



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Evaluación de la expresión de Lipocalina 2 en tejidos periodontales de ratones C57BL6 con diabetes tipo 2 y periodontitis”

TESIS

Que para obtener el título de Cirujano Dentista
presenta: Aburto Rueda Samantha Elizabeth

TUTORA

Dra. Ana Lilia García Hernández

SINODALES

Dr. Isaac Obed Pérez Martínez

Dr. Saúl Ernesto Cifuentes Mendiola

M. en C. Claudia Daniela Montes Ángeles

Dr. Carlos Andrés Gallardo Leyva

Cuautitlán Izcalli, Agosto de 2023

IZTACALA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco a mi mamá por todas las enseñanzas que me ha dado, por darme el valor para adentrarme en la investigación; por ser ella simplemente. Por el cariño y por todo lo que me ha dado. Gracias por apoyarme en todo lo que hago.

Agradezco a mi papá por tantos años de esfuerzo para llegar a donde estamos hoy, por todo el amor que me diste durante tantos años. Sin ti no sería lo que soy hoy.

Agradezco a mis gatos, Karla e Iori por estar conmigo en todas y cada una de las noches que me costó leer y redactar este trabajo: ya sea despiertos o dormidos, siempre me hicieron saber que no estaba sola.

Agradezco a la UNAM por todas las oportunidades que me ha brindado, por toda la enseñanza que me dio, por todas las amistades, recuerdos y conocimiento que obtuve por medio de ella.

Agradezco a mis maestros en la FES Iztacala por tenerme paciencia y siempre buscar que fuera una mejor alumna.

Agradezco a toda la familia Rueda Cedillo, por siempre consentirme y ser para mí una gran motivación.

A mis abuelitos Lupe y Mago, los quiero mucho y estar con ustedes siempre me reconforta y me recuerda que debo ser mejor para llegar a ser como ustedes.

A mi tía Mary, tío Max, Emy y Annie: gracias por siempre tratarme como una más de su familia. Gracias a mis tíos Lucy y Manuel, Hugo, Nalle y Andrei, Wicho y Gaby. A mis primos Andy, Mina y Mateo. Valoro mucho el tiempo con ustedes.

Agradezco a la familia Aburto Hernández por aceptarme y valorarme justo como era. A mi abuelita, mi tía Gloria, mi tío Óscar: muchas gracias por darme la oportunidad de atenderlos y cuidar de su salud cuando apenas empezaba.

Agradezco mucho a los Doctores Adrián y Heriberto por el apoyo recibido durante más de 5 años en todo lo que respecta a la carrera. Por apoyarme aun cuando hay momentos en que no deberían.

Gracias a mis amigas del trabajo: Yut, Eri, Jenny, Wendy, Mary. Por tantos momentos juntas y por todo lo que aún nos falta por vivir.

Gracias a mis amigos del Servicio Social: Gerardo, Sherly, Xime, Jaz, Diana, Absiry, Elías y David por siempre ser ejemplos a seguir para mí. A Joyce por acompañarme en el proceso y convertirse en una de mis mejores amigas en tan poco tiempo, por darme el empujón que necesitaba para decidir sobre mi futuro.

Agradezco a mis sinodales Dany y Ernesto, porque no solo se preocuparon por apoyarme en el trabajo de investigación: porque también se tomaron el tiempo de resolver dudas personales y de divertirse junto a nosotros.

Al Laboratorio de Investigación Odontológica, porque llegué a él sin saber que me deparaba el destino y salí con muchos planes en mente.

A los Doctores Ana e Isaac, aprendí mucho de todas las oportunidades que me brindaron, y de ustedes como personas en general. Gracias por la paciencia y por todas las correcciones.

A todas las personas que se alegraban cuando me escuchaban hablar de cosas que tal vez no eran tan interesantes, o que tal vez ni entendían. Gracias por el apoyo, por emocionarse junto a mí.

Gracias especiales a todos los ratones C57BL6 que vi durante mi servicio social. Sin ellos absolutamente nada de esto sería posible, agradezco poder darle un sentido a sus vidas y haber compartido 22 semanas con ustedes. Porque todos los seres vivos son valiosos.

Por último, me agradezco a mí por haberme atrevido a hacer un trabajo de investigación, por no haberme rendido, por aguantar un día más. A Sam de 17 años, por haber afrontado todo lo que tenías por delante, por no haberte rendido.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) por el financiamiento para la realización de este trabajo con numero de proyecto: IN213122 y el financiamiento del proyecto FESI-PAPCA 2021-2022-27

Tabla de contenido

1.	Introducción.....	6
1.1.	Diabetes Mellitus.....	6
1.2.	Periodontitis.....	8
1.3.	Lipocalina 2.....	10
2.	Antecedentes.....	10
3.	Justificación.....	11
4.	Hipótesis.....	12
5.	Objetivos.....	12
5.1.	Objetivo general.....	12
5.2.	Objetivos específicos.....	12
6.	Metodología de Investigación.....	12
6.1.	Modelo experimental.....	12
6.2.	Inducción de DM2.....	13
6.3.	Monitoreo del desarrollo de DM2.....	13
6.4.	Inducción de periodontitis.....	13
6.5.	Obtención de Muestras.....	13
6.6.	Medición de la pérdida ósea alveolar.....	13
6.7.	Tinción de rutina H y E e Inmunohistoquímica.....	14
6.8.	Análisis Estadístico.....	14
7.	Resultados.....	15
7.1.	La combinación de Diabetes y Periodontitis provoca una mayor pérdida ósea alveolar.....	15
7.2.	Los ratones con diabetes y periodontitis tienen un incremento en el peso, el índice de masacorporal y el tejido adiposo visceral.....	16
7.3.	Los ratones con diabetes y periodontitis presentan mayores concentraciones séricas de glucosa.....	17
7.4.	La expresión de LCN2 es mayor en los ratones con diabetes y periodontitis.....	18
8.	Discusión.....	20
9.	Conclusiones.....	21
10.	Bibliografía.....	22

1. Introducción

1.1. Diabetes Mellitus

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica que se produce cuando el páncreas no genera una hormona llamada insulina (que ayuda a regular la glucemia), o la insulina que genera no puede ser utilizada (Organización Mundial de la Salud, 2016). Asimismo, Asociación Americana de Diabetes (ADA), la define como un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia, que se da como resultado de defectos en la secreción de insulina, su acción, o ambos (Pérez-Díaz, 2016).

La insulina es una hormona que se produce dentro del páncreas, y su función es la de transportar la glucosa desde el torrente sanguíneo a el interior de las células, en donde es convertida en energía para ser utilizada o almacenada según sea el caso (Federation ID, 2021).

La clasificación de la diabetes mellitus según la OMS y que es la más utilizada actualmente es (Organización Mundial de la Salud, 2016):

1. Diabetes Tipo 1: antes conocida también como diabetes insulino dependiente o juvenil. Es causada por la destrucción de células beta pancreáticas, lo que genera un déficit absoluto de insulina. Debido a esto, los pacientes que la padecen necesitan dosis diarias de insulina para sobrevivir. Es de origen autoinmune y hasta el momento, no se conoce cómo prevenir esta enfermedad. Los síntomas principales incluyen poliuria (aumento en la cantidad de micciones diarias), polidipsia (aumento en el consumo de líquidos), polifagia (aumento en el consumo de alimento), adelgazamiento, cansancio y alteraciones en la vista.
2. Diabetes tipo 2: conocida como diabetes no insulino dependiente, o de inicio en la edad adulta. Es causada por la resistencia a la insulina, que va generando que de manera progresiva se secrete menor cantidad de insulina. Esto significa que, aunque se secrete insulina, no es utilizada de manera eficaz. Es el tipo que más frecuente de diabetes. Es posible que los síntomas que se presenten sean los mismos que en el tipo 1, pero menos intensos. Como consecuencia, en muchos casos la enfermedad no se detecta hasta varios años después de su aparición.
3. Diabetes gestacional: se trata de una afección que se produce durante el embarazo. Provoca que tanto la mujer gestante como el producto tengan complicaciones tanto en el embarazo como en el parto.

Hay diferentes causas para esta afección de acuerdo con su tipo: el tipo 1 es hereditario, mientras que el tipo 2 se desarrolla por la suma de diversos factores, como pueden ser el sedentarismo, el sobrepeso, la mala alimentación, el tabaquismo, entre otros (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Dentro de su atlas, la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) también explica que tener un nivel elevado de glucosa en la sangre es un indicador de diabetes, y si no se tiene un control sobre esta, los pacientes desarrollan complicaciones severas, tales como enfermedades cardiovasculares, neuropatía, daño renal, amputación de extremidades inferiores e incluso la pérdida parcial o total de la vista. Todas estas afecciones tienen repercusiones en la calidad de vida de los pacientes, poniéndola incluso en riesgo (Federation ID, 2021).

En la actualidad, la Diabetes Mellitus es uno de los retos más grandes a los que se enfrenta la salud pública debido a la incidencia con la que se presenta: se trata de una enfermedad que, de acuerdo con la OMS, afecta del 10 al 15% de la población adulta en América Latina. De acuerdo con la misma institución, el número de personas que padecen diabetes en el mundo se ha cuadruplicado desde 1908 hasta nuestros días. Ese aumento se relaciona también con el aumento en el número de casos de sobrepeso y obesidad (Organización Mundial de la Salud, 2016).

La IDF menciona que hasta el año 2021 se habían reportado alrededor de 510.15 millones de adultos entre las edades de 20 y 79 años que contaban con el diagnóstico de Diabetes tipo 2, y el 9.9% de las muertes en el mundo son causadas por esta afección (Federation ID, 2021).

De entre todas las complicaciones que se presentan, la periodontitis se reconoce como una de las más frecuentes entre los pacientes que tienen esta enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2016).

1.2. Periodontitis

Se trata de una enfermedad infecciosa-inflamatoria que afecta a los tejidos de soporte del diente. Suele originarse cuando un paciente padece gingivitis y no recibe tratamiento oportuno, y termina por provocar la destrucción de la inserción del diente en el hueso alveolar de manera progresiva. Es una afección degenerativa, irreversible y de progreso lento (Bonett, 2014).

La periodontitis es provocada por un cambio en el equilibrio de la microbiota oral, lo que provoca que diversos microorganismos colonicen el área supra y subgingival. El padecimiento se caracteriza por la pérdida de la estructura ósea que rodea al diente, además de presentar signos y síntomas variados, como edema, aumento o recesión de la encía, cálculo subgingival, mayor movilidad en los dientes e incluso la pérdida dental (Escudero-Castaño, 2008).

Las manifestaciones clínicas de periodontitis son: sangrado gingival, formación de bolsas periodontales y pérdida ósea radiográfica. En etapas más avanzadas, provoca la pérdida parcial o total de los órganos dentarios, lo que conlleva al edentulismo, afectando así a la función masticatoria, nutrición, estética y habla. Esto hace que la calidad de vida del paciente disminuya, y puede llegar a agravar otras condiciones subyacentes (Nazir, y otros, 2020).

La nueva clasificación de las enfermedades periodontales también incluye enfermedades sistémicas y condiciones que afectan al tejido periodontal (Vargas, 2018):

1. Salud periodontal: se trata de la ausencia de enfermedad periodontal inflamatoria. Puede presentarse en 2 situaciones: cuando el paciente ya ha tratado su periodontitis y a pesar de haber periodonto reducido, este no avanza ni es sintomático, o en el paciente que no padece esta enfermedad.
2. Gingivitis inducida por biopelícula dental: se trata de una lesión inflamatoria que resulta de la interacción entre la biopelícula presente en los dientes y la respuesta de inflamación del huésped que suele abarcar sólo la encía. La extensión de esta se determina por la cantidad de zonas que presentan inflamación, y puede ser localizada (10 a 30% de la superficie gingival) o generalizada (más del 30% de la superficie afectada). La severidad se mide de acuerdo con el nivel de inflamación y sangrado que se presente con el sondeo.

3. Enfermedades gingivales no inducidas por biopelícula: se trata de manifestaciones de enfermedades sistémicas o cambios patológicos en los tejidos gingivales. Incluyen trastornos genéticos, infecciones específicas, lesiones inflamatorias, neoplasias, enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas, lesiones traumáticas o hasta pigmentaciones del tejido gingival.
4. Enfermedades Periodontales necrosantes: se trata de condiciones que se caracterizan por presentar necrosis en el tejido gingival, dolor y sangrado. Abarca a la gingivitis necrosante, periodontitis necrosante y estomatitis necrosante.
5. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas: se da cuando una enfermedad influye en la aparición o desarrollo de la periodontitis, y puede incluir a enfermedades sistémicas como la DM2, que favorece la presencia de la periodontitis.
6. La periodontitis: se trata de la pérdida de inserción de los dientes en el hueso alveolar. Se categoriza por estadios (basados en la severidad, complejidad, extensión y distribución, y por grados, que indican la velocidad con la que avanza la enfermedad (lenta, moderada y rápida

De acuerdo con Preshaw, en los últimos años ha habido un gran énfasis en la relación bidireccional entre la DM2 y la periodontitis. Cuando se presenta la periodontitis, hay un efecto negativo en el control de la glucemia de los pacientes. La evidencia de esta hipótesis vino de una investigación realizada en la India, en la que los individuos con periodontitis severa tenían mayor dificultad para controlar la glucemia durante un seguimiento de 2 años, lo que sugiere que es un factor de riesgo para el control de la DM2 (Preshaw, Alba, & Herrera, 2012).

El desbalance de la microbiota oral provoca que se desencadene una respuesta inflamatoria exacerbada, en donde se sobre activan las células del sistema inmune que producen citosinas pro inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α E IL-17, prostanoïdes y metaloproteasas de la matriz (MMP's), que contribuyen a la destrucción progresiva e irreversible de las fibras colágenas del ligamento periodontal, y por lo tanto, a la resorción del hueso alveolar (Preshaw, Alba, & Herrera, 2012).

1.3. Lipocalina 2

La Lipocalina 2 es una glicoproteína que está constituida por 198 aminoácidos. También es conocida como Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos, y pertenece a la superfamilia de lipocalinas, un grupo de proteínas que transportan a moléculas pequeñas e hidrofóbicas, como esteroides, ácidos grasos, retinoides, prostaglandinas y hormonas (Al Jaber, 2021).

La Lipocalina 2 fue aislada inicialmente de los gránulos de neutrófilos liberados en los sitios de infección e inflamación en humanos y en células de riñón de ratón. Tiene propiedades bacteriostáticas que le dan un papel de protección en la infección, lesión, inflamación y otros tipos de estrés celular. Además, en neutrófilos humanos tiene la capacidad de interactuar y estabilizar a la MMP-9 (conocida por su capacidad de descomponer membranas basales y a la matriz extracelular) (Al Jaber, 2021).

También tiene efectos proinflamatorios ya que es capaz de dirigir la infiltración de células inmunes, influye en la polarización de macrófagos M1, promueve la formación de células espumosas, la expresión del inflamosoma NLRP3 y se considera una proteína secuestradora de hierro en la respuesta inmune innata antibacterial (Capulli, Ponzetti, & Maurizi, 2018).

Se ha observado una correlación positiva entre las concentraciones de LCN2 y la circunferencia abdominal, el porcentaje de grasa corporal, la presión sistólica, los niveles de glucosa en ayunas, las concentraciones séricas de insulina, triglicéridos y mediadores inflamatorios como la IL-1b, IL-6, IL-17 y TNF- α (Elkhidir, Eltaher, & Mohamed, 2017).

2. Antecedentes

A pesar de los hallazgos hasta ahora reportados sobre las funciones de la LCN2 en procesos inflamatorios, en el tejido óseo y su relación con la DM2; aún no se ha estudiado su expresión diferencial en tejidos periodontales bajo condiciones de periodontitis y diabetes tipo 2.

En este contexto, solo se ha observado que en pacientes con DM2 y periodontitis las concentraciones de LCN2 en líquido gingivocrevicular, suero y fluido lagrimal son mayores que en pacientes sanos (Hamdi, Entedhar, Hasan, & Nagam, 2020).

De forma similar, se han encontrado concentraciones elevadas de LCN2 en muestras de orina de pacientes con DM2 y estas tienen una fuerte correlación positiva con los parámetros clínicos de periodontitis, como la presencia de sangrado al sondear y el número de bolsas periodontales. Es importante resaltar que en estos estudios se ha reportado que las concentraciones de LCN2 son más altas durante la periodontitis severa (Nakajima, Hosojima, & Tabeta, 2019).

Debido a que los productos de glicación avanzadas (AGE's), son un componente importante en el desarrollo de las complicaciones de la DM2, se ha estudiado su influencia en la expresión de LCN2 durante la periodontitis. En un estudio *in vitro* se determinó que los AGE's en presencia de un estímulo *con P. gingivalis* inducen la expresión de LCN2 e IL-6 en células epiteliales gingivales de humano, a través de la señalización de MAPK y NFκB. De forma interesante, el uso de un anticuerpoinhibidor de los receptores de AGE's (RAGE's), disminuyó la expresión de LCN2 en estas células, por lo que se sugiere que esta molécula podría tener un papel sumamente importante en la relación bidireccional de la DM2 y la periodontitis (Kido, Hiroshima, & Kido, 2020).

Derivado de estos estudios, se ha propuesto a la LCN2 como un biomarcador que podría ser útil para el diagnóstico, monitoreo y tratamiento de la periodontitis asociada a enfermedades metabólicas, sin embargo, hasta el momento no se ha determinado su expresión en tejidos periodontales y si su expresión cambia en la periodontitis o en la diabetes tipo 2 y periodontitis.

3. Justificación

La LCN2 es una molécula que se encuentra incrementada tanto en la periodontitis en suero y la diabetes tipo 2 en huesos largos, y parece ser un factor que favorece el agravamiento de la hiperglucemia y la pérdida ósea alveolar, no obstante, se desconoce su expresión en tejidos periodontales.

En estudios realizados con anterioridad, se ha identificado que la LCN2 se expresa en diferentes tejidos en el cuerpo humano, entre ellos las células gingivales, el líquido gingivocrevicular, suero, fluido lagrimal, fémur, tejido adiposo y orina. De todos los tejidos mencionados, el que más expresión presenta es el fémur, más específicamente en sus osteoblastos. Sabiendo que el fémur es un tejido mineralizado, es probable que la Lipocalina 2 también se exprese en tejidos mineralizados de la cavidad oral, como el hueso alveolar y el cemento radicular.

Al saber si la LCN2 se expresa en tejido óseo de la cavidad oral, se abre la posibilidad para estudiar el papel de esta en los procesos de remodelado óseo fisiológico y en patologías donde se destruya el hueso como la periodontitis.

En este trabajo se busca analizar cómo se expresa esta glucoproteína en los tejidos periodontales de ratones con diabetes tipo 2 y periodontitis.

4. Hipótesis

La Lipocalina 2 (LCN2) se expresará en encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar de ratones con periodontitis y diabetes mellitus tipo 2

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar la expresión diferencial de la LCN2 en los tejidos periodontales de ratones C57BL/6 conperiodontitis y enfermedad periodontal.

5.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar el perfil glucémico
2. Evaluar la severidad de la periodontitis
3. Determinar la expresión diferencial de LCN2 en encía, ligamento periodontal y hueso alveolar

6. Metodología de Investigación

El estudio realizado es de tipo experimental, comparativo, transversal y prospectivo. Los experimentos y/o procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Investigación Odontológica, en la Sección de Inmunidad Oral y Regulación Ósea, ubicado en la Clínica Periférica Almaraz de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

6.1. Modelo experimental

Se usaron ratones macho de la cepa C57BL/6 de 4 semanas de edad, obtenidos del bioterio de la FESIztacala, UNAM. Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso libre de agua y alimento. Se dividieron en 4 grupos experimentales: dos controles (control y periodontitis), y dos diabéticos (DM2 Y DM2 con periodontitis), con una “n” de 3 ratones por grupo.

6.2. Inducción de DM2

Los ratones fueron alimentados con dieta hipercalórica desde las 4 semanas de edad hasta el momento en que fueron sacrificados. Además, se les inyectaron por vía intraperitoneal dosis bajas de estreptozotocina durante 7 días a partir de las 10 semanas de haber iniciado la dieta: el primer día se administraron 50 mg/kg, y del día 2 al 7 de la misma semana se redujo la dosis a 25 mg/kg. Se consideraron diabéticos cuando alcanzaron una concentración de glucosa en sangre mayor a 250 mg/dL y resistencia a la insulina (Cifuentes-Mendiola, Solís-Suarez, Martínez-Dávalos, Godínez-Victoria, & García-Hernández, 2022).

6.3. Monitoreo del desarrollo de DM2

Se monitoreó el peso corporal y la distancia naso-anal 3 veces por semana. Se obtuvo el índice de masa corporal (IMC). Se midió la glucosa sanguínea cada 15 días por medio de una pequeña incisión en la vena caudal con ayuda de un glucómetro (Accu-Chek). Se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa y a la insulina antes del sacrificio.

6.4. Inducción de periodontitis

A las 21 semanas de edad se indujo el desarrollo de periodontitis, a través de la colocación de una ligadura en el segundo molar superior, insertando una sutura a través de los espacios interproximales. Posteriormente se anudó la ligadura por la cara vestibular del mismo diente usando una sutura de seda 6-0 de la marca Atramat (Abe & Hajishengallis, 2013).

6.5. Obtención de Muestras

Se sacrificó a todos los ratones de los 4 grupos a las 22 semanas de edad por medio de sobredosis de pentobarbital. Posterior a esto, se recuperaron tanto la sangre periférica como los maxilares. Un hemimaxilar por ratón se utilizó para el análisis morfométrico de la pérdida ósea, mientras que el otro se utilizó para determinar la expresión de LCN2.

6.6. Medición de la pérdida ósea alveolar

La medición de la pérdida ósea se realizó conforme a lo establecido por Hasturk y sus colaboradores en 2006. Primero, se hirvieron los hemimaxilares para facilitar la remoción del tejido blando. Después, se blanquearon en cloro concentrado y se sumergieron en una solución de eosina al 0.5% y azul de metileno al 1%. Por último, se lavaron y cepillaron bajo el agua corriente para eliminar el exceso de colorante. Se midió la pérdida ósea alveolar, tomando como referencia inicial la unión cemento-esmalte y hasta la cresta ósea alveolar en la superficie

vestibular y palatina de los tres molares presentes con ayuda de un explorador endodóntico al cuál se le colocó un tope de silicón que será posicionado en los surcos y las cúspides. La distancia obtenida se midió con un calibrador Vernier de Truper® analógico de precisión 0.02mm, y se expresó en milímetros (Hasturk, 2006).

6.7. Tinción de rutina H y E e Inmunohistoquímica

Los hemimaxilares se colocaron en formaldehído al 4%. Después se lavaron con agua corriente y sedescalcificaron con EDTA sódico al 7%. Por último, se incluyeron en parafina (Paraplast Plus®, SIGMA-ALDRICH, P3683) y se realizaron cortes seriados de 5µ de grosor en el micrótopo. Las muestras obtenidas se tiñeron con H y E de acuerdo con lo reportado por Megías et al (Megías, 2023). Para determinar la expresión de LCN2 (NGAL, sc-515876, Santa Cruz Biotechnology) se llevó a cabo el protocolo de tinción de inmunohistoquímica, usando un anticuerpo monoclonal. La unión se reveló con el kit “New & Improved Super Sensitive™ Polymer-HRP IHC Detection System” (BioGenex). Las laminillas procesadas se observaron en un microscopio óptico (Axio Lab.A1, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) y se tomaron micrografías con las magnificaciones 20x de la zona del segundo molar maxilar (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA). Se realizó el análisis histológico con el fin de evaluar la positividad de la inmunohistoquímica con el programa ImageJ, cuantificando las células positivas y el porcentaje del tejido que representaron.

6.8. Análisis Estadístico

Los datos experimentales fueron analizados por medio del programa estadístico GraphPad Prism 8. Se les aplicó una prueba de ANOVA de dos vías, posteriormente también se aplicó una prueba de Tukey post hoc. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

7. Resultados

7.1. La combinación de Diabetes y Periodontitis provoca una mayor pérdida ósea alveolar

Se midió la altura ósea del hueso alveolar tanto de la superficie vestibular como de la palatina de todos los grupos de estudio, se tomó como referencia la altura ósea del grupo control (Figura 1). Observamos que los ratones diabéticos tienen reducción de la altura ósea. La colocación de la ligadura para producir periodontitis provocó una pérdida de hueso alveolar significativa en comparación con el control y el grupo diabético. La pérdida ósea alveolar fue mayor en el grupo que tenía diabetes y periodontitis

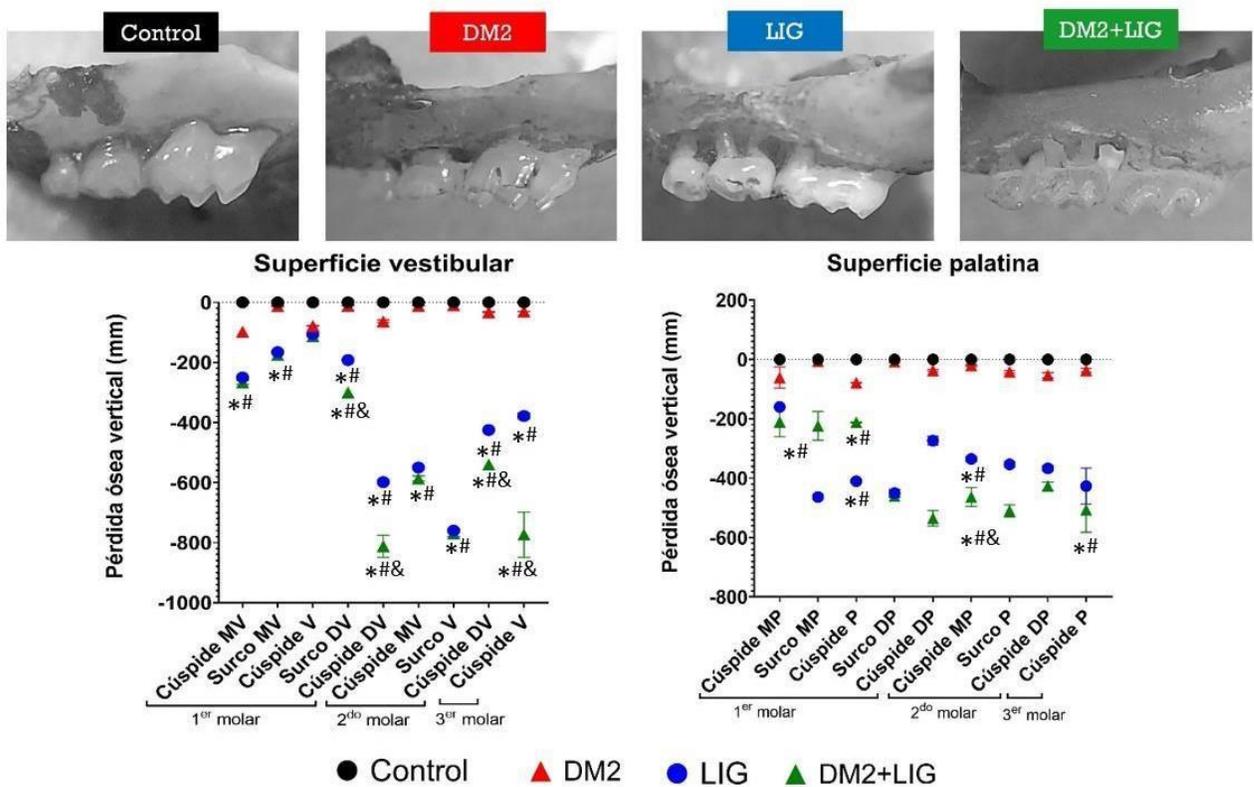


Figura 1. Altura del hueso alveolar de los grupos de estudio; n=3 por grupo; *p ≤ 0.05 vs control; #p ≤ 0.05 vs ligadura; &p ≤ 0.05 vs diabetes

7.2. Los ratones con diabetes y periodontitis tienen un incremento en el peso, el índice de masa corporal y el tejido adiposo visceral

Se obtuvo el peso corporal (Figura 2a). Desde la semana 4 que comenzaron a ser monitoreados, hasta el momento en que se comenzó a aplicar la estreptozotocina, los ratones del grupo control presentaron un aumento en el peso de manera normal, conforme crecían. A la semana 17, en los grupos diabéticos se observan cambios en el peso debido al desarrollo de la enfermedad en comparación con el grupo control y periodontitis. A la semana 18, una semana después de la inducción de periodontitis, los ratones diabéticos más periodontitis incrementaron su peso en comparación con el grupo de ratones diabéticos, control y periodontitis.

El índice de masa corporal aumentó de manera significativa en el grupo de diabetes a partir de la semana 16. El IMC se incrementó más en el grupo de diabetes más periodontitis a partir de la semana en la que se desarrolló la periodontitis (semana 17) en comparación con los grupos controles, periodontitis y DM2 (Figura 2b).

Se pesó el tejido adiposo subcutáneo y visceral de los ratones. Observamos que los ratones con periodontitis más diabetes tienen mayor cantidad de tejido adiposo visceral en comparación con el grupo control y periodontitis (Figura 2c).

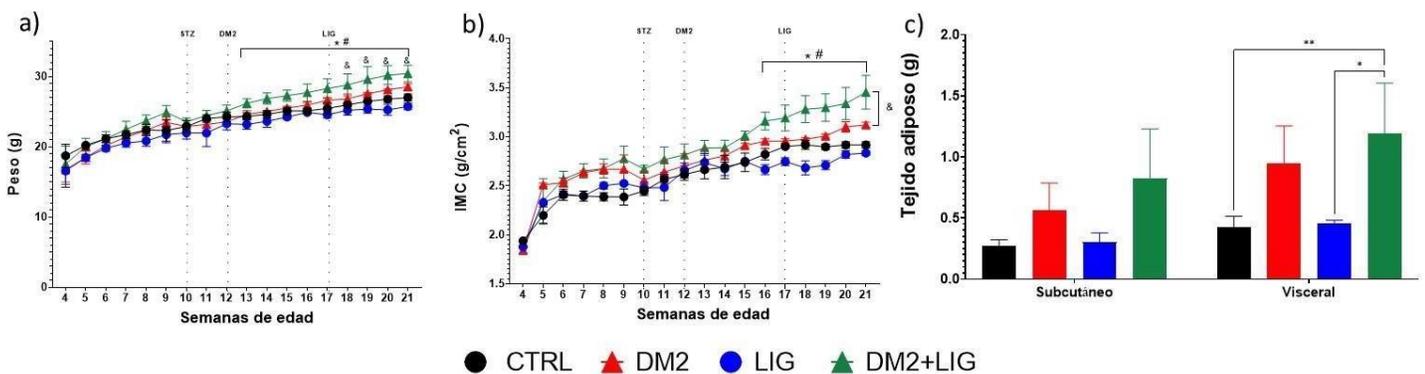


Figura 2. Mediciones somatométricas de los grupos de estudio a) peso corporal, b) índice de masa corporal, c) tejido adiposo corporal; n=3 por grupo; *p ≤ 0.05 vs control; #p ≤ 0.05 vs ligadura; &p ≤ 0.05 vs diabetes

7.3. Los ratones con diabetes y periodontitis presentan mayores concentraciones séricas de glucosa

A partir de la semana 12 los niveles de glucosa aumentan de manera abrupta en los grupos que padecían diabetes y diabetes con periodontitis. La semana posterior a la colocación de la ligadura para la inducción de periodontitis, el grupo de diabetes y periodontitis incrementó aún más los niveles de glucosa sérica en comparación con el grupo de diabetes (Figura 3a).

En la curva de tolerancia a la glucosa (Figura 3b) los grupos control y periodontitis tienen comportamientos similares entre sí, alcanzan su pico máximo a los 15 minutos, y conforme pasa el tiempo disminuyen los niveles de glucosa sérica, hasta los 90 minutos, en que los niveles de glucosa regresan a los niveles iniciales. Los ratones de los grupos diabetes y diabetes con periodontitis comienzan con niveles de glucosa altos, a los 15 minutos se incrementan los niveles de glucosa sérica y al pasar el tiempo los niveles de glucosa no disminuyen.

En las gráficas de tolerancia a la insulina (Figura 3c), observamos que los ratones de los grupos control y periodontitis tienen comportamientos similares entre sí: a los 15 minutos disminuyen sus niveles séricos de glucosa y se mantienen así hasta los 90 minutos de la prueba, mientras que en los grupos diabetes y diabetes con periodontitis se puede observar una menor sensibilidad a la insulina debido a la disminución de la tasa de reducción de la glucosa sérica post-inyección de insulina.

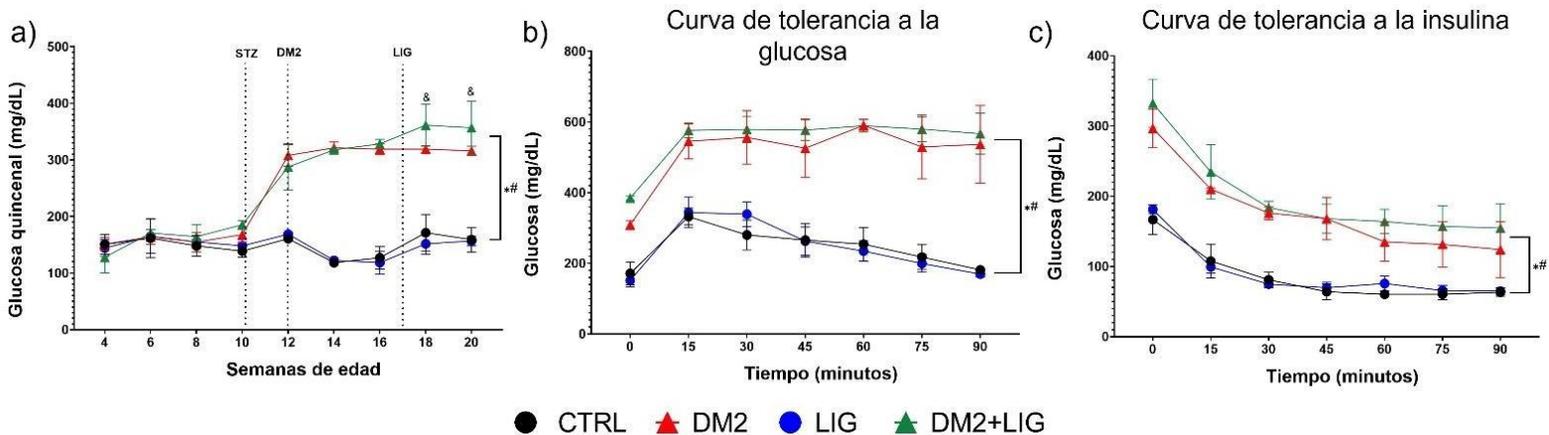


Figura 3. Perfil glucémico de los grupos de estudio a) glucosa quincenal, b) curva de tolerancia a la glucosa, c) curva de tolerancia a la insulina; n=3 por grupo; *p < 0.05 vs control; #p < 0.05 vs ligadura; &p < 0.05 vs diabetes

7.4. La expresión de LCN2 es mayor en los ratones con diabetes y periodontitis

El análisis histológico por H y E en el grupo control demostró un periodonto normal donde la encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular están definidos. En el grupo de diabetes se observaron cambios edematosos e infiltrado inflamatorio de leve a moderado. En el grupo de periodontitis se revelaron zonas de leve a moderado infiltrado inflamatorio junto con áreas de destrucción ósea. En el periodonto de los ratones con diabetes más periodontitis se observaron vasos sanguíneos congestionados, zonas de moderado a severo infiltrado inflamatorio junto con áreas de destrucción ósea y cambios edematosos.

Se evaluó la expresión de LCN2 en los 4 tejidos periodontales (Figura 4). En todos los grupos de estudio se observó la expresión de LCN2 en epitelio gingival y ligamento periodontal, aunque con diferente grado de expresión. En los grupos de ratones con diabetes, periodontitis y diabetes con periodontitis se encontró expresión de LCN2 en hueso alveolar y en el infiltrado inflamatorio (Figura 4b). La expresión de LCN2 se observó altamente expresada tanto en número de células como por porcentaje de expresión en epitelio gingival y en el infiltrado inflamatorio de los ratones con diabetes más periodontitis (Figura 4b).

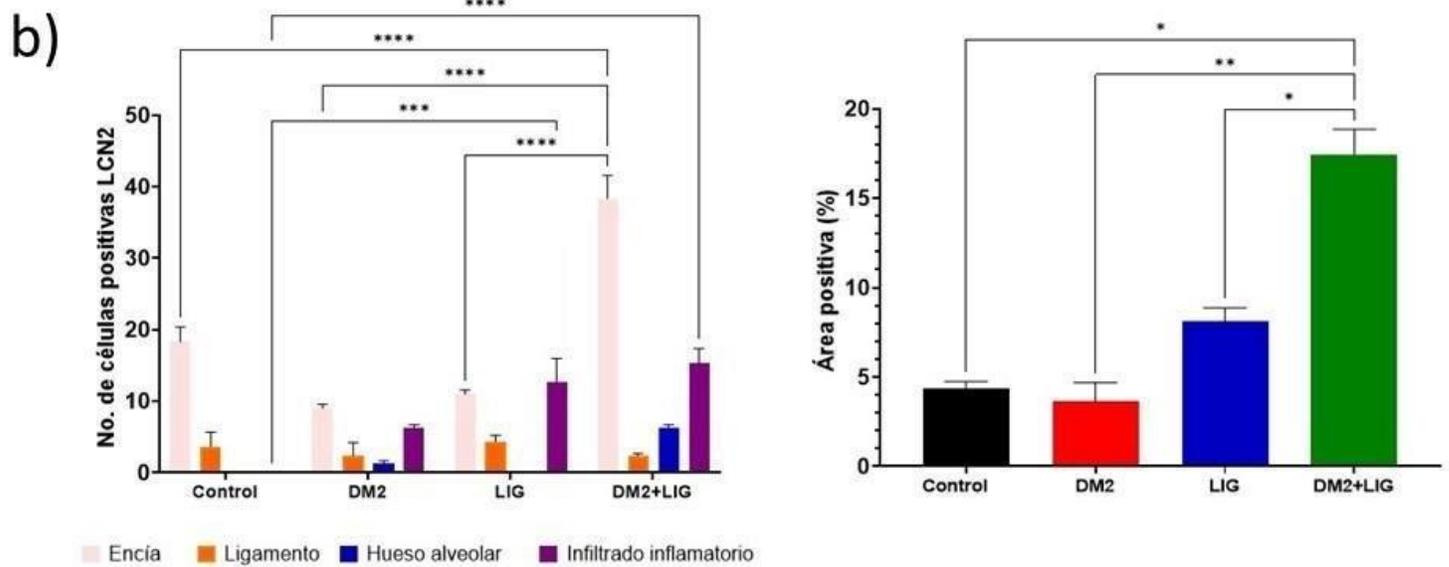
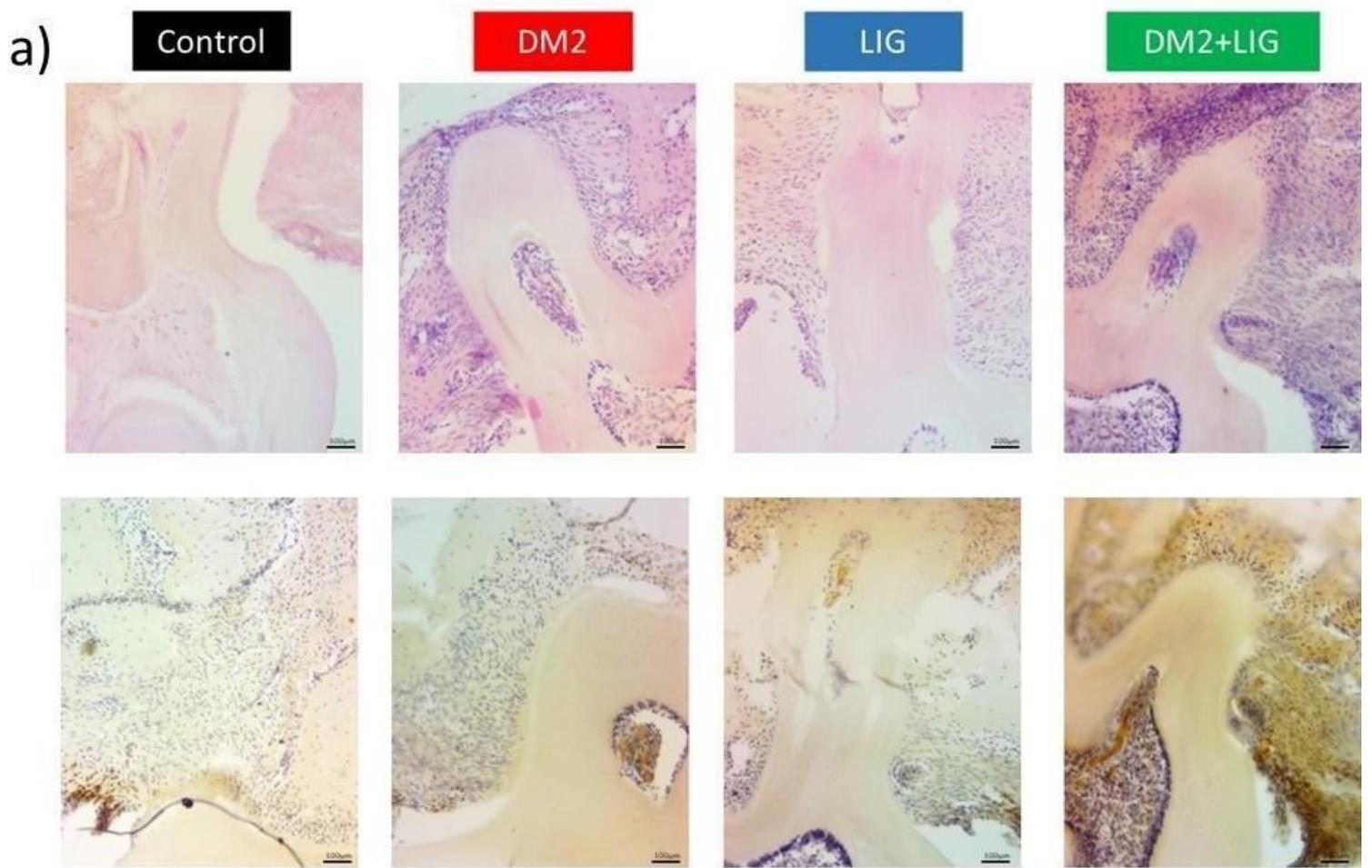


Figura 4. Expresión de LCN2 en tejidos periodontales de los grupos de estudio; a) microfotografías representativas de la tinción con HyE y la inmunohistoquímica de los grupos de estudio, b) graficas del número de células por tejido y el porcentaje del área positiva de los grupos de estudio; n=3 por grupo. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$.

8. Discusión

Si bien se ha reportado que la LCN2 se encuentra incrementada en suero de pacientes con diabetes y periodontitis (Hamdi, Entedhar, Hasan, & Nagam, 2020); en líquido gingivo-crevicular y fluido lagrimal de pacientes con obesidad y periodontitis (Pradeep, 2016), este es el primer reporte sobre la expresión diferencial de la LCN2 en tejidos periodontales en donde observamos que de forma basal la LCN2 se expresa en epitelio gingival y ligamento periodontal. En el periodonto de ratones con diabetes, la LCN2 se expresa además en hueso alveolar y la expresión de LCN2 se incrementa en todos los tejidos periodontales cuando están presentes ambas enfermedades, diabetes más periodontitis.

El incremento en la expresión de LCN2 se ha relacionado con la severidad de la periodontitis, lo que coincide con nuestros resultados en el sentido de que la periodontitis es más severa en los ratones con diabetes y la expresión de LCN2 es mayor en los tejidos periodontales de los ratones que tenían ambas enfermedades.

Un mecanismo propuesto sobre el incremento en la producción de LCN2 en la diabetes y periodontitis, es a través de la presencia de los AGE's como consecuencia de la hiperglicemia. Kido y sus colaboradores (2020) reportaron en un estudio de células epiteliales gingivales humanas cultivadas en presencia de AGE's y *P. gingivalis* un incremento en la producción de LCN2 e IL-6, de hecho, la inhibición de los receptores de AGE's (RAGE's) disminuyó la producción de LCN2 en estas células. (Kido, Hiroshima, & Kido, 2020)

De forma interesante, observamos que la LCN2 es altamente expresada en el infiltrado inflamatorio en el tejido conectivo del periodonto de los ratones con diabetes, con periodontitis y aún más en los ratones con diabetes más periodontitis. En este sentido, se ha reportado que el infiltrado inflamatorio prevalente en la periodontitis aguda es mayormente neutrófilos (Gursoy, 2008) de manera similar la diabetes provoca infiltrado inflamatorio en diferentes tejidos con alta prevalencia de neutrófilos (Herrero-Cervera, 2022), por lo que no es de extrañar que la LCN2 este altamente incrementada, ya que esta glucoproteína fue inicialmente identificada en neutrófilos (Al Jaber, 2021).

Nuestros resultados sugieren que la LCN2 este expresada en el hueso alveolar sólo en los ratones con diabetes con o sin periodontitis. En este sentido, se ha reportado que en la obesidad y la diabetes esta incrementada la producción de la LCN2 en osteoblastos de fémur, lo que provoca disminución del apetito en ratones (Mosialou, Shikhel, & al., 2017), se relaciona con el desarrollo de resistencia a la insulina (Capulli, Ponzetti, & Maurizi, 2018) y provoca una disminución en la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea, a la vez que estimula la producción de IL-6 y de RANKL para promover la resorción ósea (Capulli, Ponzetti, & Maurizi, 2018).

De acuerdo con los hallazgos de la inmunohistoquímica, podemos observar que hay una diferencia notable en la expresión de la LCN2 en los diferentes tejidos del periodonto que fueron analizados. Esto confirma la hipótesis planteada en el proyecto, que afirma que la LCN2 se expresa en los tejidos periodontales de ratones con periodontitis, diabetes y es mayormente expresada en el periodonto de los ratones con diabetes más periodontitis.

9. Conclusiones

Observamos por primera vez que los tejidos periodontales de ratón expresan de forma basal la LCN2 en encía y ligamento periodontal

La diabetes induce la expresión de LCN2 en hueso alveolar de ratón y debido a que induce infiltrado inflamatorio en el periodonto también incrementa su expresión en tejido conectivo.

La periodontitis incrementa la expresión de LCN2 en tejido conectivo, probablemente a consecuencia del incremento del infiltrado inflamatorio en el periodonto

La sumatoria de diabetes más periodontitis induce un incremento en la expresión de LCN2 en epitelio gingival y en el infiltrado inflamatorio.

10. Bibliografía

- Abe, T., & Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of immunological methods*, 49-54.
- Al Jaber, S. C. (2021). Lipocalin-2: Structure, function, distribution and role in metabolic disorder. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- American Academy of Periodontology. (2000). Parameter on chronic periodontitis with advanced loss of periodontal support. *Journal of Periodontology*, 856-858.
- Bonett, R. &. (2014). *Enfermedades Periodontales*. 23-27: Farmacia Profesional.
- Capulli, M., Ponzetti, M., & Maurizi, A. e. (2018). A complex role for Lipocalin 2 in Bone Metabolism: Global Ablation in Mice induces osteopenia caused by an altered Energy Metabolism. *Journal of Bone and mineral research*, 1141-1153.
- Chen, M., Zhong, Y., Dong, Q., Wong, H., & Wen, Y. (2021). Global, regional and national burden of severe periodontitis, 1999-2019: An analysis of the global burden of disease. *Journal of clinical Periodontology*, 28
- Cifuentes-Mendiola, S. E., Solís-Suarez, D. L., Martínez-Dávalos, A., Godínez-Victoria, M., & García-Hernández, A. (2022). CD4(+) T-cell activation of bone marrow causes bone fragility and insulin resistance in type 2 diabetes. *Bone*, 155.
- Costa, D., Lazzarini, E., & Canciani, B. E. (2013). Altered Bone development and turnover in transgenic mice over-expressing lipocalin-2 in bone. *Journal of Cellular Physiology*, 22102221.
- Dahl, S., JS, W., & al., L. C. (2018). Lipocaline 2 functions as inhibitor of innate resistance to mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Elkhdid, A., Eltaher, H., & Mohamed, A. (2017). Association of lipocalin-2 level, glycemic status and obesity in type 2 diabetes mellitus. *BMC Research notes*, 285.
- Escudero-Castaño, N., Perea-García, M., & Bascones-Martínez, A. (2008). Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Avances en Periodoncia e Implantología oral*, 27-37.
- International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas, 10th edn*. Brussels, Belgium: IDF. Recuperado de <https://www.diabetesatlas.org>
- Guo, H., Jin, D., & Zhang, Y. e. (2010). Lipocalin-2 deficiency impairs Thermogenesis and potentiates diet- induced insuline resistance in mice. *Diabetes*.
- Gursoy, U. M. (2008). Relationship between neutrophil functions and severity of periodontitis in obese and/or type 2 diabetic chronic periodontitis patients. *Quintessence Int*, 485-489.
- Guzmán-Lechuga, A. V.-B. (2020). El servicio social como recurso didáctico para intervenir la realidad social. *Zincografía*, 44-61.
- Hamdi, A., Entedhar, Hasan, & Nagam. (2020). Evaluation of lipocalin-2 and Visfatin, and Vitamin (D, C and E) in serum of diabetic patients with chronic periodontitis. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 1-10.
- Hasturk, H. e. (2006). RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB Journal*, 401-418.
- Herrero-Cervera, A. S. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol*, 177191.

- Kharroubi, A., & Darwish, H. (2015). Diabetes Mellitus: la epidemia del siglo. *World Journal of Diabetes*, 850-867.
- Kido, R., Hiroshima, Y., & Kido, J. e. (2020). Advanced glycation end products increase lipocalin 2 expression in human oral epithelial cells. *Journal of Periodontal Research*, 539-550.
- Lamster, I., & Pagan, M. (2017). Periodontal disease and the metabolic syndrome. *International Dental Journal*, 67-77.
- Li, D., Yan Sun, W., Fu, B., Xu, A., & Wang, Y. (2020). Lipocalin-2: The myth of its expression and function. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 142-151.
- Lin, X., Onda, D.-A., & Yang C-H, L. J. (2020). Roles of bone derived hormones in type 2 diabetes and cardiovascular pathophysiology. *Molecular Metabolism*.
- Megías, M. M. (20 de Mayo de 2023). *Atlas de histología vegetal y animal*. Obtenido de <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- Mosialou, I., Shikhel, S., & al., L. J. (2017). MC4R-dependent suppression of appetite by bone- derived lipocalin 2. *Natur*, 385-390.
- Nakajima, M., Hosojima, M., & Tabeta, K. e. (2019). β 2-Microglobulin and Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin, Potential Novel Urine Biomarkers in Periodontitis: A Cross-Sectional Study in Japanese. *International Journal of Dentistry*.
- Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. *Scientific World Journal*.
- Oficina del Abogado General. (2001). *Compendio de Legislación Universitaria*. Ciudad de México: Dirección General de Estudios de Legislación Universitaria.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Informe Mundial sobre la Diabetes*. Geneva, Suecia: WHO Document Production Services.
- Pérez-Díaz, I. (2016). Diabetes Mellitus. *Gaceta Médica Mexicana*, 50-55.
- Pradeep, A. N. (2016). Levels of Lipocalin-2 in crevicular fluid and tear fluid in chronic periodontitis and obesity subjects. *Journal of Investigative and clinical dentistry*, 376-382.
- Preshaw, P., Alba, A., & Herrera, D. e. (2012). Periodontitis and diabetes: a two way relationship. *Diabetología*, 21-31.
- Ramírez, K. F. (2017). Estandarización de un protocolo de Inmunohistoquímica para detectar microglia del cerebro de ratas de la cepa Wistar. *Int J Dental Sc*, 45-49.
- Róbles-Bárcena, M. C.-B.-G.-G.-P. (2012). El Servicio Social. *Plan Educativo Nacional*, 237.243.
- Rucci, N., Capulli, N., & Piperni, S. e. (2015). Lipocalin 2: a new mechanoresponding gene regulating bone homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 357-368.
- Vargas, C. Y. (2018). Clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y perrimplantarias. *Revista Odontológica Mexicana*, 10-26.