



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

Secretaría de Investigación y Posgrado

**CAMBIOS MORFOLÓGICOS DEL SUBNÚCLEO *ORALIS* DE RATAS
DIABÉTICAS CON INDUCCIÓN DE PERIODONTITIS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS ESTOMATOLÓGICAS CON TERMINAL EN ORTODONCIA

PRESENTA:

PERAL LEMUS ANAHI CATALINA

ID:215450006

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. en C. Julia Flores Tochihuitl

ID:100228022

DIRECTORES DISCIPLINARIOS:

C. D. E. O. Víctor Hernández Vidal

ID:100378833

M.P. Samantha Rivera Macías

ID:100518803

DIRECTOR METODOLÓGICO:

M.S.P. Rosendo Carrasco Gutiérrez

ID:100008655

Junio de 2017

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Antecedentes generales	3
3.1.1 Diabetes Mellitus	3
3.1.2 Relación Enfermedad Periodontal y Diabetes	4
3.1.3 Obesidad-diabetes-enfermedad periodontal.....	6
3.1.4 Ligamento periodontal y mecanorreceptores.....	7
3.1.5 Ratas Zucker: modelo biológico de obesidad y diabetes.....	8
3.2. Antecedentes específicos.....	9
4.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
5.JUSTIFICACIÓN.....	12
6.HIPÓTESIS.....	13
7. OBJETIVOS.....	13
7.1 Objetivo general.....	13
7.2.Objetivos específicos	13
8. MATERIAL Y METODO	14
8.1. Diseño de estudio.....	14
8.2. Definición de población	14

8.3 Selección de la muestra.....	15
8.4 Criterios de selección de la muestra.....	15
8.4.1. Inclusión	15
8.4.2. Exclusión	16
8.4.3. Eliminación	16
8.5 Diseño y tipo de muestreo	16
8.5.1 Definición de variables y escalas de medición.....	17
8.6 Método de recolección de datos	19
8.6.1 Fuentes primarias	19
8.7 Ubicación espacio temporal.....	19
8.8 Técnicas y procedimientos.....	19
8.8.1 Marcaje de los animales	19
8.8.2. Esquema de trabajo	20
8.8.3 Valoración basal de las ratas Zucker diabéticas y obesas.....	21
8.8.4 Producción experimental de periodontitis en las ratas Zucker y Sprague- Dawley.....	21
8.8.5 Análisis histopatológico.....	21
8.8.6 Evaluación de la morfología neuronal a través de la tinción de Golgi-Cox	22
8.8.7 Recursos materiales	24
8.8.8 Recursos financieros.....	25
8.8.9 Bioética.....	25

9. ANALISIS ESTADISTICO.....	25
10. RESULTADOS	26
11. DISCUSIÓN.....	36
12. CONCLUSIONES.....	40
13. BIBLIOGRAFIA.....	41

ABREVIATURAS

AGE. Productos finales de glicosilacion.

DM. Diabetes Mellitus.

EP. Enfermedad Periodontal.

GT. Ganglio Trigeminal.

IL. Interleucina.

NMT. Núcleos Mesencefálicos Trigeminales.

MIF. Inhibidor de la migración de macrófago.

MMP. Metaloproteinasa.

PGE. Prostaglandinas.

PMN. Polimorfonucleares.

RANKL. Activador del receptor del factor Kappa.

ROS. Especies reactivas de oxígeno.

SnO. Subnúcleo Oralis.

SnI. Subnúcleo Interpolaris.

SnP. Subnúcleo Principal.

TNF. Factor Necrótico Tumoral.

1. RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM-2) y la enfermedad periodontal (EP) son enfermedades crónicas que afectan a millones de personas en el mundo existiendo evidencia epidemiológica en humanos basada en modelos animales; las cuales indican que puede causar cambios en la fisiología sistémica, sin embargo se desconocían los cambios neurológicos que se pudieran presentar como consecuencia al daño en el ligamento periodontal debido a los factores proinflamatorios que la producen. Las citocinas y las adipoquinas (específicamente las resistinas) secretadas por la hipoxia del tejido adiposo en la obesidad, generan un estado proinflamatorio aumentando los niveles de TNF- α , leptina, Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 1 (IL-1). Esta última produce cambios en el tejido periodontal, disminuyendo los mecanismos de reparación tisular y modificando la respuesta inmune. El TNF- α tiene un importante papel en la resistencia a la insulina, ya que inhibe la acción de la insulina en los adipocitos a través de inhibidores.

Los factores que producen inflamación y estimulan a los receptores del ligamento periodontal han sido poco estudiados, los mecanorreceptores del ligamento periodontal son terminaciones de Ruffini, fibras mielinizadas inervadas por fibras aferentes cuyos somas se encuentran en el ganglio trigeminal (GT) o en los núcleos mesencefálicos trigeminales (NMT). Estos mecanorreceptores se encuentran distribuidos en el ligamento periodontal y son los que nos ayudan a regular la fuerza de la masticación y favorecen el movimiento ortodóncico por la liberación de los péptidos relacionados con la calcitonina. Entre las neuronas que hacen sinapsis con los mecanorreceptores del GT, se encuentran los subnúcleos orales (SnO).

En este estudio encontramos que las ratas hembras diabéticas y obesas de la cepa Zucker muestran disminución de la longitud dendrítica total en comparación con el grupo sin diabetes pero con inducción de periodontitis concuerda con el análisis histopatológico de la disminución de fibroblastos debido al FNT α observado en la enfermedad periodontal. Sin embargo no encontramos los mismos resultados en las ratas macho.

2. INTRODUCCIÓN

La Diabetes mellitus (DM) es un problema de salud pública actual y su enfoque es esencial, ya que se encuentra relacionada con enfermedades que causan mayor mortalidad a nivel mundial y su incidencia va en aumento.

La DM-2 y la enfermedad periodontal son enfermedades crónicas que afectan a millones de personas en el mundo existiendo evidencia epidemiológica en humanos basada en modelos animales donde se explica que la periodontitis es una complicación de la diabetes y viceversa, por lo que es una problemática de importancia para el área estomatológica.

Por su parte la Enfermedad Periodontal en datos recientes de tipo epidemiológico obtenidos de modelos animales indican que puede causar cambios en la fisiología sistémica, sin embargo se desconocen los cambios neurológicos que se pudieran presentar como consecuencia al daño en el ligamento periodontal debido a los factores inflamatorios que la producen. Las citocinas proinflamatorias como el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la Interleucina 1-beta (IL1- β) llevan a una situación de inflamación crónica produciendo cambios en el tejido periodontal disminuyendo los mecanismos de reparación tisular y modificando la respuesta inmune que puede conducir a la pérdida de inserción de tejido conectivo y el hueso alveolar; esto se puede ver agravado por la diabetes ya que estas citocinas se están produciendo en exceso.

La diabetes y enfermedad periodontal se vinculan con la obesidad, debido a sustancias secretadas por el tejido adiposo conocidas como adipoquinas. Estas sustancias tienen un efecto en el sistema inmune y en la respuesta del huésped. Al existir más tejido adiposo, aumentan los niveles séricos de adipoquinas (específicamente la resistina) asociada con la periodontitis. En la obesidad y en la diabetes hay un estado proinflamatorio donde esta incrementada la producción de TNF- α , leptina, IL-1 e IL-6 por los adipocitos; por su parte la IL-1 induce a los fibroblastos a aumentar la producción de colagenasas, causando la destrucción del tejido conectivo periodontal e inducirá a

los osteoblastos a generar señales a los osteoclastos para reabsorber estructuras óseas periodontales.

Por otra parte los factores que producen inflamación y que estimulan a los receptores del ligamento periodontal han sido poco estudiados, los mecanorreceptores del ligamento periodontal son terminaciones de Ruffini, son fibras mielinizadas están inervados por fibras aferentes cuyos somas se encuentran en el ganglio trigeminal GT o en los NMT. Estos mecanorreceptores se encuentran distribuidos en el ligamento periodontal, los inervados por el GT se encuentran en la parte media de la raíz y los inervados por los NMT se concentran cercanos al ápex de la raíz del diente. Las neuronas que hacen sinapsis con los mecanorreceptores del GT, se encuentran en el núcleo sensitivo principal (NsP) y en los subnúcleos orales (SnO), interpolaris (Snl) y en el asta medular dorsal, del núcleo trigeminal espinal.

Siendo importante obtener mayor información del conocimiento de la organización normal anatómica, sináptica, neuroquímica, así como la plasticidad estructural y química, del GT y de los NMT para aclarar su relevancia funcional sensitiva.

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Diabetes Mellitus

La DM es séptima causa de muerte en la mayoría de los países en de ingreso medianos a bajo, la OMS proyecta que para el 2030 será la séptima causa de mortalidad a nivel mundial. (OMS. 20016) En muchos países en desarrollo existe evidencia de que la prevalencia está aumentando. Siendo necesario el avance en el diagnóstico, prevención y tratamiento de esta enfermedad, se tiene el dato de que existían 422 millones de pacientes, en el 2014, con diabetes en todo el mundo y sus complicaciones llevan a discapacidad, reducción en la calidad de vida y muerte (OMS, 2016). La DM afecta el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas en donde la principal característica es la hiperglucemia.

Esta hiperglucemia tiene un amplio rango molecular y efecto celular resultando en un estrés oxidativo. (Claudina M. 2012).

La DM-2 y la enfermedad periodontal son dos desórdenes inflamatorios crónicos, que afectan la salud de millones de personas en el mundo, existen evidencias epidemiológicas en humanos y basadas en modelos animales que explican la fisiopatología de la periodontitis como una complicación de la diabetes y a su vez la diabetes como una complicación de la periodontitis, proponiéndose una relación bidireccional entre enfermedad periodontal y diabetes mellitus, siendo entonces la diabetes un desorden de importancia en el área estomatológica (Pontes y cols, 2007; Taylor y cols 2008).

3.1.2 Relación Enfermedad Periodontal y Diabetes

La EP es una respuesta inflamatoria a los en los tejidos de soporte inducida por microorganismos específicos dando como resultado la destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar. Resulta en la formación de bolsas periodontales o surcos profundizados patológicamente entre la encía y la raíz del diente, al mismo tiempo genera una respuesta inflamatoria, caracterizada por una reacción desmediada de los mediadores proinflamatorios de huésped y descomposición del tejido Pihlstromy cols, 2005; Gomez y cols, 2016 .

La EP es mucho más que una infección oral localizada, datos recientes de tipo epidemiológico y obtenidos de modelos animales indican que puede causar cambios en la fisiología sistémica, pero se desconocen los cambios neurológicos que se pudieran presentar como consecuencia al daño en el ligamento periodontal debido a los factores inflamatorios de una EP . Entre los mediadores que se derivan de esta respuesta proinflamatoria se incluyen IL-1 β , IL-6, la prostaglandina E2 (PGE2), TNF- α , activador del receptor del factor nuclear kappa B (RANKL), metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), citocinas reguladoras de células T (como IL-12, IL-18), así como quimiocinas.(Gomez J. 2016;) Las citosinas IL1- β junto a los TNF α llevan a una situación de inflamación crónica que producen cambios importantes en el tejido periodontal disminuyendo los mecanismos de reparación tisular, modificando la respuesta inmune parecen estimular la producción de colágeno de fibroblastos aceleran el mecanismo de ácido

araquidónico, que puede conducir a la pérdida de inserción de tejido conectivo y el hueso alveolar; esta situación se puede ver agravada debido a que en la diabetes estas citocinas también se están produciendo en exceso, pues varias líneas de investigación que apoyan la hipótesis de que TNF- α desempeña un papel clave en la patogénesis de la DM-2 (Zhu-Ling J. y cols 2013; Nishimuray cols 2003).

Existen estudios donde se han demostrado que las personas con diabetes no controlada, presenta una actividad aumentada de los polimorfo nucleares (PMN). Por otra parte en las personas que padecen diabetes y periodontitis se observa una disminución de quimiotaxis, defectos en la apoptosis lo conlleva a la retención de PMN en el tejido periodontal y por lo tanto su destrucción por la liberación de MMP y especies reactivas de oxígeno (ROS) .en los pacientes con diabetes existe una exposición de proteínas, principalmente colágeno, y lípidos a azúcares que conducen a la glaciación no enzimática de estas proteínas y su oxidación provocando la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGE). Los AGE se acumulan en el plasma de forma activa y se adhieren las células del endotelio, se asocian al colágeno y por lo tanto producen daño en los tejido; esto genera receptores en la membrana celular de células insulino dependientes (RAGE), estas conducen al aumento de la apoptosis y como consecuencia daño a los tejidos periodontales. (Gomez J. 2016)

La relación AGE-RAGE incrementa los niveles de mediadores proinflamatorias como el TNF α , IL1 β , IL 6 y MMP. (Claudina M. 2012)

Conjuntamente pacientes con diabetes mellitus tienen niveles elevados de productos finales de glicación avanzada que puede interactuar con receptores específicos, tales como los macrófagos CD68, estimular la producción de citoquinas como IL-1 y los monocitos, ya que en pacientes con Diabetes mellitus producen cantidades significativamente mayores de IL-1 β in vitro que de monocitos en los controles no diabéticos.

3.1.3 Obesidad-diabetes-enfermedad periodontal.

El vínculo entre obesidad, diabetes y enfermedad periodontal se debe a sustancias bioactivas secretadas por el tejido adiposo conocidas como adipoquinas. Estas sustancias tienen un rol en el sistema inmune y en la respuesta del huésped. Al existir más tejido adiposo, aumentan los niveles séricos de adipoquinas (específicamente una llamada resistina) que es asociada con la periodontitis. Los adipocitos ejercen una serie de funciones endocrinas, el aumento de la adiposidad se asocia con un estado de alto grado de inflamación y resistencia a la insulina. (Aiuto y Suvan 2013).

En condiciones de obesidad se genera una hipertrofia de los adipocitos que conlleva a un remodelado de su estructura y posterior inflamación tanto a nivel local como sistémico. Estudios han demostrado que la expansión del tejido adiposo por hipertrofia genera zonas de hipoxia, y en estas zonas de tejido adiposo secreta adipocitoquinas proinflamatorias como la matriz de MMP2, MMP9, IL6, IL1, factor inhibidor de la MIF y leptina, que están regulados por la hipoxia.

En obesidad se presenta una infiltración masiva de macrófagos y estos son responsables de la secreción de sustancias proinflamatorias y concretamente de más del 50% del FNT- α . El FNT α tiene un importante papel en la resistencia a la insulina, ya que inhibe la acción de la insulina en los adipocitos a través de inhibidores. (Izaola, 2015)

Durante la hipoxia en el tejido adiposo aumenta la secreción de adipocitoquinas pro inflamatorias como la IL-1 inducirá a los fibroblastos a aumentar la producción de colagenasa, causando destrucción del tejido conectivo periodontal y, además, inducirá a los osteoblastos a generar señales químicas a los osteoclastos para reabsorber estructuras óseas periodontales, cuadro característico de la enfermedad periodontal (Kaur y cols,2010).

3.1.4 Ligamento periodontal y mecanorreceptores

Los factores que producen inflamación y que estimulan a los receptores del ligamento periodontal han sido poco estudiados. Los mecanorreceptores del ligamento periodontal son terminaciones de Ruffini, mielinizadas, las cuales tienen un grosor de 1 a 15 micrómetros (μm) de diámetro, aunque son variables en su morfología, estos receptores son inervados por fibras aferentes cuyos somas se encuentran en el GT o en los NMT, ambos tipos de receptores inervados por las neuronas del GT o de los NMT se encuentran ampliamente distribuidos por todo el ligamento periodontal, con la particularidad de que los inervados por el GT principalmente se encuentran en la parte media de la raíz mientras que los inervados por los NMT se concentran principalmente cercanos al ápex de la raíz del diente (Linde 1990) Algunos mecanorreceptores están relacionados presumiblemente al arreglo del complejo del colágeno en el ligamento periodontal. Las neuronas que hacen sinapsis con los mecanorreceptores del GT, se encuentran en el núcleo sensitivo principal (NSP), en los subnúcleo oralis (SO), interpolaris (SI) y en el asta medular dorsal, del núcleo trigeminal espinal.

Las neuronas aferentes primarias trigeminales son químicamente heterogéneas y utilizan diversos neurotransmisores y neuromoduladores para la transmisión sináptica, estos incluyen transmisores clásicos y de peptídicos, proteínas de unión a calcio y otras moléculas neuroactivas, el contenido neuronal de estos neuroquímicos no es estático y su nivel puede variar en caso de cambios marcados en las condiciones ambientales. Se ha demostrado que las neuronas del GT y del NMT reciben entradas de diferentes grupos de neuronas que contienen varias sustancias transmisoras. Sin embargo el conocimiento detallado de la morfología neuronal ante algunos estímulos externos e internos que provocan inflamación periodontal aún no está completo. Se ha propuesto que las neurotrofinas y sus receptores desempeñan un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento de diversos tipos de neuronas sensoriales centrales y periféricas y también pueden regular la expresión fenotípica. (Wakisaka S, 2000)

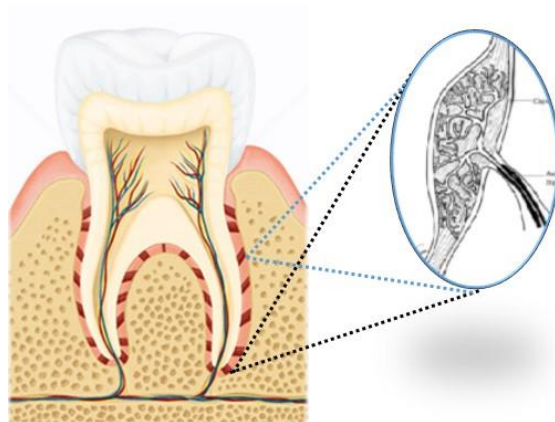


Figura 1 Localización de los receptores inervados por el GT, localizados en la parte media de la raíz; los inervados por los NMT se concentran cercanos al ápex de la raíz.

3.1.5 Ratas Zucker: modelo biológico de obesidad y diabetes

Las ratas Zucker obesas son el modelo mejor conocido de obesidad genética porque presentan una mutación del gen para el receptor de leptina que contribuye a hiperlipidemia. La obesidad en estos animales se hereda como carácter autosómico recesivo. Además se consideran un buen modelo de DM-2 porque presentan resistencia a la insulina, ligera hiperglucemia y otras alteraciones semejantes a las que aparecen en el síndrome metabólico humano. Estos animales presentan hiperinsulinemia, por lo que se les puede considerar también un modelo de resistencia a la insulina (Chen y Wang, 2005). El perfil lipídico de estos animales también se encuentra alterado. Hay aumento de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de alta densidad (HDL), pero no aumenta el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (Aleixandre y Miguel, 2008). Se tornan obesas al disminuir el estímulo termogénico, aparece la hiperfagia y la hiperinsulinemia temprana inapropiada, se presentan también anomalías hipotálamicas y neuroendocrinas con aumento de cortico esteroides y pobre fertilidad. (Hugués B.2002). Además examinando el nervio ciático se ha encontrado evidencia de neuropatía caracterizada como reducción en la velocidad de conducción y cambios morfológicos en los axones mielinizados. Considerando que en la actualidad se sabe que la enfermedad periodontal no es únicamente un problema de salud oral sino también un problema asociado a la salud sistémica del paciente, pues diversos estudios han demostrado que la respuesta del huésped a los patógenos periodontales representa un determinante

crucial en la etiopatogenia de la enfermedad. Siendo este un buen modelo animal útil para experimentar la lesión periodontal debido a que la región gingival es muy similar a la del humano (Aleixandre A. 2008).

3.2. Antecedentes específicos

En animales y en modelos celulares *in vitro*, se ha encontrado que el TNF- α inhibe la acción de la insulina y en humanos los niveles elevados circulantes de TNF- α se asocian con resistencia a la insulina (Mishima y col., 2001) y la DM-2 (Fernández-Real y col., 2002), además se ha relacionado con el aumento del descontrol de la glucemia.

Recientemente, Bretz y colaboradores (2005) mostraron que niveles circulantes de TNF- α se asociaron con mayor severidad de la periodontitis en pacientes geriátricos. Sujetos con periodontitis parecen tener sus niveles de TNF- α elevados en respuesta al Lipopolisacárido (LPS) en comparación con los controles que no tienen la periodontitis. Mientras tanto, Teles (2010) comparó los niveles medios de IL-1 β , en muestras de Fluido gingival crevicular (FGC) de sujetos periodontalmente sanos y sujetos con periodontitis crónica y han encontrado que la IL-1 β muestra una mayor asociada a los signos clínicos de la periodontitis.

En cuanto a la relación con la obesidad se han encontrado estudios previos donde sugieren que la adiponectina tiene propiedades antiinflamatorias, las cuales actúan como moduladores endógenos de las enfermedades relacionadas con la obesidad (Santhosh y cols., 2009). Debido a que la baja regulación de la expresión de genes de adiponectina en el tejido adiposo afecta directa o indirectamente los niveles de proteína C reactiva (PCR), la elevación del gen de expresión de la adiponectina podría ser necesaria para explicar la relación precisa entre obesidad y enfermedad periodontal (Endo, 2010). Bawadi y cols. (2011) mencionan que la dieta pobre y la baja frecuencia de actividad física, como parte de un cuadro de obesidad, son indicadores de riesgo para enfermedad periodontal. El receptor de tipo Toll 2 puede ser un candidato para la participación del cruce entre la inflamación y las señales metabólicas, debido a que tanto la *P. gingivalis* como los ácidos grasos libres pueden activarlo (Zelkha y cols., 2010).

Los avances recientes en la neurociencia han demostrado que, además de sus acciones de apoyo tróficos, las neurotrofinas pueden funcionar como neuromoduladores en la señalización neuronal. Siendo importante obtener mayor información del conocimiento de la organización normal anatómica, sináptica, neuroquímica, así como la plasticidad estructural y química, del GT y de los NMT para aclarar su relevancia funcional sensitiva (Lazarov, 2002

HALLAZGO	AUTOR Y AÑO
En el SnO localizado en la porción más rostral del núcleo espinal trigeminal observaron con la tinción de Golgi neuronas pequeñas con 4 morfologías distintas que proyectan al subnúcleo caudalis; en gatos.	Falls W. 1984
Demostraron el contacto sináptico entre neuronas del subnúcleo oralis y neuronas motoras del trigémino en gatos.	Yoshida a. Fukami H. et al. 2001
Utilizaron la técnica de la peróxidasa de rábano (HRP) para determinar el número y la distribución espacial de los contactos en las neuronas de la zona rostro medial del SnO y las motoneuronas α en gatos.	Yoshida A. Fukami H. et al. 2001
Usaron medios de contraste en ratas para investigar y comparar las proyecciones del SnO y <i>caudalis</i> hacia el núcleo talámico.	Goy N. Chalus M. Dallel R. y Yoisin D. 2005
Caracterizaron las distribución y morfología de las células intra trigeminales así como los axones en monos.	Warren S May P. 2013
Caracterizaron la morfología y longitud de las neuronas en la zona del borde del SnO del trigémino a través de HRP	Falls W. Alban M. 2014

Figura 2 Resumen de estudios previos donde se observaron morfología, longitud, conexiones, ramificaciones y proyecciones de las neuronas del subnúcleo oralis con diferentes técnicas, animales y condiciones.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La periodontitis es una enfermedad de etiología infecciosa y de naturaleza inflamatoria que afecta a los tejidos de inserción del diente, involucrando la destrucción del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, la cual se manifiesta clínicamente con la formación de sacos periodontales y pérdida de inserción de los tejidos periodontales.

Para el desarrollo de la periodontitis no solo están presentes patógenos periodontales específicos sino también de un hospedero susceptible. Por ejemplo, en el campo de la Ortodoncia con la colocación de la aparatología se puede generar esa condición en el paciente.

Los periodontopatógenos son los agentes etiológicos de la enfermedad periodontal, sin embargo, un importante determinante de la progresión y desarrollo de la enfermedad es la respuesta inmune del hospedero, es decir, la naturaleza de la respuesta inflamatoria influye en el carácter destructivo de la enfermedad, así como de otros factores como la presencia de enfermedades sistémicas tales como la diabetes y la obesidad.

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial y su etiología representa una interacción entre genética, metabolismo de la dieta, niveles de actividad física y consumo de alimentos altamente calóricos, entre otros. Se le considera el desorden nutricional más común en América, y es un factor de riesgo significativo para diversas enfermedades sistémicas en la edad adulta como hipertensión, diabetes mellitus, arteriosclerosis enfermedades cerebrovasculares así como cardiovasculares (CVD); en el área estomatológica se encuentra la enfermedad periodontal y su bidireccionalidad con esta enfermedad por ello por ello, esta condición sistémica se considera un problema cada vez mayor de salud pública.

Se sabe poco en relación a la lesión periodontal en una condición de diabetes y obesidad, en cuanto a la modificación de la funcionalidad y citoarquitectura sensitiva que va desde los mecanorreceptores periodontales hasta el complejo trigeminal sensitivo,

específicamente sobre las neuronas del subnúcleo oralis que recibe aferencias de estos mecanorreceptores.

En el ligamento periodontal hay terminaciones nerviosas principalmente nociceptivas, esto nos ayuda a regular la fuerza de la masticación y así mantener la integridad del diente; también hay estímulos que benefician como es en el caso del movimiento ortodóncico, en el que incrementa los péptidos relacionada con el gen de calcitonina (CGRP) que inerva la pulpa, ligamento periodontal y gingival.

Lo anterior nos lleva a formular la siguiente pregunta de investigación:

Existe modificación de la arborización dendrítica de las neuronas del subnúcleo oralis de ratas diabéticas a las cuáles se les indujo una bolsa periodontal posterior a la colocación de una ligadura metálica en el primer molar inferior derecho?

5.JUSTIFICACIÓN

La DM tipo 2 y la enfermedad periodontal son enfermedades crónicas que afectan a millones de personas adultas en el mundo existiendo evidencia epidemiológica en humanos basada en modelos animales donde se explica que la periodontitis es complicación de la diabetes y viceversa, por lo que es una problemática de importancia para el área estomatológica.

Resultados obtenidos de estudios en modelos animales y en humanos han mostrado que la periodontitis puede causar cambios en la fisiología sistémica, sin embargo se desconocen los cambios en la morfología neuronal de la ruta sensitiva que se pudieran presentar como consecuencia al daño en el ligamento periodontal.

Esta investigación tiene la finalidad de aportar conocimientos para enfrentar de manera eficaz los problemas de salud periodontal, siendo importante observar si la lesión periodontal, modifica la comunicación entre las aferentes periodontales y los núcleos trigeminales que reciben estas aferentes, valorando los posibles cambios morfológicos en la arborización dendrítica del complejo sensorial trigeminal,

principalmente del SnO, caracterizado por recibir aferencias de mecanorreceptores periodontales y pulpares.

6. HIPÓTESIS

Hi: La inducción de una bolsa periodontal en el primer molar inferior derecho produce cambios en la morfología neuronal del subnúcleo *oralis* de ratas diabéticas y obesas.

Ho: La inducción de una bolsa periodontal en el primer molar inferior derecho no produce cambios en la morfología neuronal del subnúcleo *oralis* de ratas diabéticas y obesas.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Identificar los cambios en la morfología neuronal en el subnúcleo *oralis* de ratas diabéticas y obesas hembras y machos, posterior a la inducción de una bolsa periodontal en el primer molar inferior derecho.

7.2 Objetivos específicos

- Inducir la formación de una bolsa periodontal en el primer molar inferior derecho de ratas machos y hembras Zucker (diabéticas y obesas) y ratas Sprague-Dawley.
- Evaluar la morfología neuronal del subnúcleo *oralis* de los grupos de machos y hembras Zucker y Sprague-Dawley a los que se les indujo la bolsa periodontal en comparación con sus correspondientes controles.
- Observar los cambios histopatológicos producidos por la inflamación periodontal inducida en el primer molar inferior derecho de las ratas macho y hembras Zucker y Sprague Dawley y comparar con sus correspondientes controles.
- Realizar el control de peso y glucemia en todos los grupos de estudio.

8. MATERIAL Y MÉTODO

8.1 Diseño de estudio.

- Diseño: cuasi experimental
- De acuerdo a la ubicación en el tiempo: prospectivo
- De acuerdo con la evolución de fenómeno: longitudinal
- De acuerdo con la interpretación del fenómeno: analítico
- Diseño *in vivo* e *in vitro*

8.2 Definición de la población

El estudio tiene el objetivo de conocer la morfología neuronal a nivel del subnúcleo *oralis* en un modelo de rata diabetes- obesidad de la cepa Zucker de la cual se tomó una muestra de 24 ratas hembras. También se usaron 24 ratas Sprague-Dawley como control sano: 12 ratas hembras y 12 ratas macho. Todos los grupos adultos de 8 semanas de edad, de 250 a 300 g de peso. Se mantuvieron separados hembras de machos en cajas de acrílico con rejilla de acero, colocando no más de 6 ratas por caja. Los procedimientos y cuidados fueron realizados bajo las especificaciones técnicas para el uso de animales de acuerdo a la NORMA oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, con apoyo de las instalaciones del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El Bioterio cuenta con ciclos de luz-oscuridad (12hrs cada uno) y ventilación con extractor (presión negativa) temperatura de 18° -26° C (ideal 22°C), humedad de 40 a 70 %, aire de 15 a 20 cambios por hora, ruido a no más de 85 decibeles, espacio de 150 cm² por cada 200gr de peso, alimentadas con *ad libita* (libre acceso a comida y agua).

8.3 Selección de la muestra

La selección de los grupos se realizaron de manera aleatoria estratificada y se formaron seis grupo de 6 sujetos divididos en:

GRUPO	MACHOS	HEMBRAS
Control Sano	6 ratas Sprague- Dawley machos (ratas sin diabetes y sin enfermedad periodontal)	6 ratas Sprague- Dawley hembras (ratas sin diabetes y sin enfermedad periodontal)
Control + Periodontitis	6 ratas Sprague- Dawley machos con ligadura metálica en el primer molar inferior derecho	6 ratas Sprague- Dawley hembras con ligadura metálica en el primer molar inferior derecho
Diabético	6 ratas Zucker machos	6 ratas Zucker hembras
Diabético + Periodontitis	6 ratas Zucker machos con ligadura metálica en el primer molar inferior derecho	6 ratas Zucker hembras con ligadura metálica en el primer molar inferior derecho

8.4. Criterios de selección de la muestra

8.4.1 Inclusión:

Ratas de la cepa Zucker y Sprague-Dawley hembras y machos de 8 semanas de edad, no importando la camada.

Inclusión para el estudio histológico:

- Tejido del hueso mandibular y dental integro.

Inclusión para el análisis de la morfología neuronal:

- Tejido nervioso (tallo encefálico) que no se encuentre fragmentado ni que dificulte la observación del área de interés (subnúcleo *oralis*).
- Neuronas bien teñidas, completas y aisladas para poder distinguir las dendritas.
- Neuronas multipolares con un soma en forma piramidal con una medida de 10-13 μ o con una forma fusiforme con una medida de 20-25 μ

8.4.2 Exclusión:

Ratas de distinta cepa Sprague-Dawley y con edad diferentes a 8 semanas.

Exclusión para el estudio histológico:

- Tejido mandibular y dental sin pruebas de inflamación por enfermedad periodontal.

Exclusión para el análisis de la morfología neuronal:

- Tejido nervioso (tallo encefálico) que se encuentre fragmentado, con dificultad para la observación del área de interés (subnúcleo *oralis*).
- Neuronas mal teñidas, fragmentadas y que dificulten su observación debido a que no estén lo suficientemente aisladas.

8.4.3 Eliminación:

- Fueron eliminados todas aquellas ratas que fallezcan durante el periodo de inducción de la periodontitis
- Fueron eliminadas aquellas ratas que hayan perdido la ligadura durante el proceso.

8.5. Diseño y tipo de muestreo

8.5.1 Definición de variables y escalas de medición

Variables demográficas

<i>Variable</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Escala de medición</i>	<i>Unidad escala</i>
EDAD	Tiempo que ha vivido una persona.	Semanas de nacidas al momento del sondeo.	Cuantitativa	Numérica	Semanas
SEXO	Condición orgánica, masculino o femenino de animal o planta	Hembra/Macho	Cualitativa	Nominal	Macho/Hembra
CONDICION	Diabetes: es un grupo de enfermedades metabólicas donde los niveles de azúcar son muy altos.	Enfermedad/No Enfermedad	Cualitativa	Nominal	Con Enfermedad/ Sin Enfermedad
	Obesidad: enfermedad crónica, con acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo.	Peso Machos >500gr Peso Hembras >400gr	Cuantitativa	Numérica	Kg
	Enfermedad Periodontal: enfermedad infecciosa-inflamatoria que daña los tejidos de soporte del diente.	Profundidad de bolsa, pérdida ósea.	Cuantitativa	Numérica	mm
PESO	Peso que posee un cuerpo en un determinado volumen	Peso Machos >500gr Peso Hembras >400gr	Cuantitativa	Numérica	Kg
GLUCEMIA	Medida de concentración libre de glucosa en la sangre, plasma o suero	70-100 mg/dL	Cuantitativa	Numérica	mg/dL

Variables Celulares

<i>Variable</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Escala de medición</i>	<i>Unidad escala</i>
Arborización neuronal	Número de dendritas que se encuentran en el soma de una neurona.	Número de dendritas en el soma.	Cuantitativa	Numérica	Numérica
Nivel de arborización	Longitud de las dendritas radiadas.	Niveles según la longitud de la dendrita.	Cuantitativa	Numérica	Ordinal
Histopatología	Presencia o ausencia de células fuera de la normalidad en tejido.	Presencia de células inflamatorias, osteoclastos y colágeno.	Cualitativa	Nominal	0 (nula o discreta infiltración celular), 1 (infiltración celular en encía insertada), 2 (infiltración celular en encía y ligamento periodontal) y 3 (infiltrado celular y reabsorción del hueso alveolar)

Definiciones conceptuales generales.

Grupo control: se consideran a las ratas en estado sano sin enfermedad periodontal.

Cambios morfológicos de la neurona: identificación de las neuronas en el núcleo *oralis* observando el árbol dendrítico tridimensional apical y basal, en un plano de dos dimensiones y la localización dendríticas.

Análisis de Histopatología: se valorará la proliferación celular de tejido fibroso, inflamatorio y de colágena.

8.6. Método de recolección de datos

8. 6.1 Fuentes primarias

Observación indirecta:

Observación de cortes hísticos a través del microscopio.

8.7 Ubicación espacio temporal

Se realizó la inducción de la periodontitis, posteriormente se realizaron los cortes hísticos, tinciones y observación bajo microscopio en los laboratorios Multidisciplinario y de Histopatología de la Facultad de Estomatología de la BUAP. Las ratas se mantuvieron en las instalaciones del Bioterio Claude Bernard de la BUAP.

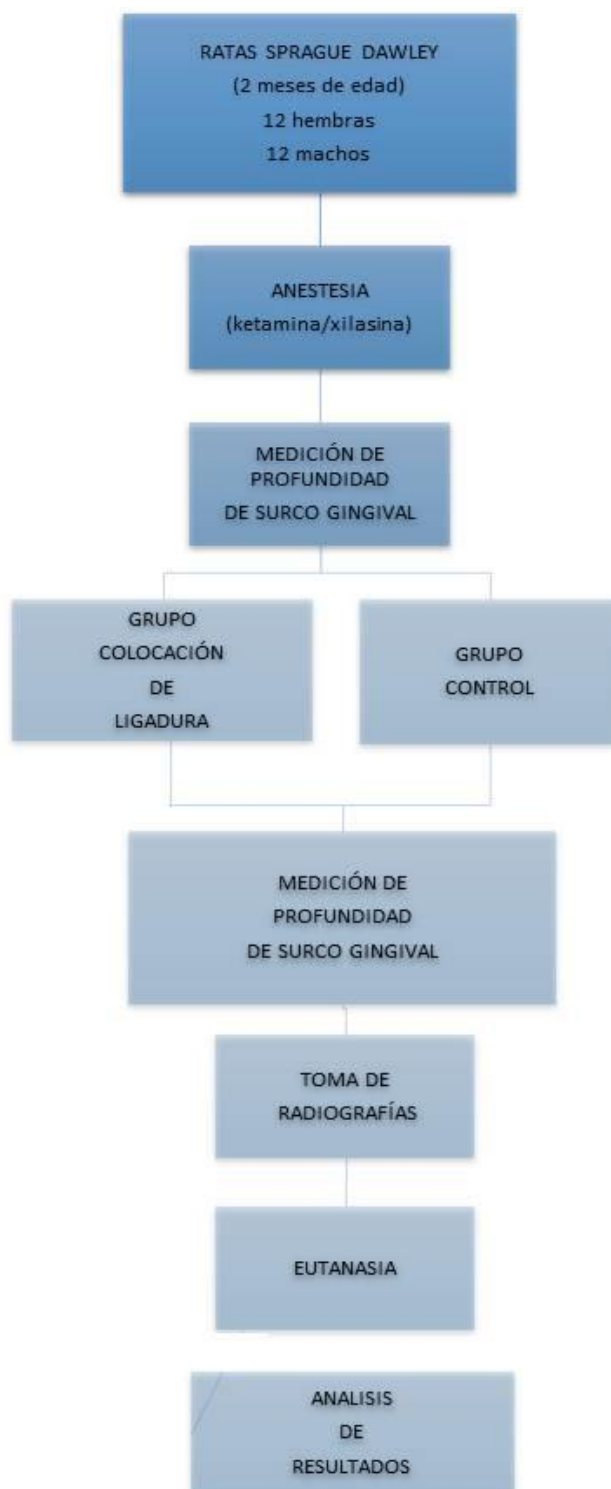
8.8 Técnicas y procedimientos

8.8.1 Marcaje de los animales

Una vez seleccionados los grupos por sexo, a cada espécimen le fue asignado un número dentro de una escala del 1 al 12 (aleatorio) se marcó con un plumón permanente en la cola, correspondiente al número asignado, y marcaje permanente usando perforaciones en las orejas, según el grupo de estudio al que pertenezcan:

- Sin perforaciones: control sano
- Oreja derecha parte anterior: control sano + periodontitis
- Oreja derecha parte posterior: diabetes
- Oreja izquierda: diabetes + periodontitis

8.8.2 Esquema de trabajo



8.8.3 Valoración basal de las ratas Zucker diabéticas y obesas

Glucemia

Los niveles de glucosa fueron evaluados a todos los grupos de estudio en 2 momentos: un momento antes de la colocación de la ligadura metálica para identificar los niveles basales y a los 14 días posteriores justo antes de la eutanasia. Adicionalmente, se realizará un seguimiento al peso corporal y la cantidad de alimento y agua consumida por los distintos grupos con la finalidad de establecer una tendencia en el comportamiento de los animales durante la progresión de la diabetes y periodontitis.

Los niveles de glucosa fueron cuantificados mediante un sistema de monitoreo de glucosa modelo ACCU-CHEK Active. Las muestras de sangre se extrajeron realizando una punción en la vena de la cola mediante capilares, depositados en una tira reactiva y llevada al aparato para el conteo de glucosa sérica.

8.8.4 Producción experimental de periodontitis en las ratas Zucker y Sprague-Dawley.

Primero fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina 10% y xilazina 2 % / kg de peso, proporcionada por el Bioterio Claude Bernard, posteriormente se procedió a ligar con una ligadura metálica de 0.08, alrededor del primer molar derecho del maxilar inferior; la ligadura permaneció por 14 días (Breivik 2000, Semenoff Segundo, y cols. 2012, Rivera y cols, 2012), con la finalidad de permitir la retención de la placa dentobacteriana. Se colocó la ligadura metálica a los grupos de las cepas Zucker y Sprague-Dawley destinados para tal fin. Las ratas designadas como control sano y las diabéticas (Zucker) sólo recibieron la anestesia.

8.8.5 Análisis histopatológico

Después de la fase experimental, todos los grupos fueron anestesiados a los 14 días con una sobredosis de anestésico (Ketamina/xilasina) y sacrificados por perfusión intracardiaca con 200 ml de 0,9 % de solución salina.

Posteriormente las mandíbulas se seccionaron (dos mitades de un corte entre los incisivos inferiores) y se fijaron en 10 % de formalina buferizada neutra por 48 hr y descalcificados en ácido nítrico al 5 % durante 7-15 días, posteriormente se procedió a la histopatología convencional: el tejido fue fijado en formaldehído al 4% y solución PBS por 48 hrs a 4°C, cambiándose la solución 2 veces por día, se lavó con PBS y se colocó en EDTA al 10% (pH=7) para su descalcificación. Enseguida se incluyó en bloques de parafina y se cortaron en cortes de 5 μ en dirección sagital. Cada corte fue colocado en un porta objetos y colocada en una solución de Hematoxilina-Eosina y otros cortes en la técnica Tricromica de Masson.

Se realizó el análisis morfológico con microfotografías de los cortes obtenidos de ambos tipos de tinción, se observaron a través del microscopio electrónico Leica DM 500 y se tomaron fotografías con el programa Leica Application Suite.

En las microfotografías se analizaron los cortes a 10X, 20X y 40X; observando el hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento dentario y encía libre diferenciado en tejido fibroso, hemático e inflamatorio.

Para el análisis histomórfico y su distribución según la normalidad en un rango del 0-3 donde el número 0 representa poca o nula presencia de células inflamatorias (restringido en la zona del margen gingival), 1 infiltración moderada (localizado en toda la encía insertada), 2 acentuada infiltración celular (infiltración celular en gingival y ligamento periodontal) y 3 acentuada infiltración celular (reabsorción completa del hueso alveolar).

8.8.6 Evaluación de la morfología neuronal a través de la tinción de Golgi-Cox

Los cerebros junto con el tallo encefálico fueron extraídos y procesados siguiendo el procedimiento de tinción de Golgi- Cox modificado descrito por Gibb y Kolb (1998). Las muestras se almacenaron primero en la oscuridad durante 14 días en solución de Golgi – Cox, este método permite la impregnación selectiva de las células nerviosas y sus prolongaciones con la reacción de nitrato de plata y el dicromato de potasio o de sodio. La técnica de Golgi-Cox es un procedimiento histológico sencillo que revela

la morfología neuronal completa, además de ser de fácil ejecución y generosa en la información que presenta. Una vez transcurrido el tiempo para la fijación del tejido con los cromatos, la solución de los recipientes fue reemplazada por la solución de sacarosa al 15%, nuevamente almacenándose en oscuridad por 5 días más.

Al finalizar el período anterior cada cerebro fue seccionado y montado en la platina del vibratomo (modelo MA752) sumergiéndose en solución de sacarosa a una temperatura de 40°C. Se cortaron en secciones sagitales (200 μm) a nivel tallo en forma transversal para ubicar al núcleo oralis (Camden Instrumentos, Leicester, Inglaterra). Las secciones se recogieron en portaobjetos recubiertos de gelatina, las laminillas se mantuvieron en una cámara húmeda para posteriormente ser reveladas.

Posteriormente se realizó el revelado de los tejidos, el tejido después de ser montado primero fue enjuagado en agua destilada y luego se colocó en un baño de hidróxido de amonio durante 30 min en la oscuridad. Después de enjuagar las secciones en agua, se sumergieron en fijador de película de Kodak durante 30 min en la oscuridad, posteriormente se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en baños sucesivos de alcohol al 50 % (1 min), al 75 % (1 min), al 95 % (1 min), y al 100 % (2 x 5 min), seguido por 15 min en xileno . Los portaobjetos se cubrieron con resina sintética (al 60% en Xilol) y se colocó el cubreobjetos.

Para la identificación de las neuronas nos apoyamos en el atlas de Paxinos y Watson (1986), una vez localizado el núcleo oralis en el tallo encefálico se eligieron seis neuronas, con ayuda de una cámara lúcida (ampliación de 40x) el árbol dendrítico tridimensional apical y basal, incluyendo todas las ramas se reconstruyó en un plano de dos dimensiones y la localización dendríticas se cuantificó por análisis de Sholl. Usando el centro del soma como punto de referencia, para el subnúcleo oralis los somas deben tener una forma piramidal con una longitud de 10-13 μ o una forma fusiforme con una longitud de 20-25 μ . Una rejilla transparente con anillos concéntricos con espacios de 10 micras se colocó sobre el dibujo y el número total de intersecciones entre anillos y cada rama dendrítica se contó por separado para dendritas apicales y basales, con el propósito de estimar el orden de la arborización de la rama dendrítica y la longitud dendrítica

total. La densidad de las espinas dendríticas se estimó mediante el análisis de segmentos de 10 μm desde las puntas terminales a gran aumento (40 \times).

8.8.7 Recursos materiales

- Tinción de Golgi- Cox, reactivos:
 - Dicromato de potasio.
 - Cloruro de mercurio.
 - Cromato de potasio.
 - Ácido acético glacial.
 - Ácido fosfotúngstico.
 - Agua de anilina.
 - Light Green.

- Tinción de Hematoxilina de Harris –Eosina:
 - Sulfato de aluminio.
 - Hematoxilina.
 - Oxido de mercurio rojo.
 - Eosina amarillenta.
 -

- Tinción tricromica de Masson:
 - Acido pícrico saturado.
 - Hematoxilina en cristales.
 - Cloruro férrico al 29%.
 - Ácido clorídrico concentrado.
 - Sol. Escarlata de Biebrich al1%.
 - Sol. Fucsina acida al 1%.

- Agua destilada.
- Etanol 50, 75, 80, 95 y 100%.
- Anestésico para rata (Ketamina/Xilasina) dosis 0.2ml/100g de peso, vía intraperitoneal.
- Ligadura Calibre 0.9
- Estuche de disección.
- Laminillas gelatinizadas al 2% bajo presión.
- Microscopio óptico, marca Leica.
- Cámara lúcida.
- Micrótopo.
- Vibratomo.

8.8.8 Recursos financieros

Los recursos para esta investigación fueron financiados por parte de PRODEP.

8.8.9. Bioética

El tipo de investigación es básica y los resultados que se obtuvieron contribuirán a la generación de conocimiento en relación a la fisiología sensorial de la vía trigeminal, fortaleciendo el manejo de la enfermedad periodontal asociada a diabetes siendo estas afecciones importantes a tratar en la población mundial.

Se utilizaron ratas adultas de la cepa Sprague-Dawley y Zucker mismas que fueron manipuladas y cuidadas de acuerdo a la NORMA oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron procesados mediante los paquetes estadísticos SPSS versión 22 y Statgraphics *Centurion*, Se utilizó estadística descriptiva para variables numéricas por medio de medidas de tendencia central y de dispersión, medidas de posición y de forma

Para evaluar los cambios morfológicos de nivel de arborización dendrítica de las neuronas del subnúcleo *oralis*, los datos obtenidos se expresaron como la diferencia y se evaluó mediante el ANOVA de un factor. Para los niveles de longitud se evaluó con ANOVA de un factor medidas repetidas y se confirmó por medio de Kruskal-Wallis. Para las diferencias entre dos muestras se utilizó la t de *Student* para muestras independiente.

Para la histopatología, se llevara a cabo la prueba de ANOVA con un valor de $p \leq 0.05$ el cual será considerado estadísticamente significativo.

Para el peso y glicemia se realizó ANOVA de pruebas repetidas con un valor de $p \leq 0.05$ y para las diferencias entre grupo se utilizó t de *student* para muestras independientes.

10. RESULTADOS

Inducción del modelo de enfermedad periodontal.

Al reproducir el modelo de enfermedad periodontal usado por otros autores, pudimos observar las bolsas periodontales pero observamos que al igual que en estudios previos no se ha reportado de manera cuantitativa la profundidad de la bolsa periodontal por lo que paralelo a este estudio, el grupo de investigación se dio a la tarea de proponer un instrumento para realizar dicha medición (tesis en proceso).

Análisis histopatológico

Se realizó el estudio histopatológico para observar la posible presencia de inflamación en los grupos a los cuales se les colocó la ligadura metálica y compararlos con sus correspondientes controles, se utilizaron las tinciones de Hematoxilina-eosina y de Massón, se tomaron fotografías a un aumento de 4 y 40x para realizar el análisis en las imágenes digitalizadas (ver figura 6).

En los tejidos de los grupos de machos teñidos con la tinción de Hematoxilina-eosina encontramos diferencias significativas en cuanto a la presencia de tejido fibroso entre el grupo control + periodontitis (CP) y el control sano (C) ($p=0.01$).

Y entre el grupo Diabetes+Periodontitis (DP) y el CP lo que concuerda con los resultados que obtuvo Huaixiu L.y cols (2016), quienes encontraron un aumento de osteoclastos al disminuir los niveles de fibroblastos (Ver figura7).

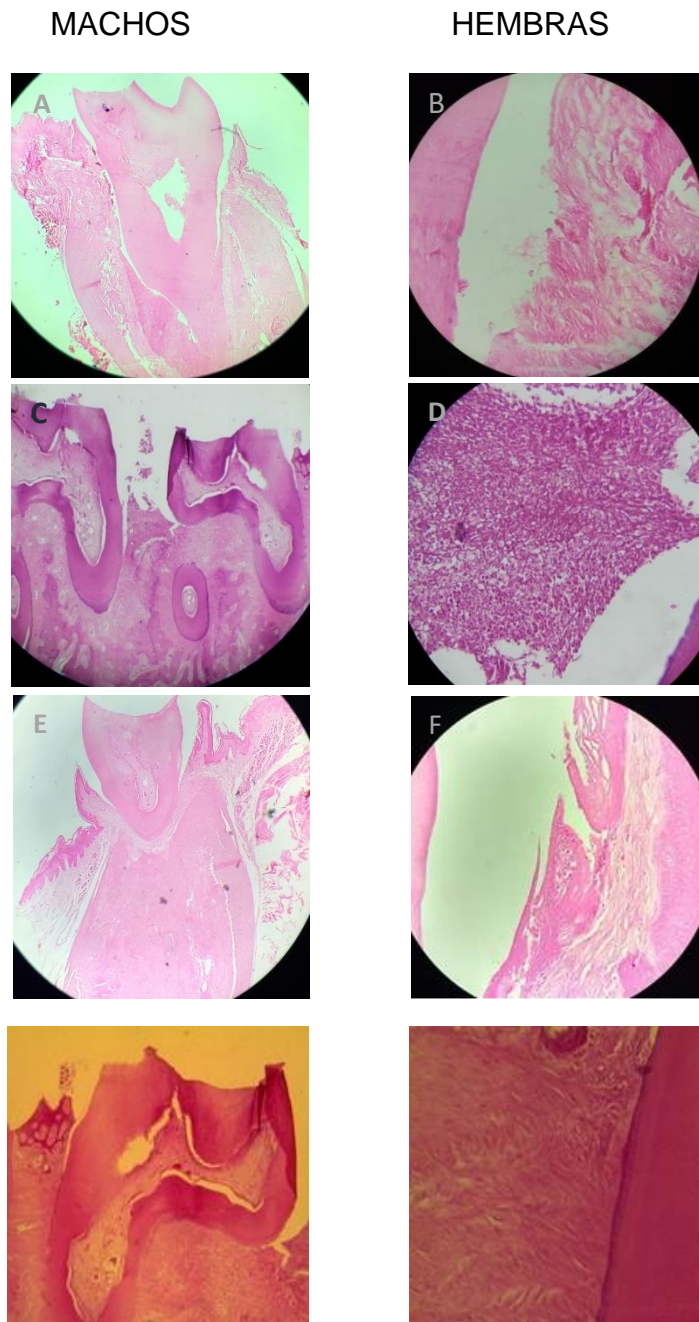


Figura 3 Control 4X B. Control 40x C. Control+ Enfermedad Periodontal 4X D. Control+ Enfermedad Periodontal 4X E. Diabetes 4X F. Diabetes 40X G. Diabetes +Enfermedad 4X H. Diabetes +Enfermedad 40X

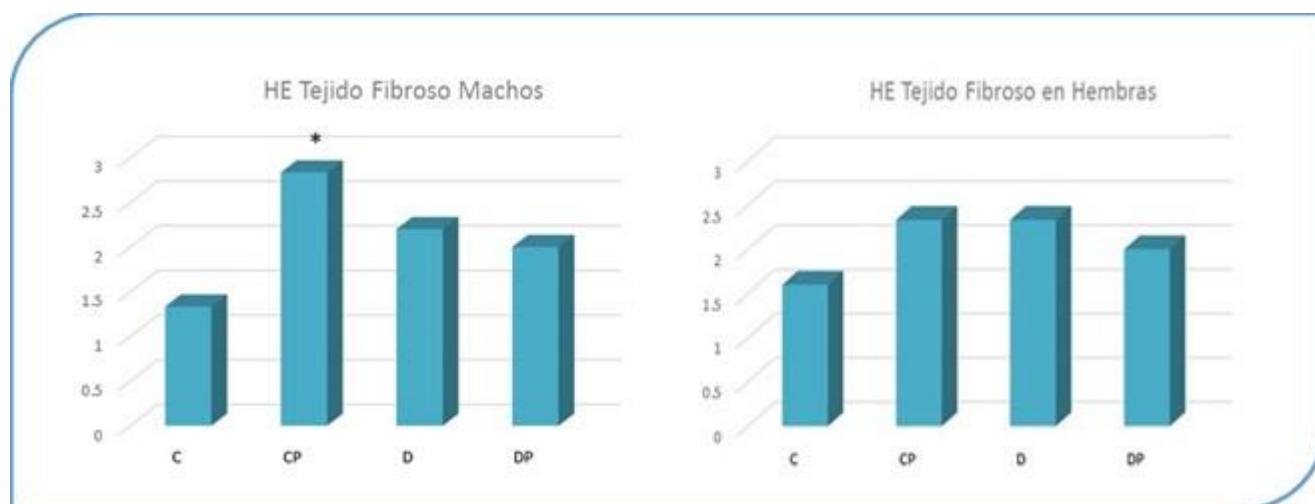


Figura 4 Graficas que muestran tejido fibroso en los distintos grupos con tinción de HE. Se observó un aumento en el número de fibroblastos del grupo hembras.

En cuanto a la presencia de tejido hemático en Machos, se encontró una diferencia significativa con un valor de $P= 0.0002$, entre el grupo C y CP, entre el grupo CP y D y entre el grupo CP y el DP (Ver figura 8).



Figura 5 Gráfica que muestra al tejido hemático con tinción HE. Muestra un valor significativo en el grupo CP de machos.

En relación al tejido inflamatorio no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos ($p=0.22$) (Ver figura 9).



Figura 6 Grafica que muestra al tejido inflamatorio en los distintos tipos de estudio con tinción de HE.

El análisis estadístico de los resultados de la tinción de Masson de los distintos grupos estudiados no mostró diferencias significativas en el tejido fibroso con un valor de ($p=0.08$); en el tejido hemático un valor de ($p=0.87$), y en el tejido inflamatorio ($p=0.53$).

Al realizar el análisis estadístico de los grupos de las hembras con tinción de HE en el tejido fibroso no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos tejido fibroso ($p=0.5$), en el tejido hemático ($p=0.88$), tejido inflamatorio ($p=0.9$). Con la tinción de Masson, tejido fibroso ($p=0.3$); tejido hemático ($p=0.9$); y en el tejido inflamatorio ($p=0.6$).

Morfología neuronal

Para el análisis morfológico la primera acción que se realizó fue la estandarización de los mejores planos anatómicos para la localización del núcleo *oralis* en los cerebros de ratas, apoyados del atlas de Watson y Paxinos y de estudios previos realizados sobre todo en gatos, así como la identificación de las neuronas y corroboración de características morfológicas con otros estudios realizados en ratas no precisamente con la tinción de Golgi, se encontró que las neuronas comúnmente encontradas en este sitio son pequeñas multipolares con un soma triangular (Ver figura 9). Se estableció entonces que el mejor

plano de corte fue el transversal y el grosor del corte para poder apreciar estas neuronas es de 200 μm (Ver figura 10).

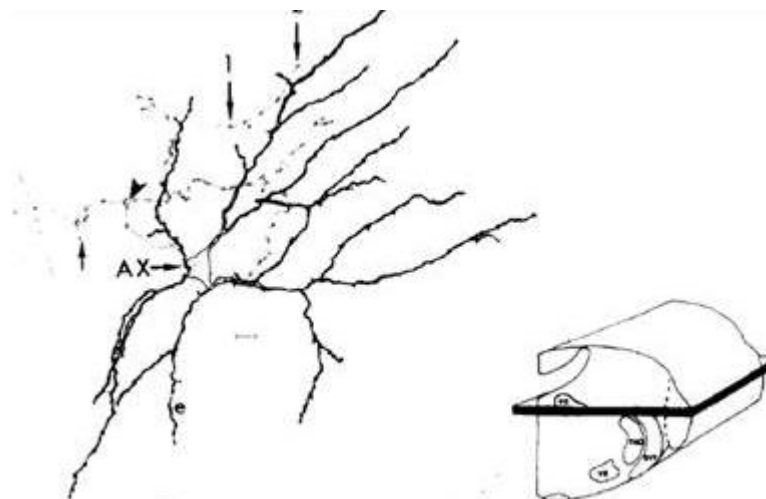


Figura 7 Planos de corte del cerebro de rata para localizar neuronas del subnúcleo *oralis*, se muestra la morfología de una neurona multipolar típica de este sitio.

A. Arborización dendrítica

Al evaluar el número de intersecciones dendríticas por círculo utilizando el análisis de Sholl, es decir, cuantificar del número de veces que las dendritas atraviesan los círculos concéntricos al núcleo (la distancia entre cada círculo es de 10 μm), pudimos comparar el grado de arborización entre los distintos grupos, incluso estimar si la mayor o menor arborización es proximal o distal al núcleo.

En los grupos de machos observamos un aumento significativo de la arborización dendrítica del grupo D en comparación del C a nivel del círculo 4 (40 μm de distancia al núcleo) ($p=0.004$); así como de los grupos grupo D y DP en comparación de los grupos 4 y 6 ($p=0.02$, $P=0.003$).

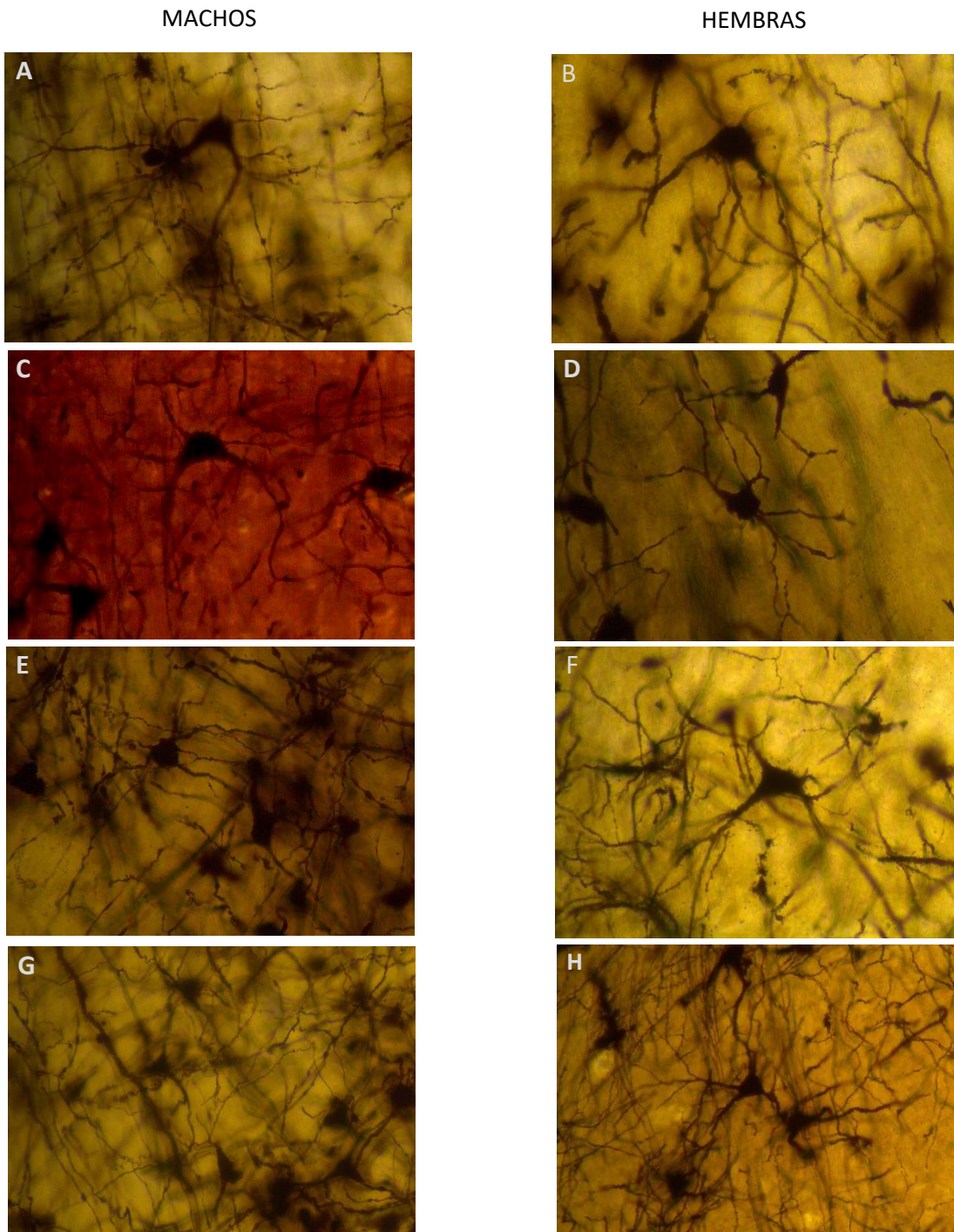


Figura 8 Morfología neuronal del subnúcleo *oralis* de ratas vistas en corte transversal a nivel del puente A. Control B. Control C. Control+ Periodontitis D. Control + Periodontitis E. Diabetes F. Diabetes G. Diabetes +Periodontitis H. Diabetes + Periodontitis. Fotografías tomadas con una amplificación de 40X

En cuanto a los grupos de hembras, después de realizar el análisis estadístico encontramos que hay una disminución significativa de la arborización dendrítica del grupo D y el CP a nivel de los círculos 1 ($p=0.04$) y 20 ($p=0.006$). También disminución de la arborización entre el grupo DP y el C en los círculos 8 ($p=0.02$) y 10 ($p=0.05$). Hay una disminución de arborización dendrítica entre el grupo D y el C, así como en Dy DP en el círculo 1 ($p=0.02$, $p=0.01$) Finalmente disminución de la arborización del grupo de DP en comparación del CP y entre C comparación con CP en el círculo 20 ($p=0.001$, $p=0.01$) (Ver figura12).

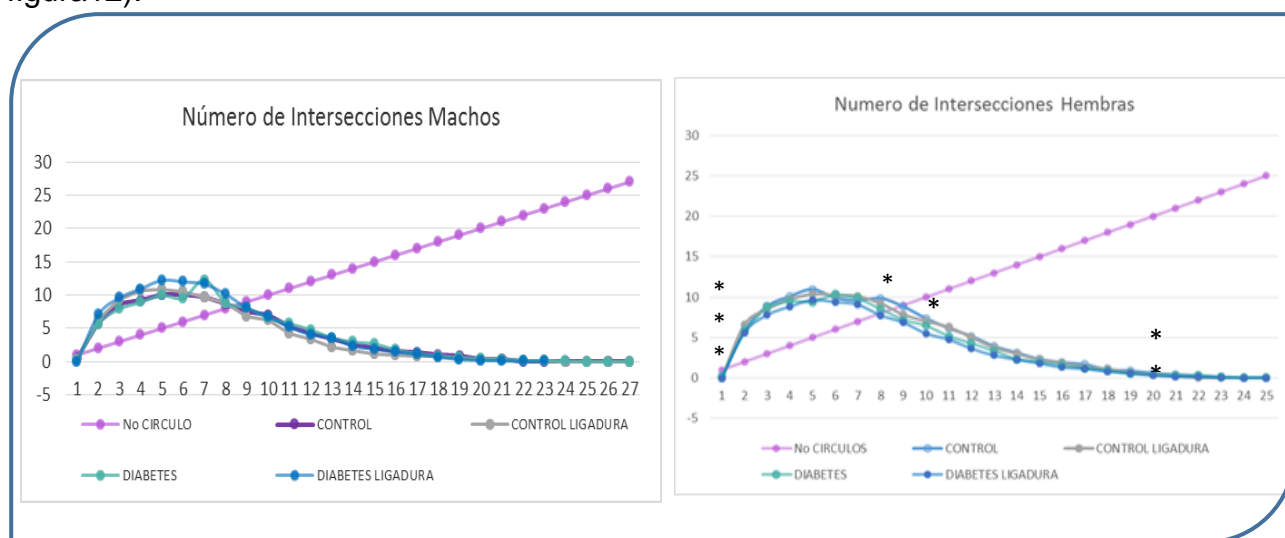


Figura No12. Arborización dendrítica de los grupos de machos y hembras expresada como el número de intersecciones de las dendritas cada 10 μm . * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), *** ($p<0.001$).

A. Longitud dendrítica

Para cuantificar la longitud dendrítica se hizo la sumatoria de la longitud de las dendritas expresada en micras para cada uno de los órdenes de dendritas observados (el orden se asigna de manera creciente cada vez que una dendrita se bifurca, de manera que a mayor ramificación mayor número de orden).

En los machos existe disminución significativa de la longitud dendrítica del grupo CP en comparación de su grupo control (C) ($p=0.08$) en el número de orden 4. Mientras que

existe un aumento de la longitud dendrítica de las ratas DP en comparación con las D ($p=0.007$) en el número de orden 4.

En el número de orden 6 encontramos una mayor arborización del grupo DP en comparación con D, y comparación entre CP- DP ($p=0.01$)($p=0.01$).

En el caso de las hembras existe disminución significativa entre el grupo DP y el grupo D en el número de orden 5 ($p=0.02$) y también comparado con el CP ($p=0.03$); encontramos diferencias entre C y CP ($p=0.02$) también observamos entre D y C ($p=0.01$) (Ver figura 13)

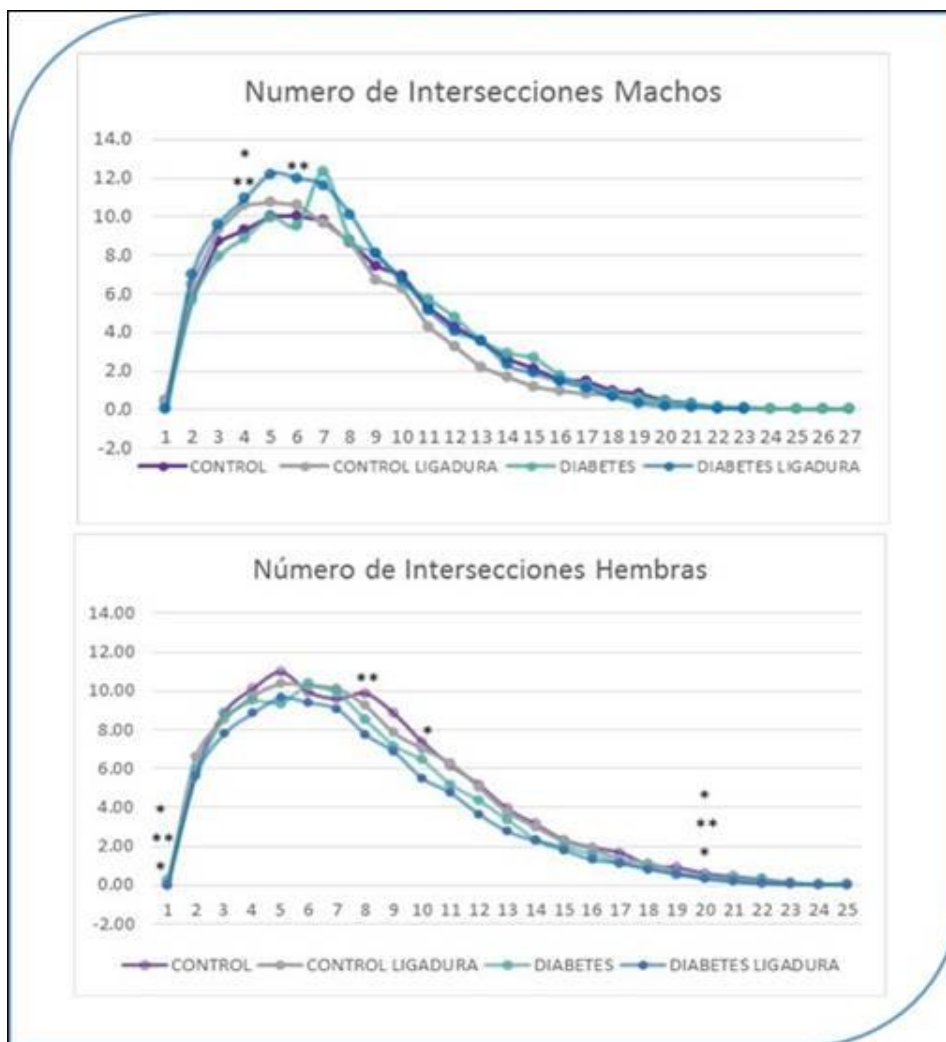


Figura 9 Longitud dendrítica expresada en micras por cada número de orden observado en todos los grupos. En el grupo de machos tuvo una diferencia significativa el grupo con DP. En el grupo d hembras hubo una diferencia significativa con un aumento en la densidad dendrítica en el grupo control.

B. Longitud dendrítica total

Finalmente se cuantificó la longitud dendrítica total por grupo estudiado y poder observar de manera general la respuesta morfológica de las neuronas ante la inflamación provocada por la bolsa periodontal.

En los machos no observamos diferencia estadísticamente significativa de la longitud dendrítica total entre los distintos grupos de estudio con un valor de $p=0.8$.

En las hembras detectamos disminución estadísticamente significativa de la longitud dendrítica entre el grupo D y el CP control enfermedad y diabetes con un valor de $p=0.01$ (Ver figura 14).



Figura 10 Comparación de la arborización dendrítica total entre los distintos grupos de estudio, de hembras y machos. En el grupo control ligadura se observó un nivel significativo con una $P=0.01$ * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), *** ($p<0.001$).

Control de peso y de glucemia

Al inicio del estudio y justo antes de la eutanasia se realizó la comparación del peso y la glucemia de todos los grupos de estudio.

En los resultados de peso en hembras encontramos una diferencia significativa entre los grupos según su condición con un valor de $p=0.03$. Se observó un aumento en el peso de las ratas DP comparadas con los grupos C, CP y D.

En los machos se observó una diferencia significativa entre los grupos con un valor de $p= 0.001$. Se encontró un mayor peso del grupo CP en comparación el grupo C, sin embargo en el grupo CP se observó un peso más bajo que los grupos D y DP.

En los resultados de glucemia en hembras no observamos un valor estadísticamente significativo $p=0.07$.

En los machos observamos un aumento en la glucemia del grupo C en comparación con los grupos D y DP.



Figura 11 Control de peso y Control de glucemia de los distintos grupos de estudio. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

11. DISCUSIÓN

El presente estudio pretende aportar nuevo conocimiento acerca de los posibles cambios provocados a la morfología neuronal del subnúcleo *oralis*, como respuesta a la inflamación periodontal inducida por la colocación de una ligadura metálica al primer molar inferior derecho de ratas diabéticas y obesas (cepa Zucker) (DP) y comparar los hallazgos contra la morfología de ratas sólo con diabetes (D), así también comparar contra la morfología de ratas sanas de la cepa Sprague-Dawley (C) y sanas (sin diabetes) con inducción de periodontitis (CP).

Si bien es cierto que se ha podido describir la anatomía y fisiología de la vía sensitiva trigeminal tanto en humanos como en animales de laboratorio, al momento actual se desconoce si un estímulo como la inflamación del ligamento periodontal provoca señales nerviosas que propicien cambios adaptativos en las neuronas de relevo que se dirigen hacia la corteza somatosensorial en específico de las neuronas del subnúcleo *oralis*, importante por recibir información de mecanorreceptores periodontales. Se desconoce si la magnitud de estos cambios adaptativos de las neuronas del subnúcleo *oralis* puede ser distinta si el sujeto y en este caso, el modelo murino presenta previamente una enfermedad sistémica como la diabetes acompañada de obesidad.

En cuanto a la relación entre la diabetes y la enfermedad periodontal varios autores que han realizado estudios en humanos y en modelos animales sugieren que es bidireccional (Li y cols., 2009) reportando que la diabetes se asocia con niveles elevados de varias citocinas proinflamatorias y otros mediadores en la saliva y el fluido crevicular, del mismo modo existe evidencia de que la periodontitis en individuos diabéticos (Segura-Egea y cols, 2012; Kuo y cols., 2008) y no diabéticos aumenta los niveles sistémicos de citocinas que promueven la inflamación (Chapple y cols, 2012; Pizzo y cols., 2010). La enfermedad periodontal adquiere gran relevancia pues es de las enfermedades crónicas más frecuentes con condiciones inflamatorias de los seres humanos en todo el mundo. La forma destructiva de enfermedad periodontal, la periodontitis, afecta aproximadamente al 50% de los adultos y más del 60% de los mayores de 65 años con periodontitis grave que impacta al 10-15% de las poblaciones (Chapple y cols, 2012).

Los efectos de la hiperglucemia y la resistencia a la insulina como factores asociados a la diabetes mellitus tipo 2 actualmente están siendo ampliamente estudiados para conocer su impacto sobre la predisposición a padecer o incrementar el daño de enfermedades sistémicas preexistentes en el individuo (Segura-Egea y cols, 2012; Claudina y cols, 2012). Si bien es cierto que las ratas Zucker representan más bien un modelo de diabetes tipo 1, y que en nuestro caso no encontramos diferencias significativas en la glucemia de los distintos grupos, esto podría explicar la relevancia de los factores ambientales como la dieta en la aparición de la hiperglucemia, ya que otros autores si han observado dicha condiciones en esta cepa después de dar una dieta hipercalórica (Nascimirnto y cols, 2013). La observación histopatológica en los grupos de machos nos muestra disminución de tejido fibroso en el grupo CP en comparación con el sano (C) y entre el grupo de DP en comparación con el CP lo que concuerda con los resultados que obtuvo Huaixiu L. y cols (2016), quienes encontraron un aumento de osteoclastos al disminuir los niveles de fibroblastos, ya durante el estado inflamatorio se genera la apoptosis de lo fibroblastos a través de citoquinas. (Arce R y cols, 2007)

Sin embargo, no influyó de manera importante en la severidad del daño al tejido periodontal en el grupo de las hembras, como lo muestran nuestros resultados histopatológicos, ante este hallazgo creemos importante investigar si la presencia de bolsas periodontales por un tiempo mayor a 14 días, genera un mayor daño a los tejidos de soporte del diente, o bien investigar si existen factores hormonales en las hembras que generan cierta protección ante este tipo de agresiones.

El ligamento periodontal recibe densa inervación sensorial de las terminaciones nerviosas libres y terminaciones mecanorreceptoras especializadas. Aunque hay varios tipos de mecanorreceptores en el ligamento periodontal, las terminaciones de Ruffini son esenciales. La morfología y las propiedades histoquímicas de las terminaciones periodontales de Ruffini han sido ampliamente estudiadas en humanos y ratas, cuyas diferencias están plenamente identificadas (Maeda y cols., 1999; Wakisaka y cols., 2000). El conocimiento de tal vía sensitiva direccional es importante para comprender las funciones perceptivas y la modulación aferente de las respuestas motoras de hecho, hay estudios

recientes que sugieren roles específicos para estas aferentes en la regulación sensoriomotora de los movimientos de masticación (Trulsson y cols., 1992).

Resultados de estudios de investigación básica y clínica han mostrado que ante estímulos como movimientos dentales, estos mecanorreceptores se adaptan, incluso cuando hay lesión a estas aferentes (Wakisaka y cols., 2000), lo que se desconoce aún es cómo responden a estímulos agresivos (plasticidad neuronal) las neuronas del subnúcleo *oralis* ante estos estímulos y otros como lo es la inflamación característica de la enfermedad periodontal, objetivo importante de nuestro estudio. Entendiéndose como plasticidad a El término plasticidad cerebral expresa: la capacidad adaptativa funcional del sistema nervioso para minimizar los efectos de las lesiones a través de modificar su propia organización estructural y funcional. Por lo general ocurre una recuperación de funciones que puede continuar por años. El grado de recuperación depende de muchos factores que incluyen edad, área comprometida, cantidad de tejido dañado, rapidez con la que se produce el daño, programas de rehabilitación y factores ambientales y psicosociales (en el caso del humano) (Aguilar F, 2002). La capacidad del cerebro para adaptarse y compensar los efectos de la lesión, aunque sólo sea de forma parcial, es mayor en los primeros años de la vida que en la etapa adulta. Los mecanismos por los que se llevan a cabo los fenómenos de plasticidad son histológicos, bioquímicos y fisiológicos, tras los cuales el sujeto va experimentando una mejoría funcional-clínica, observándose recuperación paulatina de las funciones perdidas. Aun cuando los circuitos interneuronales se establecen genéticamente, la fuerza o la eficiencia de ciertas conexiones no está determinada totalmente; de ello se infiere que dichos circuitos son capaces de modificar sus propiedades como resultado de cambios en su actividad. Los efectos de los cambios en el medio externo sobre la estructura y función del sistema nervioso tienden a ser prominentes en el sistema sensorial. La Organización Mundial de la Salud (1982) define el término neuroplasticidad como la capacidad de las células del sistema nervioso para regenerarse anatómica y funcionalmente, después de estar sujetas a influencias patológicas ambientales o del desarrollo, incluyendo traumatismos y enfermedades. Esto le permite una respuesta adaptativa (o maladaptativa) a la demanda funcional. La plasticidad funcional está acompañada por plasticidad estructural. Entre los mecanismos de reorganización funcional más importantes están el

desenmascaramiento, el retoño sináptico, la arborización dendrítica, la inhibición, facilitación y modificación de neurotransmisores, entre otros.

Enfocados a conocer los cambios en la arborización y longitud dendrítica apoyados en la tinción de Cox-Golgi y en las tinciones de Hematoxilina-eosina y de Masson para conocer los cambios histopatológicos a nivel del molar al que se le indujo la bolsa periodontal, no encontramos presencia de inflamación importante, aunque sí disminución, en el tejido fibroso, esta disminución fue provocado por el estado inflamatorio provocando su apoptosis por vía extrínseca desencadenada por el FNT.(Arce, 2007) lo cual creemos que generó respuestas de plasticidad evidentes en las neuronas del subnúcleo *oralis*, sólo en el grupos de hembras diabéticas mostró una tendencia a la disminución de la longitud dendrítica total en comparación con el grupo control y estadísticamente significativa en comparación con el grupo sano con periodontitis. Esta disminución de la longitud en el grupo de diabéticas se observa más significativa en comparación con el resto de los grupos en las dendritas de orden 2, 3, y 4 que se encuentran muy cercanas al núcleo. Lo cual nos motiva a investigar la influencia sobre las respuestas de plasticidad neuronal de otros factores relacionados con la bidireccionalidad de la diabetes y enfermedad periodontal, como lo son factores de crecimiento neuronales, la presencia de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en sangre y a nivel de la bolsa periodontal, la presencia de metaloproteinasas destructoras de colágeno, hemoglobina glucosilada, observar los posibles cambios posteriores a inflamación crónica producida por bolsas periodontales con mayor tiempo de evolución.

Desde luego es de interés de nuestro grupo de investigación investigar los cambios morfológicos de las neuronas involucradas en todas la vía mecanoceptiva que va hacia la corteza somatosensorial como son la del tálamo en su región ventro posteromedial y las de la corteza somatosensorial, que si bien se conoce mucho de su fisiología y aspectos somatotópicos (Fujita y cols., 2017), se desconocen las posibles respuestas de plasticidad ante estímulos como la enfermedad periodontal.

Finalmente la generación de nuevo conocimiento respecto de la neurofisiología de la vía sensitiva trigeminal es importante para el estomatólogo porque permite comprender la

naturaleza de las respuestas adaptativas y de plasticidad neuronal ante estímulos fisiológicos (fuerzas ortodóncicas, resorción ósea, inflamación) y patológicos (enfermedad periodontal, caries, desórdenes temporomandibulares, traumatismos, infecciones, fármacos, etc.) de tipo mecánicos, térmicos, nociceptivos y químicos. Esto permitirá mejorar las acciones preventivas, diagnósticas y de generación de mejores terapias farmacológicas y no farmacológicas para estas enfermedades de interés en estomatología.

12. CONCLUSIONES

Ratas hembras diabéticas y obesas de la cepa Zucker muestran disminución de la longitud dendrítica total en comparación con el grupo sin diabetes pero con inducción de periodontitis.

Ratas macho diabéticas y obesas de la cepa Zucker muestran disminución de la longitud dendrítica de las dendritas de cuarto orden en comparación con los grupos sano con periodontitis y diabético con periodontitis.

La disminución del tejido fibroso en el ligamento periodotal es debido a el estado inflamatorio de nuestro modelo y por la presencia de citosinas que generan su apoptosis como es el caso del FNT.

13. BIBLIOGRAFÍA

Aiuto F. Suvan J. Obesity, inflammation in oral infections Are micro ARN's the missing link?. *J Dent Res.*2012; 91(1): 5-7.

Aleixandre A. Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinol Nutr.* 2008; 55(5):217-22

Arce R. Tamayo O. Cortés A. Apoptosis de fibroblastos gingivales en periodontitis. *Colomb. Med.* 2007 Sep; 38(3): 197-209.

Breivik T. Opstad, P. Gjermo P. Thrane P. "Effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity on periodontal tissue destruction in rats". *European Journal of Oral Sciences.* 2000; 108(2): 115–122.

Bretz W. Weyant R. Corby P. Ren D. Weissfeld L. Kritchevsky S. et al. Systemic inflammatory markers, periodontal diseases, and periodontal infections in an elderly population. *J Am Geriatr Soc .*2005; 53(9): 1532–1537.

Chapple I. Genco R. Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Jurnal of Clin Periodontol* 2013; 40 (Suppl. 14): S106–12.

Claudino M. Gennaro G. Cestari T. Spadella C. Garlet G. Assis G. Spontaneous Periodontitis Development in Diabetic Rats Involves an Unrestricted Expression of Inflammatory Cytokines and Tissue Destructive Factors in the Absence of Major Changes in Commensal Oral Microbiota. *Hidawi.*2012;2012:10.

Endo Y. Tomofuji T. Ekuni D. Irie K. Azuma T. Tamaki N. et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol.* 2010; 81(4): 520-526.

Fernandez-Real J. Lainez B. Vendrell J. Rigla M. Castro A. Peñarroja G. Shedding of TNF-alpha receptors, blood pressure, and insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282(4): E952–959.

Fujita S. Kaneko M. Nakamura H. and Kobayashi M. Spatiotemporal Profiles of Proprioception Processed by the Masseter Muscle Spindles in Rat Cerebral Cortex: An Optical Imaging Study. *Front. Neural Circuits. NCBI.* 2017; 30(11):4.

Gómez J. Mariaud R. Metaloproteinasas de la matriz en pacientes con periodontitis y diabetes mellitus. *Rev Mex Periodontol.* 2016; 7 (2): 55-60

Graves D. Kang J. Andriankaja O. Wada K. Rossa C. Animals models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol.* 2012; 15:117 -132.

Hugués H. Rodríguez G. Marrero R. Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Cub Endocrinol.* 2002; 13(2):160-168.

Kaur G. Gupta N. Goyal L. Review article: obesity and periodontal disease. *Indian J Dent Sci.* 2010; 2(5): 33-35.

Kuo L. Polson A. Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health* 2008; 122(4):417–33.

Lazarov N. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol.* 2002; 66(1):19-59

- Li P. He L. Sha Y. Luan Q. Relationship of metabolic syndrome to chronic periodontitis. *J P.* 2009; 80(4):541–9.
- Maeda T. Ochi K. Nakakura-Ohshima K. Youn S. Wakisaka S. The Ruffini ending as the primary mechanoreceptor in the periodontal ligament: its morphology, cytochemical features, regeneration, and development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10, 307–327.
- Mats T. Roland S. Johansson. Kurt A. Olsson. Directional sensitivity of human periodontal Mechanoreceptive afferents to forces applied to the teeth. *Journal of Physiology.*1992; 447: 373-389
- Micklem K. A human macrophage associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. *British J Hematol.* 1989; 73(1): 6-11.
- Mishima Y. Kuyama A. Tada A. Takahashi K. Ishioka T. Kibata M. Relationship between serum tumor necrosis factor alpha and insulin resistance in obese men with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001. 52(2): 119–123.
- Nishimura F. Iwamoto Y. Mineshiba J. Shimizu A. Soga Y. Murayama Y. Periodontal disease and diabetes mellitus: The role of tumor necrosis factor-alpha in a 2-way relationship. *J Periodontol.* 2003; 74(1): 97–102.
- Nascimento C. da Silva F. Bonfleur M. Nassar C. Nassar P. Radiographic evaluation of effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Dovepress.* 2013.
- Organizacion Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes resumen de orientacio. *Who.*2016,:4
- Paxinos G. y Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4a ed. Estados Unidos. Editorial Academic Press. 1998.
- Pontes A. Flyvbjerg A. Buschard K. Holmstrup P. Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studies. *J Periodontol.* 2007; 78 (7): 1264–1275.
- Pihlstrom B. Michalowicz B. Johnson N. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005; 19; 366(9499):1809-1820.
- Pizzo G, Guiglia R, Russo L, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *EJIM* 2010; 21(6):496-2.
- Richard S, Jonathan S, Paul Z et al. IDF Diabetes Atlas. 4ª Ed. Disponible en [<http://www.idf.org/diabetesatlas>] Acceso July 28 2014
- Rivera C, Monsalve F, Suazo I, Becerra J. Stress increases periodontal inflammation. *Exp Ther Med.* 2012; 4(5): 883-888.
- Santhosh K. Rushabd J. Chandrakant D. Prabu D. Relationship of body mass index with periodontal health status of green marble mine laborers in Kesariyaki, India. *Braz Oral Res.* 2009; 23(4): 365-369.
- Segura J. Castellanos L. Machuca G. López J. González M. Velasco E. et al. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* Mar 2012;17 (2):e356-61.
- Semenoff-Segundo A. Nogueira A. Dele T. Cortelli J. Oliveira F. Cavalca S. et al. Effects of two chronic stress models on ligature-induced periodontitis in Wistar rats. *Archives of Oral Biology.* 2012; 57(1): 66-72.
- Taylor G. Borgnakke W. Periodontal disease: Associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis.* 2008; 14(3): 191–203.
- Teles R. Sakellari D. Teles F. Konstantinidis A. Kent R. Socransky S. et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol.* 2010; 81(1): 89–98.

Tsuru K. Otani K. Kajiyama K. Suemune S. Shigenaga Y. Central terminations of periodontal mechanoreceptive and tooth pulp afferents in the trigeminal principal and oral nuclei of the cat. *Brain Research*. 1987; 485 (1): 134-145

Wakisaka S. Atsumi Y. Youn S. Maeda T. Morphological and cytochemical characteristics of periodontal Ruffini ending under normal and regeneration processes. *Arch Histol Cytol*. 2000; 63, 91–113.

Zelkha S. Freilich R. Amar S. Periodontal innate immune mechanism relevant to atherosclerosis and obesity. *Periodontol*. 2000. 2010; 54(1): 207-221.

Zhu-Ling J. Yu-Qiong C. Rui G. Ying L. Zhao-Chen F. Bin Z. et al. Study of TNF- α , IL-1 β and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus and periodontitis. *Disease Markers*. 2013; 34 (5): 295–304