



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

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

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A (N)

Enrique Guillermo Licona

Fernanda Isabel Rosas Aranda

Director: Mtra. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez

Dictaminadores: Dra. Miriam Rodríguez Sosa

CD. Fernando Galván Toledo



Los Reyes Iztacala, Edo de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Lo que no te mata te hiere de gravedad y te deja tan apaleado, que luego aceptas cualquier maltrato y te dices a ti mismo que eso te fortalece”

Friedrich Nietzsche

Y así es, te fortalece...

Agradecimientos Personales

Agradezco a la Mtra. Betsaida Ortiz por ser fundamental en este proceso tan importante de mi vida, estoy eternamente agradecido, la llevaré siempre conmigo.

Agradezco a la Dra. Miriam Rodríguez por todos los momentos que me ha dado, los cuales me han enriquecido de una manera la cual no me alcanzan las palabras para describir.

Agradezco al CD. Fernando Galván Toledo por el apoyo brindado, el cual no tiene punto de comparación, es usted un ser humano invaluable.

Agradezco a la Mtra. Imelda Juárez, tu paciencia, tu carácter y tus conocimientos son un pilar para el trabajo que realice, gracias por estar siempre ahí.

Agradezco a la Dra. Norma Buenrostro por tomarse el tiempo para apoyarnos en el análisis con el microscopio confocal, gracias.

A mis abuelitas, Piva y Rique gracias por todos los años que me han regalado son el obsequio más preciado que la vida me pudo dar. No hay palabras para describir lo que siento por ustedes. No existen.

A mis padres y hermano, Manolo, Elena, Isra y Marquito, gracias por todo lo que me han dado, quiero que sepan que esto sin ustedes no hubiera sido posible.

A mis amigos que son como hermanos, a cada uno de ustedes gracias, son tan importantes para mí como no tienen idea, Chimina, Jimenita, Kalita, Turín, Anita, Meli, Teresita y Gil. Los amo y sé que nuestra amistad será para siempre. Soy muy afortunado de haberlos encontrado.

Fer, gracias por estar junto a mí siempre y brindarme tu amistad sincer hiciste más ligero el largo camino. Eres maravillosa.

A cada uno de mis maestros que son pilares en mi formación profesional y académica, pero también me han dotado de herramientas para ser mejor persona y mejor ser humano.

A cada una de las personas que me he encontrado en el camino y que me han regalado su amistad y muchas cosas más, German, Rosario, Andrés, Ceci, Nancy, Ivancito, Lis, Brendita, Bere, Celic, Peter, Angie, Astrid, Vania, Paola, Dianita, Cacho, Carest Jazieli, Adriana, Rebe, Clori, Xime, Javi y Toño. Aunque algunos ya no estén a mi lado y otros vayan llegando, a todos y a cada uno, han dejado una huella imborrable.

A cada uno de los integrantes del Laboratorio 5 de UBIMED que me brindaron su calidez, apoyo y sus conocimientos durante mi estancia, gracias Tona, Oscar, Sonia, Alexia, Danae, Caro, Thalía, Martha, Alejandro, Salvador, Octavio cada uno ustedes son increíbles.

Dedicatoria

A mí familia con todo mi amor Piva, Bolita, Bolito, Marquito, Isra, Rique, Chavo y Taty gracias por todo lo que me han dado, soy quién soy gracias a ustedes.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I. ÍNDICE DE FIGURAS | 1 |
| II. ABREVIATURAS | 3 |
| III. RESUMEN | 5 |
| IV. ABSTRACT | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1 Periodonto | 9 |
| 1.2 Encía | 10 |
| 1.2.1 Características Clínicas de la Encía | 10 |
| 1.2.2 Fibras Gingivales | 14 |
| 1.3 Epitelio de Unión | 15 |
| 1.4 Cemento Dentario | 16 |
| 1.5 Ligamento Periodontal | 18 |
| 1.6 Hueso Alveolar | 21 |
| 1.7 Periodontitis | 23 |
| 1.8 Hormonas presentes en la gestación | 25 |
| 1.9 Inmunología | 26 |
| 1.10 Metaloproteinasas | 28 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 30 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 30 |
| 4. HIPÓTESIS | 30 |
| 5. OBJETIVOS | 30 |
| 5.1 Objetivo General | 30 |
| 5.2 Objetivos Particulares | 30 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 6.1 Consideraciones Éticas | 31 |
| 6.2 Animales | 31 |
| 6.3 Inducción de Periodontitis | 32 |

| | |
|--|----|
| 6.4 Sacrificio y Obtención de Maxilares | 33 |
| 6.5 Análisis Histopatológico | 34 |
| 6.5.1 Técnica Hematoxilina-Eosina | 37 |
| 6.5.2 Técnica Tricrómica de Masson | 38 |
| 6.5.3 Técnica de Inmunofluorescencia | 38 |
| 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 39 |
| 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS | |
| 40 | |
| 8.1 Histología con Hematoxilina & Eosina | 40 |
| 8.1.1 Análisis del Nivel de Inserción | 44 |
| 8.2 Histología con Tricrómica de Masson | 45 |
| 8.3 Inmunofluorescencia de MMP-13 | 49 |
| 8.3.1 Análisis Comparativo de la Expresión de MMP-13 | 53 |
| 8.4 Inmunofluorescencia de MMP-2 | 54 |
| 8.4.1 Análisis comparativo de la Expresión de MMP-2 | 58 |
| 9. DISCUSION | 59 |
| 10. CONCLUSIÓN | 60 |
| 11. PERSPECTIVAS | 60 |
| 12. ANEXO | 61 |
| 12.1 Tren de Deshidratación | 61 |
| 12.2 Tren de Inclusión | 61 |
| 12.3 Preparación de portaobjetos | 61 |
| 12.4 Preparación de Ruyter | 61 |
| 12.5 Paraformaldehído | 62 |
| 12.6 EDTA | 62 |
| 12.7 Técnica de Hematoxilina-Eosina | 62 |
| 12.8 Técnica Tricrómica de Masson | 63 |
| 12.9 Técnica de Inmunofluorescencia | 64 |
| BIBLIOGRAFÍA | 65 |

I. INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Diagrama de los elementos del periodonto.

Fig. 2. Puntos de referencia anatómicos de la encía.

Fig. 3. Características clínicas de la encía.

Fig. 4. Encía Libre.

Fig. 5. Dibujo esquemático de un corte histológico.

Fig. 6. Encía insertada.

Fig. 7. Fibras Dentogingivales.

Fig. 8. Estructura del Epitelio Conjuntivo.

Fig. 9. Tipos de Cemento-Estructura. Localización y Desarrollo.

Fig. 10. Haces de Fibras I.

Fig. 11. Haces de Fibras III.

Fig. 12. Haces de Fibras II.

Fig. 13. Hueso Alveolar.

Fig. 14. Desarrollo de la Placa Dental.

Fig. 15. Interacción de RANK.

Fig. 16. Tipos de células.

Fig. 17. Estructura de MMPs.

Fig. 18. Organización de grupos.

Fig. 19. Cronograma.

Fig. 20. Colocación de ligadura.

Fig. 21. Punción cardiaca.

Fig. 22. Obtención de maxilar.

Fig. 23. EDTA.

Fig. 24. Aceite de cedro.

Fig. 25. Horno de Parafina.

Fig. 26. Inclusión.

Fig. 27. Corte en micrótopo.

Fig. 28. Plancha de estiramiento.

Fig. 29. Selección de laminillas.

Fig. 30. Tren de tinción H&E.

Fig. 31. Tren de tinción Tricrómica de Masson.

Fig. 32. Tinción H&E en WT.

Fig. 33. Tinción H&E en *Mif*^{-/-}.

Fig. 34. Tinción Tricrómica de Masson en WT.

Fig. 35. Tinción Tricrómica de Masson en *Mif*^{-/-}.

Fig. 36. Expresión de MMP-13 en WT.

Fig. 37. Expresión de MMP-13 en *Mif*^{-/-}.

Fig. 38. Expresión de MMP-2 en WT.

Fig. 39. Expresión de MMP-2 en *Mif*^{-/-}.

Gráfica A) Nivel de Inserción Vestibular.

Gráfica B) Nivel de Inserción Palatino.

Gráfica C) Expresión de MMP-13.

Gráfica D) Expresión de MMP-2.

II ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| IL | Interleucina |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| Fig | Figura |
| E | Encía |
| FC | Fibras circulares |
| FDG | Fibras dentogingivales |
| FDP | Fibras dentoperiósticas |
| FT | Fibras transeptales |
| GLT | Fibra granular de Tomes |
| PTH | Hormona paratiroidea |
| LP | Ligamento periodontal |
| CR | Cemento radicular |
| HA | Hueso alveolar |
| <i>Aa</i> | <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> |
| <i>Pg</i> | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| <i>Pi</i> | <i>Prevotella intermedia</i> |
| <i>Bl</i> | <i>Bacteroides forsythus</i> |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IFN | Interferón |
| Th | Linfocito T helper |
| Tc | Linfocito T citotóxico |
| HGC | Hormona gonadotrofina coriónica humana |
| MMP | Metaloproteinasa |
| EMC | Matriz extracelular |
| E2 | Estradiol |
| PMNs | Polimorfonucleares |

UCE Unión cemento-esmalte

KO Knock Out

Mif Factor de inhibición de migración de macrófagos

Mif^{-/-} Knock out para MIF

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

H&E Hematoxilina y eosina

ANEST Anestesia

CTL Control

G Gestante

PE Periodontitis Experimental

PAG Periodontitis Asociada a Gestación

Fn *Fusobacterium nucleatum*

LPS Lipopolisacárido

III RESUMEN

Las infecciones periodontales están presentes en la encía y las estructuras de soporte del diente (ligamento y hueso alveolar) y están producidas por ciertas bacterias provenientes de la placa subgingival. Particularmente, *F. nucleatum* puede inducir respuesta inflamatoria aumentando la expresión de citocinas pro-inflamatorias, así como metaloproteinasas [1]. La gestación modifica aspectos clínicos, citológicos y microbiológicos, las hormonas sexuales pueden alterar la respuesta inmune y tisular al biofilm. La relación entre los mediadores inmunológicos como las citocinas expresadas en mujeres gestantes y el desarrollo de la periodontitis no se ha establecido de manera puntual [2]. El factor inhibidor de migración de macrófagos (*Mif*) juega un papel crítico en las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Se conoce que *Mif* regula positivamente las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que causan la degradación de los tejidos blandos. Se sabe que la expresión de MMP-2 y MMP-13 aumenta en la presencia de periodontitis y se sobre expresa durante la gestación [3]. Sin embargo, la relación entre la expresión de MMP's y *Mif* durante la gestación no se ha establecido. Se utilizaron ratones hembras de 8 a 10 semanas de edad de la cepa BALB/c (Bioterio FES-I). Estudiamos 4 grupos experimentales con el fin de establecer la relación de *Mif* con las MMPs; 1) Control (CTL), 2) Gestación (G), 3) Periodontitis Experimental (PE), 4) Periodontitis Asociada a Gestación (PAG). Registramos los cambios histológicos en todos los grupos con la técnica H&E y Tricrómica de Masson y cuantificamos la fluorescencia de MMP-2 y MMP-13. Se observaron alteraciones histológicas significativas, la presencia de *Mif* aumenta la profundidad en el nivel de inserción vestibular y palatino durante la PE y favorece la desorganización de las fibras de colágeno en PE y PAG. *Mif* favorece la sobreexpresión de MMP-13 en comparación con el grupo *Mif*^{-/-}, el cual mantiene una expresión basal. En el modelo PAG se observa una disminución de la expresión de MMP-2 en comparación con los otros grupos. En conclusión *Mif* aumenta la expresión de MMP-2 y MMP-13 y esta se ve afectada por la gestación.

IV ABSTRACT

Periodontal infections are present in the gingiva and supporting structures of the teeth (ligament and alveolar bone) and are produced by certain bacteria from the subgingival biofilm. In particular, *F. nucleatum* can induce an inflammatory response by increasing the expression of pro-inflammatory cytokines, as well as metalloproteinases [1]. The pregnancy modifies clinical, cytological and microbiological aspects; sex hormones can alter the immune and tissue response to the biofilm. The relationship between immunological mediators such as cytokines expressed in pregnant women and the development of periodontitis has not been established in a timely manner [2]. The macrophage migration inhibiting factor (*Mif*) plays a critical role in acute and chronic inflammatory diseases. It is known that *Mif* positively regulates the matrix metalloproteinases (MMPs) that cause the degradation of soft tissues. It is known that the expression of MMP-2 and MMP-13 increases in the presence of periodontitis and is overexpressed during pregnancy [3]. However, the relationship between the expression of MMPs and *Mif* during pregnancy has not been established. Female mice of 5 to 10 weeks of age of the BALB / c strain (Bioterium FES-I) were used. We studied 4 experimental groups in order to establish the relationship of *Mif* with the MMPs; 1) Control (CTL), 2) Pregnancy (G), 3) Experimental Periodontitis (PE), 4) Periodontitis pregnancy-associated (PAG). We recorded the histological changes in all the groups with the H & E and Masson's Trichromic technique and quantified the fluorescence of MMP-2 and MMP-13. Significant histological alterations were observed; the presence of *Mif* increases the insertion depth in vestibular and palatal surfaces during PE and favors the disorganization of the collagen fibers in PE and PAG. *Mif* favors the overexpression of MMP-13 in comparison with the *Mif* $-/-$ group, which maintains a basal expression. In the PAG model, a decrease in the expression of MMP-2 is observed in comparison with the other groups. In conclusion *Mif* increases the expression of MMP-2 and MMP-13 and this is affected by pregnancy.

1. Introducción

La periodontitis es una de las enfermedades bucales más comunes en humanos. Se ha definido a la periodontitis como el proceso inflamatorio que daña el periodonto de inserción (ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular) [4]. La etiología de la enfermedad es principalmente infecciosa (biofilm oral), y el tratamiento se enfoca fundamentalmente en el control de la infección y reducción de la inflamación [5]. Afecta a más del 23% de mujeres en edades entre los 23 y los 54 años y está presente en el 56% de las mujeres gestantes [6]. Las variaciones hormonales que experimentan las mujeres en situaciones fisiológicas como la pubertad, menstruación, embarazo y menopausia; y no fisiológicas como la terapia de reemplazo hormonal y el uso de anticonceptivos orales, producen cambios en las características del periodonto, especialmente debido a la inflamación gingival inducida por biofilm bacteriano preexistente. La etiología a través de la cual las hormonas sexuales esteroideas femeninas afectan el periodonto, especialmente durante el embarazo, es variada. La encía humana contiene receptores para estrógeno y progesterona, y por lo tanto, un incremento plasmático de estas hormonas resulta en un aumento y acumulación de ellas en los tejidos gingivales que dan lugar a inflamación [2].

Las bacterias anaerobias gramnegativas más importantes y prevalentes en el área subgingival son el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythensis* (Tf) y *Fusobacterium nucleatum* (Fn). Estas bacterias tienen un importante papel en el comienzo y posterior desarrollo de la periodontitis participando en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de un mecanismo inmunopatogénico. Una vez establecida la periodontitis, se forma un infiltrado inflamatorio constituido por diferentes tipos celulares como macrófagos y linfocitos, que producirán distintos subtipos de citocinas, mediadores biológicos responsables de la inmunopatología de diversas enfermedades [1]. La estimulación del receptores tipo Toll 4 (TLR4) por el lipopolisacárido (LPS) induce la liberación de citocinas proinflamatorias críticas que son necesarias para activar respuestas inmunes potentes, principalmente interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), prostaglandina E₂ (PGE₂) y factor de necrosis tumoral α (TNF - α), los que promueven la liberación de enzimas tisulares causando la destrucción de la matriz extracelular y del hueso alveolar [7]. Debido a que el colágeno de tipo I representa el componente mayoritario de la matriz extracelular periodontal, se ha prestado especial atención a la colagenasa MMP-13 y la gelatinasa MMP-2 en la periodontitis [8]. Se ha demostrado que *F. nucleatum* es un potente inductor de la producción de colagenasa 3 (MMP-13). Tanto la producción de MMP-13 como la de IL-8 están al menos parcialmente reguladas por la señalización de p38 MAP cinasa en las células epiteliales infectadas por *F. nucleatum*. *F. simiae* y, en menor grado, *F. nucleatum* y *F. necrophorum* aumentan la secreción epitelial de MMP-2. La MMP-2 (gelatinasa A) tiene varias funciones en el control de la inflamación. Parece que el potencial patogénico de las fusobacterias puede deberse en parte a su capacidad para estimular la secreción de MMP-9, MMP-13 e IL-8 de células epiteliales [9].

Se han propuesto MMP's como reguladores maestros de la inflamación, a través de la proteólisis de quimiocinas, factores de crecimiento, receptores y sus proteínas de unión, proteasas, inhibidores de proteasa, así como proteínas multifuncionales intracelulares, dando lugar a funciones pro o anti inflamatorias que conducen a la homeostasis del tejido o patología [10].

El factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) juega un papel crítico en las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. MIF es conocido como contrarregulador endógeno de glucocorticoides, los cuales son producidos por las glándulas suprarrenales [3].

En la periodontitis, se ha sugerido que MIF promueve la osteoclastogénesis, favoreciendo la pérdida ósea en un modelo animal [11]. Aunque se sabe que MIF se expresa en tejidos periodontales, su impacto sobre la degradación de los tejidos blandos sigue siendo difícil de alcanzar [12]. En enfermedades inflamatorias, se conoce que MIF regula positivamente las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que causan la destrucción de los tejidos blandos. Varios informes sugieren que MMP-2 promueve la destrucción de tejidos en la periodontitis [13].

1.1 Periodonto

El periodonto es uno de los componentes morfofuncionales del sistema estomatognático (SE), y su diseño, si es analizado desde una perspectiva anatómica, histológica, neurofisiológica o biomecánica, no solo responde a funciones intrínsecas relacionadas con la nutrición o la sujeción del diente; sino también, a funciones integradas dentro de la fisiología del SE [14].

El periodonto normal proporciona el apoyo necesario para mantener los dientes en función. Consiste de cuatro componentes principales: encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Cada uno de estos componentes periodontales tiene una distinta ubicación, arquitectura de tejido, composición bioquímica y composición química, pero todos estos componentes funcionan juntos como una sola unidad [15].

Mantener una capacidad masticatoria óptima a lo largo de la vida del individuo es una prioridad fisiológica y, en ese sentido, el periodonto es un órgano con una elevada capacidad de adaptación que permite optimizar la posición de los dientes dentro de los maxilares, lo cual es esencial para mantener una oclusión óptima a lo largo del tiempo. El diseño de este "complejo periodontal", responde a ciertos principios biológicos que constituyen el fundamento de su fisiología: principio de conservación de la energía, que tiene que ver con respuestas que permitan mantener una función eficiente; y, principio de conservación de las estructuras, relacionado con mecanismos para su protección, y la del SE [14].

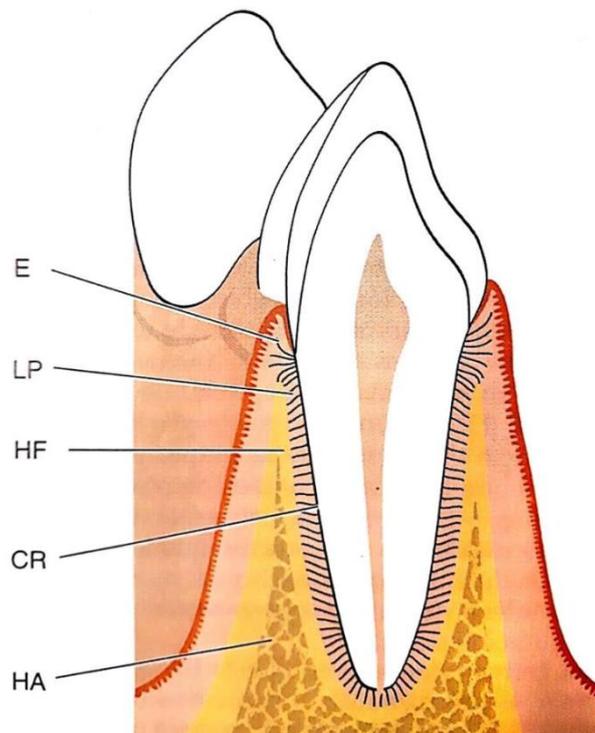


Fig. 1. Diagrama de los elementos del periodonto. El periodonto comprende los siguientes tejidos: Encía (E), Ligamento Periodontal (LP), Hueso alveolar propiamente dicho (HF), Cemento Radicular (CR) y Hueso Alveolar (HA). (Tomado de Referencia 28. Lindhe, J. 2008).

1.2 Encía

Por su importancia funcional y estructural, es uno de los tejidos más estudiados del periodonto. Es la mucosa expuesta al efecto abrasivo del bolo alimenticio durante la masticación, consecuentemente es una mucosa protegida por una capa superficial de queratina [16].

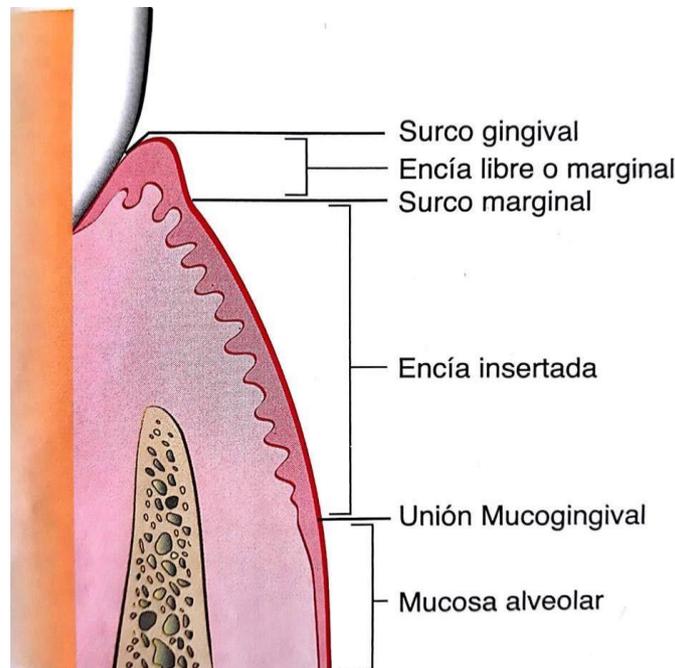


Fig. 2. Puntos de referencia anatómicos de la encía. (Tomado de Referencia 15. Carranza F, 2014)

1.2.1 Características Clínicas de la Encía

En un adulto, la encía normal cubre el hueso alveolar y la raíz del diente a un nivel apenas coronal a la unión amelocementaria. La encía se divide anatómicamente en áreas marginal, adherida, e interdental. Aunque cada tipo de encía muestra variación considerable en la diferenciación, histología y grosor de acuerdo con sus exigencias funcionales, todos los tipos están estructurados específicamente para funcionar adecuadamente contra daños mecánicos y microbianos [17].



Fig. 3. Características clínicas de la encía. A) Encía normal en un adulto sano. Se muestra la línea mucogingival (flechas) entre la encía insertada y la mucosa alveolar. B) Encía insertada en dentición permanente. Se muestra el ancho medio de la encía insertada. (Tomado de Referencia 15. Carranza F, 2014).

Encía Marginal

La encía marginal, o libre, es el extremo terminal o borde de la encía que rodea los dientes a manera de collar. Cerca del 50% de los casos se encuentra separada de la encía insertada adyacente por una depresión lineal superficial, el surco gingival libre [18].

Se limita en la porción apical por el *epitelio de unión*, y coronalmente por su borde o *margen gingival*, a sus lados está limitada por las papilas interdientarias vecinas.

El borde de la encía libre (margen gingival) en condiciones normales es ahusado (en forma de filo de cuchillo) y se ubica a 0.5 o 1mm hacia coronal de la unión esmalte cemento. Su ubicación es importante por razones estéticas, por ejemplo: cuando se desplaza hacia apical descubre tejido radicular aparentando dientes largos; mientras que, cuando está más coronalmente sobre esmalte, da la apariencia también antiestética, de dientes anchos y cortos [16].

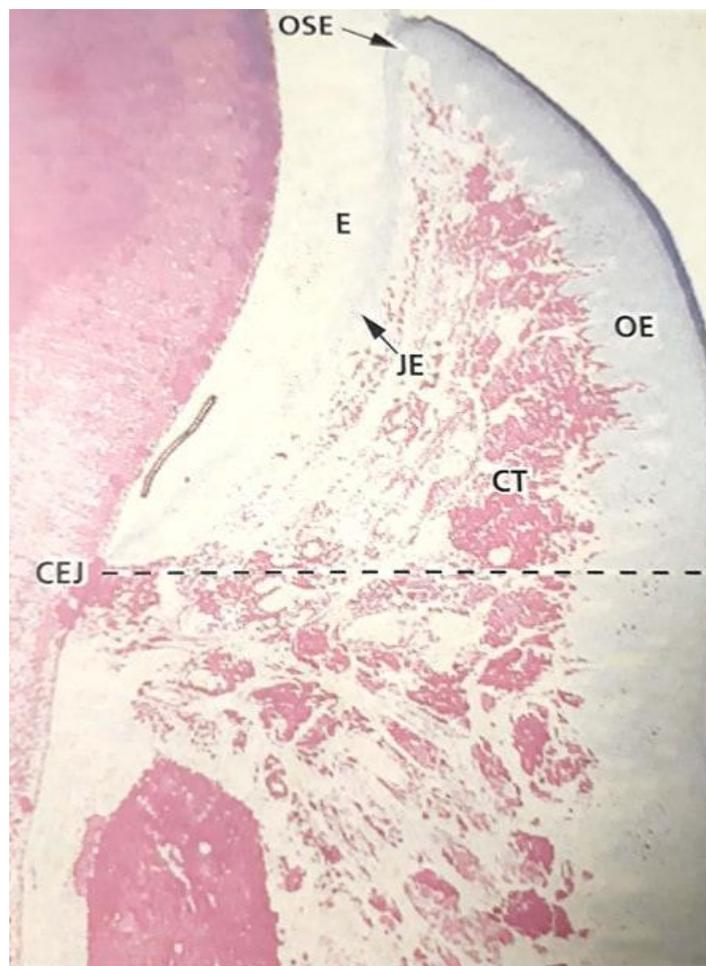


Fig. 4. Encía Libre. La encía libre comprende todas las estructuras epiteliales y del tejido conectivo (TC) situadas hacia coronal de una línea horizontal trazada a nivel de la Unión cemento-esmalte (CEJ). El epitelio que recubre la encía libre puede ser diferenciado en la siguiente forma: *Epitelio Bucal* (OE), que apunta a la cavidad bucal; *Epitelio del Surco* (OSE), que enfrenta al diente sin contactar por la superficie del esmalte; *Epitelio de Unión* (JE), que provee el contacto entre la encía y el diente. (Tomado de Referencia 28. Lindhe J, 2008).

Surco Gingival

El surco periodontal se define como el espacio alrededor de los dientes entre la encía marginal y la superficie del diente y que está limitado en su parte más apical por las células más coronales del epitelio de unión (EU) [19]. Tiene forma de V y apenas permite la entrada de una sonda periodontal. La determinación clínica de la profundidad del surco es un importante parámetro de diagnóstico. En condiciones absolutamente normales o ideales, la profundidad del surco gingival está en o cerca de 0 mm [20].

Se ha considerado en estudios clínicos en humanos que este espacio puede medir entre 1 y 3 mm en ausencia de inflamación clínica [21]. No obstante, en estudios histológicos la distancia desde las células más coronales del EU hasta el margen gingival mide entre 0.69 y 1 mm [22]. Esto sugiere que durante el sondeo hay un desprendimiento de la adherencia de las células del EU, sin llegar hasta el tejido conectivo.

Pero para efectos clínicos prácticos, un surco periodontal no presenta sangrado al sondeo y puede medir hasta 3.9 mm. En contraste, la bolsa periodontal se define como la profundización patológica del surco periodontal, dada por la pérdida ósea y de inserción periodontal [23]. Aunque el límite de 4 mm parezca arbitrario, se ha observado que frecuentemente se asocia con sitios que presentan inflamación tanto histológica como clínica y ya se observa pérdida ósea radiográfica. Medidas superiores a 4 mm resultan más evidentes con signos claros de destrucción periodontal [24].

Esta transición de un surco a una bolsa periodontal representa uno de los signos cardinales de la periodontitis, dado que es producida por la pérdida de inserción. Para efectos clínicos prácticos, una bolsa periodontal puede ser considerada a partir de 4 mm y deben presentar sangrado al sondeo, pérdida de inserción y pérdida ósea radiográfica [5].

Fluido del surco gingival:

El surco gingival contiene un líquido filtrado desde el tejido conectivo, a través del epitelio de unión y el epitelio interno de la encía libre. Es decir que proviene del suero y no de la saliva.

Se considera que este fluido:

1. Elimina material del surco por acción de "lavado"
2. Contiene proteínas plasmáticas que podrían mejorar la adhesión del epitelio con el diente
3. Posee propiedades antimicrobianas
4. Tiene actividad de anticuerpos para defender a la encía del ataque bacteriano

En condiciones normales se puede obtener poco o nada de líquido en el surco, en tanto que durante la inflamación aumenta proporcionalmente. Algunos autores sostienen que solamente se presenta como una respuesta inflamatoria, aunque hoy se acepta que es un trasudado natural que "gotea" en el surco [16].

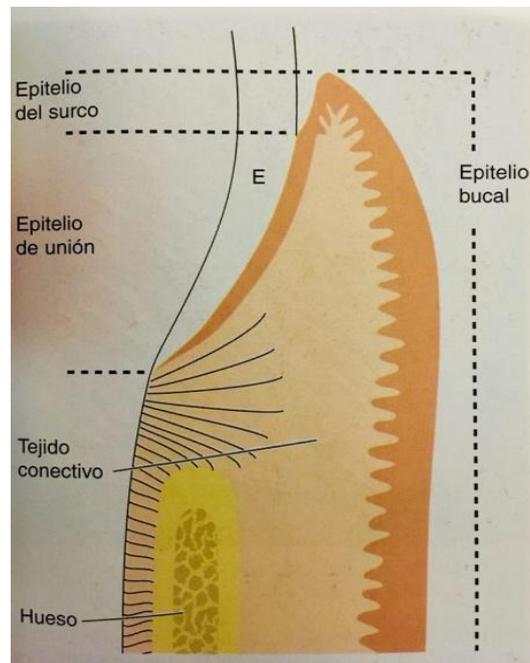


Fig. 5. Dibujo esquemático de un corte histológico. Se describe como está compuesta la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte. (Tomado de Referencia 28. Lindhe J, 2008).

Encía Insertada

Es una continuación de la encía marginal. Es firme, resistente y se une fuertemente al periostio subyacente del hueso alveolar. El aspecto facial de la encía insertada se extiende hasta la relativamente laxa y movable mucosa alveolar y está demarcado por la unión mucogingival.

El ancho de la encía insertada es otro parámetro clínico importante. Es la distancia entre la unión mucogingival y la proyección en la superficie externa del fondo del surco gingival o bolsa periodontal. No debe confundirse con el ancho de la encía queratinizada porque este último también incluye la encía marginal [15].

Esta se inserta a periostio, hueso alveolar y cemento radicular mediante fibras colágenas fundamentalmente, por lo que su consistencia es firme y resiliente. Su color es generalmente rosado pálido o salmón, con una apariencia punteada similar a la cáscara de naranja. Puede presentar pigmentos oscuros cuando presenta melanina en el estrato basal de su epitelio. Su límite apical es la unión mucogingival y su límite coronal es la línea que demarca el inicio de la encía libre, llamada surco de la encía libre [16].

Encía Interdental.

La encía interdental ocupa la tronera gingival que es el espacio interproximal bajo el área del contacto dental. La encía interdental puede ser piramidal o puede tener una forma de "collado". En la primera la punta de una papila se encuentra inmediatamente por debajo del punto de contacto; la segunda presenta una depresión tipo valle que conecta una papila vestibular y lingual y se ajusta a la forma del contacto interproximal [25].



Fig. 6. Encía insertada. Porción de las pailas interdetales (flecha) con porción central formada por encía insertada. (Tomado de Referencia 15. Carranza F, 2014).

1.2.2 Fibras Gingivales

El tejido conjuntivo de la encía marginal es densamente colágeno contiene un sistema prominente de haces de fibra de colágeno llamados fibras gingivales. Consiste en colágeno Tipo I [26].

Las fibras gingivales tienen las siguientes funciones:

1. Mantener la encía marginal adosada contra el diente
2. Proporcionar la rigidez necesaria que apoye las fuerzas de la masticación sin separarse de la superficie dentaria.
3. Unir la encía marginal libre con el cemento de la raíz y la encía insertada adyacente [27].

Clasificación de las fibras colágenas de acuerdo al tejido donde se insertan y al curso u orientación en los tejidos.

1. Fibras circulares: corren por la encía libre rodeando al diente en forma de anillo.
2. Fibras dentogingivales: se insertan en cemento radicular supra-alveolar y se proyectan en abanico hacia el tejido gingival libre de las superficies bucales, linguales y proximales; es decir, desde toda la periferia cementaria supra-alveolar del diente, hacia toda la encía libre circundante.
3. Fibras dento-periósticas: también están insertadas en cemento supra-alveolar pero se proyectan hacia el periostio de las tablas óseas alveolares bucales y linguales.
4. Fibras transeptales: se extienden entre el cemento supra-alveolar de dientes vecinos, pasando sobre el septum óseo interdental o tabique interdental [16].

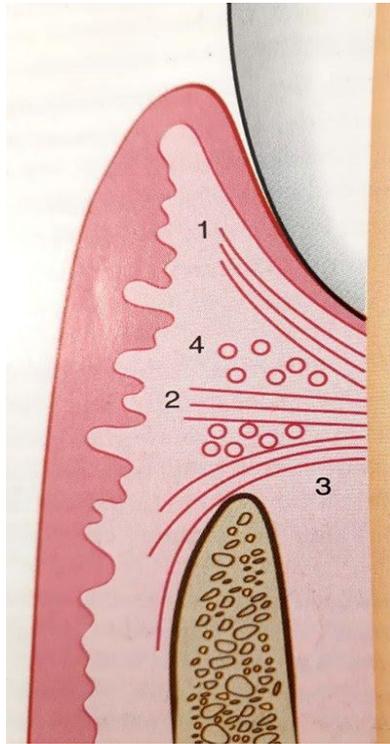


Fig. 7. Fibras Dentogingivales. Se extienden desde el cemento. 1) Hasta la cresta de la encía, 2) hasta la superficie exterior, 3) por fuera del periostio, 4) fibras circulares. (Tomado de Referencia 15. Carranza F, 2014).

1.3 Epitelio de Unión

Forma un collar epitelial de 0.25 a 1.35 mm de diámetro (en sentido coronal-apical) que proporciona la adherencia de la encía al diente, se continúa con el epitelio gingival interno, pero su estructura es diferente. Tiene un espesor de 3 a 4 capas de células en edad temprana y 10 a 20 en edad adulta, se renueva durante toda la vida. Tiene forma triangular cuyo vértice en apical está compuesto por unas pocas células, mientras su base coronal presenta 15 o 30 hileras celulares, que mide aproximadamente 0.15 mm de diámetro, constituyendo el fondo del surco. Al igual que el epitelio interno, carece del estrato queratinizado.

El epitelio de unión se encuentra adherido a la superficie dentaria en forma íntima separada únicamente por una membrana basal que lo rodea en sus dos lados que forman el vértice del triángulo. Los hemidesmosomas de las células del epitelio de unión se adhieren a la lámina lúcida de la membrana basal de la misma forma que en el epitelio interno y externo. La unión puede ser a nivel de esmalte, dentina o cemento. Con fines descriptivos al epitelio de unión también se le divide en tres zonas:

1. Apical: que se ubica en el vértice del triángulo, con características germinativas.
2. Intermedia: con características adhesivas principalmente.
3. Coronal: que son las células que se descaman hacia la luz del surco [16].

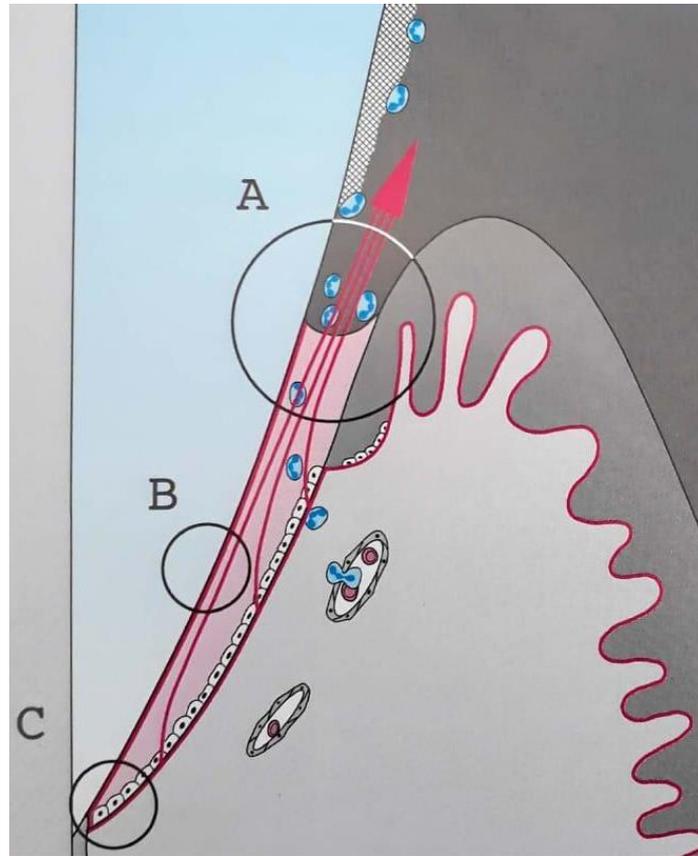


Fig. 8. Estructura del Epitelio Conjuntivo. A) Surco gingival. B) Unión epitelial. C) Extensión apical. (Tomado de Referencia 29. Wolf H, 2014.)

1.4 Cemento Dentario

El cemento es el tejido mesenquimal calcificado y avascular que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica. Los dos tipos principales de cemento son: acelular (primario) y celular (secundario), ambos consisten en una matriz interfibrilar calcificada y fibrillas de colágeno. Las dos fuentes principales de fibras de colágeno en el cemento son: fibras de Sharpey (extrínsecas), que son la porción incluida de las fibras principales del ligamento y están formadas por fibroblastos y fibras que pertenecen a la matriz del cemento (intrínsecas producidas por cementoblastos) [15].

El contenido inorgánico del cemento principalmente hidroxapatita, es del 65% en peso y al igual que otros tejidos mineralizados contiene fibras colágenas incluidas en una matriz colágena [28]. La mayor proporción de la matriz orgánica de un cemento está compuesta por colágenos tipo I (90%) y tipo III (alrededor del 5%). Las fibras de Sharpey están compuestas sobre todo por colágeno tipo I. El colágeno tipo III parece recubrir el colágeno tipo I de las fibras de Sharpey [15].

El cemento acelular es el primero en formarse, cubre el tercio cervical o la mitad de la raíz y no contiene células. Este cemento se forma antes que el diente alcance el plano oclusal y su espesor oscila entre 30 y 230µm. Las fibras de Sharpey constituyen la mayor parte de la estructura del cemento acelular que tiene un papel principal en el apoyo del diente, su tamaño, número y distribución aumentan con la función[15].

El cemento celular, formado después de que el diente alcanza el plano oclusal es más irregular y contiene células (cementocitos) en espacios individuales (lagunas) que se comunican entre sí mediante un sistema de canalículos anastomosados. Las fibras de Sharpey ocupan una porción más pequeña del cemento celular y están separadas por otras fibras que se encuentran organizadas paralelas a la superficie radicular o de un modo aleatorio [15].

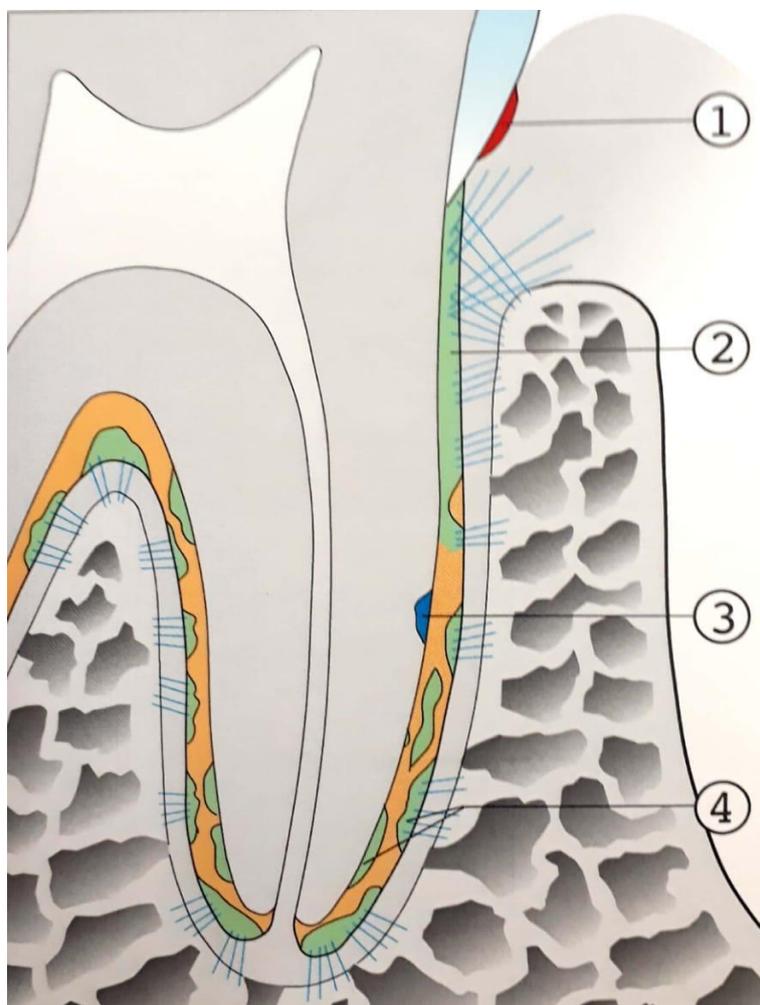


Fig. 9. Tipos de Cemento-Estructura, Localización y Desarrollo. 1) Cemento acelular, afibrilar. 2) Cemento acelular de fibra extrínseca. 3) Cemento celular de fibra intrínseca. 4) Cemento celular de fibras mixtas. (Tomado de Referencia 29. Wolf H, 2014.)

Reparación y reabsorción del cemento

La reabsorción del cemento puede ser causada por factores locales o sistémicos. Las condiciones locales que provocan la reabsorción incluyen trauma por oclusión, movimiento ortodóntico, enfermedad periapical y enfermedad periodontal entre otras. Las condiciones sistémicas incluyen deficiencia de calcio, hipotiroidismo, etc.

La reparación del cemento requiere de la presencia de tejido conjuntivo viable. Si el epitelio prolifera en un área de reabsorción la reparación no tendrá lugar. La reparación puede ocurrir en dientes tanto vitales como no vitales.

1.5 Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es el tejido blando altamente vascularizado y celular que rodea a las raíces de los dientes y conecta el cemento radicular con la pared del alveolo. En sentido coronal el ligamento se continúa con la lámina propia de la encía delimitado respecto de ella por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta ósea alveolar con la raíz [28].

El espacio para el ligamento periodontal tiene la forma de un reloj de arena y es más angosto a nivel del centro de la raíz. El espesor del ligamento periodontal es de 0.25 mm aproximadamente. La presencia del ligamento periodontal permite que las fuerzas generadas durante la función masticatoria y otros contactos dentarios sean distribuidos y absorbidos en el proceso alveolar. El ligamento periodontal es esencial también para la movilidad de los dientes. La movilidad dental está determinada en buena medida por el espesor, la altura y la calidad del ligamento periodontal [28].

Los elementos más importantes del ligamento son sus fibras que están organizadas en haces y siguen un curso ondulado que se ve en sección longitudinal. Las porciones terminales de las fibras principales que se insertan en el cemento y en hueso se llaman fibras de Sharpey. Los haces de fibras principales consisten en fibras individuales que forman una red continua y anastomosada entre diente y hueso. Una vez incluidas en la pared del alveolo las fibras de Sharpey se calcifican, se asocian con proteínas no colágenas como son la osteopontina y la sialoproteína ósea. Estas proteínas contribuyen a la regulación de la mineralización y la cohesión tisular en los sitios con aumento de tensión biomecánica.

El colágeno es una proteína compuesta de diversos aminoácidos entre los cuales se destacan la hidroxiprolina, glicina, la prolina y la hidroxilisina. Es sintetizado por fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, odontoblastos y otras células.

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

1. Grupo transeptal: se extienden interproximalmente sobre la cresta del hueso alveolar y están incluidas dentro del cemento en los dientes adyacentes. Se reconstruyen incluso después de la destrucción del hueso alveolar ocasionado por la enfermedad periodontal.
2. Grupo de la cresta alveolar: las fibras de la cresta se extienden en sentido oblicuo desde el cemento justo por debajo del epitelio de unión hasta la cresta alveolar, previenen la extrusión del diente y resisten los movimiento laterales.
3. Grupo horizontal: se extienden en sentido perpendicular al eje longitudinal del diente desde el cemento hasta el hueso alveolar.
4. Grupo oblicuo: es el grupo más grande en el ligamento, se extienden desde el cemento en dirección coronal en sentido oblicuo respecto al hueso. Llevan la carga del estrés masticatorio vertical y lo transforman en tensión sobre el hueso alveolar.

5. Grupo apical: las fibras apicales están irradiadas de manera irregular desde el cemento hasta el hueso en la región apical del alveolo. No se encuentran en raíces que no están completamente formadas.

6. Grupo interradicular: se extienden en forma de abanico desde el cemento hasta el diente, en las áreas de la furcación de dientes multirradiculares. Aunque el ligamento periodontal no contiene elastina madura pueden encontrarse dos formas inmaduras: oxitalán y elaunina. Las fibras de oxitalán se extienden paralelas a la superficie de la raíz en dirección vertical y se flexionan para insertarse en el cemento. Se cree que regulan el flujo vascular. Se ha descrito una red elástica en ligamento compuesta de laminillas de elastina con fibras periféricas de oxitalán y elaunina. Las fibras de oxitalán han demostrado desarrollarse de nuevo en el ligamento periodontal regenerado.

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

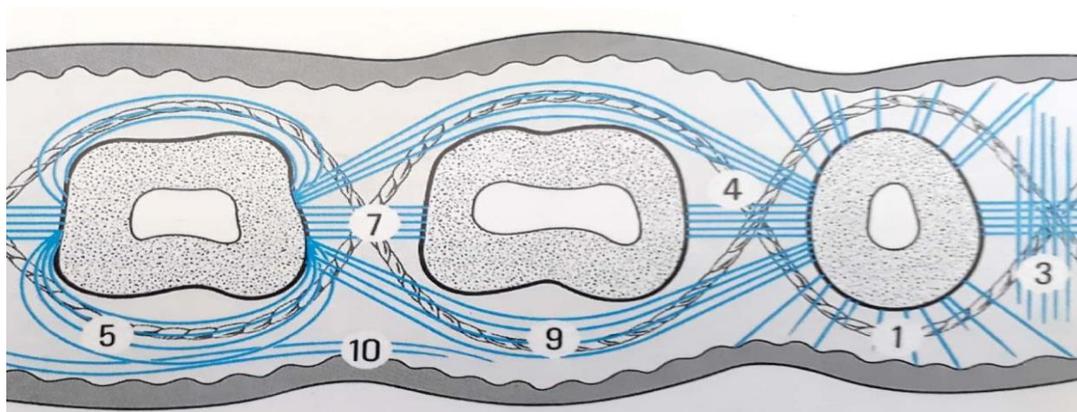


Fig. 10. Haces de Fibras I. 1) Dentogingivales. 2) Alveolo-gingival. 3) Interpapilar. 4) Transgingival. 5) Circular, semicircular. 6) Dentoperiostal. 7) Transeptal. 8) Periosteogingival. 9) Intercircular. 10) Intergingival. (Tomado de Referencia 29. Wolf H, 2014.)

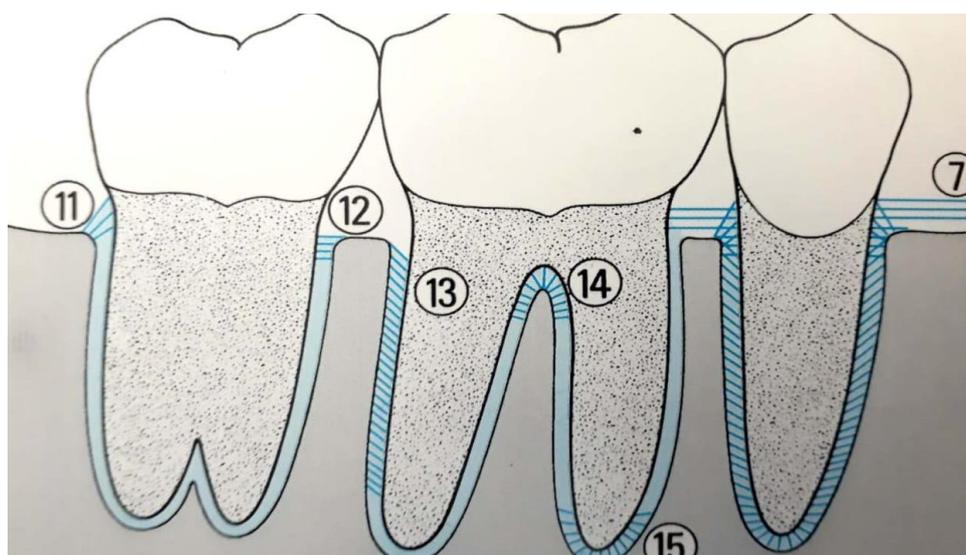


Fig. 11. Haces de Fibras III. 11) Crestal. 12) Horizontal. 13) Oblicuo. 14) Interradicular. 15) Apical. (Tomado de Referencia 29. Wolf H, 2014.)

Funciones Físicas del Ligamento Periodontal

1. Provisión de tejido blando para proteger a los vasos y nervios de lesiones causadas por fuerzas mecánicas.
2. Transmisión de fuerzas oclusivas al hueso.
- 3 Unión del diente con el hueso.
4. Mantenimiento de los tejidos gingivales en relación adecuada con los dientes.
5. Resistencia al impacto de fuerzas oclusivas (absorción del impacto) [29].

Grosor biológico

Se denomina grosor biológico a la unión dentogingival, que está constituida por el epitelio de unión y el tejido conectivo de inserción de la encía. Cuando se habla de espacio biológico no sólo se debe pensar en la longitud de la inserción gingival, sino que se debe relacionar con el grosor de la encía, el biotipo periodontal y la profundidad del surco gingival, puesto que todos estos parámetros se integran, y deben ser tenidos en cuenta para comprender de manera exacta la morfología del tejido gingival supracrestal. La variabilidad de dimensiones de los componentes epitelial y conectivo que existe entre individuos, e incluso dentro del mismo individuo, es otro factor que debe ser considerado. Una vez que se ha invadido la unión dentogingival, el tipo de manifestación clínica que se produce va a ser distinta según los casos, ya que no hay que olvidar que la respuesta está relacionada con la susceptibilidad del paciente frente a la enfermedad periodontal[30].

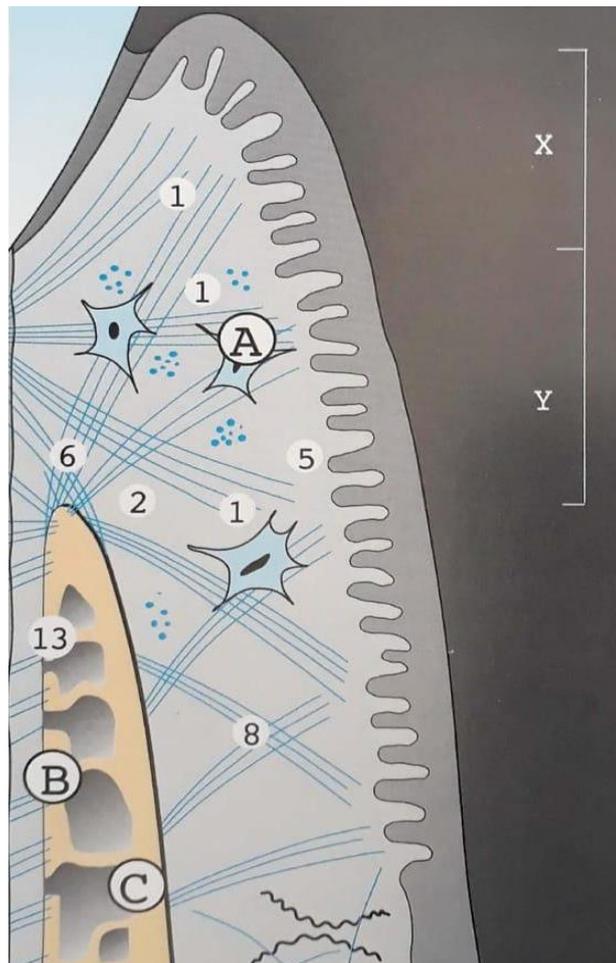


Fig. 12. Haces de Fibras II. A) Fibras Gingivales. B) Fibras del Ligamento Periodontal. C) Hueso Alveolar.
1.1 X) Epitelio Sulcular y Conectivo. Y) Unión de Tejido Conjuntivo. X+Y) Espacio Biológico. (Tomado de Referencia 29. Wolf H, 2014.)

Es el tejido óseo que contiene alvéolos o cavidades donde van alojadas las raíces de las piezas dentarias. Al fragmento de hueso que queda entre un alveolo y otro adyacente se denomina cresta o septum interdental o inter-alveolar. Las porciones óseas que cubren las superficies bucales y linguales son llamadas tablas óseas bucales y linguales respectivamente. El hueso alveolar está conformado por dos clases de hueso:

1. Hueso compacto (lámina dura, lámina densa o corteza ósea).
2. Hueso trabeculado (hueso esponjoso, lámina cribosa o trabecular).

Hueso Compacto

Llamado lámina dura o corteza ósea, consiste en una cubierta de hueso sólido, compacto, que protege al hueso trabeculado de traumas físicos y químicos en toda su extensión, inclusive la parte interna del alveolo está recubierta por esta lámina de hueso. La cresta alveolar también está recubierta por lámina dura y en radiografías ortoradiales o interproximales (de mordida) se aprecia a una distancia aproximada de 1 o 2 milímetros de la unión esmalte-cemento en condiciones de salud periodontal y aún en gingivitis.

Cuando la lámina dura sufre reabsorción rápida como en el caso de periodontitis rápidamente progresiva, queda expuesto el hueso esponjoso o trabeculado, pudiendo perderse una importante cantidad de hueso de soporte dentario hasta el punto de exfoliar la pieza. La lámina dura adyacente al ligamento periodontal, está perforada por numerosos conductos de Volkmann por los cuales pasan vasos y nervios desde el hueso alveolar hacia el ligamento. En ésta corteza también se insertan los haces de fibras de Sharpey, similar a las que quedan atrapadas en cemento radicular [16].

Hueso Trabeculado

Llamado hueso esponjoso por la similitud arquitectónica con ese material. Está compuesto por trabéculas óseas que son formadas por osteoblastos, las trabéculas se anastomosan creando una especie de red o malla de hueso que caracteriza a este tejido. Los osteoblastos, células encargadas de formar tejido osteoide constituido por fibras colágenas y una matriz con glucoproteínas y proteoglicanos; quedan atrapados en el tejido osteoide, cuando este experimenta calcificación por depósito de minerales para después transformarse en hidroxapatita y hueso.

A los osteoblastos atrapados se les denomina osteocitos. Los osteocitos residentes en las lagunas del hueso calcificado, están unidos entre sí y con los osteoblastos de la superficie ósea, mediante prolongaciones citoplasmáticas que pasan por conductillos que comunican a las lagunas. Ese mecanismo de comunicación sirve para el intercambio regular de los niveles de calcio y fósforo en sangre, utilizando para ello diferentes mecanismos de control hormonales. La calcificación ósea forma laminillas concéntricas que rodean vasos sanguíneos formando la estructura llamada sistema haversiano que nutre a todas las células. A la unidad del sistema haversiano, que representa la forma en que los osteocitos se comunican por prolongaciones citoplasmáticas dentro de canalículos se le llama osteona [16].

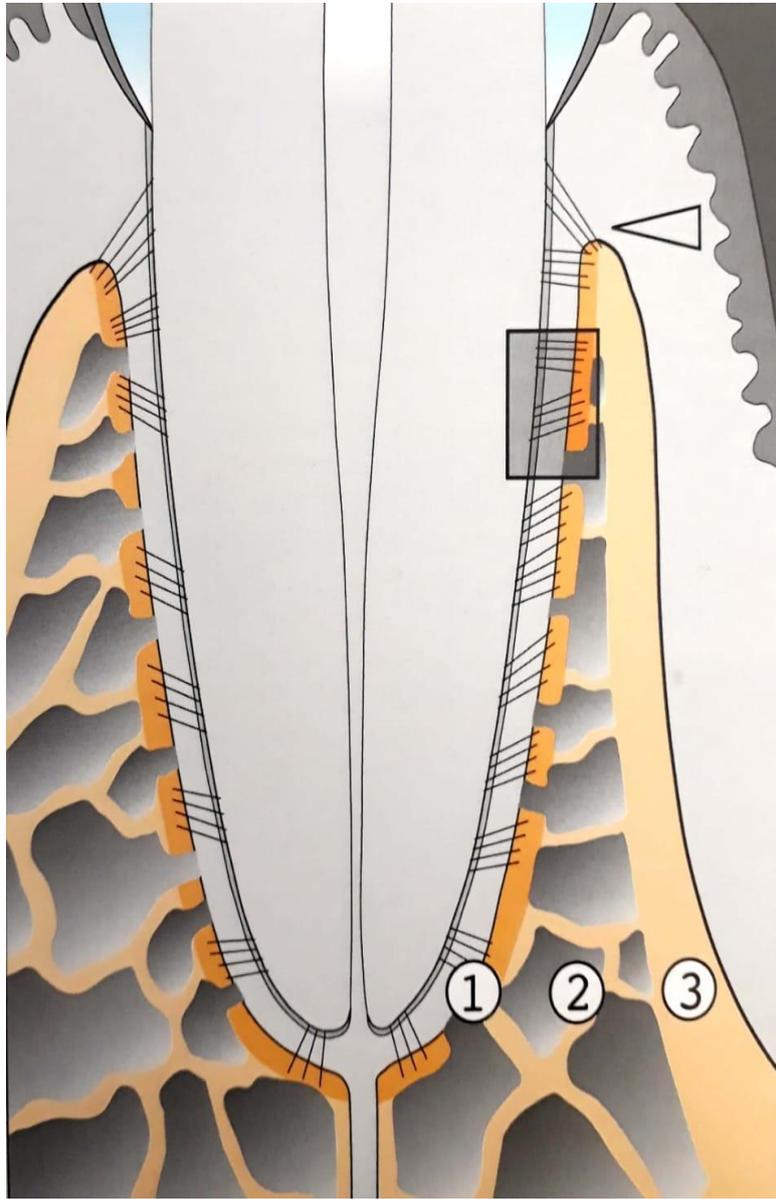


Fig. 13. Hueso alveolar. 1) Hueso Alveolar, 2) Hueso Trabecular. 3) Hueso Compacto.
(Tomado de Referencia 29. Wolf H, 2014.)

1.7 Periodontitis

La Enfermedad Periodontal es una infección crónica producida por bacterias anaerobias que crecen dentro del surco gingival. La gingivitis es la forma más leve de enfermedad periodontal; es una condición inflamatoria causada fundamentalmente por biofilm bacteriana acumulado en los dientes adyacentes a la encía, sin comprometer las estructuras de soporte subyacentes. Por otra parte, la periodontitis es una infección bacteriana que provoca un proceso inflamatorio de los tejidos, caracterizada por sangrado gingival, formación de bolsas periodontales, destrucción del tejido conectivo y reabsorción ósea alveolar [2].

Usualmente la periodontitis se desarrolla de una gingivitis preexistente; sin embargo no todos los casos de gingivitis se agravan a periodontitis. La virulencia de los microorganismos por un lado, los factores de resistencia del huésped (estatus de inmunidad, genéticos, hereditarios y factores de riesgo) y por el otro, los factores determinantes principales (proliferación de microorganismos patogénicos, toxicidad, capacidad para invadir tejidos y la respuesta individual del huésped) para la iniciación y progresión de la destrucción periodontal [29].

La enfermedad periodontal afecta a más de 23% de mujeres en edades entre los 23 y los 54 años y es provocada por bacterias del biofilm subgingival, su curso y progresión son modificados por una serie de factores como la propia respuesta inmune o enfermedades no relacionadas o condiciones sistémicas [6].

Las bacterias anaerobias gramnegativas más importantes y prevalentes en el área subgingival son el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Taenerella forsythensis* (Tf) y *Fusobacterium nucleatum* (Fn). *F. Nucleatum* puede inducir respuesta inflamatoria aumentando la expresión de citocinas inflamatorias, así como metaloproteinasas [1].

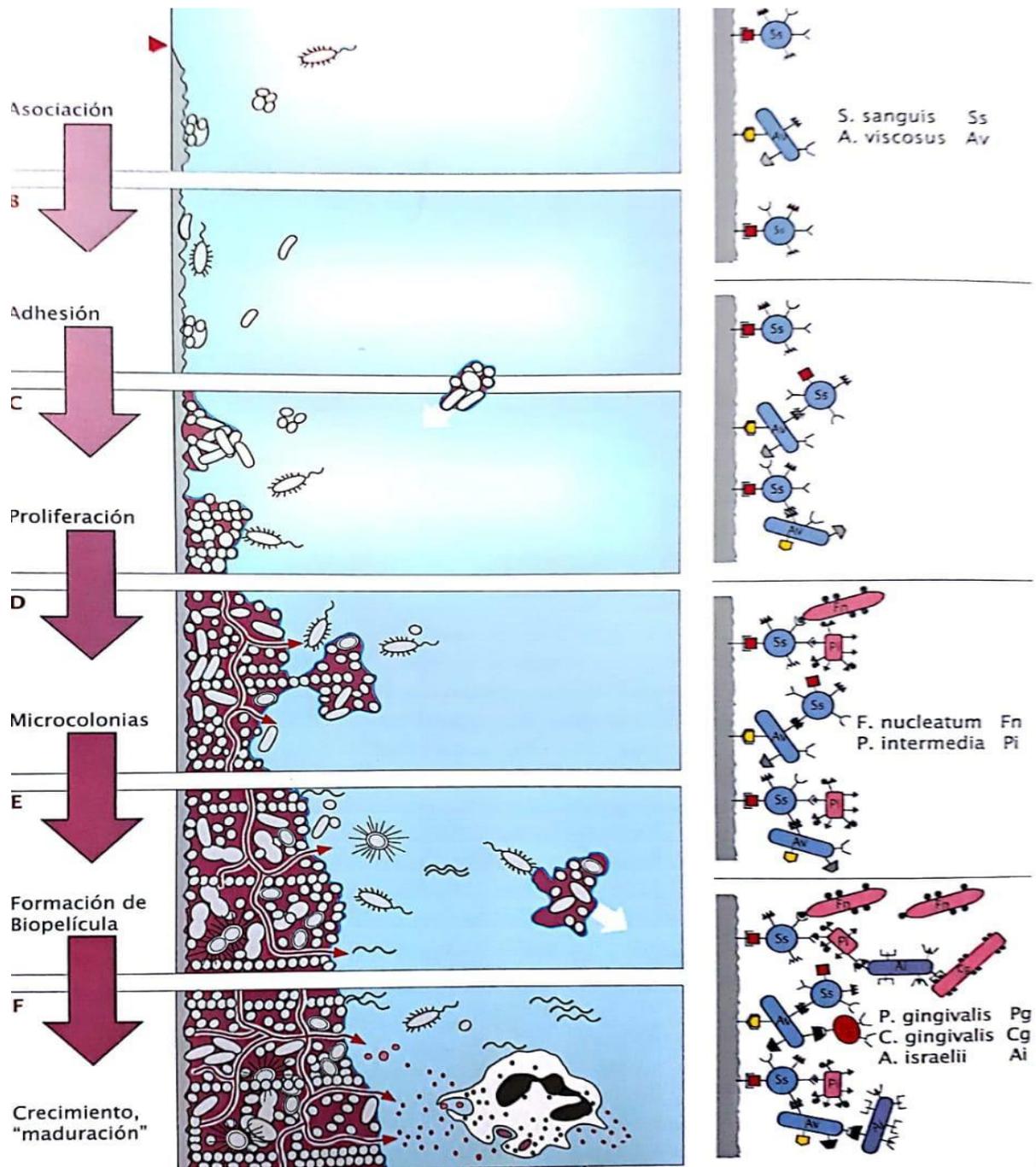


Fig. 14. Desarrollo de la Placa Dental. (Tomado de Referencia 29. Wolf H, 2014.)

1.8 Hormonas asociadas a la Gestación

Aunque parece que, durante el embarazo, la susceptibilidad de los tejidos gingivales a la inflamación está relacionada con los cambios hormonales propios del mismo, el mecanismo exacto por el cual estas hormonas incrementan la inflamación gingival es desconocido. El cambio hormonal más significativo es el incremento en la producción de estrógeno y progesterona [31].

En cuanto a los cambios inmunológicos se ha observado una reducción en la respuesta inmune celular durante el embarazo probablemente para evitar un rechazo del cuerpo de la madre hacia el feto [32].

Tanto el número como el porcentaje de linfocito T-helper (Th) disminuyen durante el embarazo y sólo se normalizan al tercer mes tras el parto. Dichos linfocitos son importantes moduladores de la respuesta inmune ya que son una fuente importante de citocinas. Producen dos tipos funcionalmente diferentes: las citocinas Th1, encargadas de la respuesta proinflamatoria, y las citocinas Th2 con propiedades antiinflamatorias. Durante el embarazo la respuesta inmune está desviada hacia la secreción de citocinas Th-2. Los linfocitos B y los monocitos sólo aumentan ligeramente, alcanzando el máximo en el momento de parto. Hay disminución de la quimiotaxis de los neutrófilos y la fagocitosis [33, 34].

El estrógeno, entre ellos el estradiol posee efectos anabólicos al mediar el metabolismo del colágeno y al estimular la angiogénesis. Dicha hormona aumenta la incorporación de prolina dentro de la molécula que va a ser sintetizada en fibroblastos cultivados de piel, y favorece la supresión del sistema inmune durante la gestación ya que disminuye la respuesta y la proliferación de los linfocitos T [35].

La progesterona es principalmente producida por el cuerpo lúteo, después por el trofoblasto. Las concentraciones de corticoesteroides, corticoesterona, también se encuentran aumentadas mientras la gestación progresa. Parecen tener una participación importante en el tráfico y funciones de las células B y T. También parecen participar en la supresión de las respuestas inmunes [36].

Las infecciones primarias en sistemas distantes pueden guiar a un embarazo a un término anormal, por lo tanto, al considerarse a la periodontitis como un proceso en el cual existe infección de los tejidos periodontales, además de un aumento en la presencia de prostaglandinas y citocinas proinflamatorias, se ha sospechado de una posible relación entre ambos factores, sin embargo, no existen evidencias sólidas que soporten esta presunción y los resultados reportados hasta ahora no han sido claramente concluyentes [37].

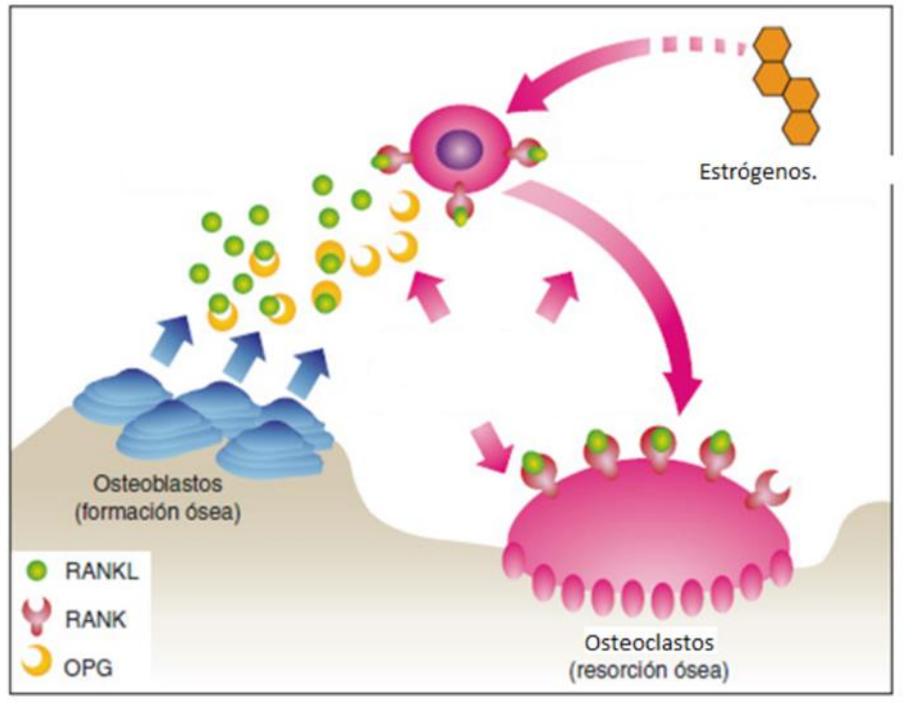


Fig. 15. Interacción de RANK. Control de la actividad de los osteoclastos mediante la interacción entre el receptor activador del ligando del factor nuclear- κ B (RANK) y la osteoprotegerina (OPG)

1.9 Inmunología

Las respuestas inmunes se clasifican como innatas o adquiridas. Las respuestas inmunes innatas pueden adaptarse con la exposición al mismo patógeno pero disminuyen una vez eliminada la amenaza, un ejemplo, son las células fagocíticas (monocitos, macrófagos, neutrófilos), fagocitan diferentes patógenos, no solo patógenos específicos. Por el contrario, las respuestas inmunes específicas aumentan durante la exposición a un patógeno. Los linfocitos T y linfocitos B son importantes en la forma fundamental de la inmunidad adaptativa conocida como respuesta inmune específica.

La inflamación es una alteración observable en los tejidos que se relaciona con cambios en la permeabilidad y dilatación vascular con infiltración frecuente de leucocitos en los tejidos afectados. Estos cambios producen eritema, edema, calor, dolor y pérdida de la función que son los puntos cardinales de la inflamación.

Por lo general la inflamación progresa en tres etapas: inmediata, aguda y crónica. Los leucocitos, controlan las tres etapas de la inflamación. La gingivitis y la periodontitis son respuestas inflamatorias en los tejidos periodontales inducidas por microorganismos en el biofilm que contribuyen a la destrucción del tejido, pérdida ósea y dental.

El lipopolisacárido es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram Negativas, desempeñan una importante función en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante de las bacterias.

Cuando el LPS es liberado de la membrana de la bacteria como consecuencia de la multiplicación o lisis, entra en contacto con varias proteínas del hospedero dentro de los que destacan la proteína de unión al LPS (LBP) y los receptores tipo toll 4 (TLR4) gracias al cual se puede llevar la transducción del LPS. La estimulación del receptor TLR4 y la producción de citocinas proinflamatorias, inducen varias respuestas en el organismo como la extravasación de los neutrófilos para que migren al endotelio a los epitelios, por lo que debe haber una inhibición de la señal de transducción del LPS que tiene como fin proteger al hospedero del daño inducido por el LPS [38].

En la enfermedad periodontal la respuesta inflamatoria produce resistencia del tejido a la invasión bacteriana pero también proporciona mecanismos que contribuyen al daño de tejidos. Las células inflamatorias agudas como mastocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMN), se combinan para formar un potente mecanismo de defensa antibacteriana, pero los signos iniciales de la gingivitis (como inflamación, enrojecimiento y sangrado al sondeo) representan los aspectos de destrucción de tejido de estas células. En enfermedad periodontal establecida también hay un cambio inflamatorio crónico, en que se agregan células B y T al espectro antibacteriano. Estas células linfocíticas también tienen la capacidad de liberar citocinas que inducen la síntesis de metabolitos del araquidónico (sobre todo PEG2), y estimular a los macrófagos y osteoclastos para que liberen hidrolasas y colagenasas, que son responsables de la pérdida ósea y de colágeno [15].

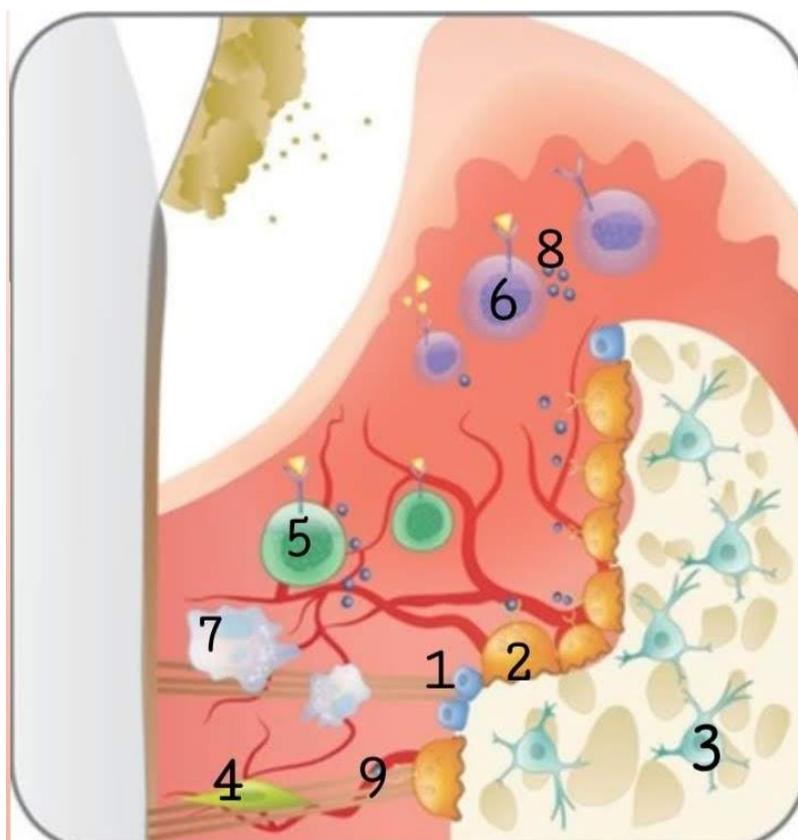


Fig. 16. Tipos de células. 1) Osteoblasto, 2) Osteoclasto, 3) Osteocito, 4) Fibroblasto, 5) Linfocitos T, 6) Linfocitos B, 7) Macrófagos, 8) RANKL, 9) Fibras de colágeno.

1.10 Metaloproteinasas

Los fluidos orales (fluido gingival crevicular (FGC), saliva, muestras de enjuagues orales y fluido sulcular peri-implantario (FSPI)) contienen mediadores moleculares llamados frecuentemente biomarcadores, los cuales son capaces de reflejar variadas condiciones fisiológicas y patológicas. Los cambios cualitativos y cuantitativos en estos biomarcadores a nivel de fluidos orales pueden reflejar el estado de salud periodontal y han demostrado ser de potencial utilidad para el diagnóstico y tratamiento de distintos desórdenes orales y sistémicos, tales como enfermedades periodontales y cardiovasculares, respectivamente. Entre estos, las metaloproteinasas (MMPs) de matriz extracelular de la familia de las colagenasas, particularmente MMP-2 y MMP-13, son enzimas proteolíticas que degradan los colágenos fibrilares, componentes centrales de la matriz extracelular periodontal [39].

Las MMPs son proteínas integrantes de la matriz extracelular (MEC) las cuales son capaces, en su medio ambiente inmediato, de activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión. Dichas metaloproteinasas constituyen una importante familia de endopeptidasas dependientes de zinc. Su actividad se encuentra regulada por inhibidores específicos conocidos como inhibidores tisulares de metaloproteinasas llamados TIMPs [40].

Las colagenasas MMP-1, 8 y 13 inician la degradación del colágeno I, II y III, los cuales continúan su degradación por otras MMPs y enzimas proteolíticas no MMPs. Estas enzimas para ejercer su acción dependen de cofactores como el calcio y zinc. Las colagenasas intersticiales operan clivando el colágeno en fragmentos de colágena $\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{4}$, que, por sí solos son fácilmente desnaturalizados y transformados en gelatina. Una vez formada la gelatina la MMP-2 y MMP-9 o gelatinasas, la degradan en miles de fragmentos diminutos [41].

Se ha reportado la activación y sobreexpresión de MMP por patógenos periodontales como *F. Nucleatum* puede inducir respuesta inflamatoria aumentando la expresión de citocinas inflamatorias, así como metaloproteinasas [1].

La expresión de MMP también es modulada por hormonas como el estrógeno, que disminuye la expresión de MMP-1 en condrocitos. Asimismo se ha reportado la disminución de la expresión de MMP-13 en presencia de Estradiol (E2) en condrocitos [42]. MMP-13 expresada en células epiteliales indiferenciadas, asociada con la degradación de colágeno y migración epitelial hacia el tejido conectivo en inflamación crónica, y con el inicio de resorción ósea.

El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz extracelular en los tejidos periodontales (encía, ligamento y hueso alveolar), su destrucción es una de las claves en las lesiones severas. Las principales MMPs asociadas con la enfermedad periodontal son MMP-8, MMP-13, mientras que la MMP-1 se ha relacionado con la transformación del tejido periodontal [43].

MMP-2 y MMP-9 son gelatinasas, MMP-2 es secretada principalmente por fibroblastos gingivales y MMP-9 es secretada principalmente por Polimorfonucleares (PMNs) y degradan colágeno tipo IV presente en tejidos gingivales [44].

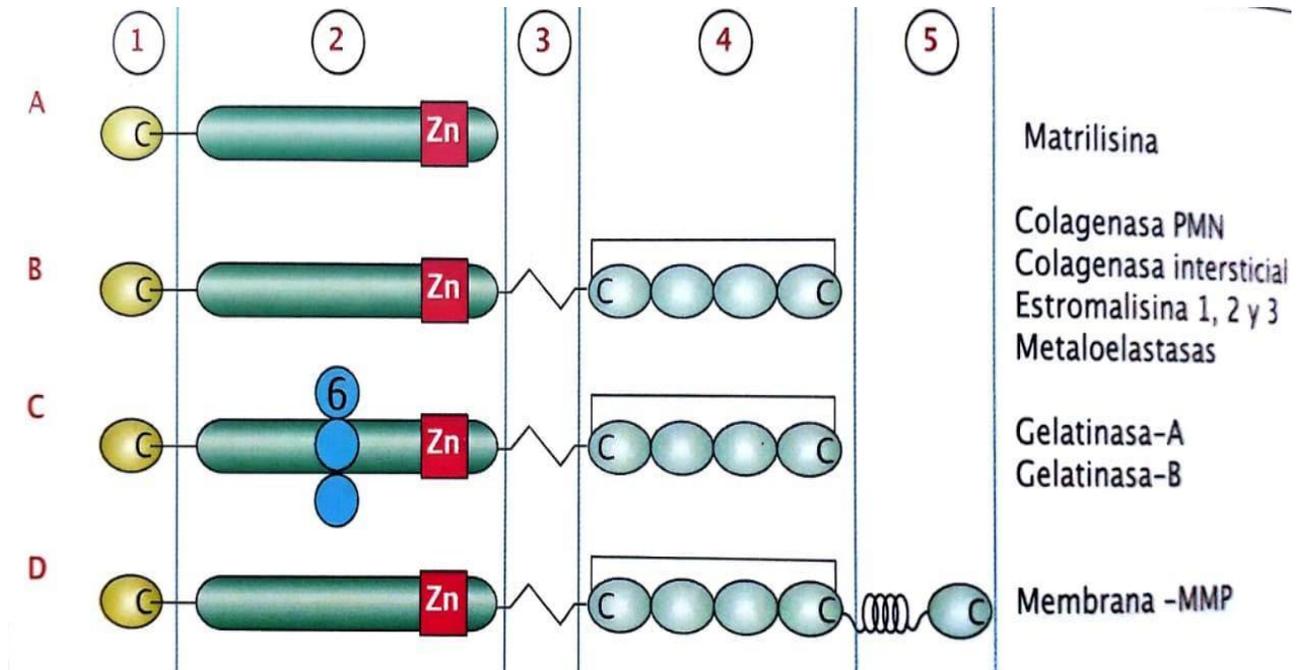


Fig. 17. Estructura de MMPs: Moléculas MMP A-C son enzimas libres, D es una membrana MMP de la superficie celular. 1) Pro-peptidos, 2) Extremo N-Terminal (porción catalítica, con Zn $2+$), 3) Bisagra entre 2 y 4. 4) Extremo C-Terminal, 5) Dominio de transmembrana, 6) Lugar de vinculación de gelatina. (Tomado de Referencia 29. Wolf H, 2014.)

2. Justificación

MIF promueve la respuesta inflamatoria y hay evidencias de que también regula de manera positiva la expresión de MMP's. La periodontitis se caracteriza por inflamación crónica, y la expresión de MMP's son determinantes en la patología, la cual se exacerba durante la gestación. Si bien, existe un amplia gama de literatura que evalúa el potencial de las MMP's como biomarcadores de la enfermedad periodontal y efectores de la degradación de la matriz de colágeno, pocas investigaciones han dirigido su esfuerzo en identificar los reguladores de la patología de la periodontitis [41]. En este trabajo proponemos estudiar la participación de MIF como regulador de la inflamación y de la expresión de las MMPs durante y al final de la gestación en un modelo murino de periodontitis experimental. Debido a que en investigaciones recientes se ha estudiado la expresión de MMP-2 y MMP-9 (Gelatinasas) optamos por comparar la participación de MMP-13 (Colagenasa) con la finalidad de observar la destrucción de colágeno.

Este trabajo experimental podrá ser abordado en futuros estudios, con el fin de obtener información básica sobre el papel regulador de MIF, sobre el proceso inflamatorio y la expresión de las MMP-2 y MMP-13 en la degradación de los tejidos durante la periodontitis durante la gestación.

3. Planteamiento del Estudio

La presencia de MIF ¿Modifica la expresión de MMP-2 y MMP-13 en un modelo con periodontitis experimental en gestación?

4. Hipótesis

MIF favorece la expresión MMP-2 y MMP-13 en la periodontitis, y ésta es regulada por la gestación.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Identificar la participación de MIF en la regulación de MMP-2 y MMP-13 en el desarrollo de la periodontitis experimental asociados a los cambios inmunes inducidos por la gestación en un modelo murino.

5.2 Objetivos Particulares

- Desarrollar el modelo de PE con ligadura de Nylon 6-0 en grupos de ratones hembras gestantes y no gestantes WT y *Mif*^{-/-} BALB/c.
- Identificar histológicamente los tejidos periodontales con la técnica de tinción hematoxilina-eosina.
- Analizar histológicamente las fibras de colágeno a través de la técnica Tricrómica de Masson.
- Establecer la severidad clínica de periodontitis experimental a través de la expresión local de MMP-2 y MMP-13 por inmunofluorescencia.

6. Materiales y Métodos

6.1 Consideraciones Éticas

Todos los experimentos del proyecto que incluyan animales de experimentación serán realizados bajo estricto cumplimiento de las normas enunciadas en el "Marco Ético de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de Laboratorio" en apego a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. El manejo de Residuos Peligrosos Biológicos – Infecciosos se realizó en apego a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-2002. Este proyecto es para la obtención del título de Cirujano Dentista, y está basado en la continuación del proyecto de Maestría realizado por la M. en C. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez para su Doctorado, el cual cuenta con la aprobación por la comisión de ética de FES-Iztacala No. CE/FESI/062017/1182 y por la Comisión de Bioseguridad de la FES-Iztacala en agosto de 2017.

6.2 Animales

Se utilizaron ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c WT y *Mif*^{-/-} (Bioterio FES-I). Fueron provistos de agua y alimento balanceado y organizados ad libitum. Se distribuyeron en 4 grupos Control (CTL), Gestación (G), Periodontitis Experimental (PE) y Periodontitis Asociado a Gestación (PAG). El trabajo con animales de experimentación se llevó a cabo en el laboratorio 5 de la UBIMED.

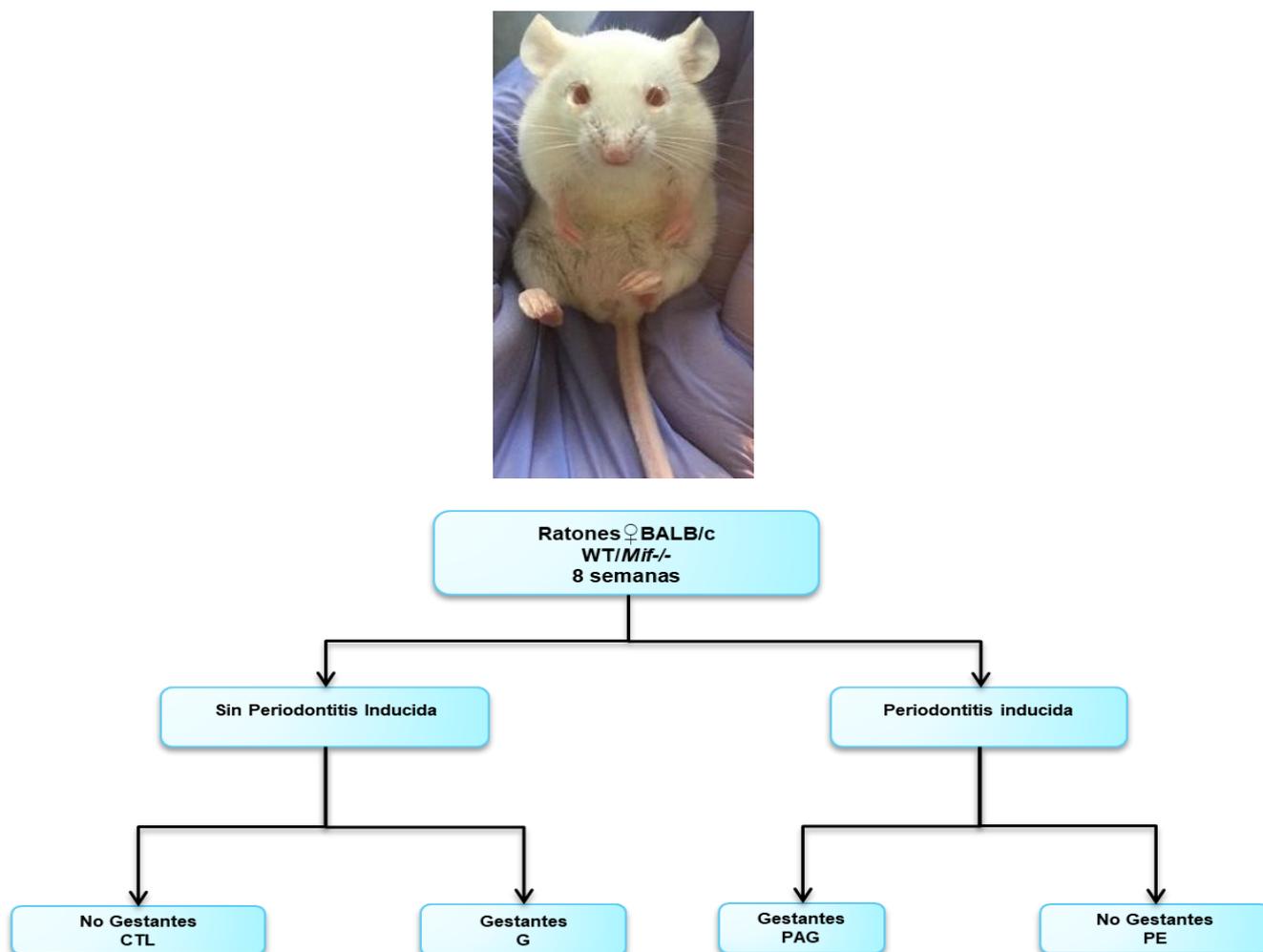


Fig. 18. Organización de los grupos.

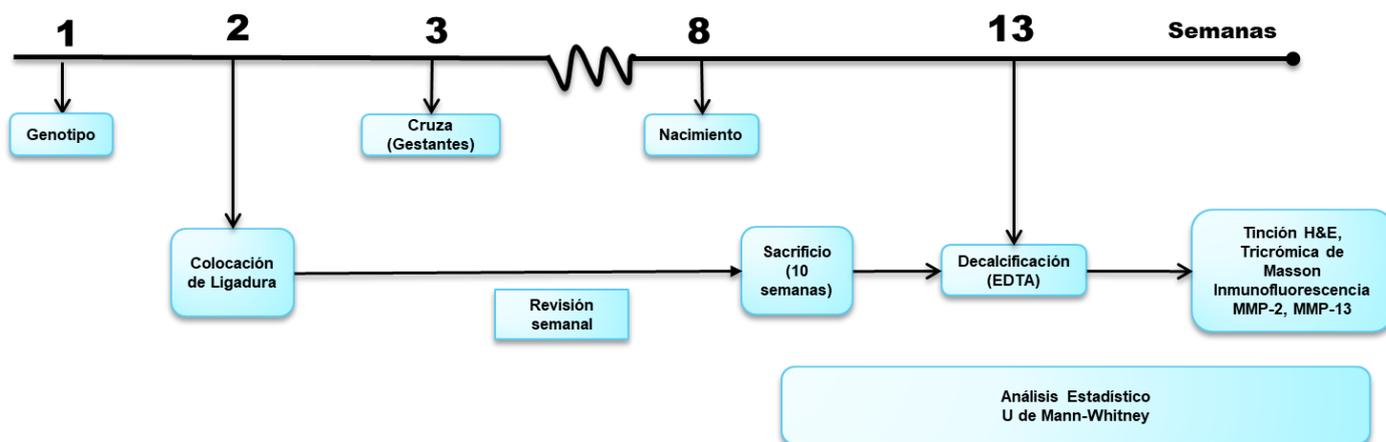


Fig. 19. Cronograma.

6.3 Inducción de Periodontitis

Una vez que los ratones llegaron a los 16 grs (aproximadamente 6-8 semanas de edad) se sometieron al procedimiento de inducción de la periodontitis en el que se colocaron ligaduras de sutura Nylon 6-0 (Ethicon) alrededor del segundo molar superior derecho [45] bajo anestesia con xilacina y ketamina, se esperó 2 semanas para que se estableciera la periodontitis, las ligaduras se verificaron cada semana. Se seleccionaron hembras con periodontitis establecida por dos semanas, para ser apareadas con los machos, con la finalidad de que quedaran preñadas (verificación del tapón positivo) para formar los grupos (PAG y PE). Otro grupo sin periodontitis también fue apareado para formar el grupo G.

Dosis Ponderal Anestesia General.

$$\text{Peso} \times (85 \text{ o } 90) = \text{Xilacina (xi)} \times 2 = \frac{\text{Ketamina (ke)} + (\text{xi})}{20 \text{ mg}} = (\text{dosis total})/2 = (\text{dosis por pata})$$

Ejemplo: $1\text{WTGL} = \frac{16.73 \times 85}{20} = 71.10$ (xi) $\times 2 = 142.20$ (ke) + 71.10 (xi) = 213.30 (xi/ke)/2 = 106.65 (por pata)

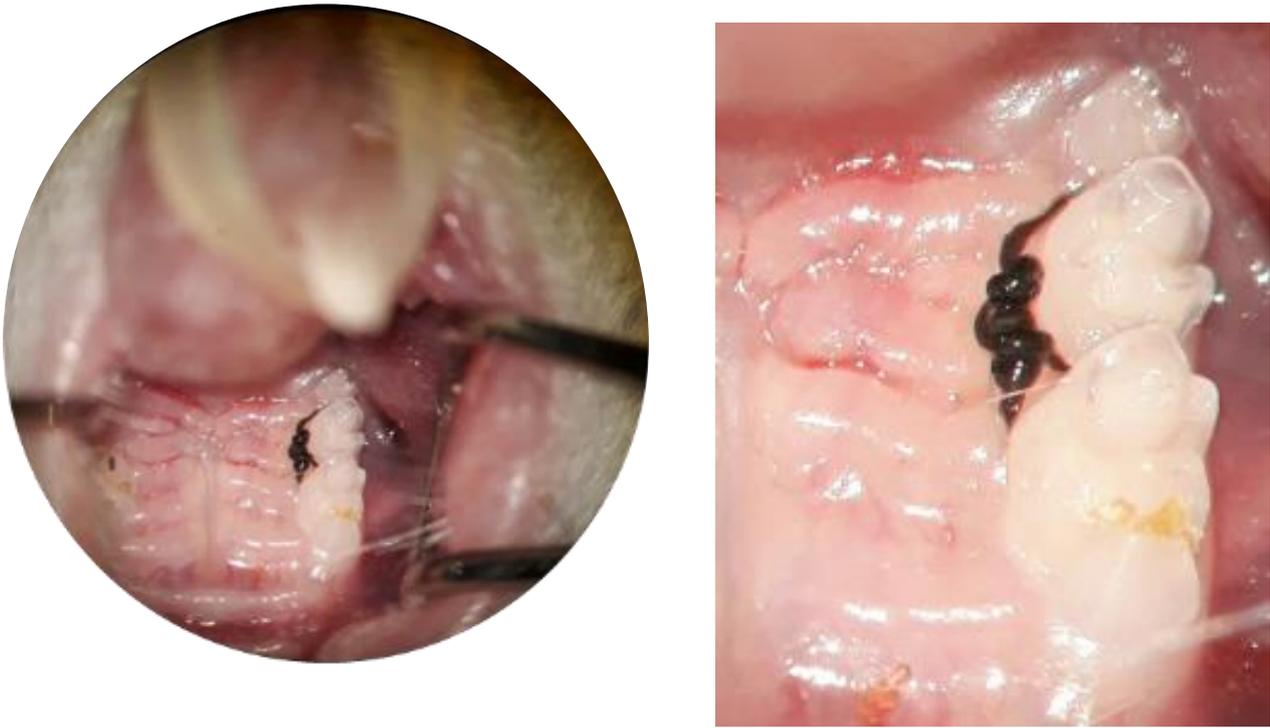


Fig. 20. Colocación Ligadura

6.4 Sacrificio y Obtención de Maxilares

Con el fin de unificar los resultados se realizaron los sacrificios de los grupos experimentales (CTL, PE, G, PAG) a las 10 semanas posteriores a la inducción de la periodontitis (18 semanas de edad). Los ratones control fueron sacrificados en los mismos tiempos que los grupos experimentales. Al término de este periodo se realizaron los sacrificios y se obtuvo una última muestra sanguínea a través de punción cardiaca. Posterior a la punción cardiaca se diseco el maxilar para su posterior inmersión en paraformaldehído al 4%, durante una hora.



Fig. 21. Punción Cardiaca



Fig. 22. Obtención de Maxilar

6.5 Análisis Histopatológico

Las maxilas fueron recuperadas y fijadas en solución de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich), después se realizó un lavado en agua corriente durante 1 hr, y fueron descalcificadas en una solución de EDTA al 4% con un pH de 7.40 (Sigma -Aldrich), durante 18 días, posteriormente fueron procesadas en el tren de deshidratación, colocadas en aceite de cedro y finalmente fueron incluidas en parafina, para realizar cortes en el micrótopo de 5 micras. Se realizaron cortes secuenciales en la zona del segundo molar, aproximadamente 20 cortes. Se seleccionaron laminillas para las técnicas de tinción.



Fig. 23. EDTA al 4%, pH 7.40

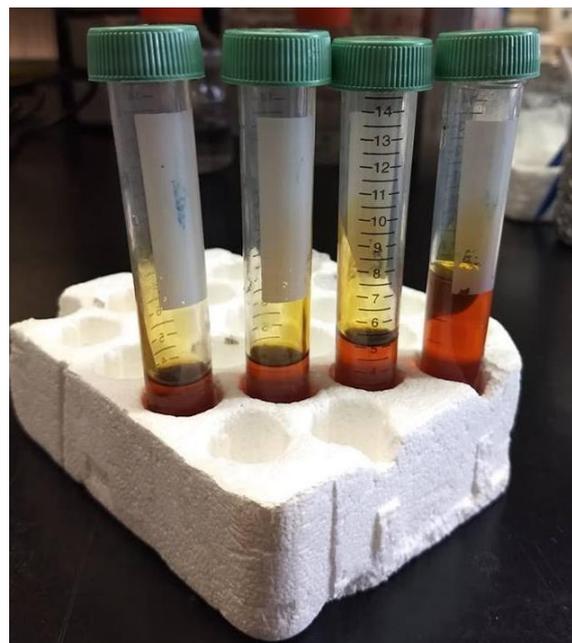


Fig. 24. Aceite de Cedro



Fig. 25. Horno de Parafina

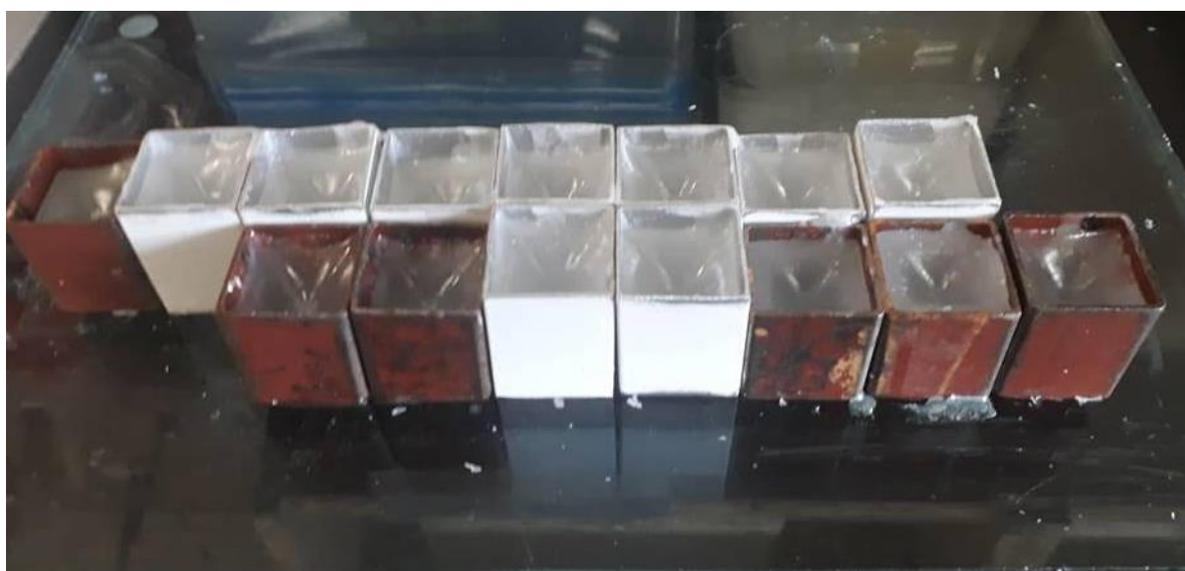


Fig. 26. Inclusión.

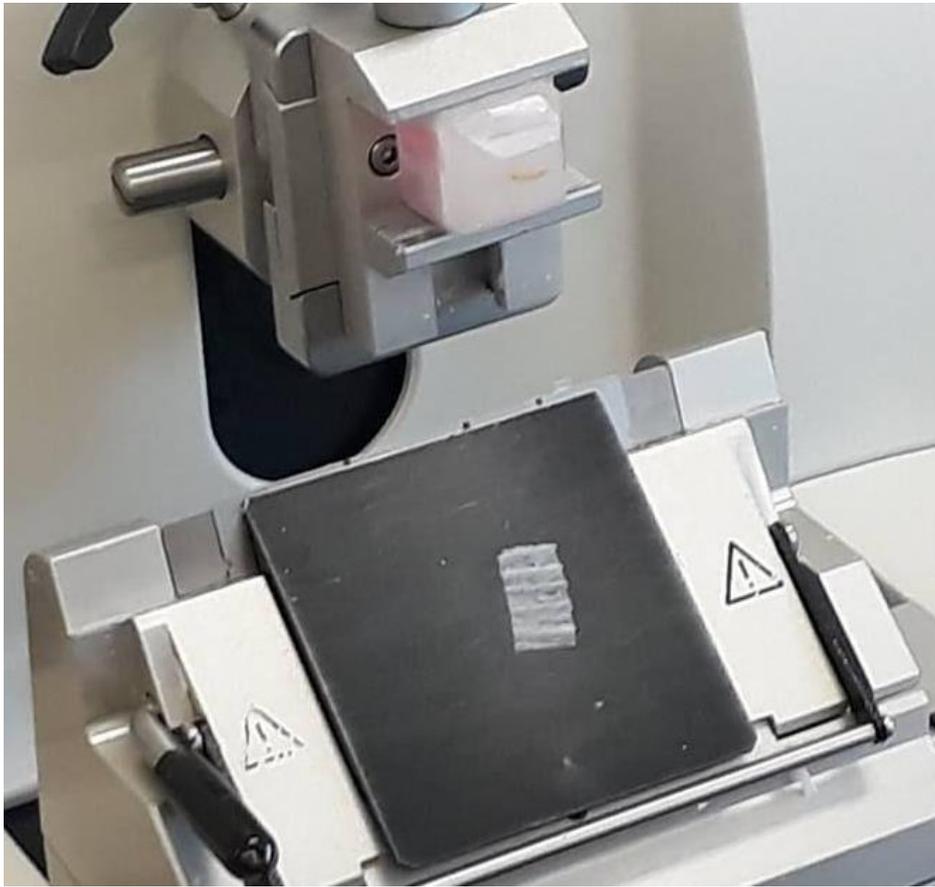


Fig. 27. Corte en Micrótopo.



Fig. 28. Plancha de estiramiento.



Fig. 29. Selección de laminillas.

Las metodologías utilizadas para cuantificar la progresión de la periodontitis inducida por ligadura varían considerablemente. Semenoff, en 2008 realizó un análisis histométrico en ratas con periodontitis inducida por ligadura. Las muestras histológicas fueron teñidas con la técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina (H-E). Se midió la distancia entre la unión cemento-esmalte (UCE) y la cresta alveolar [46].

6.5.1 Técnica Hematoxilina-Eosina

La tinción hematoxilina-eosina (H-E), es el método que utiliza la aplicación del colorante hematoxilina que, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilas) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Dada su naturaleza positiva, la hematoxilina es un componente básico que tiñe fuertemente el núcleo (debido a los ácidos nucleicos). Los componentes que colorea la hematoxilina son denominados basófilos o hematoxínófilos. La hematoxilina empleada en la técnica histológica de este estudio fue la de Harris, la cual se compone de hematoxilina, alcohol al 100%, alumbre de potasio, agua destilada y óxido de rojo de Mercurio, este último empleado para acelerar el proceso de oxidación que permite la conversión de hematoxilina a hemateína. De igual forma se empleó ácido acético glacial para aumentar la especificidad de la tinción. La eosina es un colorante acidófilo de presentación en polvo cristalino de color rojo. En la actualidad se emplean dos compuestos, la eosina Y o tetrabromo fluoresceína, comúnmente conocida como eosina amarilla; y la eosina B o dibromodinitrofluoresceína, también conocida como eritrosina B azulada. Si bien pueden ser intercambiables sin que se noten las diferencias entre ellas en el resultado de la tinción, la eosina Y alcohólica de color amarillo es la más utilizada en procedimientos rutinarios histológicos, como tinción de contraste en la técnica de la hematoxilina-eosina. Basada en su polaridad negativa, la eosina es un compuesto ácido que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva, de tal forma que tiñe organelos citoplasmáticos, fibra elástica,

colágeno y fibras musculares. Los componentes que colorea la eosina son denominados acidófilos o eosinófilos [47].



6.5.2 Técnica Tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson, (TM) al igual que otros colorantes tricrómicos, es una tinción especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia; también evidencia, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares. Estos elementos poseen afinidad por los colorantes ácidos debido a la gran cantidad de grupos catiónicos de los aminoácidos que conforman las cadenas polipeptídicas. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular (hematoxilina férrica), el citoplasma (fucsina) y las fibras de colágeno (azul de anilina). En primer lugar, se tiñen los cortes con un reactivo ácido del tipo fucsina (escarlata de Biebrich) que colorea todos los elementos acidófilos del tejido como el citoplasma, el músculo y el colágeno. Posteriormente, los cortes se tratan con ácido fosfotúngstico y/o fosfomolibdico para que el tinte escarlata de Biebrich se diluya del colágeno, pero no del citoplasma. Los ácidos fosfotúngsticos y fosfomolibdicos tienen numerosos grupos ácidos que probablemente actúan como medio de unión entre el colágeno y el azul de anilina, que es el tinte afín al colágeno en un pH ácido. Luego se emplea la hematoxilina férrica de Weigert (que emplea cloruro férrico como oxidante) para teñir componentes basófilos especialmente del citoplasma. De esta forma las fibras de colágeno teñirán azul; el citoplasma y demás estructuras oxidadas teñirán de rojo y el núcleo teñirá de color lila o marrón [47].



Fig. 31. Técnica Tricrómica de Masson.

6.5.3 Técnica de Inmunofluorescencia

La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación. Las moléculas de un colorante fluorescente absorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía (longitud de onda más corta) en luz de menor energía (longitud de onda más larga). Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación característicos; si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación, pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos características al mismo tiempo (fluorescencia de dos colores). Una molécula que flúorese puede ser fijada en el anticuerpo para ser detectada usando luz UV o láser. [48]

Una vez que se identificó la diferencia en la calidad de colágeno en los cortes con ligadura, se escogieron 2 enzimas degradantes de matriz celular: MMP-2 y MMP-13. Se realizaron en cortes secuenciales para inmunofluorescencia para MMP-2 (FITC Jackson ImmunoReserch) y MMP-13 (Rodamina Jackson ImmunoReserch), en ambas se utilizó la tinción de HOTCH (Jackson ImmunoReserch), para identificar núcleos y se analizaron con el microscopio Confocal (Leica, SP2), se marcaron 20 áreas (ROIs) para determinar la fluorescencia expresada en las diferentes muestras, para realizar un análisis estadístico. La expresión de MMP-13 en otros estudios ha sido reportada como aumentada en enfermedad periodontal activa refiere, que MMP-2 se encuentra expresada a niveles bajos en tejidos sanos, y se expresa mayormente durante la embriogénesis e inclusive durante la odontogénesis, además participa en la reparación de heridas. Una vez identificadas las características de colágeno, se analizó la expresión por fluorescencia de MMP-2 y MMP-13. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico en cortes seriados de los 4 grupos WT y *Mif*^{-/-}: Control (CTL), Gestante (G), Periodontitis Experimental (PE) y Periodontitis Asociada a Gestación (PAG) [44].

7. Análisis Estadístico

La prueba U de Mann-Whitney permite comparar dos medianas, ya sea que provengan de una variable ordinal o de una cuantitativa con libre distribución [49].

Las comparaciones de la fluorescencia de MMP-2 y MMP-13 entre los diferentes grupos considerados en este trabajo se llevaron a cabo mediante la prueba de U de Mann-Withney (con el software Graphpad Prisma 6) la cual se utiliza para comparar dos grupos de rangos y determinar que la diferencia sea estadísticamente significativa. Utilizamos un coeficiente confiabilidad del 95%.

8. Análisis de Resultados

8.1 Histología con Hematoxilina & Eosina

En los cortes histológicos de los ratones WT con tinción H&E, en el grupo CTL se observan las características normales del periodonto en salud (Fig 32a 10X), el margen de la cresta ósea se observa bien definida, las fibras gingivales y del ligamento periodontal se observan integradas al hueso alveolar y cemento radicular (Fig. 32a 40X), se observan los núcleos bien definidos y las fibras de Sharpey (Fig 32a 100X).

En el grupo G se observan pequeñas alteraciones en las características del epitelio del surco, no hay cambios en el grosor biológico (Fig. 32b 10X), se observa la cresta ósea íntegra, sin alteraciones en las fibras de colágeno (Fig. 32b 40X), se observan los núcleos ligeramente alargados, sin alteración en las fibras (Fig. 32b 100X).

En el grupo PE se observa la pérdida de continuidad del margen gingival, consecuencia de la ligadura colocada y alteraciones en grosor biológico (Fig. 32c 10X), hay pérdida de las crestas óseas y alteraciones en el ligamento periodontal (Fig. 32c 40X), se observa una distribución irregular de las fibras de colágeno y ausencia de núcleos (Fig, 32c 100X).

En el grupo PAG se observan destrucción de los tejidos, pérdida del grosor biológico y así como la formación de bolsas periodontales (Fig. 32d 10X), distribución irregular de las fibras y migración apical de la cresta ósea (Fig. 32d 40X), se observa completa ausencia de núcleos (Fig. 32d 100X).

WT

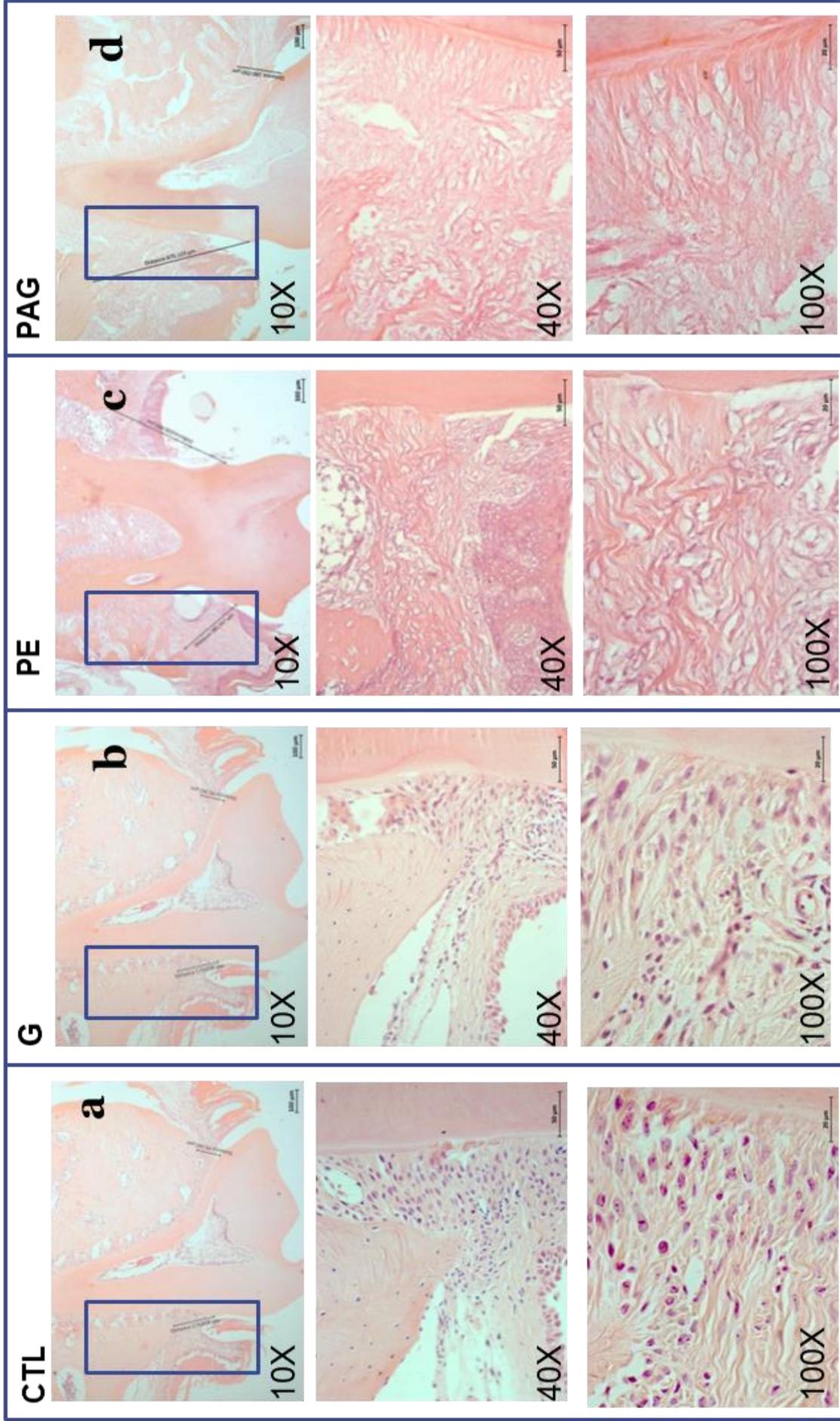


Fig. 32. Comparación del nivel de inserción WT.

Cortes histológicos teñidos con H&E. Medición del nivel de inserción en los cuatro grupos, CTL, G, PE Y PAG. En los grupos CTL y G se observan las características normales del periodonto en salud. En los grupos PE y PAG se observa la pérdida de definición de la cresta ósea, de las fibras de Sharpey y de los núcleos.

En los cortes histológicos de los ratones *Mif*^{-/-} con tinción H&E, en el grupo CTL se observan las características normales del periodonto en salud (Fig 33a 10X), el margen de la cresta ósea se observa bien definida, las fibras gingivales y del ligamento periodontal se observan integradas al hueso alveolar y cemento radicular (Fig. 33a 40X), se observan los núcleos bien definidos y las fibras de Sharpey (Fig 33 100X).

En el grupo G se observan el epitelio del surco, fibras gingivales y periodontales, no hay cambios en el grosor biológico (Fig. 33b 10X), se observa la cresta ósea íntegra así como las fibras de colágeno (Fig. 33b 40X), se observan los núcleos, sin alteración en las fibras (Fig. 33b 100X).

En el grupo PE se observa el epitelio de unión sin alteraciones, la cresta alveolar está bien definida, las fibras gingivales y periodontales están íntegras (Fig. 33c 10X), las fibras de colágeno presentan núcleos y están alineadas (Fig. 33c 40X), no se observa distribución irregular de las fibras de colágeno y leve ausencia de núcleos (Fig, 33c 100X).

En el grupo PAG se observan leves alteraciones en las características del epitelio del surco y en la integridad del grosor biológico, (Fig. 33d 10X), integración de las fibras al hueso alveolar, la cresta ósea está bien definida (Fig. 33d 40X), se observa una ausencia parcial de los núcleos (Fig. 33d 100X).

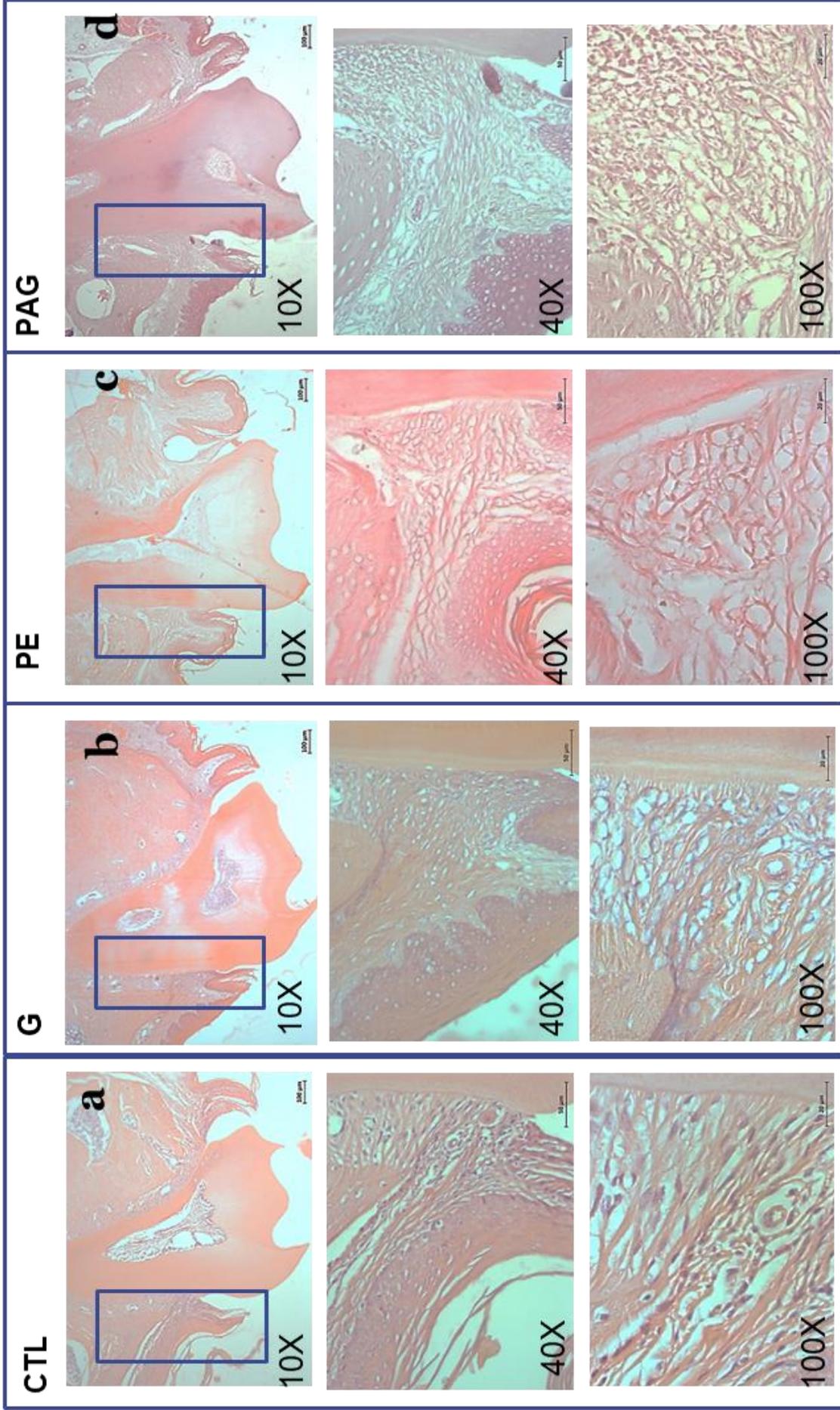
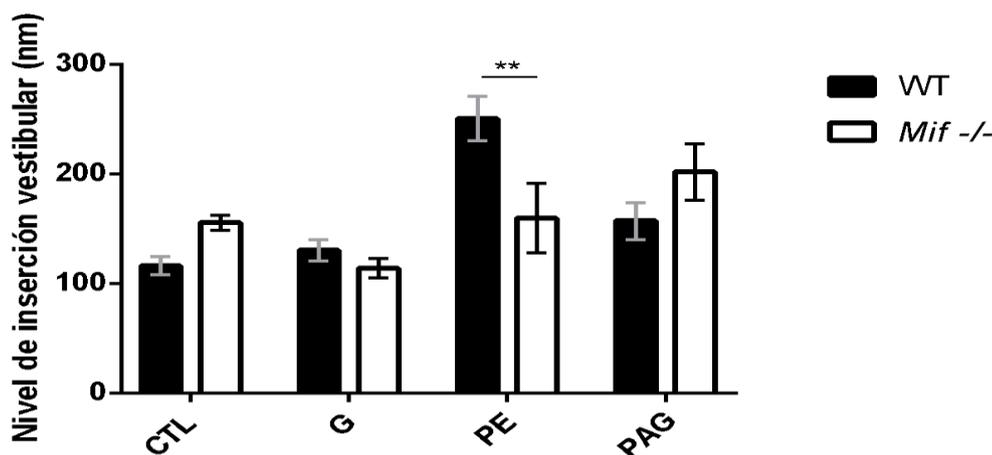


Fig. 33. Comparación del nivel de inserción Mif-/-.

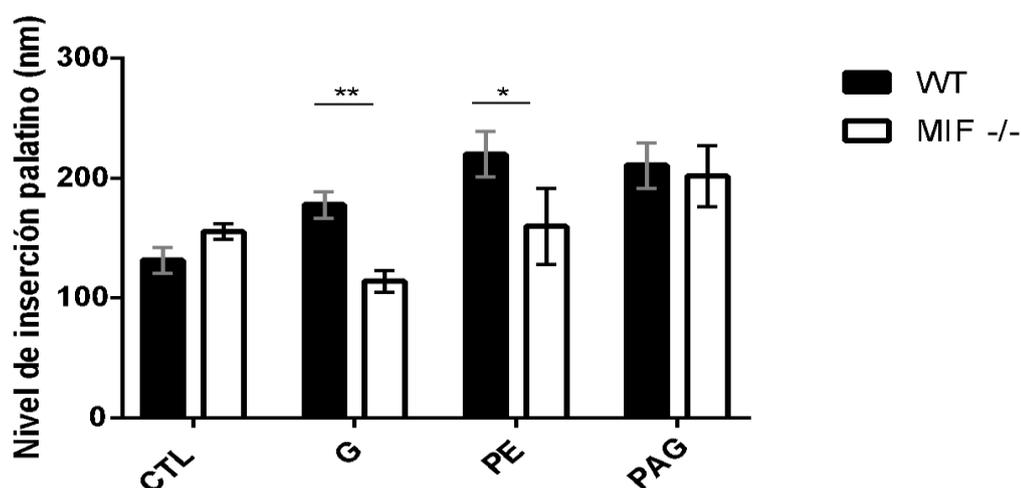
Cortes histológicos teñidos con H&E. Medición del nivel de inserción en los cuatro grupos, CTL, G, PE y PAG. En los grupos CTL y G se observan las características normales del periodonto en salud. En los grupos PE y PAG se observa una pérdida menor en las fibras de Sharpey y de núcleos.

8.1.1 Análisis Nivel de Inserción



Gráfica A) Comparación del nivel de inserción vestibular

En la comparación de la distancia entre la UCE y la cresta alveolar, entre los grupos de ratones WT y *Mif*^{-/-}, en la cara vestibular no se identificaron diferencias significativas entre los grupos CTL y G, sin embargo, se identificó que la pérdida de inserción vestibular en el grupo *Mif*^{-/-} PE fue menor en comparación con el grupo WT PE que presentó una diferencia significativa con una $P=0.01^{**}$, lo cual indica que la presencia de *Mif* favorece la destrucción del tejido periodontal, lo que provoca la pérdida de inserción y el aumento en la profundidad de la distancia entre la UCE y el borde óseo.



Gráfica B) Comparación del nivel de inserción palatino.

En la comparación de la distancia entre UCE y la cresta alveolar, aumento el nivel de inserción palatino en el grupo WT G en comparación con el grupo *Mif*^{-/-} G y presento una diferencia significativa con una $P=0.01^{**}$. El nivel de inserción palatino disminuyo en el grupo WT PE en comparación con el grupo *Mif*^{-/-} PE y presento una diferencia significativa con una $P=0.1^{*}$, lo cual indica que la presencia de *Mif* favorece la destrucción del

tejido periodontal, lo que provoca la pérdida de inserción y el aumento en la profundidad de la distancia entre la UCE y el borde óseo.

8.2 Histología con Tricrómica de Masson

En los cortes histológicos de los ratones WT con tinción Tricrómica de Masson en el grupo CTL Se observa el tejido epitelial en el surco y en la encía marginal (Fig. 34a 10X), se observan las fibras de colágeno denso en la inserción del grosor biológico (Fig. 34a 40X), los núcleos aparecen distribuidos así como las fibras de colágeno (Fig. 34a 100X).

En el grupo G Se observa una profundización del surco (Fig. 34b 10X), se observan más fibras de colágeno laxo y distribución irregular (Fig. 34b 40X), se observan alteraciones en la Organización de las fibras de colágeno ausencia de núcleos (Fig. 34b 100X).

En el grupo PE y observa la pérdida de inserción así como del grosor biológico (Fig. 34c 10X), se observa la pérdida de colágeno denso (Fig. 34c 40X), de tejido epitelial y la ausencia de núcleos (figura 34 c 100 X).

En el grupo PAG Se observa la migración apical del epitelio pérdida de integridad del tejido (Fig. 34d 10X), la distribución de las fibras de colágeno es irregular (Fig. 34c 40X), se observa tejido epitelial distribución irregular de las fibras y ausencia de núcleos (Fig. 34c 100X).

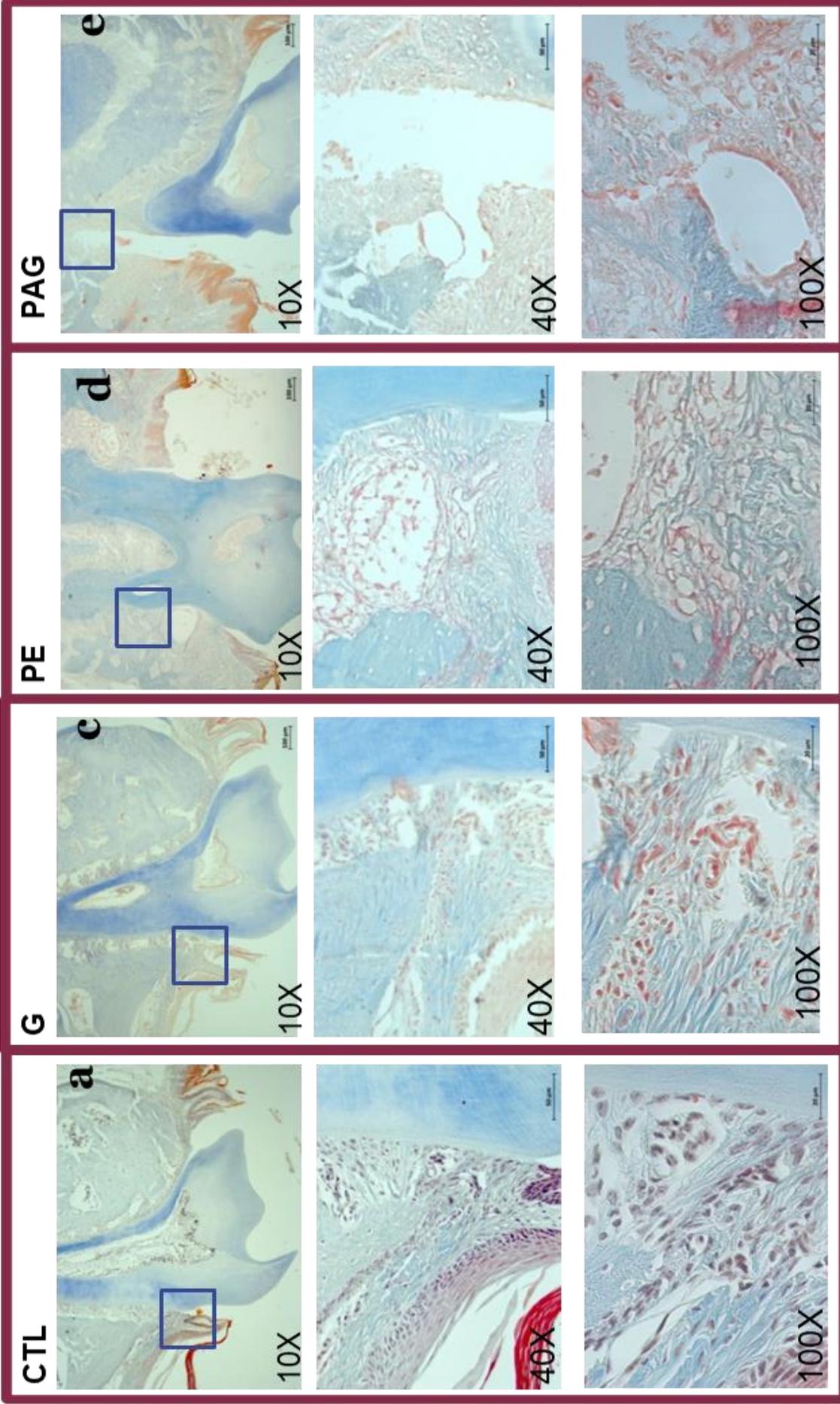


Fig. 34 Características de colágeno WT.

Cortés histológicos teñidos con tectónica de Masson. Tipo de colágeno presente en el grosor biológico en los cuatro grupos, CTL, G, PE y PAG. Colágeno denso (azul), colágeno lado (verde), quedaron a y epitelio (rojo), núcleos (negro). En los grupos CTL y G se observan las características normales del colágeno. En los grupos PE y PAG se observa la pérdida de colágeno, queratina y núcleos.

En los cortes histológicos se los ratones mis con tinción Tricrómica de Masson en el grupo CTL se observa el tejido epitelial en el surco y la encía marginal (Fig. 35a 10X), se observan las fibras de colágeno denso en la inserción de grosor biológico (Fig. 35a 40X), los núcleos aparecen distribuidos así como las (Fig. 35a 100X).

En el grupo G Se observa la distribución del tejido conectivo y epitelial respetando los límites anatómicos (Fig. 35b 10X), se observan las fibras de colágeno denso bien definidas (Fig. 35b 40X), se observa la integridad del grosor biológico así como los núcleos (Fig. 35b 100X).

En el grupo PE se mantuvo sin alteraciones drásticas Se observa el tejido epitelial en la encía marginal respetando la anatomía (Fig. 35c 10X), se observan las fibras de colágeno en la inserción del grosor biológico (Fig. 35c 40X), se observan los núcleos celulares distribuidos (Fig. 35c 100X).

En el grupo PAG se observa una distribución similar al grupo PE (Fig. 35d 10X), se observan las fibras de colágeno densos (Fig. 35d 40X), se observa la presencia de núcleos (Fig. 35d 100X).

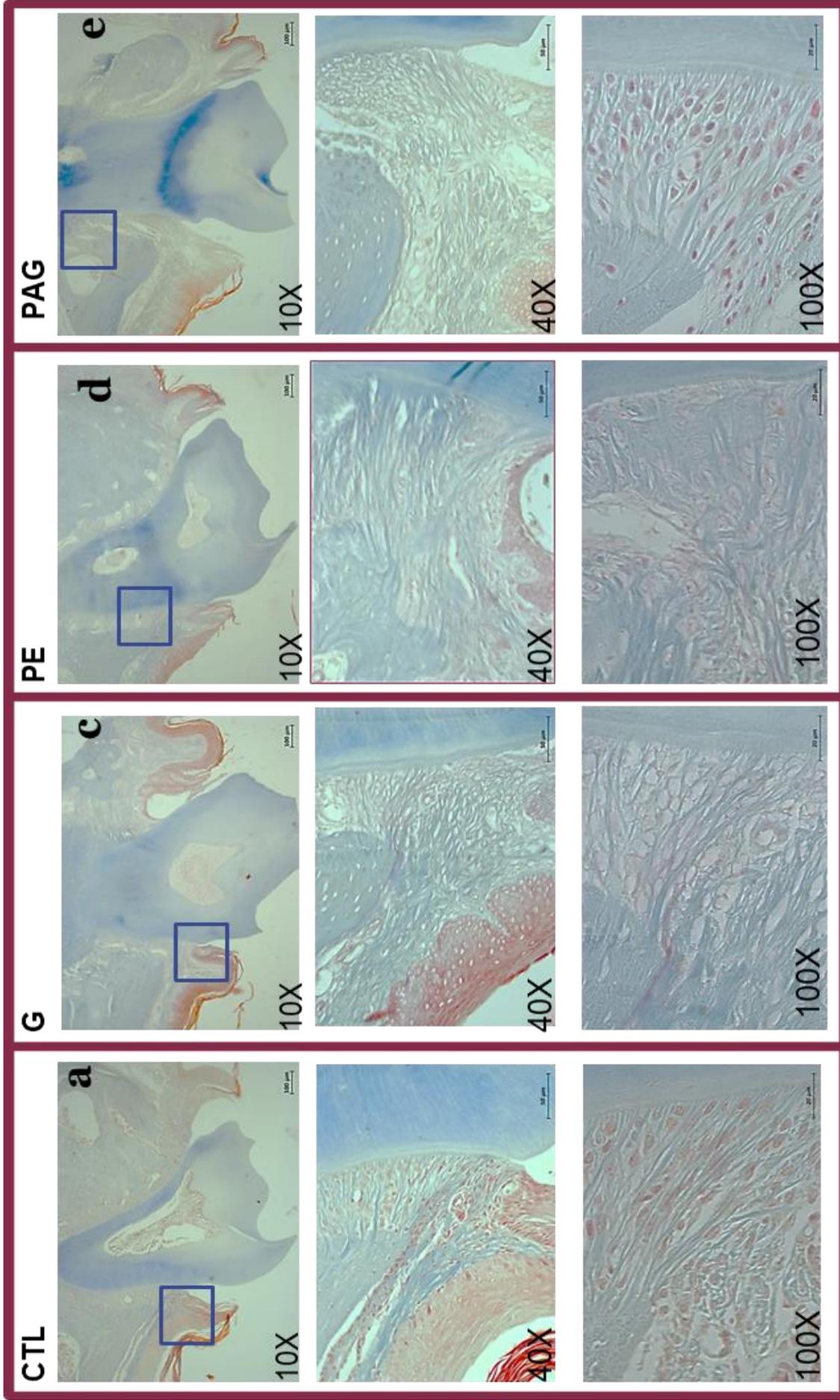


Fig. 35 Características de colágeno Mif-/- .

Cortés histológicos teñidos con tectónica de Masson. Tipo de colágeno presente en el grosor biológico en los cuatro grupos, CTL, G, PE y PAG. Colágeno denso (azul) , colágeno lado (verde), quedaron a y epitelio (rojo), núcleos (negro). En los grupos CTL y G se observan las características normales del colágeno. En los grupos PE y PAG, no se observa destrucción del colágeno, sólo una desorganización de las fibras.

8.3 Inmunofluorescencia de MMP-13

Una vez identificada la calidad de colágeno en los cortes con tinción Tricrómica de Masson, se escogieron 2 enzimas degradantes de matriz celular: MMP-2 y MMP-13. Se utilizaron cortes secuenciales para realizar la inmunofluorescencia para MMP-2, utilizando la tinción de HOTCH para identificar núcleos, se analizaron con el microscopio Confocal (Leica, SP2), se marcaron 20 ROI (región de interés) para determinar la fluorescencia expresada en las diferentes muestras y realizar un análisis estadístico.

En la Fig. 36 de expresión de MMP-13 en WT hay 4 canales, MMP-13 para la fluorescencia de MMP-13, DAPI para observar los núcleos, MERGE es la función de DAPI con MMP-13 para observar la expresión de núcleos con la fluorescencia y NO para comprobar que los canales anteriores son correctos.

Observamos un aumento en la expresión de MMP-13 en el grupo PE, en donde la enfermedad periodontal estuvo activa, comparada con los grupos CTL, G incluso con el modelo PAG.

Liang, 2016[42] reporta que la disminución de la expresión de MMP-13 puede relacionarse a la presencia de estrógeno E2 e IL-1, y lo podemos observar en el grupo G.

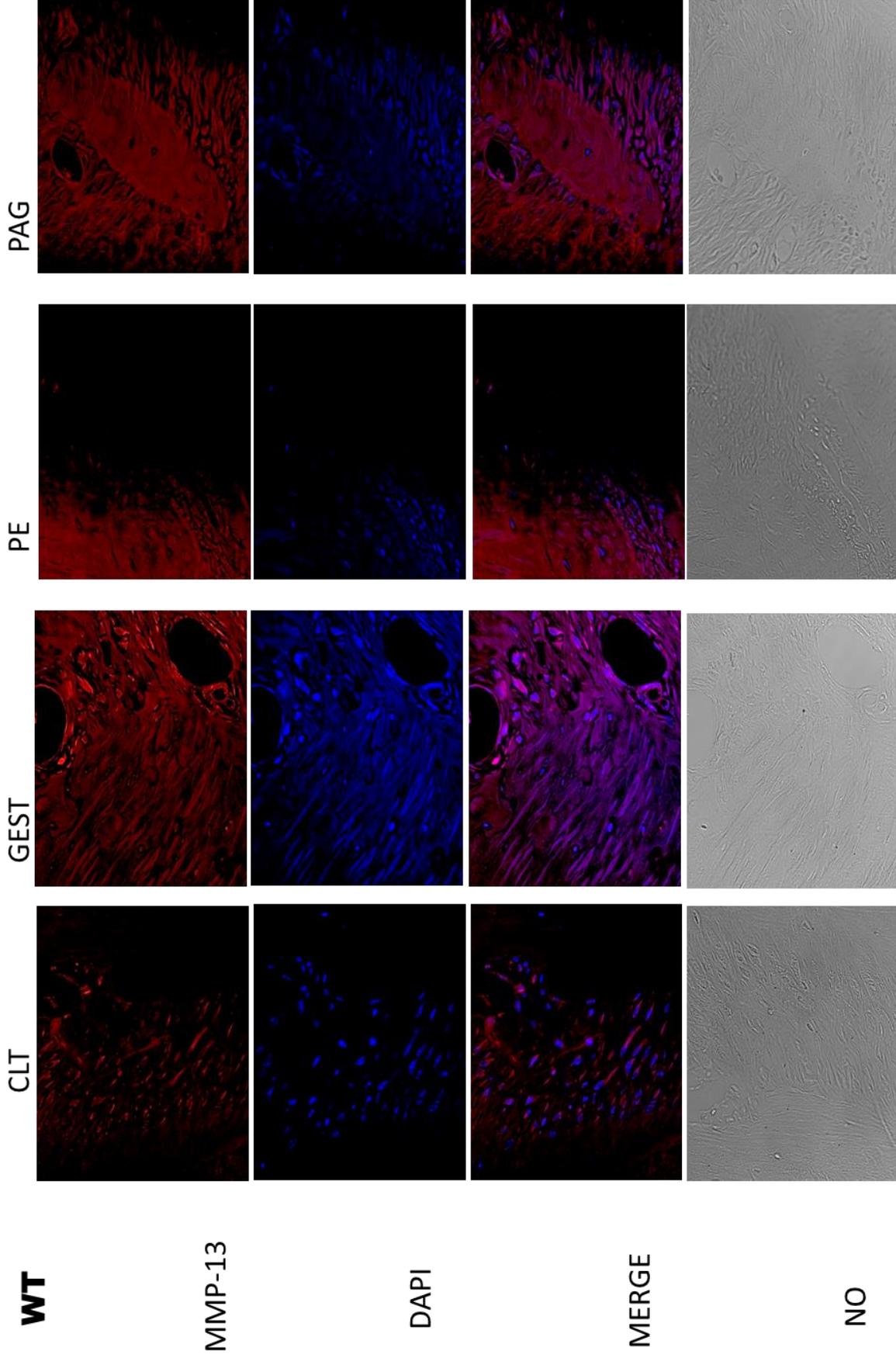


Fig. 36. Expresión de MMP-13 en WT.

Una vez identificadas las características de colágeno, se analizó la expresión por fluorescencia de MMP-13. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico, en cortes seriados de los 4 grupos experimentales, Control (CTL), Gestación (G), Periodontitis Experimental (PE) y Periodontitis Asociado a Gestación. Se observa la expresión de MMP-13, núcleos con DAPI y Merge.

En la Fig. 37 de expresión de MMP-13 en *Mif*^{-/-} hay 4 canales, MMP-13 para la fluorescencia de MMP-13, DAPI para observar los núcleos, MERGE es la función de DAPI con MMP-13 para observar la expresión de núcleos con la fluorescencia y NO para comprobar que los canales anteriores son correctos.

Observamos que hay una leve disminución en la expresión de MMP-2 en el grupo PE en donde la enfermedad periodontal fue activada, no se observan otras alteraciones en los grupos CTL, G Y PAG, también podemos apreciar una expresión basal de la MMP-13.

Se esperaba que en ausencia de MIF la expresión de MMP-13 fuera menor, podemos observar que *Mif*^{-/-} si participa en la modificación de la expresión de MMP-13.

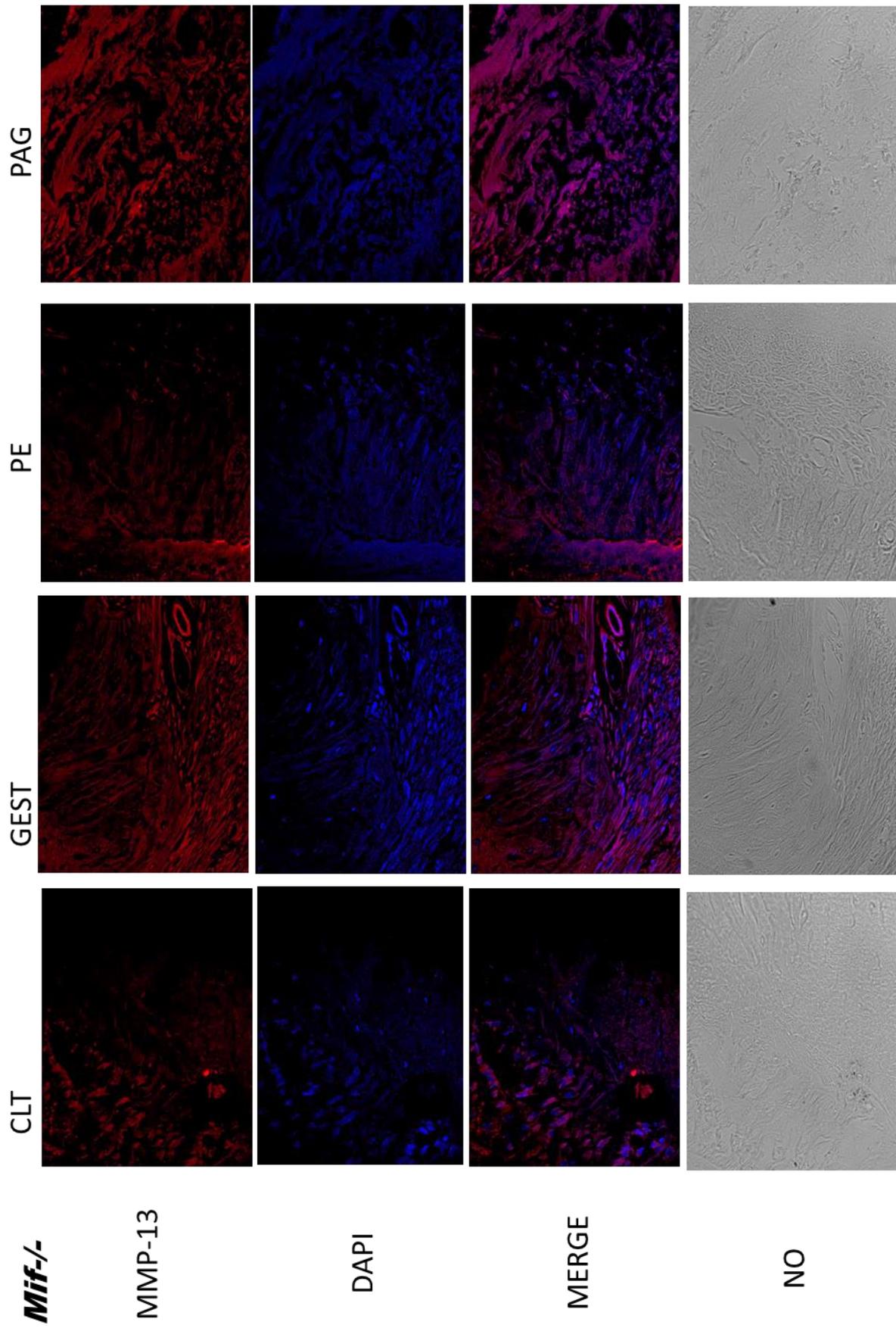
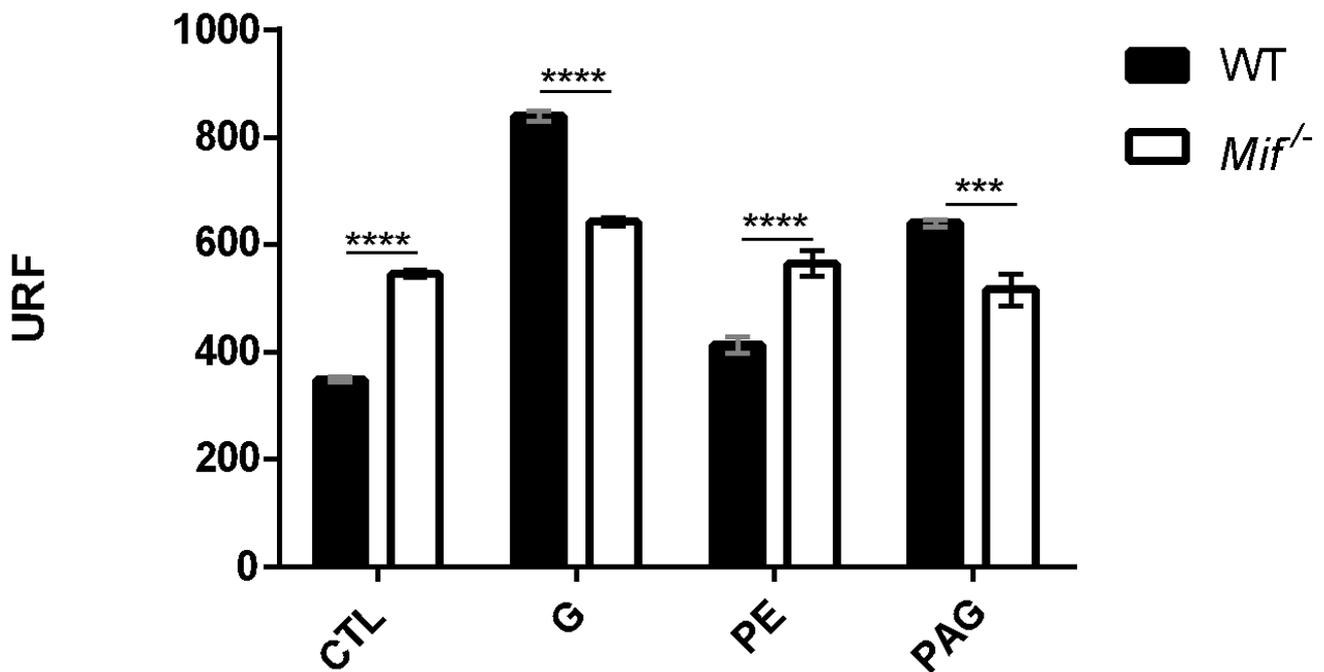


Fig. 37. Expresión de MMP-13 en *Mif*^{-/-}.

Una vez identificadas las características de colágeno, se analizó la expresión por fluorescencia de MMP-13. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico, en cortes seriados de los 4 grupos experimentales; Control (CTL), Gestación (G), Periodontitis Experimental (PE) y Periodontitis Asociado a Gestación. Se observa la expresión de MMP-13, núcleos con DAPI y Merge.

8.3.1 Análisis Comparativo de la Expresión de MMP-13



Gráfica C) Comparación de la Expresión de MMP-13.

La expresión de MMP-13 disminuyó en el grupo KO PAG en comparación con el grupo WT PAG y presentó una diferencia significativa con una $P=0.001^{***}$. En el grupo WT PE disminuyó en comparación con el grupo KO PE con una diferencia significativa de una $P=0.0001^{****}$. Mientras que en el grupo CTL KO al compararlo con el grupo CTL WT presenta una diferencia significativa con una $P=0.0001^{****}$. En el grupo KO G se observa una disminución al compararlo con el grupo WT G, presentó diferencia significativa con una $P=0.0001^{****}$.

8.4 Inmunofluorescencia de MMP- 2

Una vez identificadas las características de colágeno, se analizó la expresión por fluorescencia de MMP-2. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico en cortes seriados de los 2 grupos WT y Mif^{-/-}. Se utilizó la tinción de HOTCH, para identificar núcleos, se analizaron con el microscopio Confocal (Leica, SP2), se marcaron 20 ROI (region de interes) para determinar la fluorescencia expresada en las diferentes muestras, para realiza un análisis estadístico.

Sapna, 2014[44], refiere que MMP-2 se encuentra expresada a niveles bajos en tejidos sanos, y se expresa mayormente durante la embriogénesis e inclusive durante la odontogenesis, además participa en la reparación de heridas.

En la Fig. 38 de expresión de MMP-2 en WT hay 4 canales, MMP-13 para la fluorescencia de MMP-13, DAPI para observar los núcleos, MERGE es la fución de DAPI con MMP-13 para observar la expresiòn de nucleos con la fluorescencia y NO para comprobar que los canales anteriores son correctos.

Podemos observar que en grupo PE por contar con una enfermedad periodontal activa, su expresión es mayor comparada con los grupos CTL. G.

Sin embargo existe una disminución es su expresión con el doble estimulo en el grupo PAG, podría explicarse por la presencia de hormonas sexuales, ya que se encuentran aumentadas por la gestación.

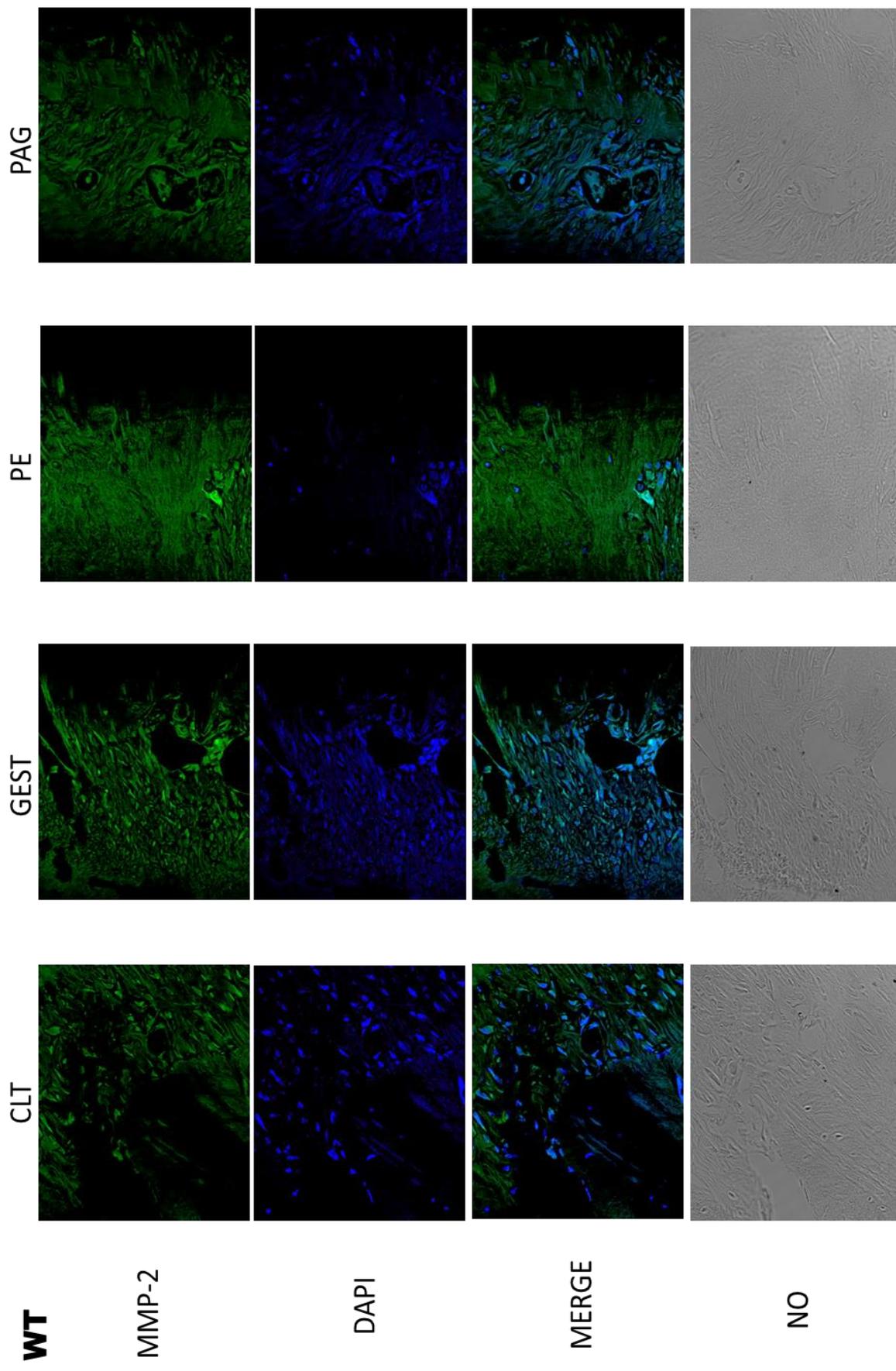


Fig. 38. Expresión de MMP-2 en WT.

Una vez identificadas las características de colágeno, se analizó la expresión por fluorescencia de MMP-2. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico, en cortes seriados de los 4 grupos experimentales, Control (CLT), Gestación (G), Periodontitis Experimental (PE) y Periodontitis Asociado a Gestación. Se observa la expresión de MMP-13, núcleos con DAPI y Merge.

En la Fig. 39 de expresión de MMP-2 en *Mif*^{-/-} hay 4 canales, MMP-13 para la fluorescencia de MMP-13, DAPI para observar los núcleos, MERGE es la función de DAPI con MMP-13 para observar la expresión de núcleos con la fluorescencia y NO para comprobar que los canales anteriores son correctos.

Podemos observar que en grupo PE hay una mayor fluorescencia comparado con el grupo CTL Y G, sin embargo es una expresión menor comparado con el grupo WT PE.

Los grupos CTL, G y PAG presentan una expresión de fluorescencia menor que los grupos WT.

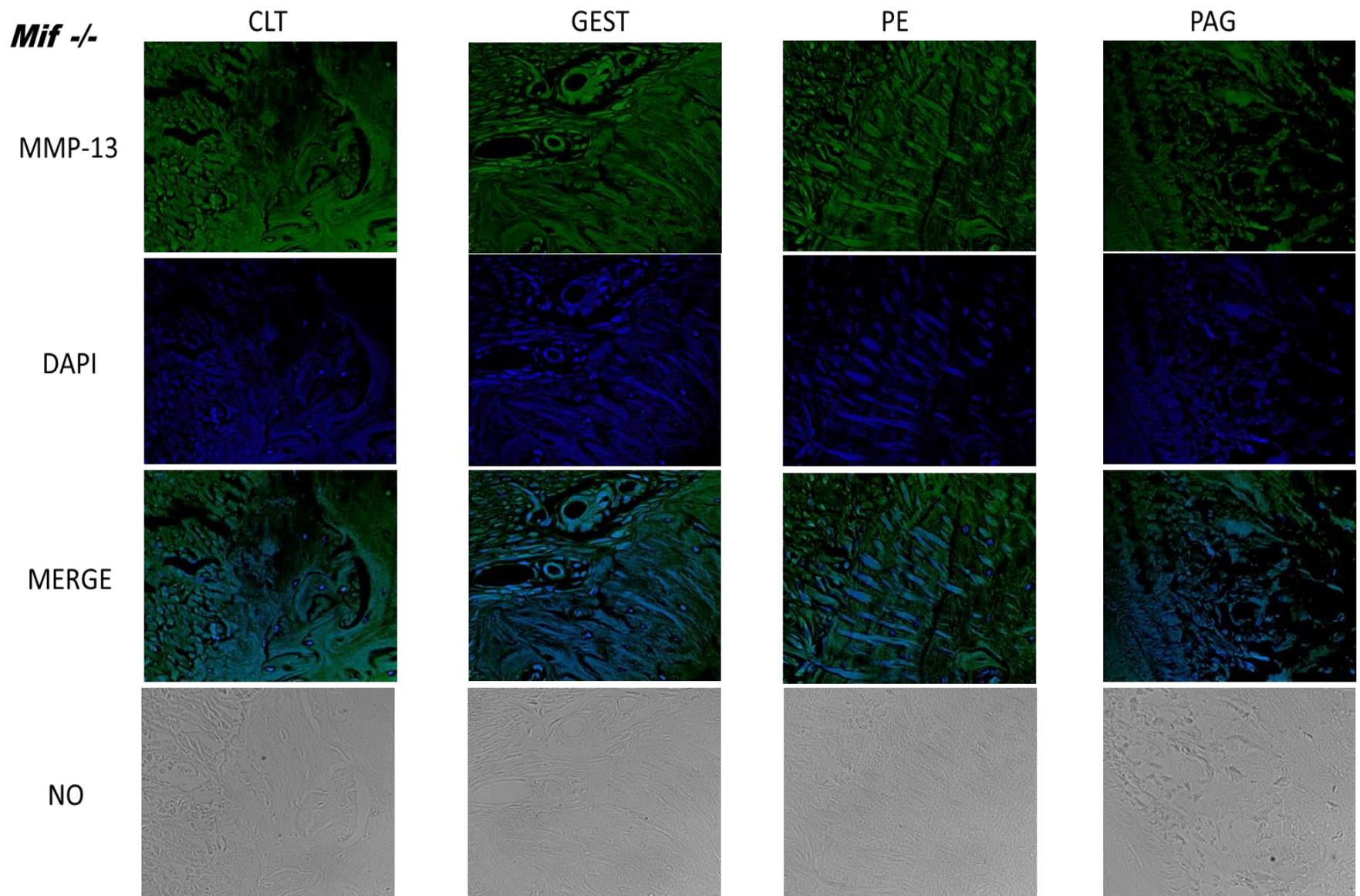
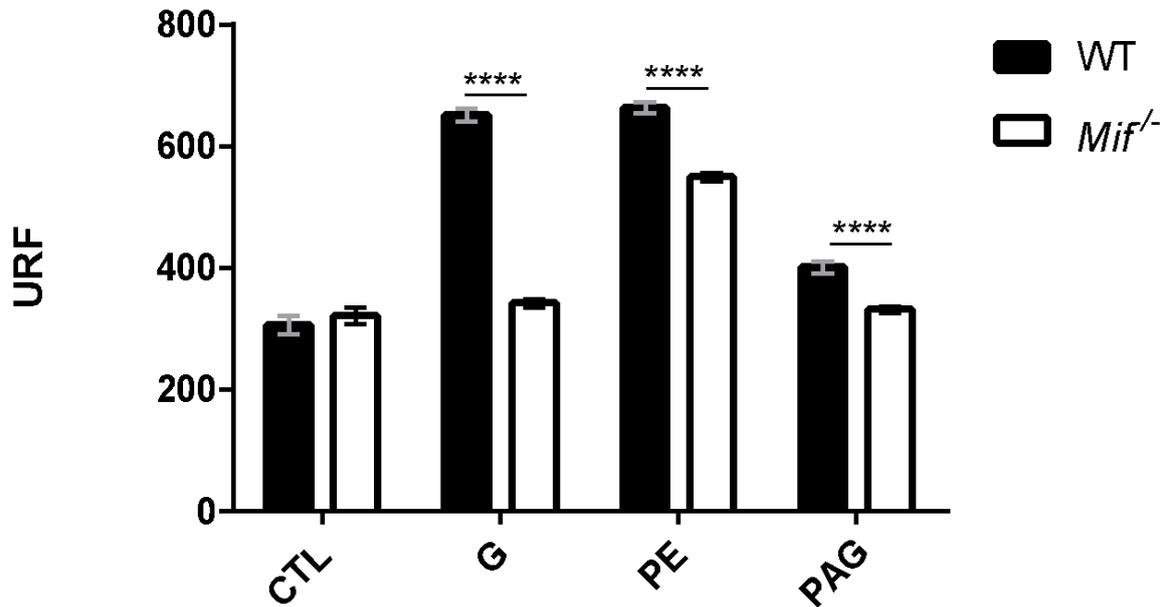


Fig. 39. Expresión de MMP-2 en *Mif*^{-/-}.

Una vez identificadas las características de colágeno, se analizó la expresión por fluorescencia de MMP-2. Para identificar las características del tipo de colágeno presente en el grosor biológico, en cortes seriados de los 4 grupos experimentales, Control (CTL), Gestación (G), Periodontitis Experimental (PE) y Periodontitis Asociado a Gestación. Se observa la expresión de MMP-2, núcleos con DAPI y Merge.

8.4.1 Análisis Comparativo de la Expresión de MMP-2



Gráfica D) Comparación de la Expresión de MMP-2.

La expresión de MMP-2 aumento en el grupo WT PE en comparación con el grupo KO PE presentando una diferencia significativa con una $P=0.0001$ ****. En el grupo KO PAG disminuyó en comparación con el grupo WT PAG y presenta una diferencia significativa de $P=0.0001$ ****. Mientas que la expresión de MMP-2 disminuyó en el grupo KO G al compararlo con el grupo WT G con una diferencia significativa con una $P=0.0001$ ****.

9. Discusión

En las Tinciones H&E y Tricrómica de Masson WT PE Y PAG observamos la distribución irregular de las fibras, pérdida de la cresta ósea y ausencia de núcleos y destrucción de las fibras de colágeno, como es reportado en enfermedad periodontal por Herane, 2014 [2].

La estimulación del receptores tipo Toll 4 (TLR4) por el lipopolisacárido (LPS) induce la liberación de citocinas proinflamatorias críticas que son necesarias para activar respuestas inmunes potentes como lo enuncia Page en 1991 (7), *F. Nucleatum* puede inducir respuesta inflamatoria aumentando la expresión de citocinas inflamatorias lo cual es reportado por Bascones en 2005 [1]. La presencia de citocinas inflamatorias tales como *Mif* explica él porque en el grupo WT en presencia de *Mif* existe una mayor destrucción de los tejidos.

En *Mif* ^{-/-} PE y PAG aún existe integridad en las fibras, ausencia leve o parcial de los núcleos, así como mayor integridad en las fibras de colágeno, *Mif* participa directamente como regulador del proceso inflamatorio.

El cambio hormonal más significativo es el incremento en la producción de estrógeno y progesterona. La encía humana contiene receptores para estrógeno y progesterona, y por lo tanto, un incremento plasmático de estas hormonas resulta en un aumento y acumulación de ellas en los tejidos gingivales que dan lugar a inflamación como lo menciona Herane en 2014 [2]. La gestación afecta principalmente mediante esta susceptibilidad de los tejidos, que es un factor para que se agrave la enfermedad.

Por otro lado *F. Nucleatum* es un potente inductor de la producción de MMP-13, y también aumenta la secreción epitelial de MMP-2. Esto representa una parte de la sobreexpresión de MMP-2 y MMP-13.

Observamos que hay un aumento en la expresión de MMP-13 en enfermedad periodontal activa, al igual que MMP-2 se encuentra expresada a niveles bajos en tejidos sanos, pero su expresión se ve favorecida por citocinas inflamatorias como *Mif* como es reportado por Sapna, 2014[44]. La sobreexpresión de MMP-2 Y MMP-13 se ve afectada por *Mif* y esta se ve a su vez afectada por la gestación.

10. Conclusión

En el presente estudio logramos establecer el modelo de periodontitis experimental de manera efectiva con una modificación de la técnica reportada por Abe, 2013 [43], modificando la sutura de nylon 6-0 por la de seda 5-0.

La presencia de la ligadura tuvo una influencia importante sobre el desarrollo y severidad de la periodontitis experimental. El análisis histológico mostró diferencias significativas en los grupos Periodontitis Experimental y Gestación.

Mif aumenta la profundidad en el nivel de inserción vestibular durante la PE y palatino durante la G y la PE; observamos que *Mif* favorece la desorganización de las fibras de colágeno en PE y PAG.

En general se reporta la sobreexpresión de MMP-2 Y MMP-13 en enfermedad periodontal. [42] *Mif* aumenta la expresión de MMP-2 y MMP-13 y esta se ve afectada por la gestación como se ha revisado la activación y sobreexpresión de MMP por patógenos periodontales como *F. Nucleatum* que puede inducir respuesta inflamatoria aumentando la expresión de citocinas inflamatorias tales como *Mif*, así como metaloproteinasas. [1]

11. Perspectivas

Como perspectivas del estudio, pueden medirse las concentraciones hormonales, para determinar su participación en este modelo. También se puede identificar si las MMP's expresadas están en su forma activa o zimógeno a través de zimogramas. También se pueden cuantificar las concentraciones de *Mif* localmente, a través de rt-PCR, para determinar sí hay variaciones en la expresión en este modelo.

Este trabajo es un acercamiento para reconocer el papel regulador de MIF, sobre el proceso inflamatorio y la expresión de las MMP-2 y MMP-13 en la degradación de los tejidos durante la periodontitis en un modelo murino gestante.

12. Anexo

12.1 Tren de Deshidratación

| REACTIVO | TIEMPO |
|-------------------------------------|--------|
| Alcohol 60% (Macron Fine Chemicals) | 40 min |
| Alcohol 70% (Macron Fine Chemicals) | 40 min |
| Alcohol 80% (Macron Fine Chemicals) | 40 min |
| Alcohol 90% (Macron Fine Chemicals) | 40 min |
| Alcohol 96% (Macron Fine Chemicals) | 40 min |
| Alcohol amílico | 20 min |
| Aceite de cedro | 2 días |

12.2 Tren de Inclusión

| REACTIVO | TIEMPO |
|--|--------|
| Parafina- aceite | 12 hrs |
| Parafina refinada de histología I (Paramex) | 12 hrs |
| Parafina refinada de histología II (Paramex) | 12 hrs |
| Parafina de inclusión Paraplast (Leica) | |

12.3 Preparación de portaobjetos

Colocar los portaobjetos nuevos en solución de Poly L-lisina, en refrigeración 4°C durante 24 hrs, secar tapados durante 24 hrs, guardar.

Poly L-lisina 10 ml

Agua Mq 90 ml

12.4 Preparación de Ruyter

Se utiliza para ayudar a estirar las muestras en cama de estiramiento

Adicionar albúmina al agua destilada, en agitación

Disolver el benzoato (gota a gota) en la acetona (en agitación)

Mezclar ambas soluciones gota a gota y después filtrar

Acetona 20 ml

Benzoato de metilo 20 gotas

Albúmina glicerinada 20 gotas

Agua destilada 80 ml

12.5 Paraformaldehído al 4 %

Paraformaldehído 4 gm

PBS o H₂O 80 ml

Calentar a 60°C con agitación, al alcanzar la temperatura, adicionar unas gotas de NaOH al 1N acuoso hasta que se disuelva el paraformaldehído y dejar enfriar.

Ajustar el pH con HCL 1N o NaOH según el caso, hasta alcanzar un pH de 7.4. Aforar a 100 ml

Guardar a 4°C y no usar después de 15 días de su elaboración.

12.6 EDTA al 7% ,1000 mL.

800 mL H₂O Destilada

70 gr de EDTA

Mezclar y poner en agitación, adicionar NaOH 1N hasta que se disuelva el EDTA (calentar ligeramente).

Ajustar pH a 7.4 con HCL 1N, aforar a 1000 mL.

Se almacena en un recipiente.

12.7 Tinción H&E

| REACTIVO | TIEMPO |
|---|--|
| Xilol I (J.T. Baker) | 5 min. |
| Xilol II (J.T. Baker) | 5 min. |
| Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals) | 5 min. |
| Alcohol etílico 96% (Macron Fine Chemicals) | 5 min. |
| Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals) | 5 min. |
| Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals) | 5 min. |
| Agua destilada | 5 min. |
| Hematoxilina de Harris (Hycel Reactivos Químicos) | 5 min. |
| Agua corriente | 10 seg. |
| Alcohol etílico al 70% (Macron Fine Chemicals) con 1% de HCl (J.T. Baker) | 10 seg. (preferentemente chorreo con pipeta Pasteur) |
| Agua destilada | Enjuagar |
| Agua amoniacal (H ₂ O + 1% hidróxido de amonio) (J.T. Baker) | 30 seg. |
| Agua destilada | Enjuagar |
| Eosina | 2 min. |
| Agua destilada | Enjuagar |
| Alcohol etílico 96% (Macron Fine Chemicals) | Lavar por chorreo con pipeta Pasteur |
| Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals) | 30 seg. |
| Xilol (J.T. Baker) | 5 min. |
| Montar con resina entellán (Merck KGaA) | |

12.8 Técnica Tricrómica de Masson

| REACTIVO | TIEMPO |
|---|----------------------------------|
| Xilol I (J.T. Baker) | 5 min. |
| Xilol II (J.T. Baker) | 5 min. |
| Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals) | 5 min. |
| Alcohol etílico 96% (Macron Fine Chemicals) | 5 min. |
| Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals) | 5 min. |
| Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals) | 5 min. |
| Agua destilada | 5 min. |
| Bouin | 48 hrs. a temperatura ambiente |
| Agua corriente (x2) | 2.5 min. (enjuagar en agitación) |
| Hematoxilina de Weigert | 8 min. |
| Agua destilada | 5 min. |
| Rojo escarlata (Sigma-Aldrich) | 8 min. |
| Agua destilada | 5 min. |
| Ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico (Sigma-Aldrich) | 8 min. |
| Azul anilina (Sigma-Aldrich) | 8 min. |
| Ácido acético (J.T. Baker) | 3 min. (cambiar cada uso) |
| Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals) | 30 seg. |
| Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals) | 30 seg. |
| Alcohol etílico 96% (Macron Fine Chemicals) | 30 seg. |
| Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals) | 15 seg. |
| Xilol (J.T. Baker) | 5 min. |
| Montar con resina entellan (Merck KGaA) | |

12.9 Técnica de Inmunofluorescencia

| REACTIVO | TIEMPO |
|---|---------------|
| Xilol I (J.T. Baker) | 5 min |
| Xilol II (J.T. Baker) | 5 min |
| Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals) | 1 min |
| Alcohol etílico 90% (Macron Fine Chemicals) | 1 min |
| Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals) | 1 min |
| Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals) | 1 min |
| Agua destilada | 3 min |
| PBS 1X (3 veces) | 1 min |
| PBS-Tritón X-100 (0.5%) | 5 min |
| PBS 1X (2 veces) | 1 min |
| Albúmina sérica bovina 1X en PBS | 2 hrs |
| Lavar con PBS-Tritón X-100 (0.5%) (3 veces) | 1 min |
| PBS 1X (2 veces) | 1 min |
| Incubar con 1er anticuerpo | 2 hrs |
| PBS 1X (2 veces) | 1 min |
| Incubar con 2º anticuerpo fluoresceinado | 2 hrs |
| PBS 1X (2 veces) | 1 min |
| Alcohol etílico 70% (Macron Fine Chemicals) | 1 min |
| Alcohol etílico 80% (Macron Fine Chemicals) | 1 min |
| Alcohol etílico 90% (Macron Fine Chemicals) (2 veces) | 1 min |
| Alcohol etílico absoluto (Macron Fine Chemicals) | 1 min |
| Xilol I (J.T. Baker) | 3 min |
| Xilol II (J.T. Baker) | 5 min |
| Montar con resina entellan (Merck KGaA) | |

Bibliografía

1. Bascones-Martinez, A. and E. Figuero-Ruiz, *Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas*. . Avances en Periodoncia e Implantología Oral, 2005. **17**((3)): p. 111-118.
2. Herane, B.M.D.L.Á., C.C. Godoy, and C.P. Herane, *Enfermedad periodontal y embarazo. Revisión de la literatura*. Revista Médica Clínica Las Condes, 2014. **25**(6): p. 936-943.
3. Bucala, R., *MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response*. FASEB J, 1996. **10**(14): p. 1607-13.
4. Llanes Llanes, E., et al., *Guías prácticas clínicas de enfermedades gingivales y periodontales*. Sosa Rosales MC. Guías prácticas de estomatología (monografía en línea). La Habana: Ciencias Médicas, 2003.
5. Botero, J. and E. Bedoya, *Determinantes del Diagnóstico Periodontal*. Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral, 2010. **3**(2): p. 94-99.
6. Webb, D.A., L. Mathew, and J.F. Culhane, *Lessons learned from the Philadelphia Collaborative Preterm Prevention Project: the prevalence of risk factors and program participation rates among women in the intervention group*. BMC Pregnancy Childbirth, 2014. **14**: p. 368.
7. Page, R.C., *The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease*. Journal of periodontal research, 1991. **26**(3): p. 230-242.
8. Hernández, M., et al., *The role of immuno-inflammatory response in the pathogenesis of chronic periodontitis and development of chair-side point of care diagnostics*, in *Pathogenesis and Treatment of Periodontitis*. 2012, InTech.
9. Hirschfeld, J., et al., *Assessment of the involvement of the macrophage migration inhibitory factor–glucocorticoid regulatory dyad in the expression of matrix metalloproteinase-2 during periodontitis*. European Journal of Oral Sciences, 2017. **125**(5): p. 345-354.
10. Van Lint, P., et al., *Resistance of collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice to TNF-induced lethal hepatitis*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(11): p. 7642-7649.
11. Madeira, M.F.M., et al., *MIF induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice*. Microbes and infection, 2012. **14**(2): p. 198-206.
12. Kasama, T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor: a multifunctional cytokine in rheumatic diseases*. Arthritis, 2011. **2010**.
13. Achong, R., et al., *Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat*. Journal of periodontology, 2003. **74**(4): p. 494-500.
14. Ramos Márquez, J., *Biomecánica de los tejidos periodontales*. 2013.
15. Newman, M., et al., *Carranza Periodontología clínica*. Mc Graw Hill, 2010.
16. López, J., *Periodonto normal*. Revista Universidad de San Carlos Guatemala, 2012: p. 23-42.
17. Ainamo, J. and A. Talari, *The increase with age of the width of attached gingiva*. Journal of periodontal research, 1976. **11**(4): p. 182-188.
18. Ainamo, J. and H. Löe, *Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva*. Journal of periodontology, 1966. **37**(1): p. 5-13.
19. Weinberg, M.A. and R.N. Eskow, *Periodontal terminology revisited*. Journal of periodontology, 2003. **74**(4): p. 563-565.
20. Gottlieb, B., *Active and passive continuous eruption of teeth*. J. Dent. Res., 1933. **13**: p. 214.
21. Caton, J., G. Greenstein, and A. Polson, *Depth of periodontal probe penetration related to clinical and histologic signs of gingival inflammation*. Journal of periodontology, 1981. **52**(10): p. 626-629.
22. Gargiulo, A.W., F.M. Wentz, and B. Orban, *Dimensions and relations of the dentogingival junction in humans*. Journal of periodontology, 1961. **32**(3): p. 261-267.
23. Toto, P.D. and A.W. Gargiulo, *Epithelial and connective tissue changes in periodontitis*. Journal of periodontology, 1970. **41**(10): p. 587-590.
24. Listgarten, M., *Periodontal probing: what does it mean?* Journal of clinical periodontology, 1980. **7**(3): p. 165-176.
25. Cohen, B., *Morphological factors in the pathogenesis of periodontal disease*. Br Dent J, 1959. **107**(7): p. 31-39.
26. Romanos, G. and J. Bernimoulin, *Collagen as a basic element of the periodontium: immunohistochemical aspects in the human and animal. 1. Gingiva and alveolar bone*. Parodontologie (Berlin, Germany), 1990. **1**(4): p. 363-375.
27. Kronfeld, R., *Histopathology of the Teeth: And Their Surrounding Structures*. 1955: Lea & Febiger.

28. Lindhe, J., T. Karring, and N.P. Lang, *Periodontologia clinica e implantologia odontologica/Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Vol. 1. 2009: Ed. Médica Panamericana.
29. Wolf, H.F. and T.M. Hassell, *Atlas a color de periodontología*. 2009: AMOLCA.
30. Delgado Pichel, A., P. Inarejos Montesinos, and M. Herrero Climent, *Espacio biológico: Parte I: La inserción diente-encía*. Avances en Periodoncia e Implantología Oral, 2001. **13**(2): p. 101-108.
31. Laine, M.A., *Effect of pregnancy on periodontal and dental health*. Acta Odontologica Scandinavica, 2002. **60**(5): p. 257-264.
32. O'Neil, T.C., *Plasma female sex-hormone levels and gingivitis in pregnancy*. J Periodontol, 1979. **50**(6): p. 279-82.
33. de Cabo, J.G., I.R. Barbosa, and J.B. Carrión, *Enfermedad periodontal y embarazo*. Periodoncia: Sociedad Española de Periodoncia, 1999. **9**(1): p. 31-40.
34. Heasman, P., J. Collins, and S. Offenbacher, *Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 β , leukotriene B $_4$, prostaglandin E $_2$, thromboxane B $_2$ and tumour necrosis factor α in experimental gingivitis in humans*. Journal of periodontal research, 1993. **28**(4): p. 241-247.
35. Matthiesen, L., et al., *Lymphocyte subsets and mitogen stimulation of blood lymphocytes in normal pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 1996. **35**(2): p. 70-9.
36. Brazao, V., et al., *Endocrine and immune system interactions during pregnancy*. Immunobiology, 2015. **220**(1): p. 42-7.
37. Yamazaki, K., et al., *IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue*. J Oral Pathol Med, 1994. **23**(8): p. 347-53.
38. Nagasawa, T., et al., *LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin*. Clinical & Experimental Immunology, 2002. **130**(2): p. 338-344.
39. Hernández, P., et al., *Análisis de MMPs en fluidos orales en el diagnóstico complementario de las enfermedades periodontales*. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral, 2012. **5**(3): p. 150-153.
40. Pereira Prado, V., et al., *Metaloproteinasas de la matriz extracelular (mmps) en Odontología*. Odontoestomatología, 2016. **18**(28): p. 20-29.
41. Mora Solera, J.R., et al., *Papel de las Metaloproteinasas de la Matriz en la Degradación del Tejido Pulpar: Una revisión literaria*. Revista Científica Odontológica, 2005. **1**(1).
42. Liang, Y., et al., *E2 regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes*. Arthritis research & therapy, 2016. **18**(1): p. 1.
43. Sorsa, T., et al., *Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines*. Pharmacological research, 2011. **63**(2): p. 108-113.
44. Sapna, G., S. Gokul, and K. Bagri-Manjrekar, *Matrix metalloproteinases and periodontal diseases*. Oral Dis, 2014. **20**(6): p. 538-50.
45. Abe, T. and G. Hajishengallis, *Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice*. J Immunol Methods, 2013. **394**(1-2): p. 49-54.
46. Semenov, T.A., et al., *Histometric analysis of ligature-induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes*. J Appl Oral Sci, 2008. **16**(4): p. 251-6.
47. Salazar, L. and F. Moreno, *Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar*. Salutem Scientia Spiritus, 2017. **2**(2).
48. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *Roitt Inmunología fundamentos*. 2008: Editorial Médica Panamericana.
49. Rivas-Ruiz, R., J. Moreno-Palacios, and J.O. Talavera, *Investigación clínica XVI. Diferencias de medianas con la U de Mann-Whitney*. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 2013. **51**(4): p. 414-419.