

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



MODELO DE ENFERMEDAD PERIODONTAL EN RATAS WISTAR

No. de registro 2019-1

TESIS QUE PRESENTA

CD. ELIZABETH CARMONA BERNAL

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ENDODONCIA

DIRECTORES DE TESIS

DRA. ERIKA DE LOURDES SILVA BENÍTEZ

DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA

ASESOR EXTERNO

M. en C. GERMÁN REYNALDO JIMÉNEZ GASTÉLUM

CULIACÁN ROSALES, SINALOA, DICIEMBRE 2019

Dedicatoria

Dedico mi tesis a mis padres Pedro y Carmen por su amor, trabajo, sacrificio y por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi prometido Jaime Eduardo Martínez Orozco por estar presente en todo momento de mi formación y estar siempre dispuesto a escucharme con paciencia, brindarme consejos, motivarme todos los días y contar con su apoyo tanto de forma personal, económica y académica para poder realizar ésta meta juntos.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por guiarme en mi camino y por permitirme concluir con mi objetivo.

A mis padres quienes son mi motor y mi mayor inspiración, quienes a través de su amor, paciencia, buenos valores y sacrificios me han ayudado siempre a trazar mi camino.

A mi prometido Jaime Martínez por ser el apoyo incondicional en mi vida, que con su amor, paciencia y consejos me ayudó a alcanzar mis objetivos, gracias por escucharme todos los días y por estudiar los carteles, todas las ponencias por video llamadas ininidad de veces, gracias por estar en todos los momentos de esta gran experiencia y por tenerte a mi lado siempre.

Agradecida con la Dra. Yolanda Castro quien siempre me apoyo aún cuando la convocatoria no estaba abierta, ella respondía llamadas y mensajes para poder llevar mis papeles y aplicar al posgrado, siempre dispuesta a ayudar y comprender en todas las situaciones de dificultad y de alegría durante nuestra estancia. A la Dra. Erika Silva por siempre estar presente en todos los modelos de la tesis y tener la paciencia de explicarme mil veces las concentraciones y volumen de LPS, por compartir sus conocimientos profesionales en clase y en la clínica. A mi equipo de tesis Germán Jiménez y Jorge López por siempre estar dispuestos a trabajar sin importar que tan temprano deberíamos de estar en el laboratorio, y hacer todo lo posible por tener en vida a las ratas con RCP para nuestro estudio. Al Dr. Geovanni Romero por su paciencia, conocimientos y apoyo en la realización del marco teórico, nada seria de mi vida sin su ayuda, siempre ha tenido mucho trabajo y obligaciones, pero sin importar que tan ocupado estuviera siempre contestaba los mensajes y llamadas para ayudarme en dudas y aclaraciones, muchas gracias por todo, en verdad lo admiro demasiado. También quiero agradecer a todos los doctores que estuvieron durante toda mi preparación: Dra. Ilsa Inzunza, Dr. Omar Cazares, Dr. Angel Basurto, Dra. Maribel Aguilar, Dr. Rosalio Ramos, Dra. Itzel Castro, Dr. Beltran, Dr. Alfredo Ayala, Dr. Eduardo Soto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
1 Resumen.....	1
2 Abstract.....	2
3 INTRODUCCIÓN	3
4 MARCO TEÓRICO	4
4.1 PERIODONTO	4
4.1.1 Los tejidos gingivales y la edad	6
4.1.2 Ligamento periodontal	6
4.1.3 El cemento.....	8
4.1.4 Hueso alveolar.....	10
4.1.5 La remodelación del hueso alveolar	11
4.2 Enfermedad periodontal	13
4.2.1 Clasificación de la enfermedad periodontal	15
4.2.2 Gingivitis	16
4.2.3 Periodontitis crónica	17
4.2.4 Periodontitis agresiva	18
4.3 Patogénesis de la enfermedad periodontal	20
4.3.1 Placa dental.....	20
4.3.2 Encía	21
4.4 Microbiología de la enfermedad periodontal	24
4.4.1 Microorganismos implicados en la enfermedad periodontal	25
4.5 Modelos animales de enfermedad periodontal.....	26
4.5.1 Modelo defecto óseo mecánico	29
4.5.2 Modelo de inducción con <i>Enterococcus faecalis</i>	29

4.5.3	Modelo de inducción con lipopolisacárido (LPS)	30
4.6	Antecedentes	34
5	JUSTIFICACIÓN	36
6	OBJETIVOS	37
6.1	Objetivo General	37
6.2	Objetivos Específicos	37
7	MATERIALES Y MÉTODOS	38
	Diseño de investigación	38
7.1	Tipos de estudio	38
7.2	Localización	38
7.3	Diseño experimental	38
7.3.1	Modelo de inoculación	39
7.3.2	Modelo con defecto óseo mecánico e inoculación	40
7.3.3	Análisis Histológico	41
8	RESULTADOS	44
8.1	Modelo de inoculación	45
8.2	Modelo con defecto óseo mecánico e inoculación	53
9	DISCUSIÓN	59
10	CONCLUSIONES	60
11	Perspectivas	61
12	BIBLIOGRAFÍA	62
13	ANEXO	68
13.1	Cuidado y manejo de los animales	68
13.2	Preparación de ácido fórmico en agua, 1000 ml	68
13.3	Procesamiento de muestras en parafina	69
13.4	Tinción de hematoxilina & eosina	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de inoculación. (A) mandíbula de rata Wistar (B) inoculación de LPS en la encía adherida.	39
Figura 2. Desarrollo de defecto óseo mecánico. (A) incisión con bisturí hoja 15c. (B) exposición del hueso, (C) defecto óseo con fresa de carburo #2 (D, E) profundidad y longitud del defecto 1.5 mm, (F) colocación de LPS E, (G) reposición del colgajo con cianocrilato tipo médico con microbrush.	40
Figura 3. Descalcificación de las mandíbulas. (A) mandíbula con inoculación de LPS <i>S. thypimurium</i> , (B) mandíbula con inoculación de LPS <i>E. coli</i> , (C) mandíbula con inoculación de LPS <i>E. coli</i> , (D) se colocaron en formaldehído 37% en una gradilla y se agregó (E) ácido fórmico.	41
Figura 4. Procesamiento de las mandíbulas. (A) muestra con ácido fórmico, (B) las mandíbulas se seccionaron y se colocaron en casete, (C) se procesó por diferentes alcoholes por 9 horas.	42
Figura 5: Colocación de las mandíbulas en parafina. (A, B) Parafina caliente a 60 °C, (C) Se colocaron los casetes en un contenedor y se agitaron cada 10 minutos por 2 horas, (E) se colocaron los tejidos en frío a 60 °C, (D) se realizaron los cortes con el micrótopo a 5 µ de grosor, (F) se colocaron los cortes en solución de agarosa para que se fijaran al portaobjetos, (G) se colocaron en un porta laminillas y se llevaron a calor por 60 °C en una hora, después se realizó la tinción con H&E (figura 6).	43
Figura 6. Tinción de los cortes. (A, B) tinción con H&E y colocación de entellan	43
Figura 7. Grupo control con solución salina. (A) Encía sana antes de la inoculación, (B) fotografía 30 días después de la inoculación.	45
Figura 8. Histología del grupo control. Se observaron los tejidos periodontales sanos.	46

Figura 9. Defecto óseo con LPS <i>E. coli</i> . (A) Encía sana antes de la inoculación, (B, C) 30 días después de la inoculación. Es posible observar la pérdida ósea dentro del círculo (C).....	47
Figura 10. Histología de inoculación LPS <i>E. coli</i> . Se observa la pulpa dental, dentina, hueso y ligamento periodontal, en la parte superior encerrado en un círculo azul se puede ver una pérdida de continuidad del LP.	48
Figura 11. Inoculación de LPS con <i>S. thypimurium</i> . (A) Encía sana antes de la inoculación, (B) fotografía 30 días después de la inoculación.....	49
Figura 12. Histología de inoculación de <i>S. thypimurium</i> . Se observaron los tejidos periodontales sanos, sin presencia de células inflamatorias.....	50
Figura 13. Inoculación de <i>E. faecalis</i> . (A) Encía sana antes de la inoculación, (B) fotografía después de los 30 días de la inoculación.	51
Figura 14. Inoculación con bacteria <i>E. faecalis</i> . En la figura (A) se observó la presencia de células gigantes multinucleadas (macrófagos) a 100 x, (B) acercamiento de las células gigantes multinucleadas, magnificación 4x.	52
Figura 15. Defecto óseo mecánico con LPS <i>E. coli</i> . (A) Defecto óseo mecánico realizado en la primera cita, (B) macroscópicamente se observo una pérdida de la cresta ósea a los 30 días.....	53
Figura 16. Histología de defecto óseo mecánico con LPS <i>E.coli</i> (A, B) Se muestra el defecto óseo mecánico con la fecha negra, sin embargo no se observa una magnificación del defecto 30 días después del piloto.....	54
Figura 17. Defecto óseo mecánico con LPS <i>S. thypimurium</i> . (A) Defecto óseo mecánico realizado en la primera cita, B) macroscópicamente se observó una pérdida de la cresta ósea a los 30 días.....	55
Figura 18. Histología de defecto óseo con LPS <i>S. thypimurium</i> . (A, B) Se observa el defecto óseo mecánico con la fecha negra, no se observa una magnificación del defecto 30 días después del piloto.	56
Figura 19. Defecto óseo mecánico con <i>E. faecalis</i> . (A) Defecto óseo mecánico realizado en la primera cita, (B) tejidos periodontales sin inflamación a los 30 días del procedimiento.	57

Figura 20. Histología de defecto óseo mecánico con inoculación de bacteria *E. faecalis*. Se observa el defecto óseo mecánico con la fecha negra, no se observó una magnificación del defecto 30 días después del piloto..... 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelos para estudiar las bacterias en ratas Wistar 28

Tabla 2. Mediadores moleculares implicados en la pérdida de hueso periodontal..... 33

1 RESUMEN

Introducción: la periodontitis es una enfermedad infecciosa de la cavidad oral que puede resultar en la pérdida de los órganos dentales, ya que su sello distintivo es la resorción ósea resultante de una respuesta inflamatoria del hospedero a un biofilm bacteriano. La inoculación de lipopolisacárido (LPS) en los tejidos gingivales es un modelo para examinar la forma en la que la respuesta inmunológica innata a este componente bacteriano induce la inflamación para estimular la osteoclastogénesis y la pérdida ósea. Por lo que se decidió realizar un modelo periodontal en ratas Wistar con inoculación de LPS de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y bacteria viable de *Enterococcus faecalis*, para generar un defecto óseo. **Objetivo:** Establecer y caracterizar un modelo de periodontitis en ratas Wistar. **Materiales y métodos:** se dividieron 14 ratas Wistar hembras en diferentes grupos dependiendo del compuesto inoculado LPS (*E. coli* o *S. typhimurium* con n=8), bacteria viable (*E. faecalis* n=4) y control con solución salina (n=2). Se realizaron dos modelos uno realizando únicamente la inoculación de los compuestos y otro realizando un defecto óseo mecánico en la mandíbula con una fresa de carburo #2 en el cual se inocularon diferentes compuestos y se reposicionó el colgajo. En ambos modelos se inoculó dos veces más, cada tercer día después de la inoculación inicial o del acto quirúrgico. Los animales fueron sacrificados 30 días después, las mandíbulas fueron diseccionadas y seccionadas para el análisis histológico, la presencia de infiltrado inflamatorio fue evaluada mediante la tinción de hematoxilina & eosina **Resultados:** la inoculación de LPS de *E. coli* y bacteria de *E. faecalis* indujeron pérdida de hueso severa a los 30 días, mientras que los grupos control se mantuvieron sin cambios.

Conclusión: en el presente estudio, hemos establecido un modelo de enfermedad periodontal en ratas Wistar mediante la inoculación de bacteria viable de *E. faecalis* así como LPS de *E. coli* ya que a los 30 días se observó una pérdida ósea evidente tanto clínica como histológicamente

Palabras clave: enfermedades periodontal, lipopolisacárido, reabsorción ósea, inflamación, activación de osteoclastos.

2 ABSTRACT

Introduction: periodontitis is an infectious disease of the oral cavity that can result in the loss of dental organs, as its hallmark is bone resorption resulting from an inflammatory response of the host to a bacterial biofilm. Lipopolysaccharide (LPS) inoculation into gingival tissues is a model for examining how the innate immune system response to this bacterial component induces inflammation to stimulate osteoclastogenesis and bone loss. It was therefore decided to perform a periodontal model in Wistar rats with inoculation of *Escherichia coli* LPS, *Salmonella typhimurium* and viable *Enterococcus faecalis* bacteria, to generate a bone defect. **Objective:** to establish and characterize a periodontitis model in Wistar rats. **Materials and methods:** 14 Wistar female rats were divided into different groups depending on the inoculated compound LPS (*E. coli* or *S. typhimurium* with n=8), viable bacteria (*E. faecalis* n=4) and control with saline solution (n=2). Two models were performed, one performing only the inoculation of the compounds and the other performing a mechanical bone defect in the jaw with a carbide drill #2 in which different compounds were inoculated and the flap was repositioned. Both models were inoculated twice more every third day after the initial inoculation or surgical procedure. The animals were sacrificed after 30 days, the jaws were dissected and sectioned for histological analysis, the presence of inflammatory infiltrate was evaluated by hematoxylin & eosin staining. **Results:** the inoculation of *E. coli* LPS and *E. faecalis* bacteria induced severe bone loss after 30 days, while the control groups remained unchanged.

Conclusion: in the present study, we have established a model of periodontal disease in Wistar rats by inoculating viable *E. faecalis* bacteria as well as LPS of *E. coli* since at 30 days an evident bone loss was observed both clinically and histologically.

Keywords: periodontal diseases, lipopolysaccharide, bone resorption, inflammation, activation of osteoclasts.

3 INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal se clasifica de acuerdo a su agresividad y la cantidad de bacterias que inducen la destrucción de los tejidos, en la cavidad oral se encuentran alrededor de 600 especies bacterianas las cuales tienen la capacidad de colonizar, multiplicarse y defenderse de los mecanismos de defensa del hospedero, con la finalidad de sobrevivir y dañar los tejidos periodontales. Las bacterias producen factores de virulencia como lipopolisacárido (LPS), éste provoca inflamación gingival y estimula la osteoclastogénesis y la consecuente pérdida ósea.

Se han reportado diferentes modelos animales para provocar la enfermedad periodontal, en nuestro caso proponemos realizar un defecto óseo mecánico con fresas de carburo y posteriormente la colocación de LPS o bacterias viables en el defecto realizado, posteriormente se colocaron inoculaciones de los mismos componentes en los tejidos gingivales por dos sesiones más, todo esto con la finalidad de examinar la respuesta inmunológica y la consecuente pérdida ósea. Los modelos animales de enfermedad periodontal son de gran importancia en el desarrollo de bases científicas que llevan a la comprensión de procesos patológicos, también contribuyen al desarrollo de herramientas de diagnóstico más precisos y estrategias terapéuticas más eficientes.

Con esta finalidad se decidió realizar un modelo periodontal en ratas Wistar con inoculación de LPS *E.coli*, *S. thypimurium* o bacteria viable de *E. faecalis* y así generar un defecto óseo, el cual posteriormente sea la base para evaluar materiales relacionados a la regeneración ósea.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 PERIODONTO

Está compuesto por cuatro estructuras que conforman una unidad funcional y comparten un mismo origen embriológico: cemento, ligamento periodontal (LP) y hueso alveolar y encía, las cuatro estructuras se origina al mismo tiempo que se forma la raíz a partir de la capa celular interna del saco dentario en la etapa de folículo dental (1, 2).

La unión de estos tejidos tiene un papel funcional en la cavidad oral más allá de anclaje del diente en el hueso. Los tejidos duros (cemento y hueso) y los tejidos blandos (LP y gingival) del periodonto tienen gran importancia en la respuesta inflamatoria local e inmunológica, mediante la síntesis y la liberación de citocinas, factores de crecimiento y enzimas. La reparación y / o regeneración del periodonto depende de muchos de los acontecimientos que ocurren durante el desarrollo de estos tejidos únicos, sin embargo, los cambios bioquímicos y moleculares completos y los orígenes de células, particularmente los cementoblastos, aún no se entienden por completo, es importante tener en cuenta que el tejido periodontal no puede ser regenerado (3).

Las estructuras que forman el periodonto de inserción tienen una evolución correlativa a lo largo de la vida del diente, ya que la remodelación permanente de las fibras periodontales y del tejido óseo, así como la aposición continua y selectiva del cemento, se relaciona con los movimientos de acomodación y desplazamiento de los dientes. Además, si el diente se pierde por extracción el cemento y parte del ligamento periodontal también se pierde, mientras que el hueso alveolar y las fibras periodontales remanentes sufren una regresión total (1).

El periodonto tiene una relación circundante con la pulpa y el diente, un tejido periodontal sano alimenta y apoya las raíces dentales. Existe una comunicación adecuada entre la pulpa y el ligamento periodontal a través de los túbulos dentinarios, conductos laterales y/o accesorios y foramen apical (4).

La mucosa oral se clasifica en mucosa especializada (dorso de la lengua), la mucosa alveolar no queratinizada y la mucosa masticatoria queratinizada, la mucosa masticatoria incluye la mucosa del paladar duro y la encía (5).

La encía está demarcada de la mucosa alveolar por la unión mucogingival, ésta protege el hueso y los dientes, así como las raíces alveolares subyacentes de trauma mecánico y proporciona una barrera epitelial para ayudar a evitar que las bacterias lleguen a los tejidos subyacentes, desempeña un papel activo en la comunicación celular, responde a la infección, e integra las respuestas inmunológicas innatas y adquiridas cuando se presentan las bacterias. Las células epiteliales excretan interleucina 8 (IL-8), otras citocinas y producen péptidos antimicrobianos como parte de un mecanismo de defensa innato (3).

La encía se divide en encía libre, encía adherida, y encía interdental. La superficie de la encía libre adyacente al diente forma la pared del surco gingival, la encía en el lado opuesto de esta capa está expuesta directamente a la cavidad oral, la encía libre es continua a la encía insertada y puede ser delimitada por un surco gingival libre. La encía interdental puede tener una forma piramidal o col. El Col es una cavidad no visible entre el epitelio bucal y la papila gingival lingual, éste está cubierto con epitelio no queratinizado y se encuentra más comúnmente entre los premolares, primeros y segundos molares maxilares, así como primeros molares mandibulares. Esta región de epitelio no queratinizado es más susceptible a irritaciones y trauma, lo que resulta en la inflamación y posible pérdida temprana del periodonto (6).

El grupo de fibras gingivales se considera a veces parte del grupo de fibras del ligamento periodontal, los haces de fibras de colágeno de la encía se organizan en grupos: dentogingivales; se unen en el cemento cervical de encía libre. Estas son las fibras más numerosas de la encía, alveologingival; las fibras se adhieren al hueso alveolar de la encía libre, dentoperiósticas; se unen el cuello del cemento al hueso alveolar después de las transversales sobre el margen alveolar y hacia el ápice, circulares o gingivales; las fibras se entrelazan con los otros grupos de fibras dentro del margen gingival y rodean el diente (7).

4.1.1 Los tejidos gingivales y la edad

El periodonto está sometido a variaciones funcionales y morfológicas, así como cambios relacionados con la edad (8). Todas las células del cuerpo y del periodonto están preprogramados para la muerte celular, en particular, las células gingivales y los fibroblastos tienen una alta tasa de apoptosis en el daño normal del periodonto (3, 7). La apoptosis puede desempeñar un papel en diferentes tipos de agrandamiento gingival en particular causada por los bloqueadores de los conductos de calcio, sin embargo, los mecanismos son multifactoriales y no se entiende completamente (9).

En el ligamento periodontal adulto hay subgrupos de fibroblastos fenotípicamente peculiares y distintos términos funcionales. Se observan idénticos microscópicamente pero pueden tener funciones distintas, como la secreción de colágeno de diferentes tipos. Los odontoblastos y cementoblastos, así como osteoclastos y odontoclastos también aparecen en las superficies óseas y cementarias del ligamento periodontal (8).

La enfermedad periodontal avanzada tiene como consecuencia la pérdida de los dientes afectados durante la edad adulta, también puede afectar a la salud general de nuestro cuerpo (10).

Es por eso que se debe de tener el conocimiento de todos los tejidos que conforman el periodonto para la salud de los órganos dentales presentes en cavidad oral, como serán desarrollados a continuación.

4.1.2 Ligamento periodontal

Es el tejido conectivo que rodea la raíz y la conecta con el hueso, se continua con el tejido conectivo de la encía y se comunica con los espacios medulares a través de los conductos vasculares del hueso (8).

El ligamento periodontal (LP) juega un papel importante en la transferencia de cargas a través de los dientes hasta el hueso alveolar, es el mecanismo fisiológico responsable principalmente del movimiento del diente en respuesta a la fuerza. Cuando un diente es sometido a una fuerza excesiva, la energía de deformación es disipada por el componente viscoso del tejido poroso y el

intersticial fluye hacia el hueso alveolar, que también es un medio poroso. El LP sin enfermedades contribuye a la correcta distribución de tensiones desde el diente hasta el hueso alveolar. Sin embargo, las enfermedades periodontales son altamente prevalentes y podría afectar hasta al 90% de la población mundial (11).

El LP está en contacto con los tejidos gingivales, ancla el diente en la mandíbula, actúa como un amortiguador, el ligamento periodontal se puede dividir en una región relacionada con el hueso rico en células y vasos, una zona media con un menor número de células y fibrillas de colágeno más delgadas, y una región relacionada con cemento con haces de colágeno denso (3). Las células progenitoras para exposiciones de fibras, osteoblastos, y cementoblastos se encuentran en el ligamento periodontal, cuando se destruye, se produce una anquilosis dentoalveolar y se pierde la capacidad de adaptación del periodonto (12). Las células del ligamento periodontal intervienen en la formación y resorción del cemento y hueso, que ocurre en el movimiento dental fisiológico, la adaptación del periodonto ante las fuerzas oclusivas y la reparación de las lesiones, las variaciones de la actividad enzimática celular también se relacionan con el proceso de remodelación. Las principales fibras colágena del LP están dispuestas en haces que se insertan en el cemento y el hueso alveolar, se conocen como fibras de Sharpey, los haces de estas fibras individuales forman una red continua de conexiones entre el diente y el hueso (8, 13). El colágeno tipo I es el componente principal de estas fibras las cuales mineralizan cuando quedan incrustadas en el cemento y el hueso alveolar, la inserción de la pared alveolar de fibras de Sharpey es el lado de tensión de la LP. Como las fibras de Sharpey atraviesan profundamente en el hueso, la longitud de penetración en los tejidos duros puede ser mucho mayor que la anchura de la LP (14).

Las fibras principales del ligamento periodontal están dispuestas en cinco grupos: transeptales de las crestas alveolares, horizontales, oblicuas, apicales e intrarradiculares. Las células y fibras viejas tienden a desaparecer y las sustituyen otras nuevas y es posible observar actividad mitótica en los fibroblastos y las células endoteliales. Los fibroblastos elaboran las fibras de colágena y las células mesenquimatosas residuales se convierten en

osteoblastos y cementoblastos. En consecuencia la velocidad de formación y la diferenciación de los osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos afecta la velocidad con que se forman la colágena, el hueso y el cemento (15).

El ligamento periodontal también contiene una proporción considerable de sustancia fundamental que rellena los espacios entre las fibras y las células. Consta de dos componentes principales: glucosaminoglicanos como ácido hialurónico, proteoglicanos y glucoproteínas como fibronectina y laminina, su contenido de agua es elevado (70%) (8).

El ligamento periodontal está en contacto por la parte externa al hueso alveolar y la parte interna con el cemento radicular.

4.1.3 El cemento

Es un tejido mesenquimatoso calcificado que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica (8), compuesto por un 45-50% materia inorgánica, 22% de materia orgánica y 32% de agua, el principal componente orgánico está representado por fosfato de calcio y cristales de hidroxapatita. La matriz orgánica se compone de fibras de colágeno tipo I (90%) y colágeno tipo III (5%). El cemento recibe el alimento del LP. La sialoproteína ósea puede actuar como una molécula de adhesión para mantener las células en la superficie de la raíz e iniciar la formación de minerales. El cemento es más delgado en la unión cemento-esmalte y más grueso apicalmente (3).

La coloración del cemento es blanco anacarado, más oscuro y opaco que el esmalte, pero menos amarillento que la dentina, su dureza es menor que la dentina y el esmalte, es similar a la del hueso laminar, el cemento es menos permeable que la dentina a pesar de su mayor contenido de sustancia orgánica y a su menor densidad, su radiopacidad es semejante a la del hueso compacto, el espesor del cemento no permite una visualización marcada, excepto en la zona del ápice donde el tejido es más grueso, la radiopacidad depende del contenido mineral, por esta razón es que el cemento es notablemente menos radiopaco que el esmalte (1).

El cemento presenta un espesor de 0.10 a 0.38 mm, el espesor del LP disminuye con la edad (tiene un ancho promedio en individuos jóvenes de 0.20

mm y de 0.15 mm en personas mayores de 50 años), aumenta con la función masticatoria, es más ancho en dientes funcionales y más delgado en dientes infuncionales o retenidos (16).

El cemento se divide en celular y acelular, el cemento acelular (primario) es el primero en formarse y cubre desde el tercio cervical hasta la mitad de la raíz, no contiene células. Este cemento se forma antes que el diente alcance el plano oclusivo y su grosor varía desde 30 hasta 230 μm . Las fibras de Sharpey constituyen la mayor parte de la estructura del cemento que posee una función principal en el soporte dentario, casi todas las fibras se insertan en la superficie radicular en ángulos casi rectos y penetran el cemento a profundidad, sin embargo otras entran desde varias direcciones distintas. El cemento celular (secundario) se forma una vez que el diente está en plano oclusivo, es más irregular y contiene diferentes células como los cementocitos, en espacios individuales o lagunas que se comunican entre sí en espacios conectados, el cemento celular es menos calcificado que el tipo acelular. Ambos constan de una matriz interfibrilar calcificada y fibras de colágena tipo II (8).

La dureza y composición química del cemento es similar a la del hueso por lo cual son tejidos de comparación; además ambos crecen por aposición, poseen laminillas, cuando el cemento presenta células éstas se alojan en lagunas como los osteocitos. Ambos tejidos proporcionan un anclaje o inserción a las fibras periodontales (3). Las fibras de Sharpey son fibras extrínsecas principiarles del ligamento periodontal formadas por fibroblastos las cuales pertenecen a la matriz del cemento intrínseco producidas por cementoblastos, éstos forman los componentes de naturaleza no colágena de la sustancia fundamental interfibrilar como proteoglicanos, glucoproteínas y fosfoproteínas (17).

El cemento cubre y protege la totalidad de la superficie radicular del diente desde el cuello anatómico hasta el ápice aunque en ocasiones puede extenderse sobre el esmalte en la región cervical. El cemento no está vascularizado y carece de inervación, no tiene capacidad de ser remodelado y es por lo general más resistente a la resorción que el hueso. Este hecho es importante desde el punto de vista clínico puesto que si fuera resorbido

fácilmente la aplicación de técnicas ortodónticas ocasionaría la pérdida de cemento en la raíz (1).

El cemento está en contacto con el hueso alveolar desde la cresta ósea hasta la parte apical.

4.1.4 Hueso alveolar

Las apófisis alveolares denominadas también procesos alveolares y bordes alveolares forman parte de los huesos maxilares superior e inferior. Los procesos alveolares corresponden a las porciones de los huesos maxilares que rodean y contiene a los receptáculos o alveolos dentarios, estos alveolos son cavidades cónicas que alojan a las raíces de los elementos dentarios (1).

Se compone 67% de materia orgánica (hidroxiapatita) y 33% de materia inorgánica, el colágeno constituye la mayoría del componente orgánico del hueso (80-90%) colágeno tipo I (95%) y el (5%) de colágeno tipo III, V, VI, XVI (18). El hueso alveolar se forma durante el crecimiento fetal por osificación intramembranosa y consta de una matriz calcificada con osteocitos encerrados dentro de espacios llamados lagunas, los osteocitos inducen prolongaciones hacia los canalículos que se irradian de las lagunas. Los canalículos forman un sistema anastomosante a través de la matriz intracelular del hueso que llevan oxígeno y nutrientes a los osteocitos por sangre y eliminan los desechos metabólicos. Los vasos sanguíneos se ramifican extensamente y atraviesan el periostio. El endostio se localiza junto a los vasos de la médula. Hay crecimiento óseo por la aposición de una matriz orgánica depositada por los osteoblastos. Los sistemas haversianos (hosteones) son las vías internas que suministran sangre al hueso demasiado grueso que no podrían irrigar solo vasos superficiales, se encuentran en las tablas corticales y cortical alveolar (8).

La osteopontina (OPN) y la sialoproteína ósea (BSP) son dos proteínas no colágenas del hueso y el cemento que están presentes en los espacios interfibrilares. La matriz de colágeno llamada osteoide secretada por los osteoblastos, proporciona el andamio para la deposición mineral apatita, así como otras proteínas no colágenas, diferentes tipos de huesos se encuentran

en la región maxilofacial. El hueso reticular surge de una placa del tejido conectivo y un proceso de osificación intramembranosa. El maxilar y la mandíbula contienen los procesos alveolares que albergan raíces de los dientes, el hueso alveolar es compatible con la estructura dental, ayuda a distribuir las fuerzas oclusales y se remodela continuamente ya que responde a las fuerzas de masticación. El hueso alveolar se compone de hueso cortical, hueso esponjoso (compacto), en la parte media (trabecular). El hueso esponjoso también se encuentra en los espacios interdentes e interradiculares entre el hueso cortical y la pared alveolar. El hueso que recubre los alvéolos donde las fibras de Sharpey se insertan, se denomina hueso haz, está irregularmente dispuesto y menos denso, es producido por osteoblastos entre las fibras de Sharpey. Las capas de hueso están dispuestas paralelamente a la dirección ápico coronal del diente. El hueso cortical interior es radiográficamente denso y se denomina radiográficamente como la lámina dura, el hueso cortical se reúne coronalmente en el margen alveolar y está generalmente 1.5 mm a 2.0 mm por debajo de la unión esmalte-cemento (19).

A medida que avanza la etapa de vida este hueso se está remodelando constantemente.

4.1.5 La remodelación del hueso alveolar

El remodelado es el mecanismo óseo más importante como vehículos de cambio de forma, resistencia a fuerzas, reparación de heridas y homeostasis de calcio y fósforo en el organismo. El hueso contiene 99% de los iones calcio del cuerpo y por lo tanto es la fuente principal de liberación de iones de calcio cuando los niveles de calcio en la sangre descienden; esto puede vigilarse a través de la glándula paratiroides. La disminución de calcio en sangre tiene como mediadores a receptores que se hallan sobre las células principales de la glándula paratiroides, que entonces libera hormona paratiroidea (PTH), la PTH estimula a los osteoblastos para liberar interlucinas 1 y 6 las cuales estimulan a los monocitos para migrar hacia el área ósea (8).

El hueso es remodelado bajo una fuerza constante al existir una interdependencia de los osteoblastos y osteoclastos (20). El aumento de

trabéculas del hueso esponjoso en número y espesor y el hueso cortical se puede añadir por el aumento de las fuerzas de oclusión, los osteoclastos son responsables de la resorción de hueso mediante la eliminación de la matriz orgánica de hidroxiapatita. Surgen de las células hematopoyéticas de linaje monocito / macrófago de la médula ósea. Los osteoclastos son grandes células multinucleadas que producen una variedad de enzimas hidrolíticas que son secretadas en un medio ácido. Los osteoclastos se encuentran en lagunas de Howship. El borde rugoso de un osteoclasto multinucleado crea un microambiente de resorción ósea, los osteoblastos producen matriz ósea (tanto colagenosa y no colagenosa) que se denomina osteoide, la rápida formación de hueso (embrionario y hueso en crecimiento juvenil así como en la reparación del hueso afectado) se llama tejido óseo. Hay grandes extensiones de espacios ocupados por cristales minerales interfibrilares y un gran número de osteocitos. La fosfatasa alcalina, secretada por los osteoblastos, inicia la nucleación de cristales de hidroxiapatita, el hueso laminar más maduro ha organizado láminas de fibra de colágeno perpendicular el uno al otro con muy poco espacio interfibrilar. La osteopontina y sialoproteína ósea se expresan en el hueso alveolar, la osteopontina se encuentra en las líneas de cemento en los huesos y puede desempeñar un papel en la integración de hueso nuevo y viejo juntos, los osteoblastos que no se someten a apoptosis o permanecen en la superficie del hueso pueden ser atrapados en las lagunas del hueso como osteocitos (3).

La formación de hueso y la resorción están estrechamente coordinados, los osteoclastos son estimulados para reabsorber el hueso por la hormona paratiroidea, vitamina D3, IL-1, IL-6, TNF α , TNF β , y la prostaglandina E2 (PGE 2). La hormona paratiroidea y la vitamina D3 tienen influencia del osteoclasto indirectamente actuando sobre los osteoblastos. Los osteoclastos son inhibidos por la calcitonina, TNF β , estrógenos, e IFN α , estrógenos y prostaglandina E2 que es un potente estimulador de los osteoclastos y la resorción ósea. Una nueva área interesante de la regulación de hueso es el RANK (receptor del factor nuclear activador $\kappa\beta$ / RANKL (ligando del receptor del factor nuclear activador $\kappa\beta$) / OPG (osteoprotegerina) en relación a la regulación de los osteoclastos (20). También es necesario para macrófago

factor estimulante de colonias de estar presente junto con los osteoblastos y el contacto célula a célula para la regulación del equilibrio de los osteoclastos RANKL / OPG en el microambiente óseo es crucial para el control de los osteoclastos, los estimuladores de osteoclastos y la resorción ósea es un trabajo subsiguiente a través de este sistema provocando una enfermedad periodontal (3, 21).

4.2 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es una infección bacteriana mixta que produce la destrucción inflamatoria de los tejidos periodontales que rodean y soportan los dientes. La microbiota periodontal forma un ecosistema complejo llamado biofilm dental, dentro del cual los patógenos pueden producir factores de virulencia que les permiten evadir las defensas del hospedero, así como provocar una respuesta inmunológica del hospedero que es perjudicial para los tejidos del mismo (22), Las bacterias por lo tanto inician la enfermedad activando los mecanismos del hospedero y después destruyen las estructuras de soporte del periodonto (23).

La enfermedad periodontal es una de las enfermedades de los tejidos periodontales en la cual se produce la pérdida de inserción (24) y la destrucción de las estructuras de soporte de los dientes incluyendo el ligamento periodontal, el hueso y los tejidos blandos (25). La enfermedad periodontal, sin embargo abarca un amplio espectro de enfermedades que sólo la periodontitis y el reconocimiento de estas enfermedades requiere hacer un diagnóstico. El diagnóstico clínico de la enfermedad periodontal es el reconocimiento de la presencia de una patología, es hecha por el reconocimiento de los diversos signos y síntomas en los tejidos periodontales que anuncian una desviación de la salud. El diagnóstico de la enfermedad periodontal exige un conocimiento de lo que constituye la salud periodontal. El periodonto sano de los cuales sólo los tejidos gingivales pueden ser observados directamente, se describe como encía punteada de color rosa o rosa coral pálido en la raza caucásica, con varios grados de pigmentación en otras razas. Si bien se adapta a los tejidos subyacentes, con un margen de borde de cuchillo en la que hace tope con el

diente, el margen gingival se encuentra en ausencia de patología, en la unión cemento-esmalte. Se muestra un borde festoneado con figuración más alto interdental, donde constituye la papila interdental, bucal y lingual. Hay una grieta gingival donde hace tope con el diente que en la salud es 1-3 mm de profundidad y hay una ausencia de sangrado de la grieta en el sondaje suave. El periodonto sano mostrará una pequeña cantidad de fluido intersticial, fluido gingival crevicular, la pared lateral del surco constituye el margen gingival libre. Desde el punto más apical del margen gingival libre hasta la unión mucogingival es el tejido gingival adjunto, que varía en anchura de 1 a 9 mm y tiene una superficie punteada. Éste es un tejido inmóvil fuertemente unido hasta el hueso como un mucoperiostio y es una mucosa queratinizada bien adaptada para resistir la lesión apical de la unión mucogingival y se continúa con la mucosa de revestimiento de la boca, que es móvil libremente y tiene un epitelio no queratinizado. En general se cree que la función de la mucosa alveolar como un tejido marginal y áreas donde hay falta de encía adherida puede constituir problemas mucogingivales (24).

Las células epiteliales funcionan como una barrera mecánica contra la invasión por organismos patógenos y promueven la comunicación intercelular a través de complejos de unión célula-célula, seguido de la producción de citocinas inflamatorias y péptidos antimicrobianos. Complejos de unión celular multi-proteína son estructuras simétricas que se forman entre las células y son cruciales para mantener la integridad física y funcional de los tejidos. Las células epiteliales están generalmente interconectadas por uniones estrechas, uniones de adherencia, desmosomas, y uniones gap. Sin embargo, el epitelio de unión en el tejido periodontal clínicamente sanos solamente está interconectado por desmosomas y ocasionalmente por uniones gap, y tiene anchos espacios intercelulares (26). El inicio de la enfermedad periodontal se atribuye a la escisión dentro de la segunda o tercera capa de células de las células DAT (unido directamente al diente, por sus siglas en inglés "*Directly Attach at the Teeth*") en la porción más coronal del epitelio de unión frente a películas de biofilm, y no a la separación de las células DAT del diente. Tras la escisión de la unión de la superficie epitelial, la secreción de citocinas y quimiocinas tales como la (IL-8) resultan en la acumulación de neutrófilos en el

epitelio de unión, mientras que las proteasas secretadas por los neutrófilos interrumpe la barrera epitelial del epitelio de unión y se da una acumulación de neutrófilos activados en áreas de lesión. Existen diferentes clasificaciones de la enfermedad periodontal por el grado de afección bacteriana realizada al periodonto (27).

4.2.1 Clasificación de la enfermedad periodontal

Existen dos tipos principales de enfermedad periodontal: gingivitis y periodontitis, también hay diferentes tipos de gingivitis y periodontitis sin embargo, la forma crónica de cada una es el más común (22).

Los sistemas de clasificación se utilizan para la mayoría de las enfermedades para ayudar a diseñar estrategias terapéuticas apropiadas, basadas en pruebas de los ensayos clínicos llevados a cabo de manera apropiada. Las enfermedades periodontales no son ninguna excepción. La clasificación de éstas ayuda en el desarrollo de marcos para el estudio de la etiología, patogénesis y tratamiento de enfermedades; además, proporciona a la comunidad sanitaria internacional con una forma de comunicarse en un idioma común. Los sistemas de clasificación también proporcionan a los profesionales un esquema con el cual es posible organizar y ejecutar las estrategias de tratamiento para los pacientes de manera individual. La forma ideal para clasificar cualquier patología es usar el nombre del agente etiológico (24).

La “*American Academy of Periodontology*” (AAP) realizó la clasificación de enfermedades periodontales en 1999, la cual era una de las más completas, detalladas y complejas. Dicha clasificación es la siguiente: enfermedades gingivales, inducidas por placa, no inducidas por placa, periodontitis crónica y periodontitis agresiva (zonas localizadas y generalizado), la periodontitis como una manifestación de enfermedad sistémica en enfermedades periodontales, necrozantes, abscesos del periodonto, periodontitis asociada con lesiones endodónticas y condiciones de desarrollo o adquiridos (24).

Las manifestaciones clínicas y causales de las enfermedades delineadas en Estados Unidos en 1989 y en Europa en 1993 no se observaron con regularidad en otros países del mundo y no siempre coinciden con los modelos

presentados. En consecuencia la AAP esclareció el sistema de clasificación con base en datos científicos y clínicos de actualidad. La clasificación resultante de las diferentes formas de periodontitis simplificó para describir tres manifestaciones clínicas generales de periodontitis: periodontitis crónica, agresiva, con manifestaciones de enfermedades sistémicas (8).

Una de las primeras condiciones periodontales es la gingivitis la cual al no ser tratada evoluciona a una enfermedad periodontal.

4.2.2 Gingivitis

La gingivitis es una condición inflamatoria en los tejidos blandos que rodean los dientes (la encía) y es el resultado de una respuesta inmunológica directa a la placa microbiana en los dientes (25). Esta inflamación se evidencia por enrojecimiento e inflamación de los tejidos blandos, así como el sangrado del surco gingival, se considera una condición reversible (22). La gingivitis también puede ser generada por otros factores como: fumar, medicamentos así como los cambios hormonales que se producen en la pubertad y el embarazo. Uno de los principales factores para esta enfermedad es la acumulación de placa bacteriana, la cual al no ser eliminada desencadena una respuesta inmunológica que daña los tejidos periodontales del órgano dental (25).

Las lesiones gingivales pueden clasificarse en dos grandes categorías: inducida por placa y no inducida por placa. Las lesiones inducidas por placa dental (gingivitis) pueden ser relacionados o no con factores contribuyentes locales o pueden ser modificadas por factores sistémicos, medicamentos o por malnutrición. Cabe señalar que aunque por definición de gingivitis se ha descrito tradicionalmente como asociado con un periodonto donde no hay pérdida de inserción, es posible que se produzca en un periodonto con un nivel de inserción reducido que sea estable y no experimentar pérdida progresiva de la unión. En la gingivitis no inducida por placa, las lesiones gingivales abarcan las causadas por la placa bacteriana específica, infecciones fúngicas o víricas, origen genético, las condiciones sistémicas (condiciones dermatológicas reacciones corporales, lesiones de trauma, no se especifique otra cosa, para

formas de gingivitis que no encajen perfectamente en cualquiera de las otras áreas (24).

Loe y col., demostraron que los procedimientos intensivos de control de la placa bacteriana erradicó la gingivitis clínica (28). La gingivitis clínica podría también controlarse con antisépticos tales como clorhexidina (29), dado que el espectro de actividad de estos agentes se dirigen principalmente a los microorganismos, la importancia de la terapia antimicrobiana para la prevención de la gingivitis es, más evidente. Lindhe J (30), demostró que el progreso de la periodontitis destructiva podría ser detenido parcialmente y revertido por procedimientos quirúrgicos acompañados de limpieza dental dos veces al mes, al no ser tratada evoluciona a una periodontitis crónica.

4.2.3 Periodontitis crónica

La periodontitis es una condición irreversible y más grave generalmente provoca inflamación gingival en individuos susceptibles. En la periodontitis la lesión inflamatoria afecta la encía, el periodonto, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar, causando la destrucción de estas estructuras de soporte del diente hasta ocasionar la pérdida de los mismos (22). La expresión de la periodontitis crónica incluye la colonización subgingival por patógenos microbianos (31).

El término "crónica" se eligió ya que se consideró ser no específica y no dependiente de la edad y por lo tanto menos restrictiva (24). La periodontitis crónica es más prevalente en adultos, pero puede presentarse en niños, se vincula con la acumulación de placa y cálculos, y suele tener un ritmo de progresión lento a moderado, pero se observan periodos de destrucción más rápida. Las aceleraciones del ritmo de la enfermedad pueden deberse al impacto de los factores locales, sistémicos y ambientales que influyen en la interacción normal entre hospedero y bacterias (8).

La periodontitis crónica puede ser localizada o generalizada, dependiendo del daño a las estructuras periodontales y el número de órganos dentales afectados. La periodontitis localizada se describe como 30% o menos de los sitios afectados y la periodontitis generalizada afecta más del 30% (24).

Las características de una periodontitis crónica son que la cantidad de destrucción es consistente con la presencia de factores locales, la presencia de cálculo subgingival es un hallazgo frecuente, está asociado con un patrón variable microbiano, es lento para la tasa de progresión moderada pero puede tener periodos de rápida progresión, puede ser mas edificación sobre la base de extensión y la gravedad, puede estar asociada con factores predisponentes locales (como dientes o relacionados con factores iatrogénicos), puede ser modificada por y/o asociada con enfermedades sistémicas, puede ser modificado por factores distintos de enfermedad sistémica como el tabaquismo y el estrés emocional (32).

La gravedad de la enfermedad se ha caracterizado tradicionalmente por ser ligera donde la pérdida de hueso está en el tercio coronal de la raíz, moderada donde la pérdida de hueso está en el tercio medio de la raíz y avanzada cuando está en el tercio apical de la longitud de la raíz. La clasificación es en base de la pérdida clínica de fijación (CAL) como de la siguiente manera: ligera = 1-2 mm CAL; moderado = 3 a 4 mm CAL; y severa = 5 mm CAL (24).

Los signos de la inflamación a menudo difieren dependiendo del control de la placa del paciente, a medida que la enfermedad progresa movilidad y migración de los dientes puede ocurrir de forma individual o general, cuando se pasa por desapercibido estos factores entonces esta enfermedad evoluciona a una periodontitis agresiva (33).

4.2.4 Periodontitis agresiva

Es una forma agresiva de enfermedad es caracterizada por avanzada pérdida de tejido periodontal y rápida progresión de la enfermedad, asociada a factores sistémicos modificantes, genéticos e inmunológicos que favorecen la predisposición a su aparición (24). Una característica principal que la diferencia de la periodontitis crónica es la evidente y rápida progresión de la pérdida de inserción y destrucción ósea. Los pacientes están sistémicamente sanos; además se observa una predisposición a la enfermedad dentro del grupo familiar. Otras características secundarias que se presentan generalmente pero no universalmente: la cantidad de irritantes locales no se corresponden con la

severidad de la destrucción periodontal; proporciones elevadas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y ocasionalmente de *Porphyromonas gingivalis*; defectos en los leucocitos y en algunos casos la pérdida ósea y la pérdida de inserción pueden autolimitarse. La periodontitis apical se puede presentar en forma Localizada o Generalizada. La Periodontitis Agresiva Localizada (PAL) es definida por las siguientes características: la destrucción periodontal interproximal es localizada en el primer molar e incisivos y no más de dos dientes adicionales afectados, principalmente inicia en la adolescencia (24).

La periodontitis agresiva difiere de la crónica por la rapidez de la progresión en personas sanas, existe ausencia de grandes acumulaciones de placa y cálculos así como antecedentes familiares de enfermedad agresiva que señala un rasgo genético (8).

La Periodontitis Agresiva Generalizada (PAG) se diferencia de la forma localizada por la cantidad de dientes permanentes involucrados: pérdida de inserción interproximal generalizada, afectando al menos tres dientes adicionales además de primeros molares e incisivos. Afecta a personas menores a 30 años pero los pacientes pudieran tener mayor edad; la destrucción de inserción y de hueso alveolar es de marcada índole episódica (24).

El tratamiento puede ser iniciado sólo después de un diagnóstico cuidadoso por parte de un periodoncista con conocimiento específico, el odontólogo general, odontopediatra u ortodoncista pueden jugar un papel fundamental en la detección de posibles casos a ser referidos para su ulterior evaluación y el tratamiento periodontal en niños y adolescentes, generalmente se divide en tres fases: fase inicial, dirigida a controlar el factor causal primario en la enfermedad placa dental, terapia correctiva para establecer medidas terapéuticas para restaurar función y estética, terapia de mantenimiento dirigida a la prevención de la recurrencia y progresión de la enfermedad (34).

El manejo de la PA dependerá de diferentes factores: un diagnóstico temprano de la enfermedad, máxima supresión de microorganismos infectantes y el establecimiento de un programa de mantenimiento individualizado a largo plazo 6 días (25).

4.3 Patogénesis de la enfermedad periodontal

4.3.1 Placa dental

La patogenia de la enfermedad periodontal es un proceso en el que la presencia de ciertos elementos de las bacterias (LPS) del área subgingival actúan como antígenos activando el sistema inmunológico gingival, siendo la placa dental un factor principal para desencadenar estas respuestas en el hospedero (35).

La placa dental es una biopelícula catalogada como un ecosistema en el que las bacterias forman microcolonias que están rodeados por una matriz protectora compuesta de glucoproteínas y polisacáridos extracelulares (8). Los microorganismos colonizan rápidamente las superficies de diente limpio después de cesar todos los procedimientos de higiene oral, a los pocos días los signos clínicos y microscópicos de la gingivitis se hacen evidentes, estos cambios inflamatorios pueden revertirse cuando se reanudan los métodos adecuados de limpieza de dientes. La causa probable que haga que los microorganismos formen la placa dental y la gingivitis es mediante la liberación de productos bacterianos que inducen la inflamación del tejido. Los ensayos clínicos han documentado la importancia de la placa microbiana supragingival y subgingival en el tratamiento de la gingivitis y la periodontitis (25).

La biopelícula tiene conductos circulatorios que permiten la entrada de nutrientes y salida de los productos de desecho o metabolitos. Un sistema circulatorio es necesario porque la difusión sería insuficiente para satisfacer las necesidades nutricionales y respiratorias de la densa población de organismos, el biofilm de las bacterias también tienen un medio de comunicación llamado detección de quórum en la que la acumulación de un metabolito más allá de un nivel de umbral provoca cambios en la expresión génica a través de la comunidad. Dentro del biofilm, hay microambientes que varían en pH y las concentraciones de diversos productos químicos y metabolitos. Estas variaciones permiten diferentes especies con las necesidades metabólicas variadas para prosperar en distintos microambientes dentro del ecosistema, fomentando de este modo una mayor diversidad en la población bacteriana.

Esta diversidad se asegura de que las infecciones mixtas causadas por la placa dental son más difíciles de manejar y hace que sea más difícil de predecir el organismo particular lo cual es probable que sean responsables de cada infección (22).

El sitio de especificidad y la predilección en la periodontitis y gingivitis probablemente se relaciona con la retención de placa en áreas específicas, como en las áreas locales donde la higiene bucal es alterada, en zonas de acumulación de cálculo y en las zonas de restauración sin sellado en el margen gingival (24).

En la etapa de la gingivitis la primera afección clínica será en la encía observando inflamación y enrojecimiento de las papilas dentales, así como sangrado al comer o cepillarse los dientes.

4.3.2 Encía

La encía es parte de la mucosa bucal masticatoria que cubre los procesos y rebordes alveolares, rodea el cuello de los dientes a los cuales se adhiere a través de la unión dentogingival, por ser la encía una membrana mucosa posee un doble origen embriológico, el tejido epitelial de revestimiento deriva del ectodermo cubre la cavidad bucal primitiva o estomodeo y el tejido conectivo subyacente del mesénquima cefálico o ectomesénquima (1, 36).

La encía sana se caracteriza por su color rosa y su consistencia firme interdental, los tejidos gingivales sanos son firmes, no sangran al sondaje, cubren el espacio por debajo de las zonas de contacto entre los dientes, la encía sana presenta un aspecto punteado, y hay un margen de filo entre el tejido blando y el diente. La encía normal es libre de evidencia histológica de inflamación, pero esta condición ideal se ve muy raramente en secciones de tejido microscópicos. Esto se debe a que la mayoría de los tejidos gingivales humanos son, sin importar cuán clínicamente sanos en apariencia ligeramente inflamada debido a la presencia constante de la placa microbiana. Incluso en el estado muy saludable, la encía tiene leucocitos en el filtrado, que está predominantemente compuesto por neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares. Una muestra de placa subgingival, cuando se ve bajo el microscopio

invariablemente mostrará microorganismos de la placa y neutrófilos. Los neutrófilos se reclutan a la bolsa periodontal o en la encía gingival debido a moléculas que los atraen liberado por las bacterias, llamado péptidos quimiotácticos. Además las bacterias dañan las células epiteliales y liberan citocinas que atraen más leucocitos (predominantemente neutrófilos). Los neutrófilos dentro de la encía gingival pueden fagocitar y digerir bacterias y por lo tanto eliminar estas bacterias de la bolsa. Si el recuento de neutrófilos se sobrecarga de 10 bacterias "explota". Esto provoca daños en los tejidos de enzimas tóxicas que se liberan de los neutrófilos. Por lo tanto, los neutrófilos pueden ser vistos como a la vez útil y potencialmente perjudiciales. La defensa de los neutrófilos puede en algunos casos funcionar bien, reducen la carga bacteriana y pueden considerarse importante en la prevención de la lesión de gingivitis. Sin embargo, cuando hay una sobrecarga de la placa microbiana los neutrófilos y la barrera de las células epiteliales no serán suficientes para controlar la infección, en tales casos el tejido gingival se volverá muy inflamado y esto se ve clínicamente como gingivitis. La mayoría de las personas desarrollan signos clínicos de la gingivitis después de 10-20 días de la acumulación de placa. La gingivitis se presenta como enrojecimiento, inflamación y un aumento de la tendencia de la encía a sangrar al sondaje suave. En esta etapa la inflamación gingival es reversible si la placa se elimina mediante medidas de control eficaz de la placa. En las primeras etapas de la gingivitis, los cambios clínicos son muy sutiles. Sin embargo, el examen microscópico de los tejidos revela cambios histopatológicos, estos cambios incluyen alteraciones en la red de vasos sanguíneos y muchos lechos capilares están abiertos que de otro modo se cierra, se realiza un exudado de suero y proteínas a partir de la inflamación y hay un influjo de células inflamatorias o leucocitos en el tejido; las células inflamatorias incluyen linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Los macrófagos y los neutrófilos son células fagocíticas que digieren las bacterias, mientras que los linfocitos están implicados en la respuesta inmunológica celular o humoral contra los microorganismos (25).

La encía sana está completamente libre de signos histológicos de inflamación lo cual se le conoce como el estándar de oro de la salud, sin embargo esta norma es clínicamente muy difícil de lograr, en algunos se produce la

acumulación de placa en las denticiones incluso más limpias y saludable de las personas con encía clínicamente sana. La gingivitis clínicamente establecida no tiene pérdida ósea o la migración apical del epitelio a lo largo de la raíz. En la densidad de células del plasma histopatológico, es decir la densidad de células que producen anticuerpos sólo se encuentran del 10-30% de los leucocitos totales en la filtración. La periodontitis se caracteriza clínicamente por la migración apical del epitelio a lo largo de la superficie de la raíz o la pérdida de inserción clínica y bolsas periodontales más profunda así como la pérdida de la cresta ósea. Histopatológicamente es similar a la gingivitis crónica y hay una densidad mayor que el 50% de las células plasmáticas (1).

Dependiendo del individuo, la progresión de la gingivitis a periodontitis requiere cantidades variables de tiempo. Breck y col., (37) sugieren que en la situación normal pueden ser necesarios más de 6 meses para que la lesión de gingivitis evolucione a periodontitis, además este movimiento de gingivitis a periodontitis sólo se produce en un subconjunto de la población. La razón del por qué algunos pacientes desarrollan periodontitis más fácilmente que otros es muy difícil de explicar, se cree que es multifactorial. Debe tenerse en cuenta que los cambios durante la gingivitis son en gran medida reversibles, mientras que los que se observan durante la periodontitis como la pérdida de masa ósea y la migración apical de la adherencia epitelial son irreversibles. La periodontitis es una condición acumulativa y una vez que se pierde hueso es casi imposible de recuperar, la mayoría de los pacientes pierden hueso de soporte del diente gradualmente durante un período de años. Los peores efectos de la periodontitis se observan con frecuencia en los pacientes mayores más que en los jóvenes que aún tienen que desarrollar profundidad de bolsas periodontales y extensa pérdida ósea o la recesión gingival asociada que se produce en la periodontitis (25).

Los procesos patogénicos de las enfermedades periodontales son en gran parte el resultado de la respuesta del hospedero. Estos procesos destructivos son inducidos por las bacterias de la microbiota pero son llevados a cabo por las células del hospedero. El hospedero produce enzimas que descomponen el tejido, este es un proceso necesario que se inicia y se controla por el hospedero con el fin de eliminar bacterias que conforman la microbiota (30).

4.4 Microbiología de la enfermedad periodontal

En las muestras de placa subgingival de humanos se han encontrado alrededor de 400 o 600 especies de bacterias, de éstas posiblemente 10-20 especies pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad periodontal destructiva (25). Estas especies bacterianas deben ser capaces de colonizar con el fin de sobrevivir y dañar los tejidos periodontales. Para colonizar sitios subgingivales los microorganismos deben ser capaces de: 1) adherirse a los tejidos periodontales, 2) multiplicarse, 3) competir con otros microorganismos en su hábitat y 4) defenderse de los mecanismos de defensa del hospedero (38).

El área de surco gingival es un lugar ideal para el crecimiento microbiano, pero para habitarlo, una especie bacteriana debe superar una serie de obstáculos derivados del hospedero. Éstos incluyen los mecanismos de defensa innatos específicos tales como el desplazamiento mecánico, el flujo de saliva y el fluido gingival crevicular, estos fluidos ayudan a prevenir la colonización y pueden bloquear la unión de células bacterianas a las superficies dentales y tisulares. Algunos componentes de la saliva y el fluido crevicular de la encía pueden eliminar directamente a las bacterias. Si una bacteria evade con éxito los factores inhibidores presentes en la saliva y se une a una superficie en el área subgingival, hay otros mecanismos por superar como el desprendimiento de células epiteliales, los anticuerpos previenen la unión bacteriana, la apoptosis y la fagocitosis de bacterias por los neutrófilos. Si una especie bacteriana entra al tejido conectivo subyacente, se enfrentara a una multitud de células inmunológicas del hospedero incluyendo linfocitos B, T, neutrófilos, macrófagos, entre otros. En resumen, tener éxito, las bacterias deben de tener la capacidad de evadir todos los mecanismos de la respuesta de defensa que el hospedero despliega (25).

Cuando los factores de virulencia de las bacterias como LPS o ácido lipoteicoico están en contacto con las células del epiteliales del surco gingival, éstas producen defensinas y citocinas proinflamatorias (19). Los leucocitos como macrófagos y neutrófilos, producen péptidos antimicrobianos que dañan

la superficie de las bacterias permitiendo su eliminación (39). Es de gran importancia también la producción de IL-1 y TNF α , los cuales generan cambios vasculares, incrementan el calibre de los vasos sanguíneos e inducen la expresión de proteínas de adhesión celular. Adicionalmente producen IL-8, una citocina con actividad quimiotáctica para PMN. De esta forma los PMN son atraídos al sitio donde se acumulan las bacterias, salen de los vasos sanguíneos y se acumulan en el tejido conectivo adyacente al surco alterando el tejido conectivo adyacente al epitelio de unión. Muchos PMN se abren paso por los espacios intercelulares del epitelio de unión y salen al surco donde se degranulan (20), liberando reactivos del oxígeno (ROS) y enzimas como catepsina G, lactoferrina, defensinas, mieloperoxidasa, metaloproteinasas (MMP-8) y serina proteasas, todos estos reactivos biológicos son dañinos para las bacterias, también pueden ser para los tejidos periodontales y algún daño tisular microscópico puede esperarse. No obstante, el agente infeccioso es controlado en la mayoría de casos, el estímulo disminuye y se establece un balance de la respuesta inmunológica (26).

4.4.1 Microorganismos implicados en la enfermedad periodontal

La respuesta inflamatoria e inmunitaria es determinada por la presencia de patógenos periodontales (40) en gran medida bacilos Gram negativos anaerobios con un poco de cocos anaerobios y una gran cantidad de espiroquetas anaerobias, los principales organismos vinculados con lesiones periodontales profundas son destructivos como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola* (41).

P. gingivalis se detecta con mayor frecuencia en periodontitis severa del adulto, en formas destructivas de la enfermedad y en las lesiones activas que en la salud o la gingivitis o sujetos desdentados. En ellos se reducen en número en los sitios tratados con éxito, y se observa recurrencia de la enfermedad después de la terapia. Se ha demostrado que *P. gingivalis* induce respuestas elevadas de anticuerpos sistémicos y locales en sujetos con diversas formas de periodontitis (41). Los niveles de *P. intermedia* suelen ser elevados en ciertas formas de periodontitis, los anticuerpos séricos elevados contra esta especie se

han observado en algunos pero no todos los sujetos con periodontitis refractaria.

Bacteroides forsythus se ha encontrado en un mayor número de sitios en individuos que presentan enfermedad periodontal destructiva que en los que presentan gingivitis o sitios sanos, también se ha detectado con mayor frecuencia en lesiones periodontales activas (34).

En la periodontitis juvenil localizada, *A. actinomycetemcomitans* parece ser el patógeno periodontal predominante. Genco y col., (42) indicaron que los organismos de la microbiota normal juegan un papel clave en la gingivitis mientras que los organismos exógenos o microorganismos anaerobios más inusuales parecen estar implicados en la periodontitis. Aunque espiroquetas tales como *T. dentícola* son notoriamente difíciles de cultivar en el laboratorio, estos anaerobios estrictos pueden comprender más de 30% de la microbiota periodontal subgingival. Los patógenos mencionados anteriormente son siempre parte de una gran y variada microflora encontrada en la placa subgingival, algunos no se detectan en ciertos sitios con periodontitis y pueden incluso estar completamente ausentes en los cultivos de varios sitios en un paciente con periodontitis sin tratamiento (25).

E. coli y *S. thypimurium* son bacterias no frecuentes en la enfermedad periodontal como tal, pero son utilizadas para la estandarización de modelos de enfermedad periodontal ya que se ha comprobado que el LPS de estas bacterias ocasionan defectos óseos críticos mayores comparados con bacterias propias de la enfermedad.

4.5 Modelos animales de enfermedad periodontal

Como se ha mencionado anteriormente la periodontitis es una de las enfermedades con mayor prevalencia en los seres humanos, por lo tanto se han realizado estudios en modelos animales como ratas y ratones, los cuales presentan características similares en comparación con el humano, estos modelos facilitan la comprensión de los hallazgos inmunológicos que causan daño a los tejidos como consecuencia de la respuesta del hospedero, además de que son fáciles de manipular y no presentan alto costo para su alimentación.

Con éstos modelos se puede contribuir al desarrollo de herramientas de diagnóstico más precisos y estrategias terapéuticas periodontales más eficaces (32, 43, 44).

Existen diferentes modelos de estandarización de enfermedad periodontal como se muestra en la tabla 1. Uno de los modelos más utilizados es el de periodontitis inducida por inoculación de LPS de *S. Thypimurium* o *E. coli*, este modelo es considerado un método rápido para desarrollar la enfermedad periodontal en rata, el cual se realiza de forma bilateral en molares superiores e inferiores así como en incisivos inferiores, por lo general se utiliza un volumen de 20-30 µg de LPS el cual se inocula de 2 a 4 sesiones, al finalizar los modelos animales son sacrificados después de 8,7,15 o 30 días para observar la pérdida ósea en cortes histológicos, así como inmunohistoquímica para RANK y RANK-L, osteoprotegerina y osteoclastos encargados de la reabsorción ósea, de esta forma se compara el defecto óseo entre los grupos, con la finalidad de observar la enfermedad periodontal ocasionada en los diferentes tiempos (45, 46).

Existen otras alternativas para generar los defectos óseos como la realización de un defecto óseo mecánico y agregar componentes bacterianos o bacterias viables como *E. faecalis*, este modelo se realiza para obtener un defecto óseo crítico mayor y tener un mejor campo de visión para su regeneración que se puede realizar en otras líneas de investigación con diferentes materiales (43).

Tabla 1. Modelos para estudiar las bacterias en ratas Wistar

Modelo	Descripción
Ligadura en rata	La colocación de una ligadura conduce a la acumulación de la placa dental y microulceración del epitelio del surco que, a su vez, facilitan la invasión de patógenos periodontales en el tejido conectivo.
Infección de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> naturalmente coloniza la cavidad oral de las ratas, que puede ser examinado para establecer los factores de virulencia crítico para la colonización.
Oral Gavaje Experimental de la periodontitis	Varias cepas bacterianas asociadas con periodontitis en los seres humanos han sido utilizados en este modelo, incluyendo <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>Tannerella forsythia</i> y <i>Treponema denticola</i> . Típicamente, los ratones o ratas se les da un número conocido de bacterias en una suspensión viscosa (2% de carboximetilcelulosa) administrado por vía oral.
Inyección de lipopolisacárido	La inyección de LPS en los tejidos gingivales es un modelo para examinar la forma en la respuesta inmunológica innata a este componente bacteriano induce la inflamación para estimular la osteoclastogénesis y la pérdida ósea.
Calota	Se ha empleado para investigar el efecto de las bacterias sobre la resorción ósea, la actividad de resorción ósea de las células dendríticas y de interacciones de las bacterias en el tejido conectivo <i>in vivo</i> .
Defecto crítico de tamaño mandibular en rata	Fue desarrollado para estudiar el hueso de la mandíbula, ha sido útil para comparar la eficacia de diferentes materiales para aumentar la formación de hueso.

Tomada de Graves, Kang (38).

4.5.1 Modelo defecto óseo mecánico

En este tipo de modelo se genera un defecto óseo de manera intencional para colocar bacterias o sus componentes con el fin de obtener una mayor pérdida ósea periodontal, y así evaluar la capacidad de ciertos materiales para regenerar el defecto óseo creado (47-50).

Los animales más utilizados para estos modelos son: ratas, ratones, cerdos y conejos (51). Para la realización del defecto se recomienda la utilización de una pieza de alta velocidad o motor de laboratorio y fresas de carburo número 2 para el desgaste del hueso acompañado de abundante irrigación con solución salina, los defectos realizados mayores a 2 mm son considerados defectos críticos (2, 52, 53). Éstos no curan espontáneamente cuando se deja de tratar durante cierto tiempo o muestran menos del 10% de regeneración ósea durante la vida natural del animal (52, 54). Es por eso que los defectos mecánicos deben realizarse de mayor tamaño, se recomiendan de 1 a 2 mm y se recomienda la colocación materiales que promuevan la regeneración ósea en el periodonto.

4.5.2 Modelo de inducción con *Enterococcus faecalis*

Los enterococos son cocos Gram positivos que habitan en el tracto gastrointestinal, la cavidad oral y la vagina en los seres humanos como comensales normales (55). Estos son unos de los tres principales patógenos bacterianos nosocomiales y cepas resistentes a los antibióticos actualmente disponibles y plantean verdaderas dificultades terapéuticas (56, 57).

E. faecalis en la cavidad oral puede ser una fuente de infección, el estado de salud de la cavidad oral influye directa o indirectamente la colonización por *E. faecalis* (58). Este microorganismo en pacientes con periodontitis es favorecido por la presencia de la microbiota subgingival y la inflamación periodontal; las bolsas periodontales presentan un entorno muy rico para la colonización de *E. faecalis* que con el proceso inflamatorio persistente puede proporcionar una amplia gama de nutrientes y sitios de unión para el establecimiento de este microorganismo (57, 59).

E. faecalis posee varios factores de virulencia que pueden ocasionar inflamación periodontal y la destrucción de tejidos (60, 61). Estos factores de virulencia incluyen sustancias de agregación, las adhesinas de superficie, el ácido lipoteicoico y la producción de superóxido extracelular, enzimas líticas como la gelatinasa, hialuronidasa y elastasa, la toxina citolisina y las hemolisinas capaces de inducir disfunciones de neutrófilos (56, 62), cada una de ellas pueden estar asociadas con varias etapas de una enfermedad periodontal. *E. faecalis* puede aumentar la patogenicidad en infecciones mixtas con bacterias anaeróbicas (63, 64). Pero la correlación entre la prevalencia de este patógeno y la enfermedad periodontal no está clara, sólo un número limitado de estudios han evaluado la correlación entre la prevalencia de *E. faecalis* y las enfermedades periodontales (60, 61).

4.5.3 Modelo de inducción con lipopolisacárido (LPS)

4.5.3.1 LPS

El LPS es un constituyente de la pared celular de los organismos prácticamente todos Gram-negativos. Estas moléculas son conocidas por inducir el reclutamiento inflamatorio de las células es decir, leucocitos polimorfonucleares en filtración, edema, la dilatación vascular en el tejido periodontal inflamatoria, las prostaglandinas y secreción de citocinas, la producción de la enzima lítica, y la activación de osteoclastos (33). También se conoce que el LPS puede activar la respuesta inflamatoria y los osteoclastos a través del efecto directo en los leucocitos circulantes, con la participación de los osteoblastos a la pérdida ósea alveolar inicial (32).

El LPS bacteriano promueve significativamente la inflamación gingival y periodontal con el aumento de expresión de citocinas inflamatorias, la migración apical del epitelio de unión y los resultados de activación de la osteoclastogénesis en la resorción ósea alveolar, como se puede observar en la tabla 2. Dentro de los tejidos periodontales y gingival el fluido crevicular, la activación de monocitos, macrófagos, fibroblastos y células proinflamatorias produce citocinas, tales como IL-1 β , IL-6, y TNF α , estas citocinas conducen a la destrucción de tejidos a través de la degradación de los componentes de la

matriz. Este modelo ha sido utilizado para evaluar diferentes hipótesis sobre los mecanismos de destrucción del hueso alveolar debido a LPS bacteriano es uno de los factores más importantes para la inducción de la pérdida de masa ósea en la periodontitis (32, 43, 65).

4.5.3.2 LPS induce la resorción ósea

El LPS activa monocitos y macrófagos para producir citocinas tales como TNF α , IL-1, IL-6 que, a su vez, sirven como mediadores de inflamación endógenos. Se ha identificado un factor de transcripción TNF α inducido por el LPS (LITAF), el cual es un mediador en la expresión de citocinas inflamatorias en procesos inducidos por el LPS. LITAF se une a STAT6B, el cual es un miembro de la familia STAT6, al unirse esto dos factores ocasionan la modulación de la producción de TNF α (26, 66).

Los receptores de tipo Toll (TLRs) son componentes del sistema inmunológico innato, que reconocen la presencia de microorganismos invasores a través de moléculas tales como LPS. Estudios recientes indican que los TLR comparten la capacidad de obligar al factor intracelular de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (66).

El LPS interactúa con receptores Toll receptor 4 (TLR4) expresado en células de linaje de monocitos, tales como células dendríticas y macrófagos, así como en células derivadas del linaje de monocitos como los preosteoclastos y osteoclastos, activando una vía de señalización intracelular con algunos transductores de señales que desencadenan una consiguiente cascada de señalización de RANK como el factor 6 receptores asociado a TNF (TRAF6), o NF κ B o MAPKs (66).

En los preosteoclastos expuestos a LPS y a M-CSF pero no a RANKL se suprime la vía JNK y NF κ B, por lo cual no se expresa al factor nuclear de linfocitos T activados (NFATc1) que participa en la expresión de genes durante la diferenciación de los osteoclastos, pero en los preosteoclastos expuestos a LPS y RANKL se estimula la activación de NFATc1 vía JNK y NF κ B en la osteoclastogénesis. En los osteoclastos maduros en presencia de RANKL, el LPS promueve la supervivencia celular mediante la activación de otros

factores, Akt, NFkB, y ERK a través de MyD88, es decir que LPS pueden tener diferentes efectos sobre la osteoclastogénesis dependiendo de la etapa de diferenciación del preosteoclasto o de activación del osteoclasto (67).

Las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α secretadas por los fibroblastos, macrófagos, linfocitos TCD4⁺ y osteoblastos inducen la expresión de RANKL. La interacción de LPS con sus receptores CD14/TLR 4 provoca la secreción directa, producto de estas citocinas. Sin embargo en los linfocitos T la síntesis de RANKL es indirecta de la interacción con LPS ya que requieren de una célula presentadora de antígeno (CPA) como las células dendríticas, la regulación de la expresión RANKL en los linfocitos T requiere de dos señales: de la estimulación de su receptor TCR por un antígeno presentado por un MHC-II y del receptor CD28 localizado en la membrana CPA. En presencia de M-CSF, TNF α , IL-1 e IL-6 se inducen la síntesis de RANKL por los osteoblastos y se amplifica la secreción de M-CSF. En los osteoblastos la expresión de RANKL es mediada por 1,25 hidroxicolecalciferol, paratohormona, por PGE2 y por citocinas liberadas por los macrófagos (68).

El enlace del receptor RANK expresado en los osteoclastos indiferenciados o inactivos con RANKL impulsa la osteoclastogénesis y promueve la activación y supervivencia de los osteoclastos. Sin embargo, en los osteoblastos también se sintetiza y secreta una proteína, identificada como la osteoprotegerina (OPG), que se une específicamente a RANKL en su forma soluble o de membrana e inhibe competitivamente la interacción RANKL / RANK. En condiciones en las cuales la concentración de OPG sea mayor en relación con el nivel expresado de RANKL se presenta una inhibición entre la unión entre RANKL y RANK lo que genera disminución de la velocidad e intensidad de la osteoclastogénesis y se promueve la apoptosis de osteoclastos diferenciados y activados. Por lo tanto, el equilibrio entre la expresión RANKL y OPG es esencial para la determinación de la actividad osteoclastogénica en el hueso alveolar como se observa en la tabla 2 (67).

Tabla 2. Mediadores moleculares implicados en la pérdida de hueso periodontal.

Mediadores osteolíticos bacterianos		Mediadores osteolíticos inmunológicos	
LPS	Aumenta la expresión de RANKL por los osteoblastos. Estimula la producción de PGE2 por el osteoblasto. Estimula directamente la diferenciación y activación de los osteoclastos. Estimula la producción de citocinas proinflamatorias	Linfocitos T activados	Producción de RANKL
Peptidoglicano	Aumenta la expresión de RANKL por los osteoblastos. Estimula la producción de citocinas proinflamatorias	Linfocitos B Activados	Producción de RANKL
Ácidos Teicoicos y Lipoteicoicos	Estimula la producción de citocinas proinflamatorias	Monocitos/ Macrófagos	Expresan RANKL involucrados en reclutamiento de células precursoras de médula ósea. TNF α producida por monocitos locales RANKL+ promueve osteoclastogénesis. Pueden desarrollarse en osteoclastos al encontrarse con LTCD4 ⁺ activados.
Proteínas de choque térmico 60 de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Efecto osteolítico. Estimula la producción de citocinas proinflamatorias	Células Dendríticas	Células dendríticas maduras contribuyen indirectamente en la osteoclastogénesis. Células dendríticas que se diferencian en osteoclastos DDOC.
Colagenasas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Degradan colágeno Tipo I de la matriz extracelular	IL-1	Estimula producción de RANKL por osteoblastos contribuyendo a la diferenciación de osteoclastos
Proteasas de periodontopatógenos	Degradan proteínas de matriz extracelular	TNF α	Estimula producción de RANKL por osteoblastos contribuyendo a la diferenciación de osteoclastos
Polisacáridos capsulares	Estimula la producción de citocinas proinflamatorias	TNF β IL-6 IL-17 IL-15	Efecto indirecto en osteoclastogénesis por activar células inmunológicas involucradas en la secreción de RANKL.
Proteínas fimbriales	Estimula la producción de citocinas proinflamatorias		

Tomada de Moreno Correa and Contreras Rengifo (68).

4.6 Antecedentes

Troncoso, 2010 (65) menciona que la enfermedad periodontal puede ser inducida en ratas mediante la introducción de microorganismos patógenos, ya se ha reportado la inoculación de toxinas bacterianas (69, 70) observando que la enfermedad periodontal experimental desarrollada, presenta características similares a la que se presenta en humanos y por lo tanto puede ser utilizado para estudiar los mecanismos de progresión de la enfermedad (69) o incluso la evaluación de opciones para su tratamiento ya que son más precisos que los estudios *in vitro*(45).

Un modelo experimental proporcionado por Dimitrescu, 2004 (70) que induce la inflamación periodontal la cual presenta características similares a la enfermedad periodontal en los seres humanos con una inoculación de 10 µg/µl de LPS, *Salmonella typhimurium* en 15 ratas Wistar macho en papila interdental del primer y segundo molar por 7, 10 días y observaron un gran cantidad de osteoclastos.

Rogers, 2007 (71) menciona que los constituyentes bacterianos como LPS de bacterias Gram-negativas, pueden iniciar la pérdida ósea inflamatoria a través de la inducción de citocinas inflamatorias en el hospedero. Al realizar un estudio inmunohistoquímico en 18 ratas Sprague-Dawley hembras con inoculación de 10 µg/µL de LPS *A. actinomycetemcomitans* inoculando en encía palatina en primer, segundo y tercer molar observaron que se pueden iniciar la pérdida ósea alveolar a través de la inducción de citocinas inflamatorias IL-1-6, TNFα y osteoclastos, en ratas por 8 semanas.

Autores como Johnson, 2006 (64) reportaron que la pérdida de hueso alveolar ocasionada por LPS *E. coli* y el aumento en el número de osteoclastos se produjeron a los 7 días después de la inoculación, seguido por aumentos significativos después de 15 y 30 días post-inoculación. Además desarrollaron un modelo de 7 ratas Wistar macho con LPS *E.coli*, 25 µg/µl con micropipeta en el surco palatino de terceros molares maxilares se presentó mayor alteración en citocinas, IL1, fas ligando y todos los moduladores de inflamación.

Algunos investigadores como Horváthy, Schandl (72) realizaron un defecto óseo crítico en ratas en el hueso parietal con el mismo protocolo utilizado en

nuestro estudio, con la finalidad de regenerar el defecto óseo con suero y albúmina.

5 JUSTIFICACIÓN

Los modelos animales de ratas pueden imitar complejidades celulares que se producen en los seres humanos *in vivo* y son más precisos en estudios *in vitro*. Es de gran importancia enfocarnos en el defecto óseo ocasionado por bacterias o sus componentes celulares como el LPS en nuestro estudio y de esta forma poder comprender los diferentes procesos patológicos ocasionados en los tejidos periodontales y observar el infiltrado inflamatorio mediante cortes histológicos, así como la respuesta inmunológica del organismo ante las agresiones ocasionadas a los tejidos.

Nuestro modelo de estudio es de gran importancia porque al tener conocimiento y entendimiento de los cambios que suceden en el organismo durante la enfermedad periodontal, es posible buscar diferentes estrategias terapéuticas que sean eficaces para una regeneración del defecto óseo que afecta las estructuras del periodonto, y de esta forma poder conservar los órganos dentales en cavidad oral por un largo periodo de tiempo.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Establecer un modelo de enfermedad periodontal en rata Wistar

6.2 Objetivos Específicos

1. Identificar defectos óseos en mandíbula de rata Wistar con inoculación de LPS de *E. coli* o *Salmonella typhimurium* y *E. faecalis*
2. Promover el incremento de defectos mecánicos con inoculación de LPS de *E. coli* o *Salmonella typhimurium* y *E. faecalis* en mandíbula de rata Wistar.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de investigación

7.1 Tipos de estudio

Experimental, *in vivo*, prospectivo, transversal, comparativo.

7.2 Localización

Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAS.

7.3 Diseño experimental

Se usaron ratas hembras Wistar de 8 a 10 semanas de edad con un rango de peso de 250 a 350 gr. Se anestesiaron con 1 ml de cloroformo en un tiempo promedio de 2 a 4 minutos. Se realizaron dos modelos experimentales, uno realizando tres inoculaciones de 20 µg de LPS (a una concentración de 5 µg/µl) cada tercer día. LPS de *E. coli* (n=2), LPS de *S. thypimurium* (n=2), bacteria viable de *E. faecalis* (n=2), inoculando una concentración de 7×10^7 bacterias, grupo control con solución salina (n=2).

El segundo modelo consistió en la realización de un defecto óseo mecánico en la mandíbula con una fresa de carburo #2 inoculando 20 µg (a una concentración de 5 µg/µl), LPS de *E. coli* (n=2), LPS de *S. tiphimurium* (n=2), o bacteria viable *E. faecalis* (n=2), inoculando una concentración de 7×10^7 bacterias. Posteriormente se inoculó 2 veces más con separación de 3 días para la recuperación del animal. Al término de la última inoculación se dejaron a las ratas un periodo de 30 días para posteriormente sacrificarlas y tomar las mandíbulas para la realización del análisis histológico.

7.3.1 Modelo de inoculación

En el caso de LPS se inocularon 20 µg (a una concentración de 5 µg/µl) con una jeringa de insulina en la encía adherida colocando un volumen de 4 µl. Se realizaron 3 inoculaciones con LPS *E. coli*, o LPS *S. thypimurium*. En el caso de *E. faecalis*, se inoculó una concentración de 7×10^7 bacterias en 4 µl, de la misma manera se realizaron 3 inoculaciones cada tercer día, teniendo 2 ratas para cada grupo (figura 1).

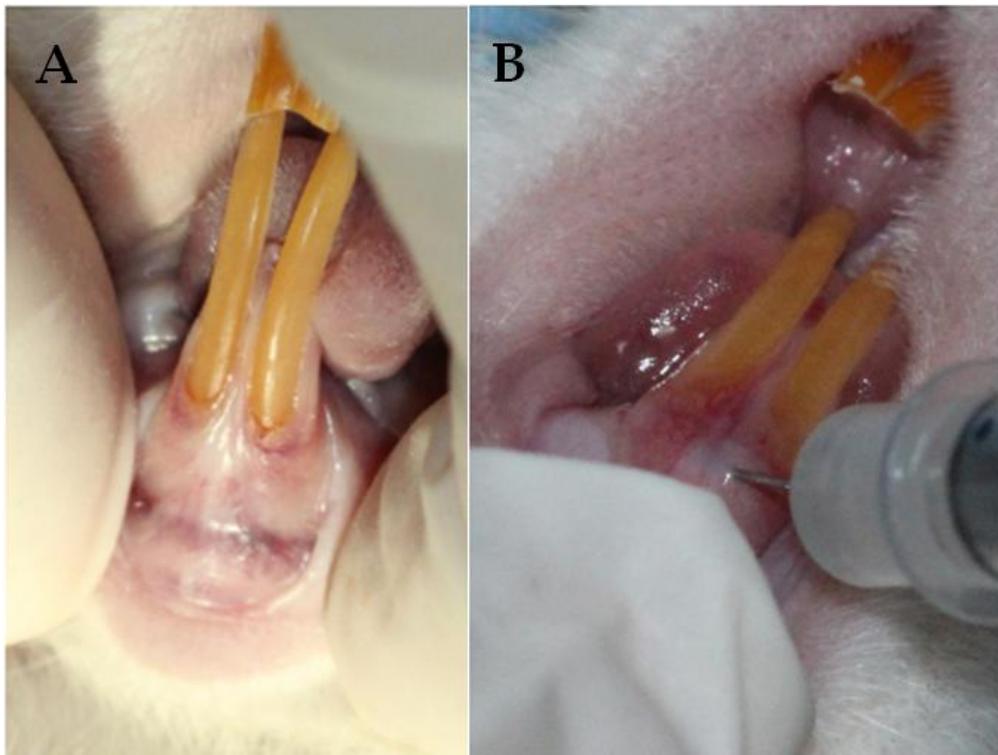


Figura 1. Modelo de inoculación. (A) mandíbula de rata Wistar (B) inoculación de LPS en la encía adherida.

La inoculación en la encía adherida, duró aproximadamente de 2 a 4 segundos, posteriormente se regresó la rata a su jaula para su recuperación.

7.3.2 Modelo con defecto óseo mecánico e inoculación

Se realizó incisión con una hoja de bisturí 15 C de una liberatriz en la parte distal del central inferior izquierdo (figura 2A), realizando el desprendimiento del colgajo de espesor total con un instrumento Allen (figura 2B), posteriormente se realizó el defecto óseo con un motor dremel (figura 2C) adaptado con una fresa de carburo #2 (figura 2C) el defecto se ejecutó a una longitud y profundidad de 1.5 mm (figura 2D y 2E) después se colocaron 4 μ l LPS de *E. coli* (n=2), *S. thypimurium* (n=2) (5 μ g/ μ l) o bacteria *E. faecalis* (7×10^7 bacterias, n=2) con una micropipeta correspondiente a cada grupo experimental (figura 2F). Al terminar el procedimiento se colocó una gota de cianocrilato tipo médico en un microbrush y se reposicionó el colgajo (figura 2G), para sustituir la sutura ya que el biotipo es muy delgado y los puntos de sutura se pueden desprender fácilmente, después se realizaron 2 inoculaciones de 4 μ l con una separación de 3 días.

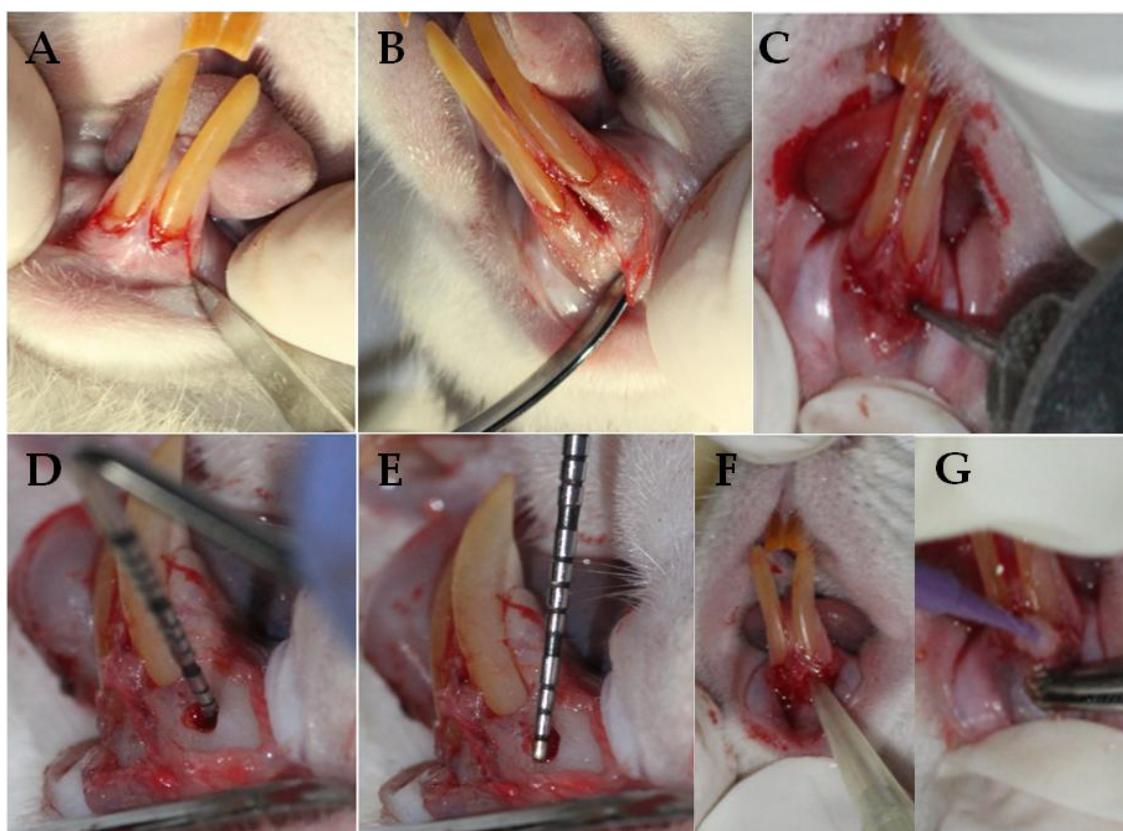


Figura 2. Desarrollo de defecto óseo mecánico. (A) incisión con bisturí hoja 15c. (B) exposición del hueso, (C) defecto óseo con fresa de carburo #2 (D, E) (F) (G)

profundidad y longitud del defecto 1.5 mm, (F) colocación de LPS E, (G) reposición del colgajo con cianocrilato tipo médico con microbrush.

7.3.3 Análisis Histológico

Las mandíbulas se colocaron en formaldehído al 37% por un periodo de 24 horas, después se colocaron en una gradilla para agregar ácido fórmico (Anexo 1) por tres días en una concentración de 1:10 respecto al tamaño de la muestra y se dejó por 3 días en ácido fórmico para la descalcificación como se muestra en (figura 3).

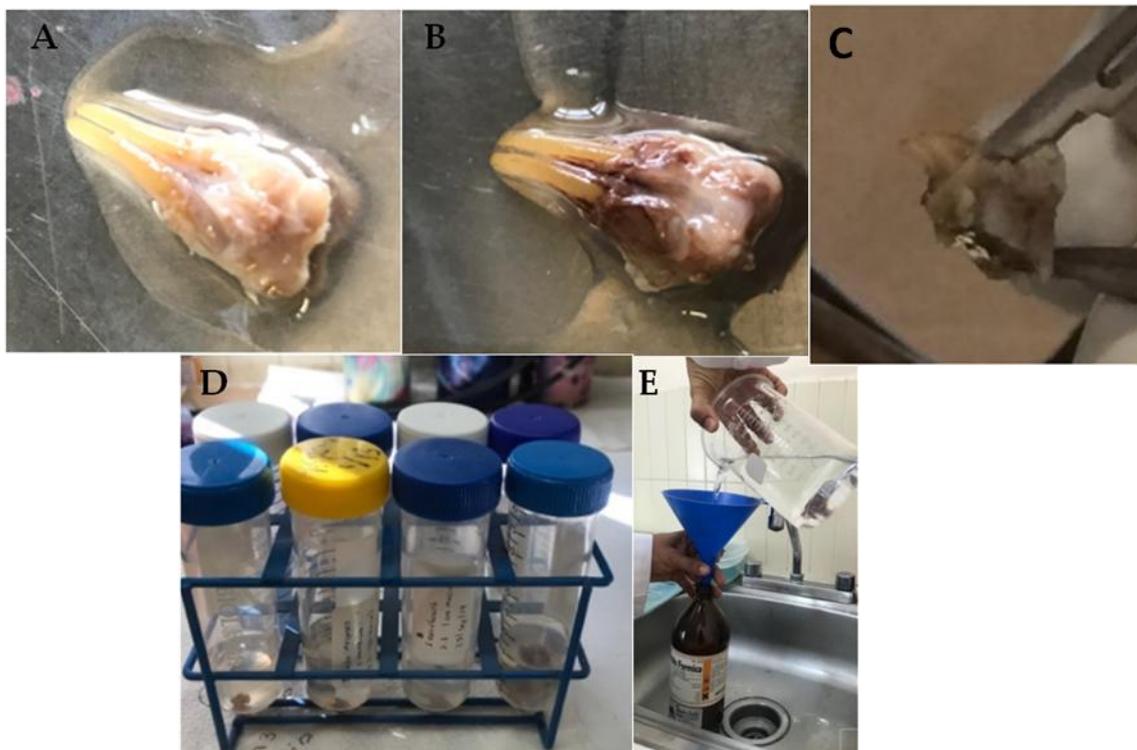


Figura 3. Descalcificación de las mandíbulas. (A) mandíbula con inoculación de LPS *S. thymurium*, (B) mandíbula con inoculación de LPS *E. coli*, (C) mandíbula con inoculación de LPS *E. coli*, (D) se colocaron en formaldehído 37% en una gradilla y se agregó (E) ácido fórmico.

Una vez descalcificados los tejidos (figura 4A) éstos se colocaron en casetes (figura 4B) para procesarlos en parafina (anexo 13.3), cambiándolos por los diferentes alcoholes cada hora con 9 horas de procedimiento (figura 4C), al terminar se calienta la parafina por 2 horas a una temperatura de 58 - 60° C (figura 5A y 5B), después se colocaron los casetes en un contenedor (figura 5C) el cual se agitó cada 10 minutos por 2 horas para que los cortes se embebieran en parafina. Se dejó a temperatura ambiente por 2 horas y se colocan en frío para realizar los cortes para el análisis histológico (figura E). Al finalizar se realizaron secciones con un micrótopo manual (Beltronic) de 5 µm (figura 5D).

Los cortes se tomaron con un porta objetos y se colocaron en solución de agarosa a baño maría de 40 - 45° C (figura 5F). Posteriormente se colocaron en una gradilla de portaobjetos para meter al horno de 60° C por una hora (figura 5G).

Es necesario realizar la tinción de H&E (anexo 13.4) de inmediato para la conservación del tejido (figura 6A y 6B).



Figura 4. Procesamiento de las mandíbulas. (A) muestra con ácido fórmico, (B) las mandíbulas se seccionaron y se colocaron en casete, (C) se procesó por diferentes alcoholes por 9 horas.

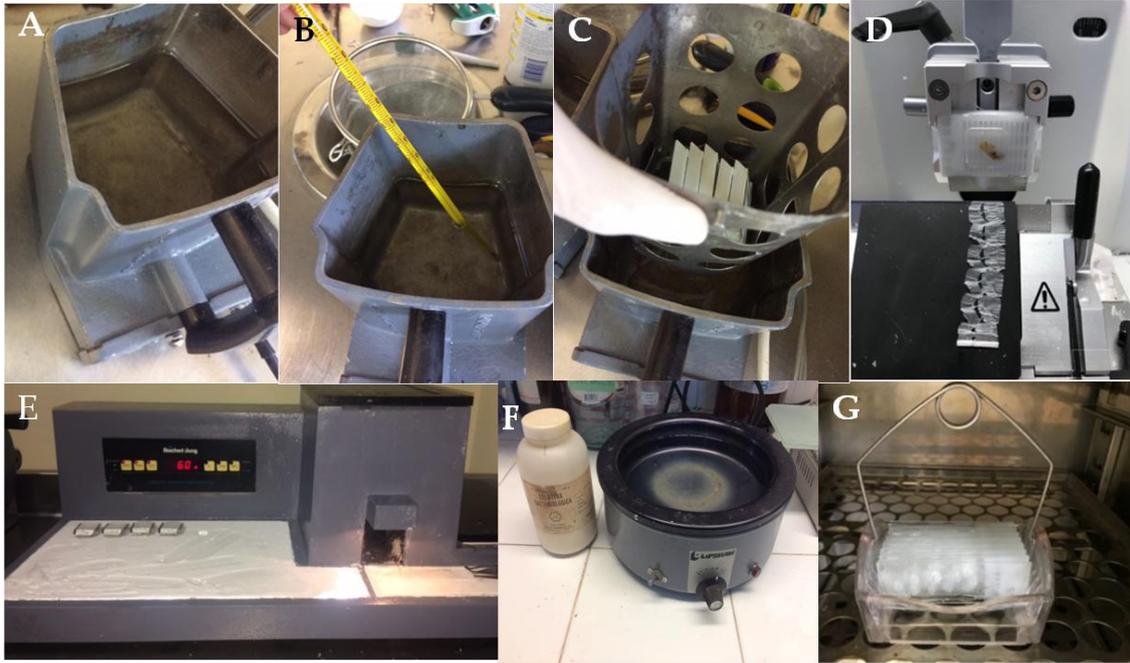


Figura 5: Colocación de las mandíbulas en parafina. (A, B) Parafina caliente a 60 °C, (C) Se colocaron los casetes en un contenedor y se agitaron cada 10 minutos por 2 horas, (E) se colocaron los tejidos en frío a 60 °C, (D) se realizaron los cortes con el micrótopo a 5 μ de grosor, (F) se colocaron los cortes en solución de agarosa para que se fijaran al portaobjetos, (G) se colocaron en un porta laminillas y se llevaron a calor por 60 °C en una hora, después se realizó la tinción con H&E (figura 6).

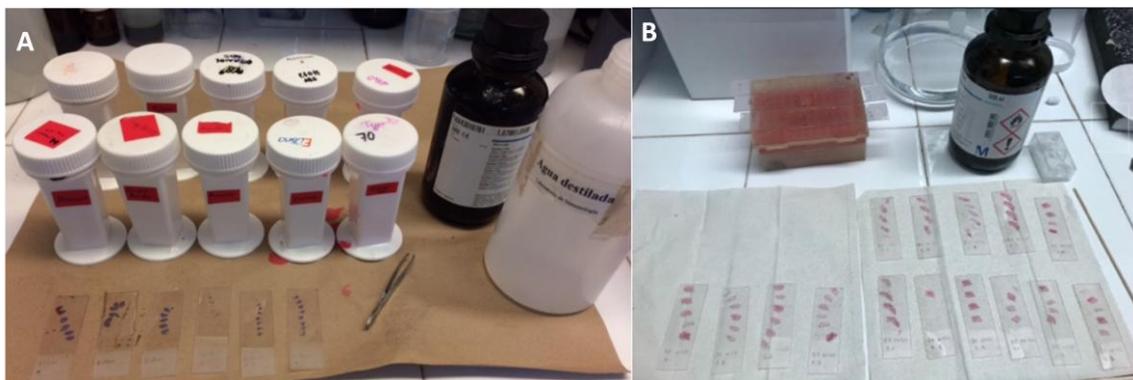


Figura 6. Tinción de los cortes. (A, B) tinción con H&E y se colocó entellan

8 RESULTADOS

La inoculación de LPS de *E. coli* y bacteria de *E. faecalis* indujeron pérdida de hueso severa a los 30 días, mientras que los grupos control se mantuvieron sin cambios.

En los resultados histológicos del grupo control, no presentó ninguna alteración en los tejidos periodontales (figura 7 A, B), mientras que en el grupo tratado con inoculación LPS *E.coli* a los 30 días (figura 9), es posible observar la pérdida de continuidad del ligamento periodontal en la unión esmalte-dentina, la cual es una característica de la enfermedad periodontal en humanos, macroscópicamente observamos la pérdida ósea inducida por el LPS (figura 10). En el grupo inoculado con bacteria viable de *E. faecalis*, histológicamente se observó una gran cantidad de células gigantes multinucleadas (macrófagos), las cuales son las principales células del sistema inmunológico que tienen como función la fagocitosis de bacterias y otros microorganismos (figura 14). Se decidió no desprender la encía en uno de los modelos (n=2) al momento del sacrificio para descartar que el desprendimiento de la misma fuera un factor que no permitiera observar el infiltrado inflamatorio en los tejidos por la manipulación realizada (figura 13). Debido a la presencia de macrófagos en el tejido se puede pensar en una pérdida ósea, sin embargo histológicamente no fue posible observarla.

No fue posible lograr un incremento del defecto óseo mecánico con la inoculación del LPS, lo cual podría deberse al tipo de anestesia utilizada, ya que ésta limitaba el tiempo de trabajo al realizar la inoculaciones, las cuales debían ser llevadas a cabo de forma rápida para evitar que el animal se despertara, otro factor posible pudiera ser el volumen de inoculación.

8.1 Modelo de inoculación

En el grupo control se observaron los tejidos periodontales antes de la realización de piloto (figura 7-A), se realizó la comparación macroscópica a los 30 días del modelo de estudio, sin presentar ningún cambio en tejidos blandos y óseos (figura 7-B).

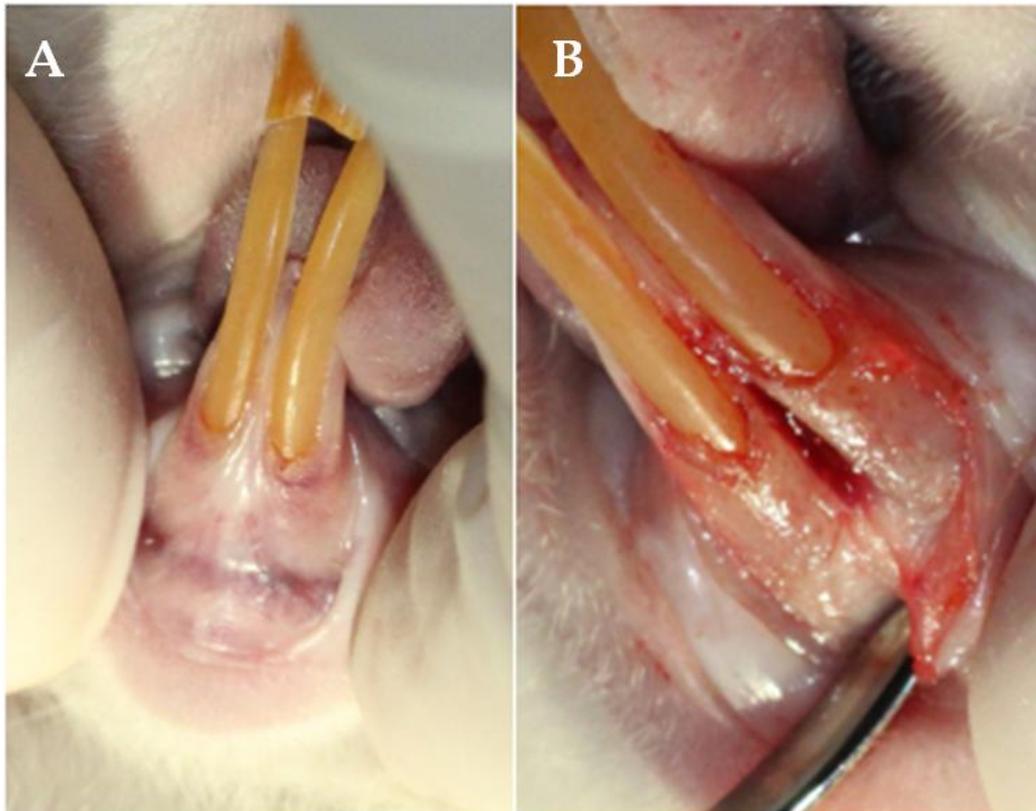


Figura 7. Grupo control con solución salina. (A) encía sana antes de la inoculación, (B) fotografía 30 días después de la inoculación.

En los cortes histológicos los tejidos se encontraron sin infiltrado inflamatorio y en su posición original, además es posible apreciar los tejidos periodontales como: dentina, ligamento periodontal y hueso alveolar (figura 8).

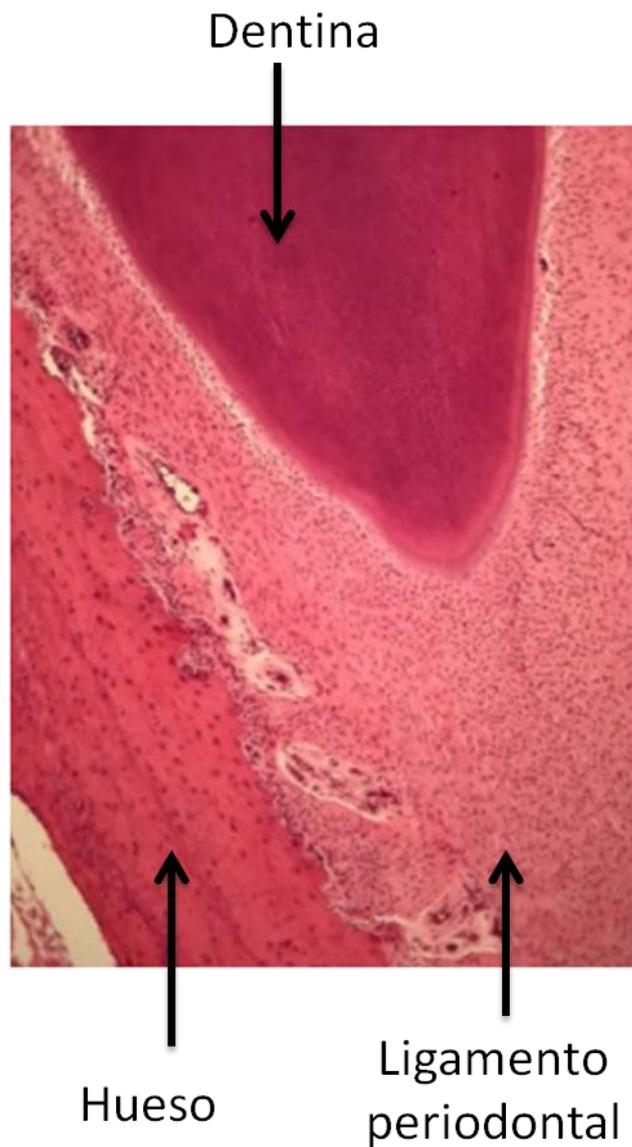


Figura 8. Histología del grupo control. Se observaron los tejidos periodontales sanos a una magnificación de 4x.

En el grupo de LPS *E. coli* se observaron los tejidos periodontales antes de la realización de piloto (figura 9-A), posteriormente se realizó la comparación macroscópica a los 30 días del modelo de estudio, donde se puede observar un defecto óseo crítico (figura 9-B y 9C).

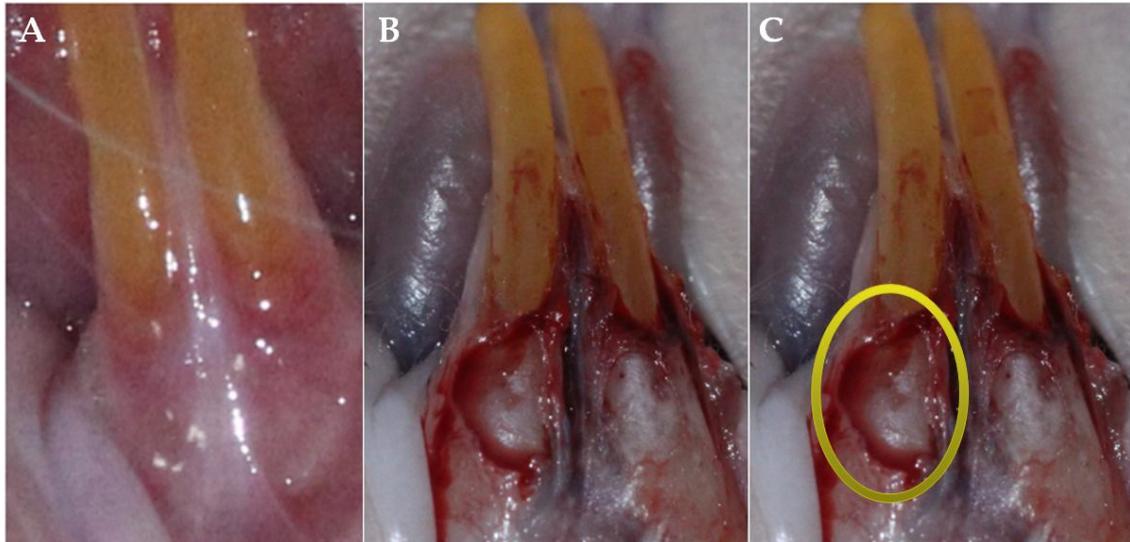


Figura 9. Defecto óseo con LPS *E. coli*. (A) Encía sana antes de la inoculación, (B, C) 30 días después de la inoculación. Es posible observar la pérdida ósea dentro del círculo (C).

En los cortes histológicos se observó una pérdida de continuidad del ligamento periodontal debajo de la unión esmalte-dentina (círculo azul), no se observó infiltrado inflamatorio, sin embargo si es posible apreciar los tejidos periodontales (figura 10).

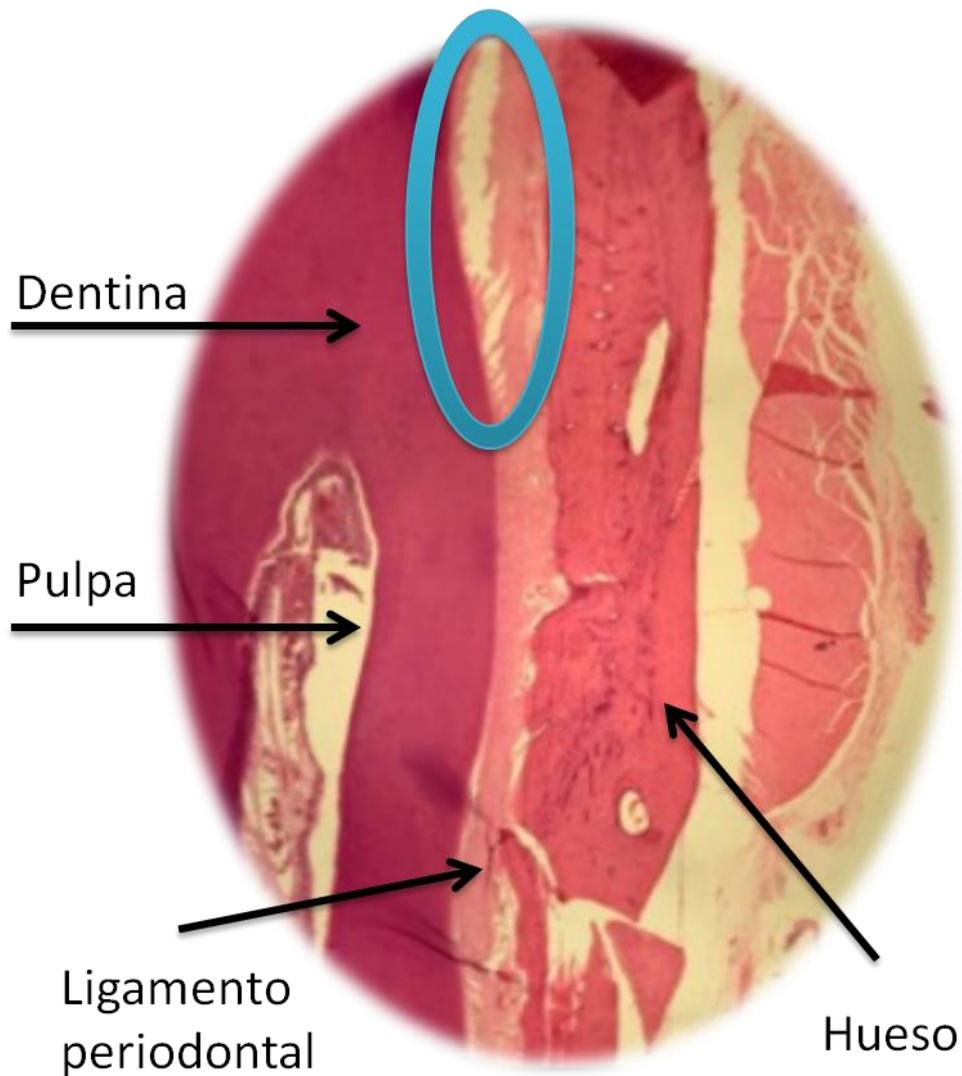


Figura 10. Histología de inoculación LPS *E. coli*. Se observa la pulpa dental, dentina, hueso y ligamento periodontal, en la parte superior encerrado en un círculo azul se puede ver una pérdida de continuidad del LP a una magnificación de 4x.

En el grupo de LPS *S. thypimurium* se observaron los tejidos periodontales antes de la realización de piloto (figura 11-A), se realizó la comparación macroscópica a los 30 días del modelo de estudio, no observando ningún cambio en tejidos blandos y óseos (figura 11-B).

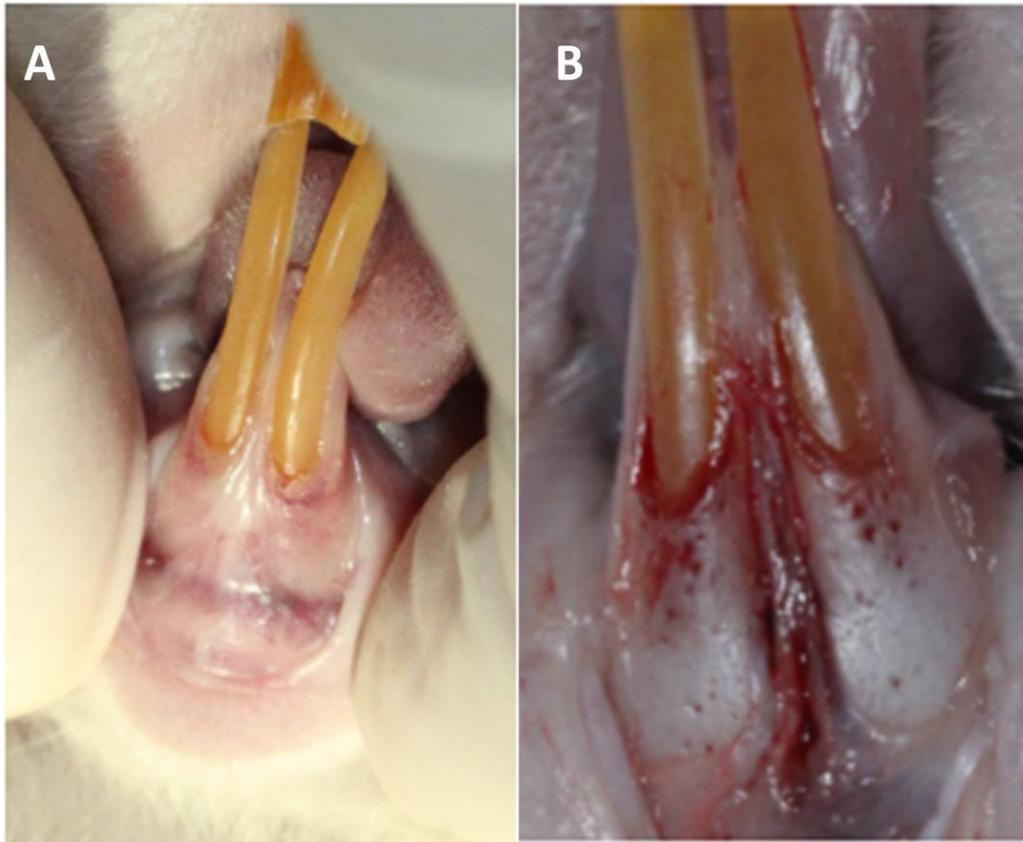


Figura 11. Inoculación de LPS con *S. thypimurium*. (A) encía sana antes de la inoculación, (B) fotografía 30 días después de la inoculación.

En los cortes histológicos no se observó infiltrado inflamatorio ni alteraciones en los tejidos periodontales como: dentina, ligamento periodontal y hueso alveolar (figura 12).

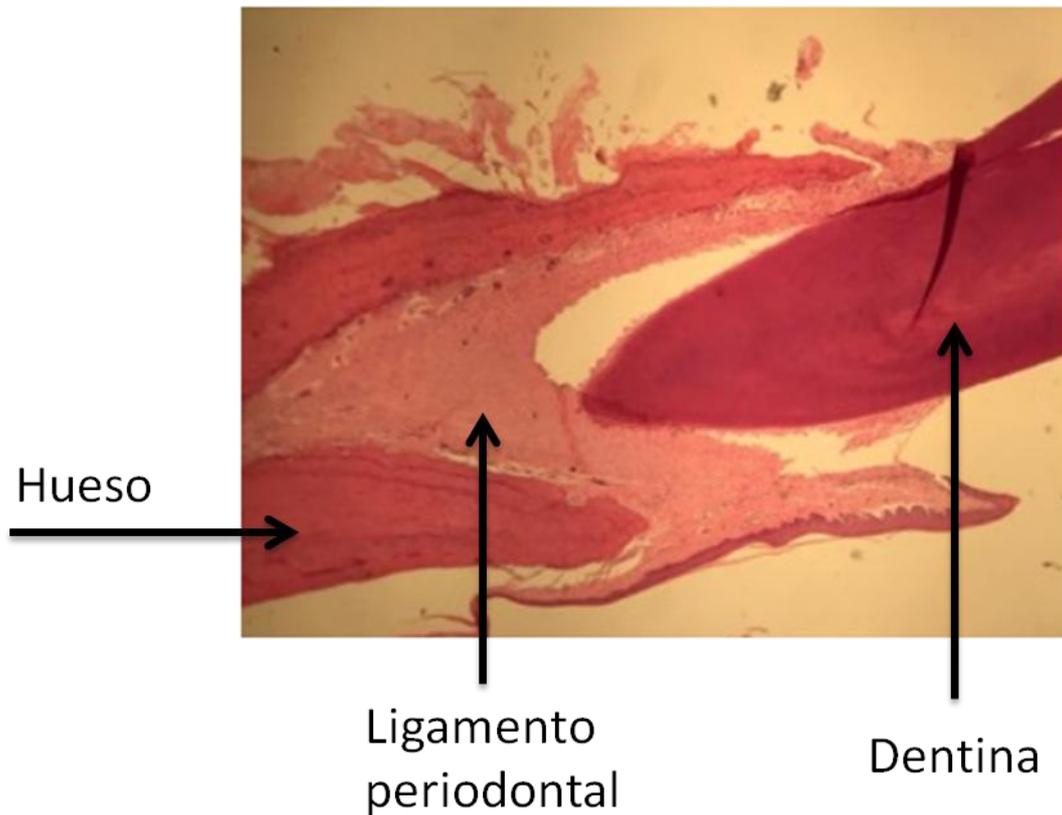


Figura 12. Histología de inoculación de *S. thypimurium*. Se observaron los tejidos periodontales sanos, sin presencia de células inflamatorias a una magnificación de 4x.

En el grupo de inoculación con bacteria viable *E. faecalis* fue posible observar los tejidos antes de la realización de piloto (figura 13-A), se realizó la comparación macroscópica de los tejidos blandos a los 30 días del procedimiento, en este modelo no se desprendió la encía para observar macroscópicamente, con la finalidad de descartar que el desprendimiento de la encía afecta en los cortes histológicos para observar la presencia de infiltrado inflamatorio (figura 13-B).

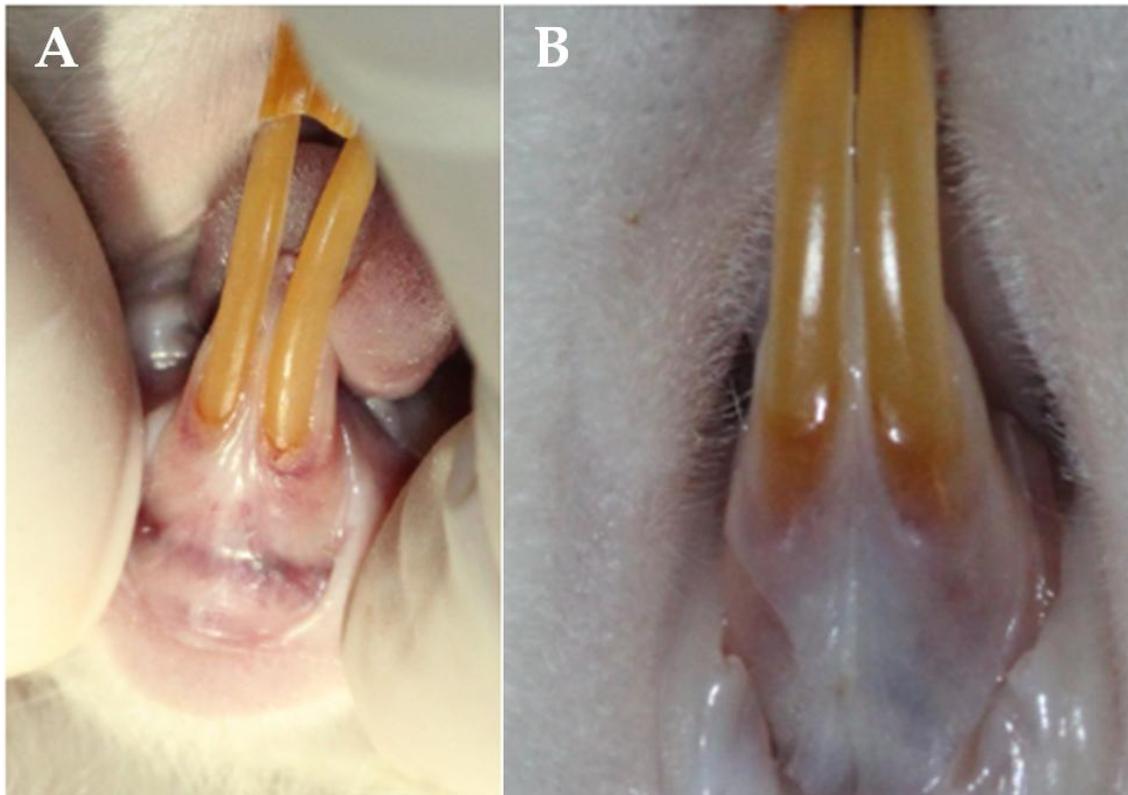


Figura 13. Inoculación de *E. faecalis*. (A) encía sana antes de la inoculación, (B) fotografía después de los 30 días de la inoculación.

En los cortes histológicos los tejidos se observó infiltrado inflamatorio, así como una gran cantidad de células gigantes multinucleadas (macrófagos), se considera que este modelo sí presenta una pérdida ósea por la presencia de los macrófagos, aunque no se puede observar el defecto óseo histológicamente (figura 14).

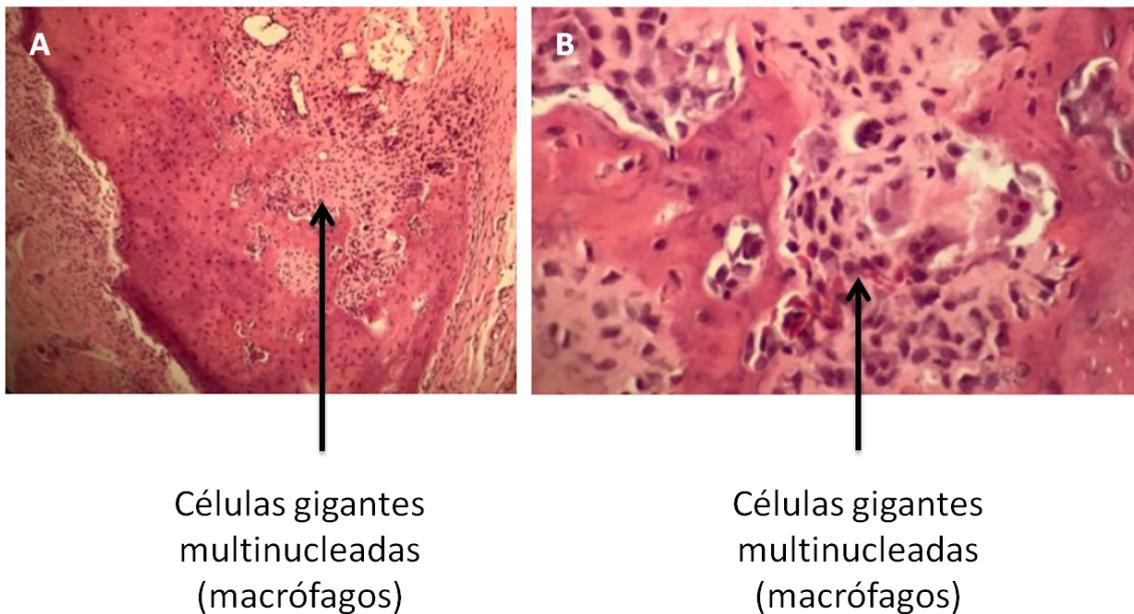


Figura 14. Inoculación con bacteria *E. faecalis*. En la figura (A) se observó la presencia de células gigantes multinucleadas (macrófagos) a 100x, (B) acercamiento de las células gigantes multinucleadas, a una magnificación de 4x.

8.2 Modelo con defecto óseo mecánico e inoculación

En el grupo de defecto mecánico con inoculación de LPS de *E. coli* se observaron los tejidos y la realización del defecto óseo (figura 15-A), se realizó la comparación macroscópica a los 30 días del modelo de estudio, observándose únicamente la pérdida de la cresta ósea (figura 15-B).

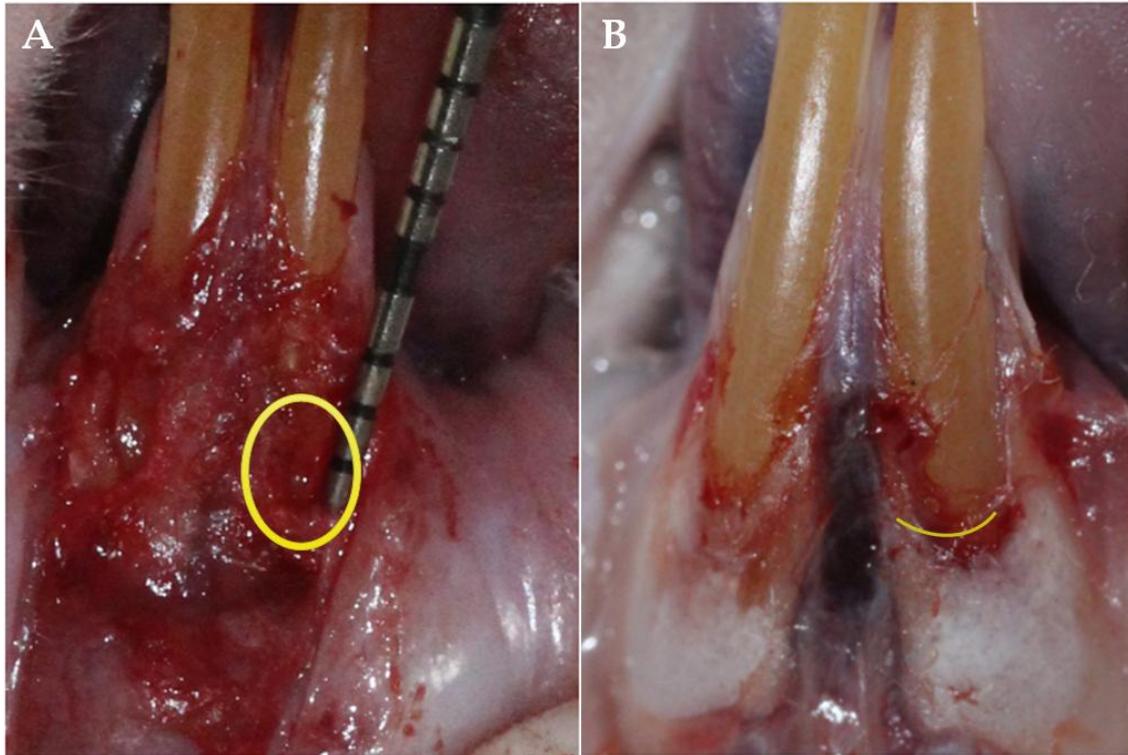


Figura 15. Defecto óseo mecánico con LPS *E. coli*. (A) defecto óseo mecánico realizado en la primera cita, (B) macroscópicamente se observó una pérdida de la cresta ósea a los 30 días.

En los cortes histológicos se puede observar el defecto óseo realizado de forma mecánica (flecha negra), sin embargo no se observó un defecto óseo magnificado, los tejidos no muestran infiltrado inflamatorio ni alteraciones en los tejidos periodontales (figura 16).

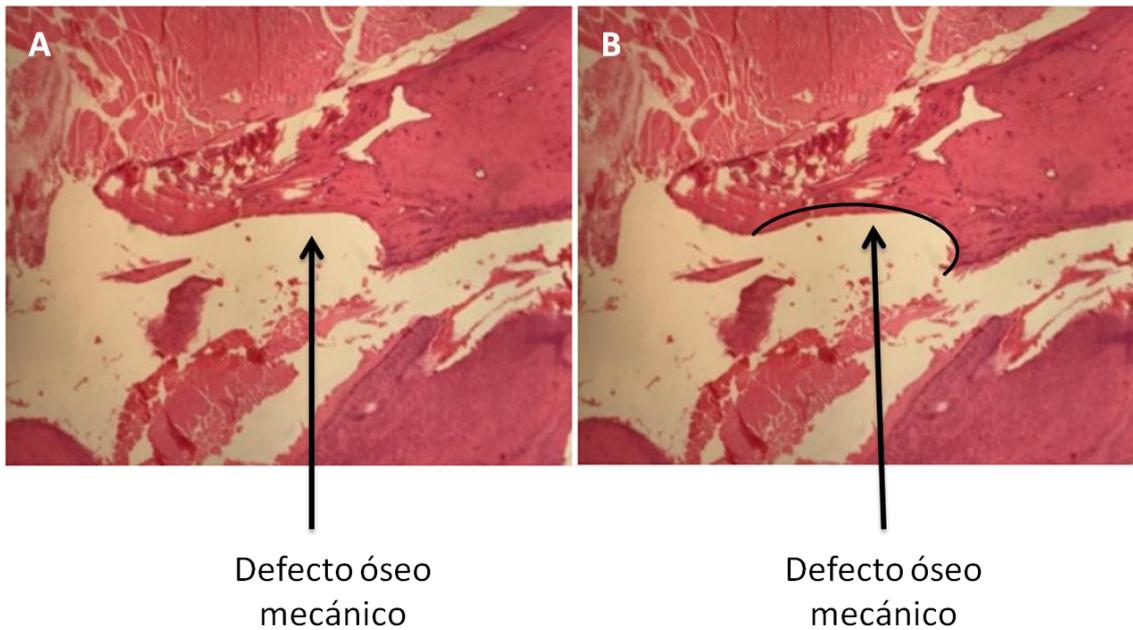


Figura 16. Histología de defecto óseo mecánico con LPS *E.coli* (A, B) se muestra el defecto óseo mecánico con la flecha negra, sin embargo no se observa una magnificación del defecto 30 días después del piloto a una magnificación de 4x.

En el grupo de defecto mecánico con inoculación de LPS de *E. S. thypimurium* se pueden observar los tejidos y la realización del defecto óseo (figura 17-A), se realizó la comparación macroscópica a los 30 días del modelo de estudio, observándose solamente la pérdida de la cresta ósea (figura 17-B).

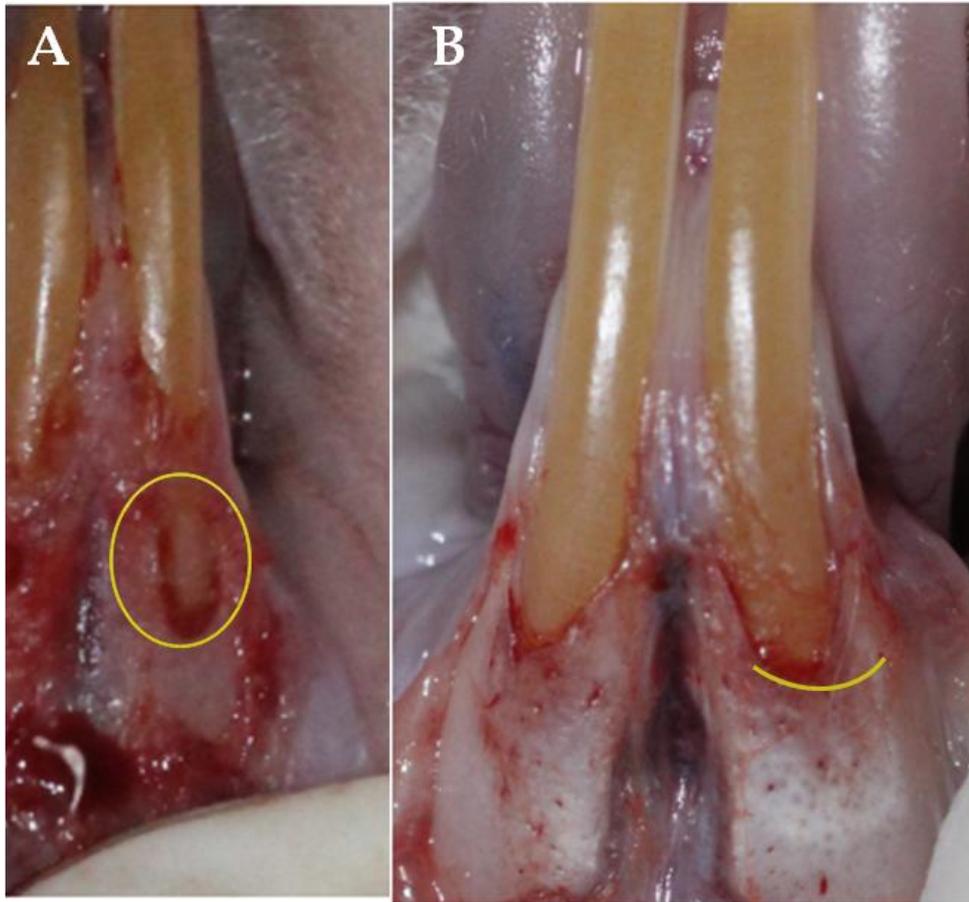


Figura 17. Defecto óseo mecánico con LPS *S. thypimurium*. (A) defecto óseo mecánico realizado en la primera cita, B) macroscópicamente se observó una pérdida de la cresta ósea a los 30 días.

En los cortes histológicos se observó el defecto óseo realizado de forma mecánica (flecha negra), sin embargo no se observa un defecto óseo magnificado, los tejidos se encuentran sin infiltrado inflamatorio y sin alteraciones en los tejidos periodontales (figura 18).

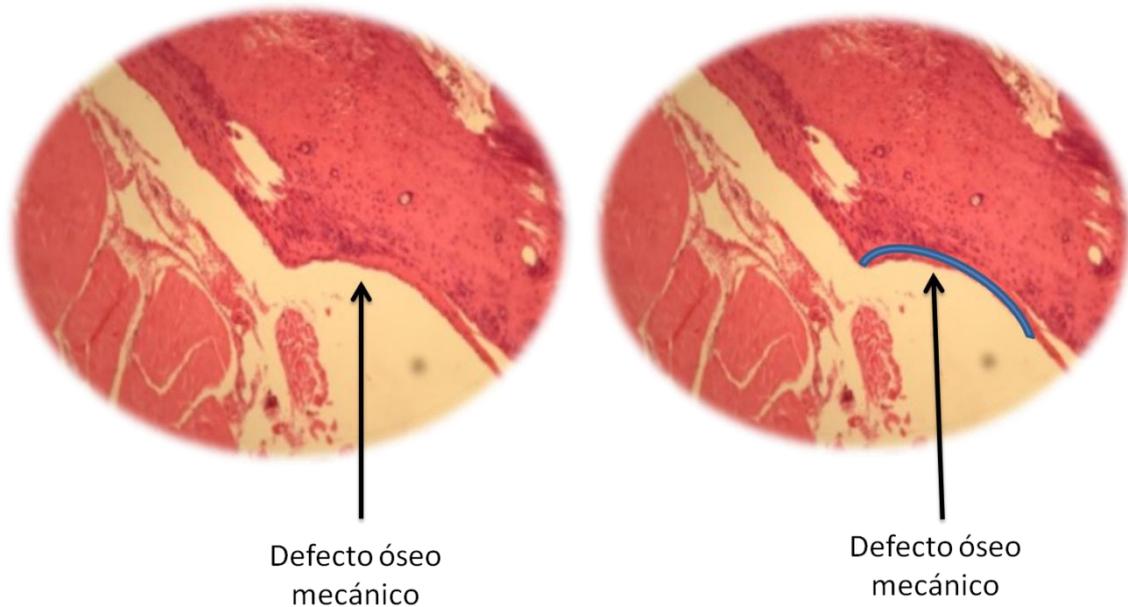


Figura 18. Histología de defecto óseo con LPS *S. thypimurium*. (A, B) se observa el defecto óseo mecánico con la flecha negra, no se observa una magnificación del defecto 30 días después del piloto, a una magnificación de 4x.

En el grupo de defecto mecánico con inoculación de bacteria *E. Faecalis* se observaron los tejidos y la realización del defecto óseo encerrado con un círculo amarillo (figura 19-A), se realizó la comparación macroscópica de los tejidos blandos a los 30 días del procedimiento, en este modelo no se desprendió la encía para su observación macroscópica, con la finalidad de descartar que el desprendimiento de la encía afectara los cortes histológicos y la observación de la presencia de infiltrado inflamatorio (figura 19-B).

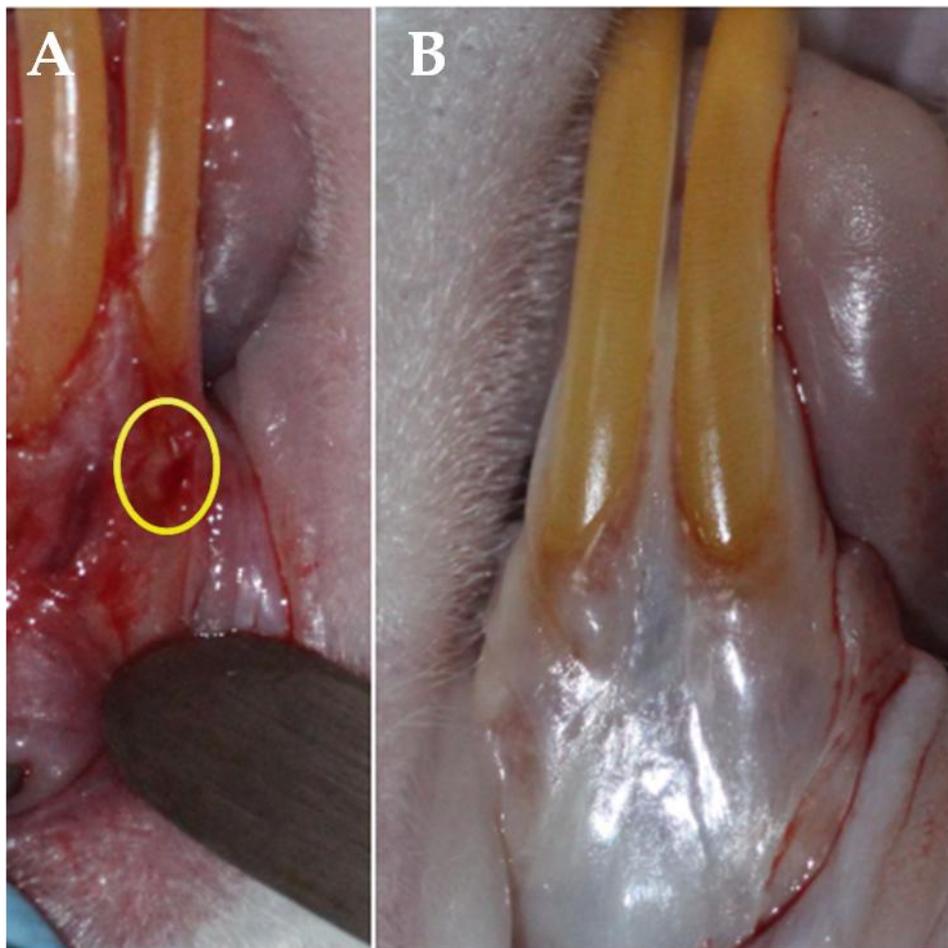


Figura 19. Defecto óseo mecánico con *E. faecalis*. (A) defecto óseo mecánico realizado en la primera intervención, (B) tejidos periodontales sin inflamación a los 30 días del procedimiento.

En los cortes histológicos se muestra un defecto óseo realizado de forma mecánica (flecha negra), sin embargo no se observó un defecto óseo magnificado, los tejidos se encuentran sin infiltrado inflamatorio y sin alteraciones en los tejidos periodontales (figura 20).

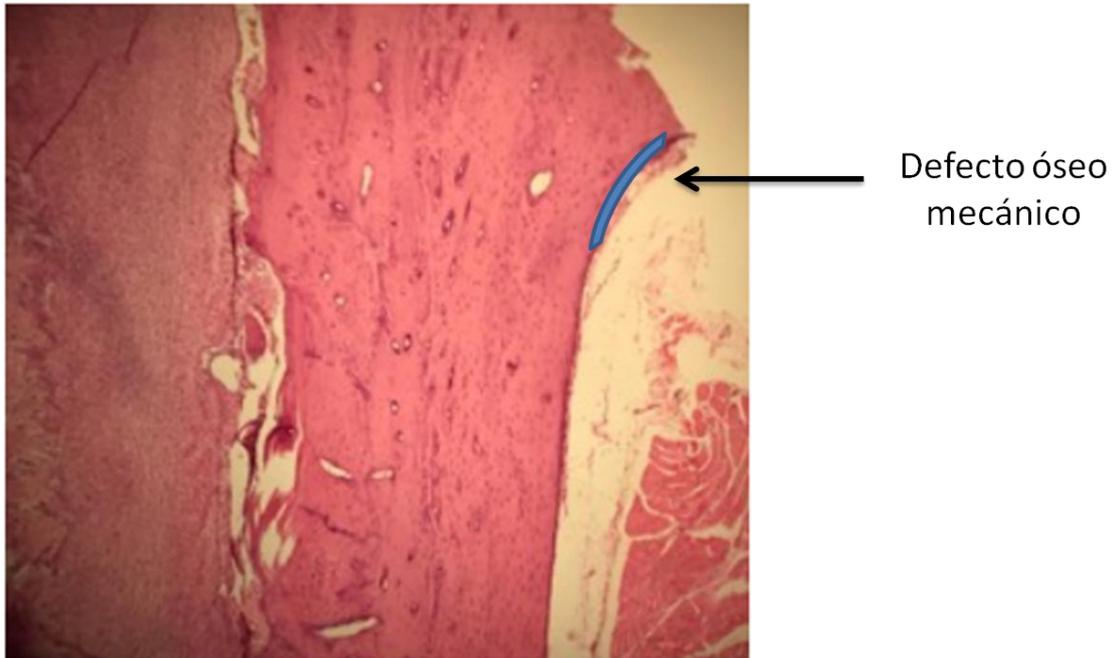


Figura 20. Histología de defecto óseo mecánico con inoculación de bacteria *E. faecalis*. Se observó el defecto óseo mecánico con la flecha negra, no se observó una magnificación del defecto 30 días después del piloto a una magnificación de 40x.

9 DISCUSIÓN

Se ha demostrado que el LPS es proinflamatorio, estimula fuertemente la reabsorción ósea mediante la producción y liberación de citocinas (73), los LPS más utilizados para estandarizar modelos de enfermedad periodontal en ratas son *E. coli* y *S. thypimurium*, los cuales no son frecuentes en cavidad oral, además en nuestro estudio se decidió utilizar bacteria *E. faecalis* ya que Troncoso, 2010 (65), mencionan que la enfermedad periodontal puede ser inducida en ratas por la introducción de microorganismos patógenos.

Por lo tanto estamos en desacuerdo con Garrison, 1988 (74) quien menciona que *S. thypimurium* no es un microorganismo oral usual, por eso que se optó por utilizarlo como estímulo inflamatorio. Aun así en su estudio histológico, se observaron muchas de las características de la periodontitis humana, en particular la migración apical del epitelio de unión, la degradación del colágeno y la pérdida ósea alveolar significativa utilizando 10 µg/µl de LPS *S. thypimurium* en la papila de primero y segundo molar superior, a diferencia de los resultados obtenidos en nuestro estudio, en los cuales no se presentaron las mismas características, no se observó un defecto óseo con el LPS.

De la misma manera nuestros resultados contrastan con Dumitrescu, Abd El-Aleem (70) quienes inocularon 10 µg/µl de LPS *S. thypimurium* en ratas Wistar en primer y segundo molar a los 7, 10, 15 días observando pérdida ósea e inflamación. En nuestro estudio no mostró estos hallazgos, incluso inoculando el doble de la concentración que dichos autores utilizaron.

Concordamos con Rogers, Li (71) quienes reportaron pérdida ósea a los 10 días de inocular LPS *E. coli* en ratas Wistar, observando una inflamación de los tejidos, similar a nuestros resultados, aunque nosotros lo observamos a un periodo de 30 días, un periodo similar al reportado por Gulle, 2014 (46) quienes realizaron inoculación en ratas Wistar en palatino de primer y segundo molar con LPS *E. coli* por 3 semanas, teniendo como resultado cambios histológicos de pérdida ósea parecida a la enfermedad humana; en nuestro estudio también se demostró pérdida ósea macroscópicamente.

10 CONCLUSIONES

En el presente estudio, hemos establecido un modelo de enfermedad periodontal en ratas Wistar mediante la inoculación de bacteria viable de *E. faecalis* así como LPS de *E. coli* ya que a los 30 días se observó una pérdida ósea evidente tanto clínica como histológicamente.

En los modelos de defecto óseo mecánico con inoculación de LPS *E. coli*, *S. thypimurium* o *E. faecalis* no se observó un aumento en el tamaño del mismo, consideramos que la realización del defecto es una limitación ya que no es fisiológico por lo tanto el sistema inmunológico promueve su osteointegración.

Los resultados obtenidos con LPS de *E.coli* y bacteria de *E. faecalis* tienen gran similitud a la enfermedad periodontal humana, por lo tanto se puede utilizar para el estudio de los mecanismos de la inflamación y la pérdida ósea en periodontitis.

11 PERSPECTIVAS

Complementario a este estudio, se recomienda realizar nuevamente el modelo periodontal con la utilización de una anestesia diferente al cloroformo, ya que no se logra obtener un estado de anestesia profunda y consideramos que por la premura para trabajar el modelo se realiza una incorrecta inoculación, además del deceso de modelos animales. Incluso podría considerarse el disminuir la cantidad de volumen inoculado con la finalidad de colocarlo en su totalidad. Sería interesante complementar el estudio con mediciones del defecto periodontal al iniciar y finalizar el procedimiento para realizar un análisis estadístico, a su vez elaborar estudios de inmunohistoquímica, para observar la presencia de: RANK, RANK-L, osteoprotegerina, IFN γ , así como una tinción TRACP para identificar los osteoclastos presentes en el defecto óseo realizado.

Consideramos que sería de interés la realización del defecto óseo más apical para su fácil identificación, ya que su realización a nivel de la encía marginal en la mayoría de los modelos realizados el daño fue en la cresta ósea y es difícil de interpretar en algunas imágenes macroscópicas al sacrificar los modelos animales, de esta forma se podrán utilizar diferentes materiales para la regeneración ósea en futuras investigaciones.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Avery JK, Chiego Jr DJ. Principios de histología y embriología con orientación clínica 2007.
2. Li Y, Nan X, Zhong T-Y, Li T, Li A. Treatment of Periodontal Bone Defects with Stem Cells from Inflammatory Dental Pulp Tissues in Miniature Swine. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019;1-10.
3. Stepaniuk K, Hinrichs JE. Systemic manifestations of periodontal disease. *Veterinary periodontology*. 2012;81-90.
4. Terlemez A, Alan R, Gezgin O. Evaluation of the Periodontal Disease Effect on Pulp Volume. *Journal of endodontics*. 2018;44(1):111-4.
5. Gómez AA. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Universitas Odontológica*. 2006;25(57):26-33.
6. Delgado Pichel A, Inarejos Montesinos P, Herrero Climent M. Espacio biológico: Parte I: La inserción diente-encía. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2001;13(2):101-8.
7. Carranza FA, Sznajder NG. Compendio de periodoncia: Ed. Médica Panamericana; 1996.
8. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology: Elsevier health sciences; 2011.
9. Satchell P, Gutmann J, Witherspoon D. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *International endodontic journal*. 2003;36(4):237-45.
10. Coll HAS, Jiménez MS, Castro NC. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *CES Odontología*. 2015;28(2):112-8.
11. Ortún-Terrazas J, Cegoñino J, Santana-Penín U, Santana-Mora U, del Palomar AP. Approach towards the porous fibrous structure of the periodontal ligament using micro-computerized tomography and finite element analysis. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2018;79:135-49.
12. Menicanin D, Bartold PM, Zannettino AC, Gronthos S. Genomic profiling of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2009;5(1):36-50.
13. García Ballesta C, Pérez Lajarín L, Cortés Lillo O. Alteraciones radiculares en las lesiones traumáticas del ligamento periodontal: revisión sistemática. *Rcoe*. 2003;8(2):197-208.
14. Arce RM. Terapia periodontal del futuro. *Colombia médica*. 2004;35(3):40-7.
15. Gómez APA, Rodríguez AMO, Ramírez AFV, Acuña BJH, Ruiz CA, Rojas CAB, et al. Fundamentos de la odontología: periodoncia: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
16. Soto J, Moreno S, Moreno F. Antropología dental y periodoncia: Relación entre los rasgos morfológicos dentales y la enfermedad periodontal. *Acta Odontológica Venezolana*. 2014;48(3).

17. Jeffcoat M, Jeffcoat R, Jens S, Captain K. A new periodontal probe with automated cemento-enamel junction detection. *Journal of clinical periodontology*. 1986;13(4):276-80.
18. Hoffmann T, Gaengler P. Clinical and patho-morphological investigation of spontaneously occurring Seriodontal isease in dogs. *Journal of small animal practice*. 1996;37(10):471-9.
19. Shinoda H, Takeyama S, Suzuki K, Murakami S, Yamada S. Pharmacological topics of bone metabolism: a novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis. *Journal of pharmacological sciences*. 2008;106(4):555-8.
20. Bosshardt D. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *Journal of dental research*. 2005;84(5):390-406.
21. Pérez D, Bolaños A, Davideau J. La respuesta inmunológica innata y la destrucción del tejido óseo en la enfermedad periodontal. Revisión de la literatura. *Acta odontológica venezolana*. 2013;51(2):37-8.
22. Harvey JD. Periodontal Microbiology. *Dental Clinics of North America*. 2017;61(2):253-69.
23. Sharma A, Raman A, PRADEEP AR. Role of 1% alendronate gel as adjunct to mechanical therapy in the treatment of chronic periodontitis among smokers. *Journal of Applied Oral Science*. 2017;25(3):243-9.
24. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal*. 2009;54:S11-S26.
25. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2001;25(1):8-20.
26. Botero JE. Respuesta inmune en las enfermedades del periodonto: desde salud hasta enfermedad y sus implicaciones terapéuticas. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*. 2009;21(1).
27. Fujita T, Yoshimoto T, Kajiya M, Ouhara K, Matsuda S, Takemura T, et al. Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease. *Japanese Dental Science Review*. 2018;54(2):66-75.
28. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *Journal of periodontology*. 1965;36(3):177-87.
29. Ciancio SG, Mather ML, McMullen JA. An evaluation of minocycline in patients with periodontal disease. *Journal of periodontology*. 1980;51(9):530-4.
30. Lindhe J NS. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. *Clinical of perriodontology*. 1975;2:67-79.
31. Rams TE, van Winkelhoff AJ. Introduction to Clinical Microbiology for the General Dentist. *Dental Clinics*. 2017;61(2):179-97.
32. de Molon RS, de Avila ED, Cirelli JA. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2013;4(4):211-8.

33. Mingfeng D, Xiaodong M, Yue L, Taikui P, Lei X, Ming L. Effects of PPAR- γ agonist treatment on LPS-induced mastitis in rats. *Inflammation*. 2014;37(6):1919-24.
34. Genco R, Zambon J, Christersson L. The origin of periodontal infections. *Advances in dental research*. 1988;2(2):245-59.
35. O'Brien-Simpson NM, Holden JA, Lenzo JC, Tan Y, Brammar GC, Walsh KA, et al. A therapeutic *Porphyromonas gingivalis* gingipain vaccine induces neutralising IgG1 antibodies that protect against experimental periodontitis. *NPJ vaccines*. 2016;1:16022.
36. Biolcati E, Carranza Jr F, Cabrini R. Variaciones y Alteraciones De La Queratinizacion En Encias Humanas Clinicamente Sana. *Rev Asoc Odontol Argent*. 1953;41:446.
37. Rutherford R, Niekrash C, Kennedy J, Charette M. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *Journal of periodontal research*. 1992;27(4):285-90.
38. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Frontiers of oral biology*. 2012;15:117-32.
39. Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases. *Salud publica de Mexico*. 2006;48(1):62-71.
40. Reithe P, Stoll B. The effect of chlorhexidine gluconate on plaque and gingivitis. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*. 1977;32(9):753-4.
41. Mahanonda R, Seymour G, Powell L, Good M, Halliday J. Effect of initial treatment of chronic inflammatory periodontal disease on the frequency of peripheral blood T-lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. *Oral microbiology and immunology*. 1991;6(4):221-7.
42. Schenkein HA, Genco RJ. Gingival fluid and serum in periodontal diseases: II. Evidence for cleavage of complement components C3, C3 proactivator (factor B) and C4 in gingival fluid. *Journal of periodontology*. 1977;48(12):778-84.
43. Do M-J, Kim K, Lee H, Cha S, Seo T, Park H-J, et al. Development of animal experimental periodontitis models. *Journal of periodontal & implant science*. 2013;43(4):147-52.
44. Ionel A, Lucaciu O, Moga M, Buhatel D, Ilea A, Tabaran F, et al. Periodontal disease induced in Wistar rats-experimental study. *Human and Veterinary Medicine*. 2015;7(2):90-5.
45. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa Jr C. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Periodontal Disease*. 15: Karger Publishers; 2012. p. 117-32.
46. Gulle K, Akpolat M, Kurcer Z, Cengiz M, Baba F, Acikgoz S. Multi-organ injuries caused by lipopolysaccharide-induced periodontal inflammation in rats: role of melatonin. *Journal of periodontal research*. 2014;49(6):736-41.

47. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1999;367:S59-S67.
48. Miller MQ, McColl LF, Arul MR, Nip J, Madhu V, Beck G, et al. Assessment of Hedgehog Signaling Pathway Activation for Craniofacial Bone Regeneration in a Critical-Sized Rat Mandibular Defect. *JAMA facial plastic surgery*. 2019;21(2):110-7.
49. Illueca FMA, Vera PB, Cabanilles P, Fernanades V, Loscos F. Periodontal regeneration in clinical practice. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:382-92.
50. Greenwell H. Committee on Research, Science and Therapy, American Academy of Periodontology. Position paper: Guidelines for periodontal therapy *Periodontol*. 2001;72:1624-8.
51. Knothe UR, Dolejs S, Miller RM, Tate MLK. Effects of mechanical loading patterns, bone graft, and proximity to periosteum on bone defect healing. *Journal of Biomechanics*. 2010;43(14):2728-37.
52. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*. 2012;7(10):1918.
53. Goldman H, Shuman A. A technic for the therapy of the two-walled osseous defect. *Periodontics*. 1968;6(2):88-9.
54. Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2008;85(1):206-17.
55. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(2):239.
56. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004;15(5):308-20.
57. Souto R, Colombo APV. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Archives of oral biology*. 2008;53(2):155-60.
58. Souto R, Andrade AFBd, Uzeda M, Colombo APV. Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37(3):208-15.
59. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.
60. Colombo AV, Barbosa GM, Higashi D, di Micheli G, Rodrigues PH, Simionato MRL. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from

subjects with periodontitis and periodontal health. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(10):1592-600.

61. Balaei-Gajan E, Shirmohammadi A, Abashov R, Agazadeh M, Faramarzie M. Detection of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(4):e667-70.

62. Huycke MM, Joyce W, Wack MF. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Infectious Diseases*. 1996;173(3):743-5.

63. Brook I. Effect of *Streptococcus faecalis* on the growth of *Bacteroides* species and anaerobic cocci in mixed infection. *Surgery*. 1988;103(1):107-10.

64. Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2006;32(10):946-50.

65. Troncoso CM, Castillo-Ruiz M, Daille L, Fuentesvilla I, Bittner M. Co-detección de Patógenos Periodontales en Pacientes Chilenos con Periodontitis Crónica. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 2010;3(3):118-22.

66. Tang X, Metzger D, Leeman S, Amar S. LPS-induced TNF- α factor (LITAF)-deficient mice express reduced LPS-induced cytokine: evidence for LITAF-dependent LPS signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(37):13777-82.

67. Inarejos Montesinos P. Participación de los mediadores de la respuesta inmune inflamatoria en la resorcion del hueso alveolar durante la periodontitis cronica-revision de literatura 2013.

68. Moreno Correa S, Contreras Rengifo A. Mecanismos moleculares implicados en la destrucción ósea en la periodontitis: Revisión de la literatura. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 2013;6(3):142-7.

69. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *Journal of periodontology*. 1991;62(1):59-73.

70. Dumitrescu AL, Abd El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *Journal of Clinical Periodontology*. 2004;31(8):596-603.

71. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa Jr C, Bronson P, Krieder JM, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *Journal of periodontology*. 2007;78(3):550-8.

72. Horváthy DB, Schandl K, Schwarz CM, Renner K, Hornyák I, Szabó BT, et al. Serum albumin-coated bone allograft (BoneAlbumin) results in faster bone formation and mechanically stronger bone in aging rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2019.

73. Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *Journal of endodontics*. 2004;30(2):88-91.
74. Garrison SW, Nichols FC. Gamma interferon modulation of prostaglandin E2 release from monocytes stimulated with lipopolysaccharides from *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides gingivalis*, and *Salmonella typhimurium*. *Oral microbiology and immunology*. 1988;3(3):138-43.
75. Fuentes Paredes FdM, Yanavilca M, Amelia R, Rosales Fernández AL, Tarmeño C, Alberto R. *Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón*. 2010.

13 ANEXO

13.1 Cuidado y manejo de los animales

El manejo cotidiano y durante los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud-2014 y a las normas de salud NOM-062-ZOO-1999, las cuales buscan:

(Evitar al máximo el sufrimiento de los animales, usar un procedimiento que garantice una muerte sin sufrimiento al momento de sacrificar un animal, proporcionar un máximo de comodidad, excepto cuando las variables experimentales justifiquen la situación, proteger al personal de laboratorio involucrado en el cuidado de animales)

Para ello se previno e identificó en las ratas de laboratorio signos de enfermedad, conducta anormal, dolor y sufrimiento. Se les proporcionó alimento estéril y agua potable *ad libitum*, condiciones de temperatura y ventilación adecuadas, también fueron sexados y agrupados de acuerdo a las condiciones y necesidades que se requirieron (75).

Las jaulas donde fueron alojadas contaron con diversos registros para un adecuado control y se acondicionaron con aserrín para favorecer su aislamiento térmico y construcción de nido, garantizar la absorción de su orina, excremento, desperdicio de agua y facilitar la salinización. Además la limpieza de las jaulas se realizó de manera periódica y los desechos, el manejo de cadáveres y residuos patológicos se llevaron a cabo acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 para los Residuos peligrosos biológicos infecciosos (75).

13.2 Preparación de ácido fórmico en agua, 1000 ml

25 ml de formol al 40%

Agregar agua destilada hasta 950 ml

Adicionar ácido fórmico concentrado 25 ml

13.3 Procesamiento de muestras en parafina

Una vez descalcificados los tejidos, se colocaron en casetes para procesarlos en parafina, siguiendo los pasos (16 horas): etanol 70%, dos cambios, etanol 80%, etanol 95%, etanol absoluto, etanol-xileno 1:1, xileno, todos son con un cambio por una hora de cada sustancia, se colocó en parafina (58 - 60° C), dos cambios en una hora embeber los tejidos en moldes para parafina

El cambio se realizó todos los días hasta terminar la descalcificación (de uno a siete días para bloques óseos medios, según la concentración del ácido) las mandíbulas se descalcificaron con 3 días, en nuestro caso no se realizó el cambio de ácido fórmico.

13.4 Tinción de hematoxilina & eosina

Método de tinción de rutina en histología y citología. Es una tinción basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateína, formada por oxidación de la hematoxilina. Este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una gradación entre el rosa, y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente). Se consigue así un buen contraste de las preparaciones microscópicas facilitando su observación.

Preparar el frotis bacteriano

Teñir el frotis de cristal violeta durante 1 minuto

Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante

Cubrir la preparación con lugol durante 1 minuto

Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso de lugol

Lavar con alcohol-acetona la preparación para eliminar el primer colorante

Lavar de nuevo con agua destilada para retirar los restos de alcohol/acetona

Teñir la preparación con safranina durante 1 minuto

Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante

Secar la preparación al aire

Observar al microscopio óptico y finalmente identificar como Gram positivos y Gram negativos.