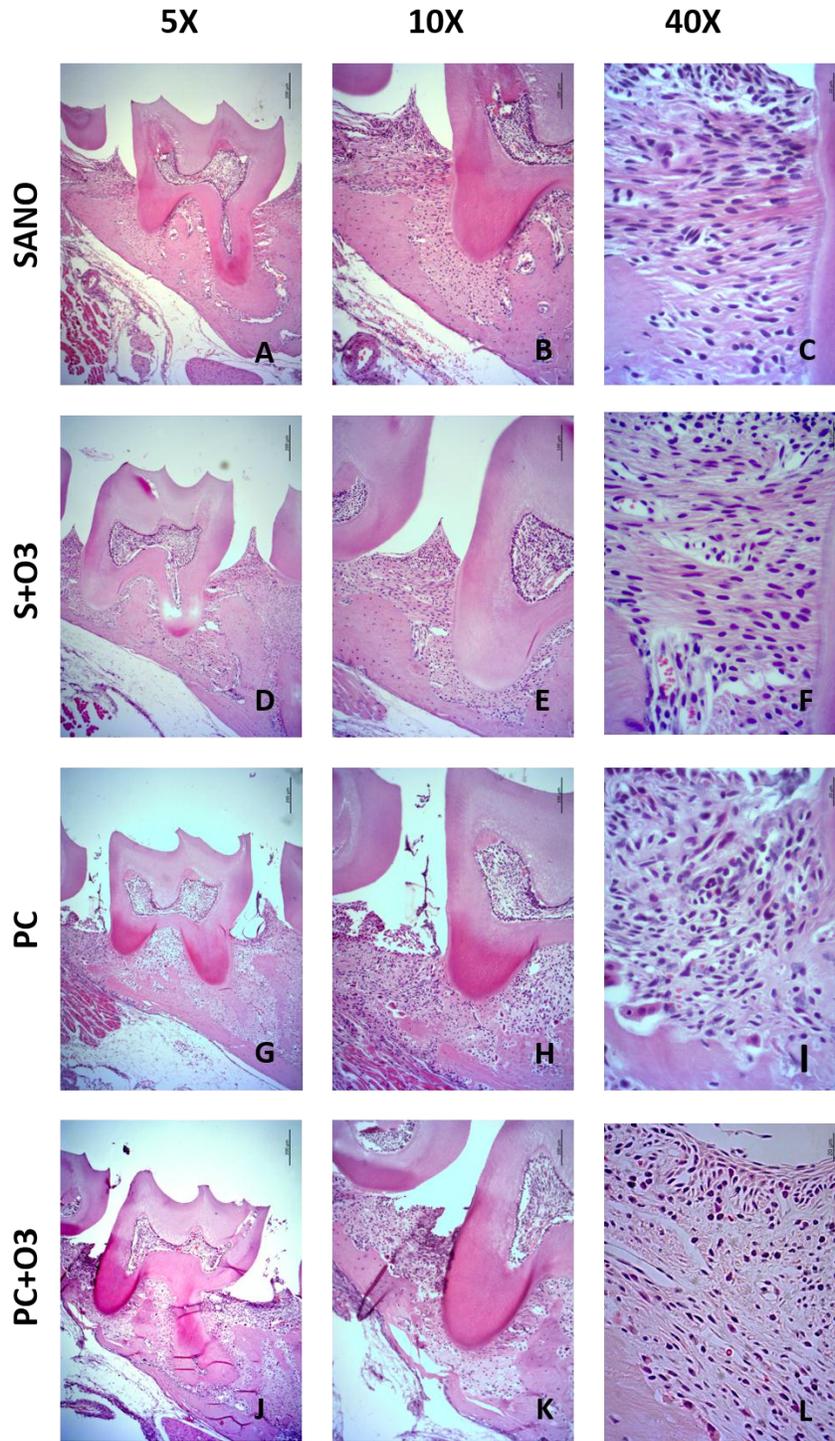


Figura 5. Microfotografías de los hemimaxilares teñidos con H y E.

(A, B, C) El grupo sano no presenta destrucción tisular. (D, E, F) Se observa un ligero aumento en el infiltrado inflamatorio que no parece ser perjudicial para los tejidos. (G, H, I) El grupo PC, muestra pérdida de la inserción de las fibras periodontales, el infiltrado inflamatorio es mayor y se observan células similares a osteoclastos. (J, K, L). En el grupo PC+O3 aún se puede ver hueso alveolar en la zona interradicular y hay una reducción del infiltrado inflamatorio.

Estado Inflamatorio del Periodonto

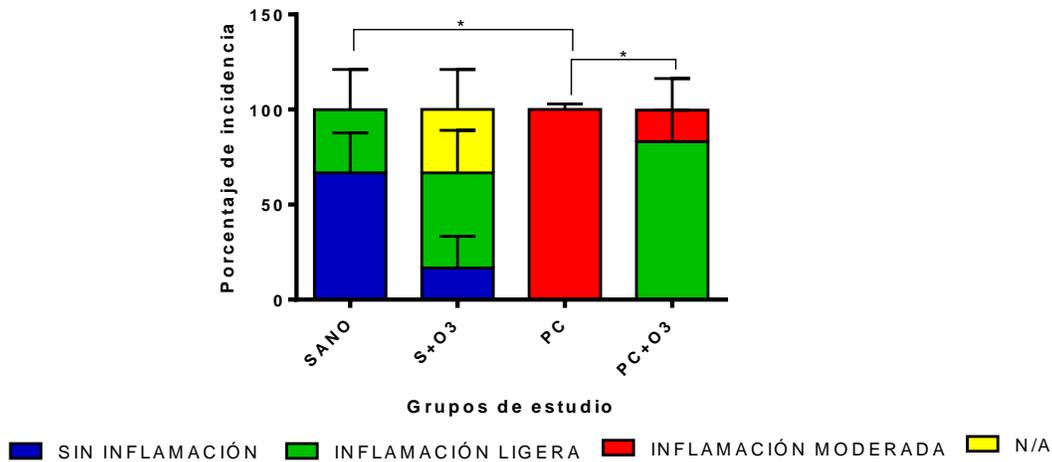


Gráfico 2. Incidencia del estado de inflamación periodontal.

El grupo de PC+O3 el grado de inflamación es ligero en comparación al grupo PC que presenta inflamación moderada.

4.3. EL O3 EVITA LA DEGRADACIÓN EXCESIVA DE LAS FIBRAS DE COLÁGENA

Se realizó la evaluación de la constitución de las fibras del periodonto a partir de la tinción con Sirius Red con Fast Green como medio de contraste que tiñen las estructuras de colágenas y no colágenas respectivamente.

En el grupo Sano (5/6), la tinción con Sirius Red tiñe la colágena de color rojo brillante, en algunas zonas por la alta densidad de las fibras de colágena se aprecia un color guinda-negrusco en una estructura fibrilar perpendicular adyacente al segundo molar superior, que se inserta desde la unión cemento-esmalte a lo largo del área del cemento radicular. Las fibras en su mayoría densas (4/6; 67% densas vs 1/6;16.6% mixtas predominantemente densas) forman una red a lo largo de ambas raíces y en la zona interradicular en la que también es visible el hueso. Uno de los casos revisados, el tejido se observó dañado debido al procesamiento histológico y este se clasificó como N/A (1/16.6%) (Figura 7 A, B, C, D y E)

De igual manera, en el grupo S+O3 (6/6) se observan fibras de color rojo y guinda-negrusco perpendiculares a la raíz del diente que se extienden ordenadamente y se

insertan desde la unión cemento-esmalte hasta el hueso alveolar. Las fibras de colágena son mixtas predominantemente densas en la mitad de los casos (3/6; 50%) En dos de los casos, las fibras con predominantemente densas (2/6; 33.33%) y en uno el tejido se observó dañado debido al procesamiento histológico y este se clasificó como N/A (1/6; 16.6%). (Figura F, G, H, I y J).

Las fibras del ligamento periodontal del grupo PC (6/6) son mixtas predominantemente delgadas (5/6; 83.33% vs 1/6; 16.6% N/A). Observamos el conjunto de fibras que se insertan muy por debajo de la unión cemento-esmalte. Las fibras perpendiculares a la raíz observadas se mezclan con haces de fibras desordenadas. Las fibras de colágena presentan un entrelazado laxo, delgado y con espacios vacíos que probablemente representan edema. En algunas zonas ya no se aprecia la arquitectura del ligamento.

El hueso alveolar tiñe rojo para el colorante, pero presenta zonas que tiñen de azul. (Figura 7 K, L, M, N y O).

Por último, el grupo PC+O3 (6/6), muestra haces de colágena mixtos predominantemente delgados (5/6; 83.3%) que tiñen de color rojo y guinda-negro. Las fibras se insertan por debajo de la unión cemento-esmalte y a lo largo de la raíz dentaria. A diferencia del grupo PC que no recibió tratamiento, en la zona interradicular todavía se puede observar la estructura de los haces de colágena, sin embargo, las fibras se ven más laxas con espacios amplios entre ellas en comparación al Sano y S+O3. En este grupo se observó un caso con fibras mixtas predominantemente densas (1/6; 16.6%) (Figura 7 P, Q, R, S y T).

Estadísticamente, se encontraron diferencias significativas entre el grupo Sano y Sano+O3 con respecto a los grupos PC y PC+O3 (*) $p \leq 0.05\%$ cuando los grupos se compararon con el grupo control (Gráfico 3).

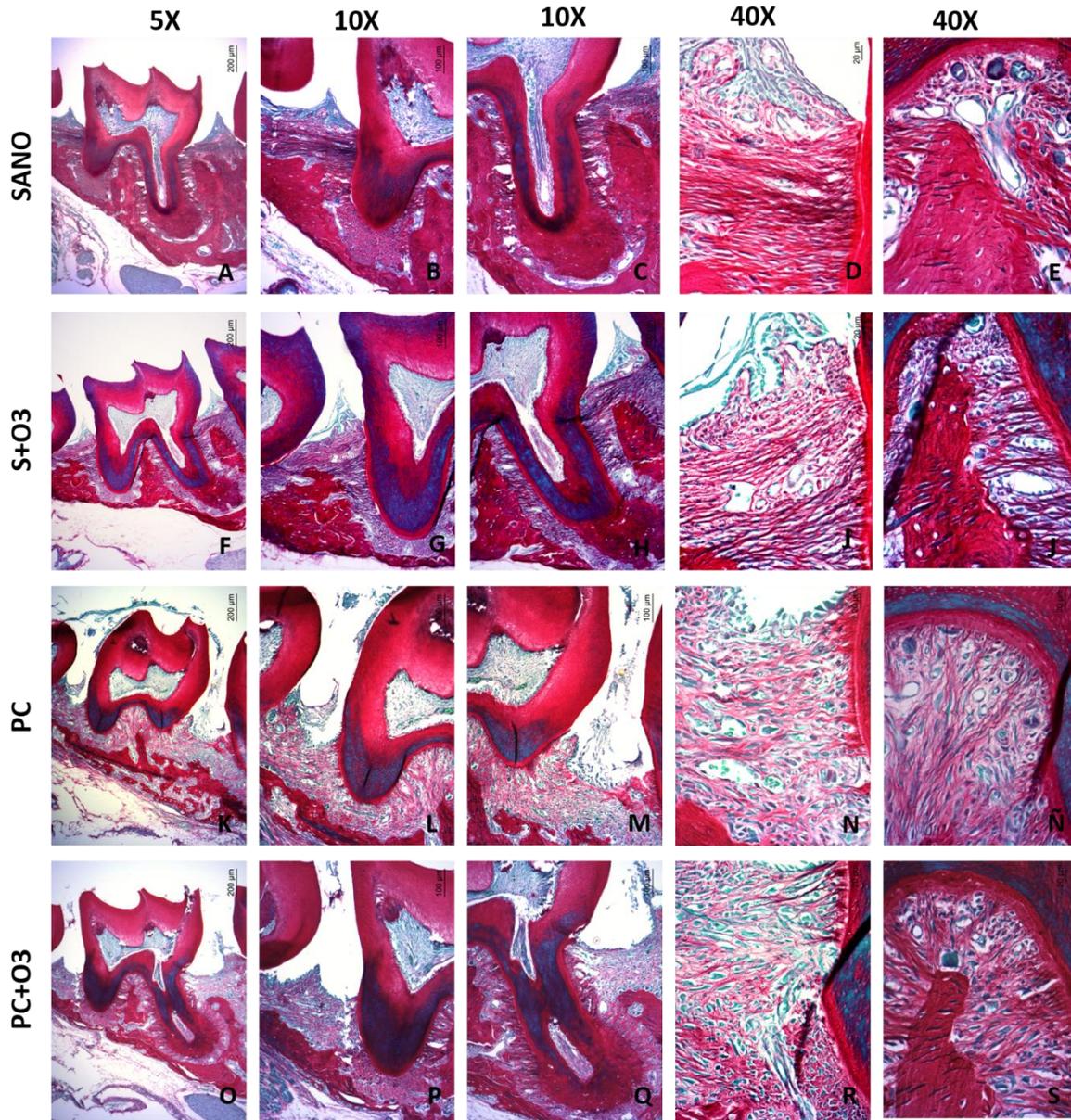


Figura 6. Microfotografías de los cortes teñidos con Sirius Red. Para la evaluación de las fibras de colágena

(A, B, C, D, E) Grupo Sano. Se observan fibras densas. (F, G, H, I, J) Grupo S+O3. Se observan fibras mixtas predominantemente densas. (K, L, M, N, Ñ) Grupo PC Se ha perdido el orden e inserción de las fibras de colágena que son mixtas predominantemente delgadas. (O, P, Q, R, S) Grupo PC+O3 En la zona interradicular se observan fibras tanto delgadas como densas y el nivel es conservado.

Calidad de las Fibras de Colágena

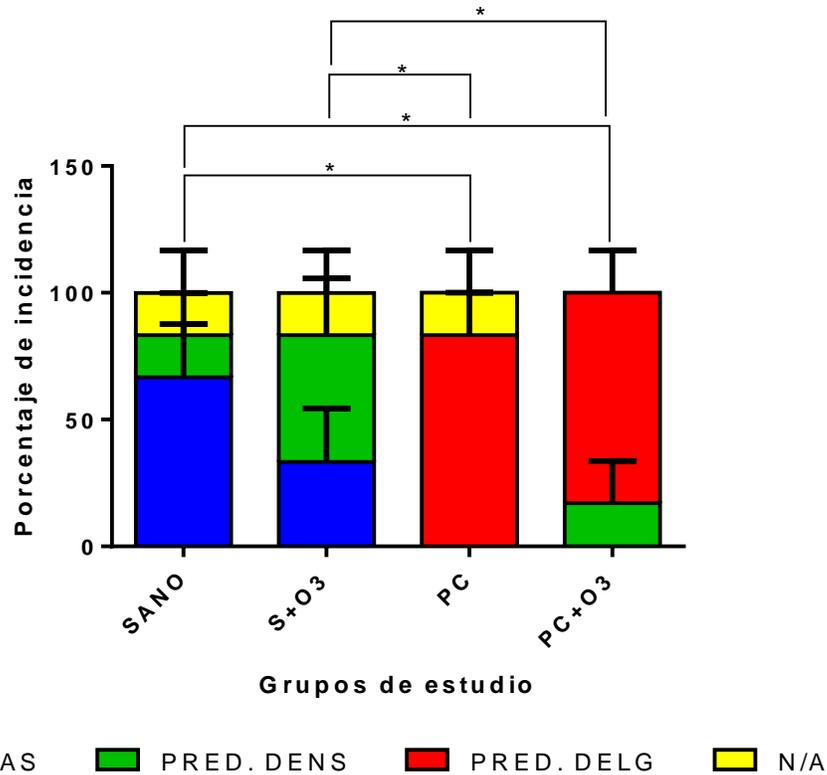


Gráfico 3. Incidencia de la calidad de las fibras de colágena.

El grupo con PC+O3 presenta fibras de colágena mixtas predominantemente delgadas de forma similar al grupo PC.

4.4. SUPLEMENTAR LA DIETA CON O3 REDUCE EL EDEMA Y PROMUEVE LA REPARACIÓN PERIODONTAL

En esta evaluación se utilizaron los cortes histológicos teñidos con Sirius Red y se tomaron en cuenta tres aspectos: la congestión de los vasos que refiere edema en los tejidos, el número de los vasos y el calibre de estos que denota la reparación del tejido.

En el grupo Sano (6/6) se encontraron vasos de pequeño calibre y de morfología circular (5/6; 83%), dispersos en el tejido conectivo adyacente a las raíces del segundo molar. En la mayoría de los casos no se observó congestión vascular (4/6; 67%) y los vasos sanguíneos son escasos (5/6; 83%) (Figura 7 A). Por lo que no se observa edema ni reparación tisular.

De manera interesante, en el grupo S+O3 (6/6) se visualizaron vasos tanto pequeños como grandes estos últimos con morfología ovalada (3/6; 50%). Además, de que se observó un ligero aumento en la formación de vasos sanguíneos (3/6; 50%) con respecto al grupo Sano (Figura 7 B), lo que sugiere una remodelación tisular.

En los tejidos periodontales del grupo PC (6/6), predominaron los vasos de gran calibre (4/6; 67%) con morfología ramificada característica del aumento en el proceso de formación de vasos sanguíneos (5/6; 83%). Dentro de su superficie se encontraron múltiples cúmulos de eritrocitos (6/6; 100%) (Figura 7 C), por lo que se identifica edema e inflamación en los tejidos.

El grupo PC+O3 (6/6), presentó tamaño y morfología de los vasos sanguíneos muy parecida al grupo Sano+O3 (3/6; 50%), ya que se obtuvo el mismo porcentaje de incidencia en la congestión de los vasos (4/6; 67%) y aunque se observó formación de vasos, fue menor en comparación al grupo PC que no recibió tratamiento (4/6; 67%) (Figura 7 D). Esto nos indica una reducción en el edema y mayor reparación de los tejidos.

El análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre el grupo Sano y el de PC, pero no entre los grupos PC y PC+O3. (*) $p \leq 0.05\%$ cuando los grupos se compararon con el grupo control (Gráfico 4).

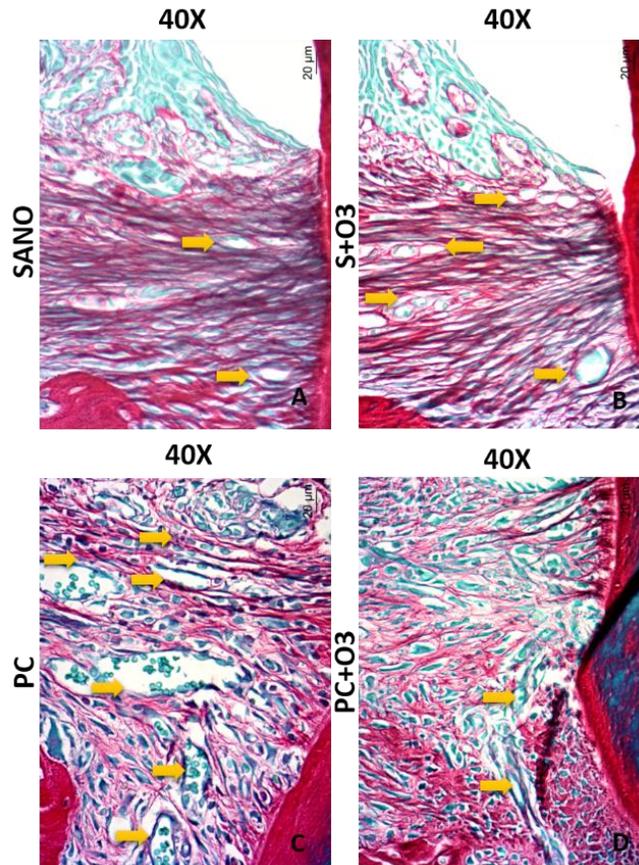


Figura 7. Microfotografías representativas de la caracterización del estado de los vasos sanguíneos en los diferentes grupos.

Las flechas indican, (A) Grupo Sano. Se muestran vasos pequeños y escasos en el tejido conectivo. (B) Grupo S+O3. Se observan vasos pequeños y grandes con aumento en el número de estos. (C) Grupo PC. Presencia de grandes vasos sanguíneos congestionados. (D) Grupo PC+O3. Los vasos son de menor calibre y número que el grupo PC, también se observan menos congestionados.

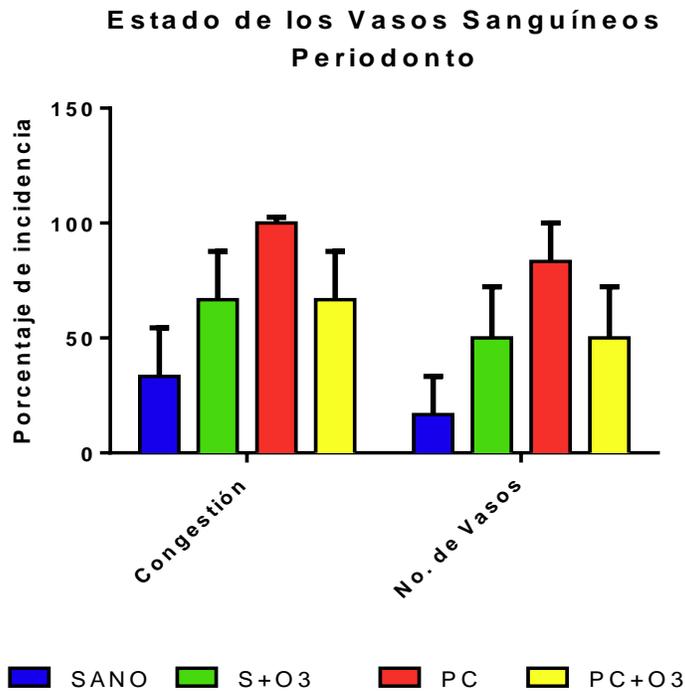


Gráfico 4. Cambios en el estado de los vasos sanguíneos. El grupo con PC presenta una mayor cantidad de número de vasos sanguíneos y congestión de estos en comparación con grupo Sano.

4.5. EL SUPLEMENTO ALIMENTICIO CON O3 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE MMP-9

La evaluación de la expresión de MMP-9 y MMP-2 se realizó con base en la intensidad de la reacción de peroxidasa, la cual se observó particularmente en los compartimientos correspondientes al citoplasma y ocasionalmente en el núcleo de células residentes en el periodonto.

La expresión de MMP-9 en el epitelio del grupo Sano (5/6), fue predominantemente positiva (+) especialmente en el estrato basal (4/6; 67%). Igualmente, el tejido conectivo subyacente tuvo una expresión positiva (4/6; 67%). En esta zona se observan, además, pequeños fibroblastos con morfología estrellada, con expresión positiva (3/6; 50%) y en algunos casos parcialmente positiva (-/+) (2/6; 33.3%). Las células endoteliales de este grupo tuvieron una expresión negativa (-) (5/6; 83.33%). En el borde del hueso alveolar, se observaron escasas poblaciones de células similares osteoclastos, cuya expresión proteica

fue altamente positiva (+++) en la mitad de las muestras (3/6; 50%) y positiva en el resto de ellas (2/6; 33.3%). Como se mencionó con anterioridad, en uno de los casos el tejido no era apto para realizar el análisis, se les asignó como N/A (1/6; 17%) (Figura 8 A, B).

El epitelio bucal del grupo S+O3 (5/6) tuvo una expresión parcialmente positiva (3/6; 50%), al igual que en el tejido conectivo subyacente (5/6; 83.3%). En este último, representado en su totalidad por poblaciones de fibroblastos pequeños y estrellados, cuya expresión fue parcialmente positiva en la mitad del grupo (3/6; 50%), en dos casos fue negativa (2/6; 33.3%) y en un caso fue N/A (1/6; 17%). Las células endoteliales mostraron un ligero aumento en la expresión de MMP-9, siendo parcialmente positiva en la mitad de los casos (3/6; 50%). Las células similares a osteoclastos ubicadas en el borde del hueso alveolar eran escasas, pero tuvieron expresión positiva en dos casos (2/6; 33.3%) y altamente positiva en dos casos más (2/6; 33.3%). Se observaron algunas células inflamatorias dispersas en el tejido con expresión negativa en dos casos (2/6; 33.3) y positiva en dos casos más (2/6; 33.3%) (Figura 8 C, D).

En el grupo PC (6/6) la expresión fue altamente positiva en el epitelio bucal y en el tejido conectivo subyacente de más de la mitad del grupo (4/6; 67%). Los fibroblastos pequeños y estrellados eran escasos, con expresión altamente positiva en dos casos (2/6; 33.3%) y parcialmente positiva en dos casos más (2/6; 33.3%). En este grupo ya es posible observar la presencia de fibroblastos grandes y ahusados con expresión altamente positiva en tres casos (3/6; 50%) y en dos casos fue negativa (2/6; 33.3%). Las células endoteliales son predominantemente positivas para la expresión de la proteína (3/6; 50%). Se aprecian un aumento considerable en el número de poblaciones de células similares a osteoclastos ubicadas en el borde del hueso alveolar, con expresión altamente positiva en la totalidad de los casos (6/6; 100%), al igual que en las células de tipo inflamatorio (5/6; 83.3%) (Figura 8 E, F).

El grupo PC+O3 (5/6), tiene una expresión parcialmente positiva en dos casos (2/6; 33.3%) y positiva en dos casos más (2/3; 33.3%) tanto en el epitelio bucal como en el tejido conectivo subyacente. Las poblaciones de fibroblastos presentan morfología pequeña y

estrellada con expresión positiva (4/6; 67%). Hay algunos grupos de fibroblastos grandes y ahusados positivos para la proteína (3/6; 50%). Asimismo, se aprecia menor presencia de células inflamatorias cuya expresión es positiva (3/6; 50%). Las células endoteliales muestran una expresión predominantemente negativa (3/6; 50%). En el borde del hueso alveolar se observan células similares a osteoclastos escasas con expresión positiva citoplasmática para la proteína (2/6; 33.3%) y altamente positiva (2/6; 33.3%) (Figura 8 G, H).

Estadísticamente se encontraron diferencias representativas en los grupos Sano y S+O3 en comparación al de PC, (*) $p \leq 0.05$ cuando los grupos se compararon con el grupo control (Gráfico 5).

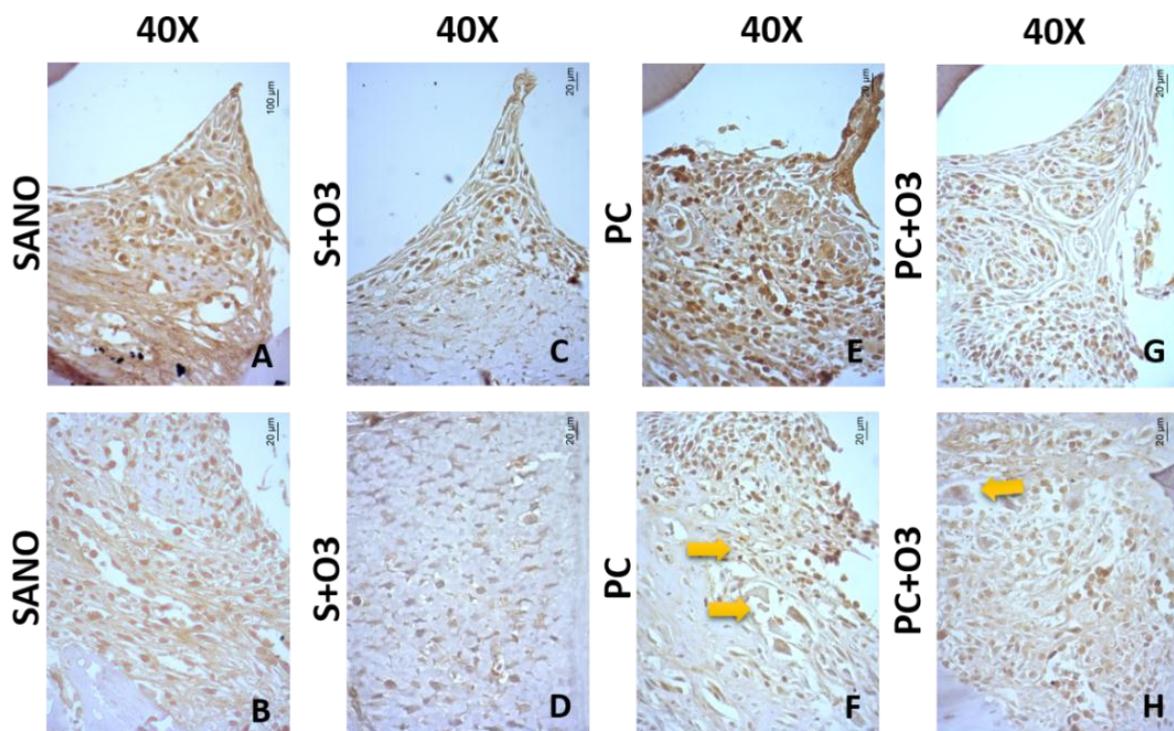


Figura 8. Microfotografías representativas de la expresión de MMP-9 en los diferentes grupos de estudio.

(A, B) Tejidos del grupo Sano que muestran expresión positiva de la proteína. (C, D) En el grupo S+O3 se observa menor intensidad de la expresión. (E, F) Destrucción del epitelio gingival en comparación a los grupos sin PC, por lo que hay mayor expresión de MMP-9. Se señalan grupos de células similares a osteoclastos y fibroblastos grandes y ahusados (flechas). (G, H) el grupo PC+O3 presentó menor intensidad en la expresión de la proteína que los grupos sin tratamiento (Flechas).

Expresión de MMP-9 Tejidos Periodontales

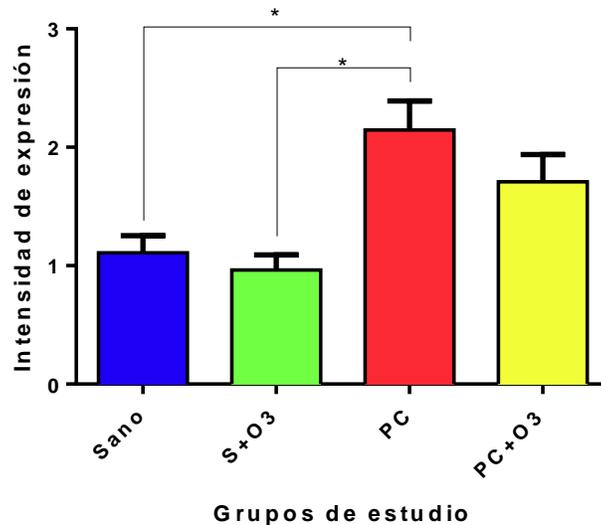


Gráfico 5. Intensidad de expresión de MMP-9 en el periodonto.

El grupo PC presenta mayor expresión de MMP-9 en comparación con los grupos sanos, S+O3 y PC+O3

4.6. EL O3 INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE MMP-2.

Se evaluó la expresión de la proteína MMP-2 por medio de inmunohistoquímica en tejidos periodontales sanos, en tejidos con periodontitis inducida por ligadura, y en tejidos murinos con periodontitis y suplemento con O3.

La expresión de proteína MMP-2 se presentó principalmente en el citoplasma de las células epiteliales de los tejidos periodontales murinos siendo ocasionalmente nuclear, además, los fibroblastos y las células inflamatorias como los PMN, los macrófagos y células plasmáticas también mostraron expresión citoplasmática y ocasionalmente nuclear para la proteína. En el borde del hueso alveolar, se observaron células grandes multinucleadas con prolongaciones citoplasmáticas adyacentes al hueso, similares a osteoclastos, mismos que tuvieron una expresión predominantemente citoplasmática para la proteína.

En el grupo Sano (6/6), se aprecia una expresión parcialmente positiva (-/+) de la proteína a nivel del epitelio bucal, esta se da primordialmente a nivel del estrato basal de la mitad

de los casos (3/6; 50%). El tejido conectivo subyacente al epitelio también muestra una expresión parcialmente negativa (4/6; 67%) y está compuesto por fibroblastos con forma estrellada y pequeña que tienen una expresión nula (-) o parcialmente negativa de la MMP-2 (3/6; 50% vs 3/6; 50%). La expresión de las células endoteliales e inflamatorias es negativa en la totalidad de los casos (6/6; 100%). Adyacentes al borde del hueso alveolar se observa un limitado número de células similares a osteoclastos cuya expresión de la proteína es negativa o parcialmente negativa (2/6; 33.3% vs 2/6; 33.3%). (Figura 9A y B)

El epitelio y el tejido conectivo subyacente del grupo S+O3 (4/6) presentaron una expresión parcialmente negativa (2/6; 33.3% y 3/6; 50%) respectivamente. Los fibroblastos ubicados en el tejido conectivo son pequeños y estrellados con expresión parcialmente negativa (3/6; 50%). En todas las muestras, las células epiteliales fueron negativas a la MMP-2 (4/6; 67%) mientras que las células inflamatorias tuvieron expresión nula o escasa (2/3; 33.3% vs 2/3; 33.3%) de la proteína. Al igual que en el grupo Sano, se encontraron grupos reducidos de osteoclastos, sin embargo, estos presentaron un aumento en la expresión, siendo esta predominantemente positiva (+++) (2/6; 33.3%). (Figura 9C y D)

En el caso del grupo PC (6/6) la expresión de MMP-2 en el epitelio fue positiva (3/6, 50%). Lo mismo sucedió en el tejido conectivo subyacente en donde se encontró una expresión positiva (4/6; 67%). En esta zona se ubicaron fibroblastos tanto pequeños y estrellados como grandes y ahusados con expresión positiva de la proteína (3/6; 50%) en ambas poblaciones. En cuanto a las células endoteliales, estas obtuvieron una expresión nula o parcialmente negativa (4/6, 67% vs 2/6; 33.3%). Dentro de este grupo se identificaron múltiples poblaciones de células inflamatorias cuya expresión fue positiva en la mitad de las muestras (3/6; 50%). (Figura 9E y F)

Por último, el grupo de PC+O3 (6/6), mostró una expresión positiva en todos los estratos del epitelio bucal de la mitad de los casos (3/6; 50%). El tejido conectivo subyacente se caracteriza por la presencia de fibroblastos pequeños y estrellados que expresan la proteína parcialmente (3/6; 50%) y fibroblastos ahusados de mayor tamaño cuya

expresión es parcialmente positiva y positiva en dos casos más (2/6; 33.3% vs 2/6; 33.3%). Las células endoteliales tuvieron una expresión negativa en casi todo el grupo (5/6; 100%). Por el contrario, las células inflamatorias presentaron expresión altamente positiva (+++) en gran parte de las muestras (4/6; 67%). Las células similares a osteoclastos halladas en el borde del tejido óseo son positivas en la mitad del grupo (3/6; 50%). (Figura 9G y H)

Estadísticamente se obtuvieron diferencias significativas en el grupo Sano con respecto al de PC y PC+O3, (*) $p \leq 0.05$ cuando los grupos se compararon con el grupo control. (Gráfico 6)

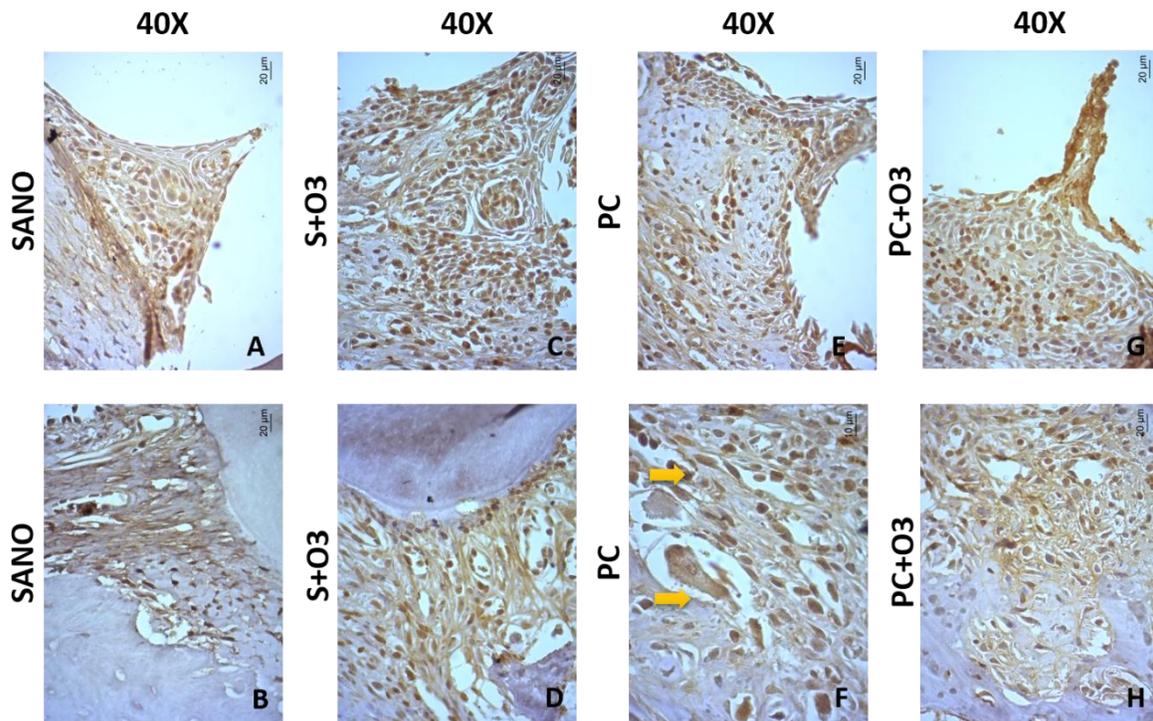


Figura 9. Microfotografías representativas de la expresión de MMP-2 en los diferentes grupos de estudio

(A, B) Tejidos del grupo Sano que muestra escasa expresión positiva de la proteína. (C, D) En el grupo S+O3 se observa mayor expresión en comparación al sano. (E, F) Destrucción del epitelio, se observa mayor expresión en la capa basal. En el tejido conectivo se observan poblaciones de fibroblastos grandes y ahusados (flechas). (G, H) el grupo PC+O3 presentó mayor expresión en comparación a todos los grupos (Flechas).

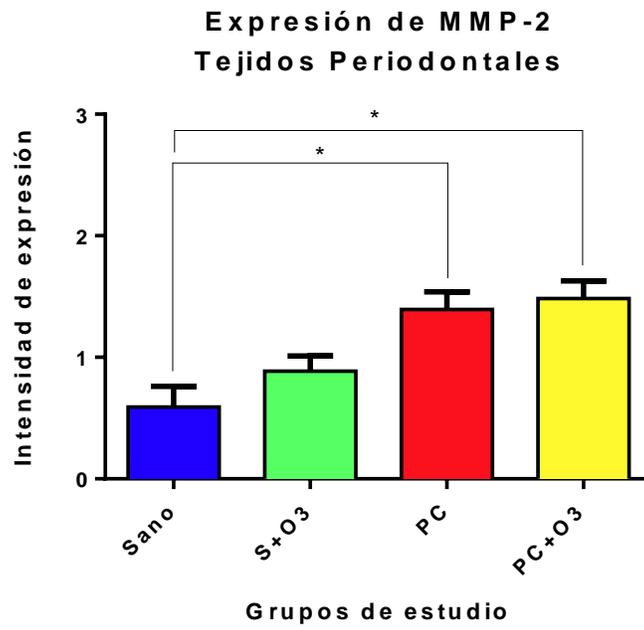


Gráfico 6. Intensidad de la expresión de MMP-2

El grupo PC+O3 presenta mayor expresión de MMP-2 en comparación con los grupos sanos, O3, y PC.

DISCUSIÓN

La PC es una enfermedad de carácter infeccioso e inflamatorio crónico causante de la destrucción de los tejidos de soporte del diente.

Dentro de las características se encuentra la presencia de un denso infiltrado inflamatorio representado por neutrófilos, macrófagos y células plasmáticas encargadas de producir moléculas de tipo proinflamatorio como las MMP's que propician la destrucción de las fibras de colágena y la activación de mecanismos de resorción del hueso alveolar (19).

También se ha descrito que hay un remodelado continuo de la red de vasos que se encuentran en el tejido subyacente al epitelio, con un marcado incremento en la densidad numérica y diámetro de los vasos (edema), resultado de la angiogénesis (41).

En los últimos años, han surgido investigaciones respecto a los efectos benéficos del O3 en enfermedades crónico-degenerativas las cuales se caracterizan por un componente inflamatorio.

Por esta razón el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto y potencial de los ácidos grasos O3 como parte del tratamiento de la inflamación presente en la periodontitis, a partir de muestras histológicas obtenidas de un modelo murino experimental.

Inicialmente encontramos una menor pérdida del hueso alveolar en el grupo PC+O3, estos resultados coinciden con los mostrados con anterioridad en los estudios de Bendyk et al. (2009) y Kesavalu, L., et al. (2006)., en donde expusieron que en modelos murinos de periodontitis al que se le suplementó la dieta con aceite de pescado, hubo hasta un 72% menos pérdida ósea aun con la presencia de *P. gingivalis* (28, 35).

En la evaluación histológica del estado inflamatorio, pudimos observar que el grupo PC+O3 si bien presentó signos de destrucción periodontal, esta no fue de la misma magnitud que en el grupo PC que no recibió tratamiento. Más aún, el grupo PC+O3 mostró inflamación ligera ya que hubo una disminución del infiltrado inflamatorio en la zona del segundo molar en donde se colocó la ligadura.

Este efecto antiinflamatorio también fue reportado en un estudio realizado por Hasturk, H., et al. (2006), en donde a conejos con PC inducida por ligadura e inoculación de *P. gingivalis* y que recibieron aplicaciones tópicas de resolvina E1 (RvE1) el cual es un metabolito del O3, tuvieron una menor infiltración de neutrófilos en el sitio de la lesión y por lo tanto se observó escasa destrucción tisular (39).

En otro estudio similar en el que se comparó el suplemento con O3 como tratamiento profiláctico y coadyuvante del tratamiento de la enfermedad periodontal inducida por presencia de lipopolisacáridos (LPS), se observó inflamación ligera o moderada que provocaba leves cambios en la red de vasos sanguíneos y en fibras periodontales lo cual es muy parecido a lo observado en nuestro trabajo (42).

Según nuestras investigaciones, hasta el momento ningún estudio ha evaluado el efecto del O3 sobre los cambios en la composición de las fibras de colágena que constituyen el periodonto. Aunque estadísticamente no tuvimos datos significativos debido al tamaño de la muestra, histológicamente pudimos observar que en el grupo PC+O3 se evitó el deterioro excesivo de las fibras de colágena, ya que en algunos casos se encontraron fibras mixtas predominantemente densas y por lo tanto también existió una menor pérdida de inserción del ligamento periodontal. Lo anterior puede relacionarse con que el O3 promueve la continua reparación y remodelación de los tejidos.

No obstante, si existen estudios que demuestran que productos derivados del O3 como el EPA y el DHA, mejoran el proceso de cicatrización. Hankenson, K. D., et al. (2000), demostraron que el EPA afecto de forma positiva el proceso de reparación de una herida *in vitro* a través del aumento de la síntesis y producción de colágena por parte de fibroblastos del ligamento colateral medial (43).

Otro aspecto evaluado en el presente estudio, el estado de los vasos sanguíneos después de la administración de O3. Los cambios de las condiciones de los vasos sanguíneos en el grupo PC+O3 fueron evidentes; se observaron menos cúmulos de células sanguíneas en el lumen de los vasos además de que se redujo la neoformación y el tamaño de estos, contrario a lo que se puede apreciar en el grupo PC. Estos resultados indican que el

tratamiento con O₃, contribuye a la reducción del edema y la promoción de la reparación tisular.

A pesar de que no se han elaborado estudios sobre este efecto del O₃ específicamente en la periodontitis, si hay antecedentes del uso de O₃ o alguno de sus derivados para disminuir el proceso de formación de vasos sanguíneos. Zhuang, W., et al. (2013), demostraron que el EPA y DHA, suprime la expresión del factor de crecimiento vascular (VEGF) en células endoteliales *in vitro*, el cual se ha propuesto como blanco terapéutico en enfermedades angiogénicas e inflamatorias (44).

Dentro de los resultados obtenidos en la evaluación de la expresión de MMP's en tejidos periodontales murinos, se encontró que el O₃ disminuye la expresión de MMP-9.

En múltiples estudios se ha encontrado una alta expresión de MMP-9, LGC y tejidos con periodontitis, mientras que la MMP-2 se halla en menores cantidades, lo que coincide con lo observado en las muestras del grupo PC sometidas a inmunohistoquímica (45-47).

Aun no se han presentado trabajos que estudien el potencial de O₃ para disminuir la producción de MMP-2 y MMP-9 en la periodontitis. Sin embargo, si existe evidencia de que el O₃ y sus derivados contribuyen a la regulación de estas MMP's.

En un estudio realizado en cultivos celulares de queratinocitos de humanos, se determinó que el pre-tratamiento con EPA, inhibió la expresión de MMP-9 inducida por la producción de TNF- α (48). De forma parecida, nosotros observamos que el O₃ disminuye la expresión de la MMP-9 en la PC, por lo que probablemente, reduce la destrucción periodontal mediada por la inflamación.

La expresión de MMP-2 fue altamente positiva aun con el suplemento alimenticio. Esto podría deberse a que el O₃ favorece a la remodelación de los tejidos, y como se mencionó anteriormente la MMP-2 se expresa de forma constitutiva y está más relacionada procesos de remodelado que con procesos inflamatorios como es el caso de la MMP-9. Este resultado es contrario al reportado por Nicolai, E., et al. (2017). en los que se ha visto

que el uso de O3 reduce los niveles de MMP-2 en dentina de dientes tratados *in vivo* y *ex vivo* (49).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el suplemento alimenticio con O3 representa una opción quimioterapéutica viable para modular la inflamación y promover la reparación tisular como complemento del tratamiento periodontal convencional.

CONCLUSIONES

El suplemento alimenticio con O3 en el modelo de periodontitis murina:

- Disminuye la destrucción del hueso alveolar.
- Reduce el infiltrado inflamatorio.
- Evita la degradación excesiva de las fibras de colágena.
- Disminuye el edema y promueve la reparación tisular.
- Disminuye la expresión de MMP-9 en los tejidos periodontales.
- Incrementa la expresión MMP-2 en los tejidos periodontales.

Determinamos que el suplemento de la dieta con O3 reduce la inflamación y la destrucción de los tejidos en la periodontitis murina.

REFERENCIAS

1. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*. 1999;4(1):1-6.
2. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontology 2000*. 2013;62(1):203-17.
3. Van Dyke TE. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Molecular aspects of medicine*. 2017;58:21-36.
4. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010:A Systematic Analysis. *Journal of Dental Research*. 2013;92(7):592-7.
5. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. *Journal of Periodontology*. 2005;76(12):2187-93.
6. Hasturk H, Kantarci A. Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontology 2000*. 2015;69(1):255-73.
7. Dye BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontology 2000*. 2012;58(1):10-25.
8. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal*. 2009;54 Suppl 1:S11-26.
9. Lamster IB, Pagan M. Periodontal disease and the metabolic syndrome. *International dental journal*. 2017;67(2):67-77.
10. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *Journal (Canadian Dental Association)*. 2000;66(11):594-7.
11. Hasan A, Palmer RM. A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. *British dental journal*. 2014;216(8):457-61.
12. Mark Bartold P, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontology 2000*. 2017;75(1):317-29.
13. Sonnenschein SK, Meyle J. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontology 2000*. 2015;69(1):221-54.
14. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013;2013:7.
15. Yucel-Lindberg T, Bage T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2013;15:e7.
16. Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32 Suppl 6:87-107.
17. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2001;25:8-20.
18. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):116-51.
19. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2014;64(1):57-80.
20. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *Journal of periodontal research*. 2002;37(3):196-203.
21. Franco C, Patricia H-R, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(2):440.

22. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral diseases*. 2014;20(6):538-50.
23. Dahan M, Nawrocki B, Elkaim R, Soell M, Bolcato-Bellemin AL, Birembaut P, et al. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *Journal of clinical periodontology*. 2001;28(2):128-36.
24. de Araujo Junior RF, Souza TO, de Medeiros CA, de Souza LB, Freitas Mde L, de Lucena HF, et al. Carvedilol decrease IL-1beta and TNF-alpha, inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL expression, and up-regulates OPG in a rat model of periodontitis. *PloS one*. 2013;8(7):e66391.
25. Saed GM, Zhang W, Diamond MP. Effect of Hypoxia on Stimulatory Effect of TGF- β 1 on MMP-2 and MMP-9 Activities in Mouse Fibroblasts. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2000;7(6):348-54.
26. El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M, Darweesh M, Alshahat M, Kantarci A, et al. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 Fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol*. 2010;81(11):1635-43.
27. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 1997;46(8):310-9.
28. Bendyk A, Marino V, Zilm PS, Howe P, Bartold PM. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *Journal of periodontal research*. 2009;44(2):211-6.
29. Badran Z, Kraehenmann M, Guicheux J, Soueidan A. Bisphosphonates in Periodontal Treatment: A Review 2009. 3-12 p.
30. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 1997;14:112-43.
31. Im DS. Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages. *European journal of pharmacology*. 2016;785:36-43.
32. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews*. 2010;68(5):280-9.
33. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Molecular nutrition & food research*. 2012;56(7):1073-80.
34. Van Dyke TE. The Management of Inflammation in Periodontal Disease. *Journal of periodontology*. 2008;79(8 Suppl):1601-8.
35. Kesavalu L, Vasudevan B, Raghu B, Browning E, Dawson D, Novak JM, et al. Omega-3 Fatty Acid Effect on Alveolar Bone Loss in Rats. *Journal of dental research*. 2006;85(7):648-52.
36. Kim HJ, Ohk B, Yoon HJ, Kang WY, Seong SJ, Kim SY, et al. Docosahexaenoic acid signaling attenuates the proliferation and differentiation of bone marrow-derived osteoclast precursors and promotes apoptosis in mature osteoclasts. *Cellular signalling*. 2017;29:226-32.
37. Martínez-Milán MP-O, AL; García-Hernández, AL. El suplemento alimenticio con ácidos grasos omega 3 disminuye la inflamación y pérdida ósea periodontal murina. 2017.
38. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of immunological methods*. 2013;394(1-2):49-54.
39. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, et al. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(2):401-3.
40. Cantley MD, Haynes DR, Marino V, Bartold PM. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38(6):532-41.

41. Chapple CC, Kumar RK, Hunter N. Vascular remodelling in chronic inflammatory periodontal disease. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2000;29(10):500-6.
42. Araghizadeh N, Paknejad M, Alaeddini M, Minaii B, Abdollahi M, Khorasanie R. The efficacy and prophylactic characteristics of omega-3 fatty acids in experimental gingivitis in rats. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2014;17(2):87-92.
43. Hankenson KD, Watkins BA, Schoenlein IA, Allen KGD, Turek JJ. Omega-3 Fatty Acids Enhance Ligament Fibroblast Collagen Formation in Association with Changes in Interleukin-6 Production. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 2000;223(1):88-95.
44. Zhuang W, Wang G, Li L, Lin G, Deng Z. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reduce Vascular Endothelial Growth Factor Production and Suppress Endothelial Wound Repair. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2013;6(2):287-93.
45. Rai B, Kaur J, Jain R, Anand SC. Levels of gingival crevicular metalloproteinases-8 and -9 in periodontitis. *The Saudi Dental Journal*. 2010;22(3):129-31.
46. Victor DJ, Subramanian S, Gnana PPS, Kolagani SP. Assessment of Matrix Metalloproteinases-8 and -9 in Gingival Crevicular Fluid of Smokers and Non-smokers with Chronic Periodontitis Using ELISA. *Journal of International Oral Health : JIOH*. 2014;6(6):67-71.
47. Makela M, Salo T, Uitto V-J, Larjava H. Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the Oral Cavity: Cellular Origin and Relationship to Periodontal Status. *Journal of Dental Research*. 1994;73(8):1397-406.
48. Kim HH, Lee Y, Eun HC, Chung JH. Eicosapentaenoic acid inhibits TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human keratinocytes, HaCaT cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;368(2):343-9.
49. Nicolai E, Sinibaldi F, Sannino G, Laganà G, Basoli F, Licocchia S, et al. Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids Act as Inhibitors of the Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 Activity. *The Protein Journal*. 2017;36(4):278-85.