



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL  
INFLAMOSOMA EN TEJIDO GINGIVAL DE PACIENTES CON  
PERIODONTITIS CRÓNICA Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

MUÑOZ SAAVEDRA ÁNGEL ENRIQUE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ

DICTAMINADORES

DRA LETICIA MOREO FIERROS

DR. EDUARDO F. LLAMOSAS HERNANDEZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# INDICE

	Resumen.	1
1.	Introducción.	
	1.1    Diabetes mellitus.	2
	1.2    Enfermedad periodontal.	4
	1.2.1    Periodontitis crónica.	5
	1.3    Relación entre la diabetes mellitus y la periodontitis crónica.	6
	1.4    Inflamosoma.	6
2.	Antecedentes.	
	2.1    La inflamación como vínculo entre la DM2 y la PC	10
	2.2    Participación del inflamosoma en la DM2 y la PC	10
3.	Justificación.	12
4.	Hipótesis.	13
5	Objetivos.	
	5.1    Objetivo General.	13
	5.2    Objetivo específico.	13
6.	Material y métodos.	
	6.1    Tipo de Investigación.	14
	6.2    Población de estudio.	14
	6.3    parámetros de inclusión.	14
	6.4    Criterios de exclusión.	15
	6.5    Toma y manipulación de las biopsias de tejido gingival.	16
	6.6    Obtención de RNA total.	17

---

CIRUJANO DENTISTA	FESI	UNAM
6.7	Preparación del RNA.	17
6.8	Síntesis de c DNA.	18
6.9	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. (PCR-RT)	19
6.10	Procedimiento histopatológico.	19
6.11	Tinción de hematoxilina y Eosina.	19
6.12	Inmunohistoquímica.	20
6.13	Recolección de líquido gingivocrevicular.	21
6.14	Manipulación de muestras de líquido gingivo-crevicular.	21
6.15	Técnica de ELISA.	22
6.16	Análisis Estadístico.	24
7.	Resultados.	
7.1	Análisis de parámetros clínicos de la población de estudio.	25
7.2	Análisis de los parámetros glicémicos de la población con diabetes mellitus tipo 2.	27
7.3	Características histológicas de las muestras gingivales	28
7.4	Determinación del m RNA de NLRP3, ASC y Caspasa-1 en muestras gingivales.	30
7.5	Características proteicas de las muestras de tejido gingival.	31
7.6	Determinación de las citocinas de líquido Gingivocrevicular.	33
8.	Discusión.	34
9.	Conclusión.	37
10.	Referencias bibliográficas.	38

## RESUMEN

La periodontitis crónica (PC) es una enfermedad infecciosa caracterizada por inflamación persistente que propicia la destrucción de los tejidos de soporte del diente. Hay una fuerte asociación de la PC y la diabetes mellitus 2 (DM2). Se ha propuesto que la DM y la PC son enfermedades bidireccionales, es decir, el desarrollo de una de estas enfermedades puede afectar el desarrollo o la severidad de la otra y viceversa, el proceso inflamatorio crónico presente en ambas patologías podría ser el factor que relaciona ambas patologías, ya que las citocinas proinflamatorias incrementadas en la DM propician las condiciones ideales para la destrucción de los tejidos periodontales, mientras que un proceso infeccioso crónico localizado como la PC puede incrementar citocinas inflamatorias a nivel sistémico y pueden inducir resistencia a la insulina. Investigar el origen y producción de citocinas inflamatorias comunes y descritas en ambas patologías como la IL-1 $\beta$  para poder entender la bidireccionalidad entre ambas enfermedades. La IL-1 $\beta$  es activada a través de la Caspasa-1 la cual es escindida a través de un complejo proteico llamado inflamosoma. El inflamosoma es un mecanismo importante de la inmunidad innata responsable de catalizar la activación de Caspasa-1 la cual activa la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 y puede actuar como sensor de señales de daño metabólico en la DM2, por lo que puede ser un mecanismo común que regule la inflamación en la PC y en la DM2. **Objetivo:** Determinar la expresión de las proteínas que componen el Inflamosoma en tejido gingival y la cantidad de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 contenidas en el líquido gingival crevicular (LGC) de pacientes con periodontitis crónica y diabetes mellitus tipo 2.

**Metodología:** Se seleccionaron 45 pacientes de las clínicas de especialidad de endoperiodontología y ortodoncia de la FES Iztacala UNAM y de acuerdo a su diagnóstico periodontal y sistémico se dividieron en 3 grupos: sanos, PC, PC-DM2. Se obtuvieron biopsias de encía y LGC. Las biopsias fueron analizadas por RT-PCR e inmunohistoquímicas para las proteínas NLRP3, ASC y Caspasa-1 y en el LGC se determinó la concentración de IL-1 $\beta$  e IL-18 por medio de ELISA. **Resultados:** Se observó mayor expresión del RNAm y células positivas de NLRP3, ASC y Caspasa-1 y mayor cantidad de IL-1 $\beta$  e IL-18 en pacientes con PC y PC-DM2. Se observó la sobreexpresión de Caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en los pacientes con PC-DM2 evidenciando la sobre activación del inflamosoma. **Conclusiones:** El inflamosoma es un mecanismo común inflamatorio en la PC y la DM2. La activación del inflamosoma puede contribuir de forma importante a la destrucción de los tejidos periodontales.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Diabetes Mellitus.

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica, crónica y hormonal caracterizada por el aumento de glucosa en sangre. A esta condición se le conoce como hiperglicemia y es ocasionada por alteraciones en la producción, en la calidad de insulina o cambios en la respuesta del organismo a la acción de la insulina. (Assoc 2011)

La DM es clasificada de acuerdo a sus características fisiopatológicas en 3 categorías.

- 1.1.1 La Diabetes Mellitus tipo I (DM1) es el resultado de la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, encargados de la producción de insulina, provocando la deficiencia absoluta de insulina en el organismo.

La DM1 representa del 5% al 10% de la población diagnosticada con Diabetes Mellitus a nivel mundial y puede dividirse por su etiología en 2 subcategorías.

- a) Diabetes Mellitus tipo 1 autoinmune: resultante de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas por auto anticuerpos para los islotes pancreáticos y para insulina, descarboxilasa de glutamato específico para su isoforma 65, también conocido como GAD2 O GAD65 y para IA-2 e IA2 $\beta$ . Alguno o usualmente varios de estos auto anticuerpos están presentes en el 85 o 90% de individuos cuando se les detecta inicialmente la hiperglicemia en ayunas. (Assoc 2011)
- b) Diabetes Mellitus tipo I Idiopática. Algunas formas de este tipo de diabetes mellitus no tienen factores etiológicos conocidos. Estos pacientes tienen una permanente insulinopenia y se ha atribuido a factores hereditarios ya que carece de evidencias inmunológicas contra las células  $\beta$  pancreáticas. (Kerner and Bruckel 2011)

- 1.1.2 La Diabetes Mellitus tipo II (DM2) es caracterizada por la hiperglicemia ocasionada por el desarrollo de resistencia a la insulina en el organismo y la deficiencia de las células  $\beta$  pancreáticas para secretar insulina. La DM2

constituye el 90% de la población diabética a nivel mundial. Existen diversas causas probables de esta forma de diabetes, aunque su causa específica no es bien conocida. La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes tienen obesidad, lo que por sí mismo causa algún grado de resistencia a la insulina.

La patogenia de la DM2 implica complejas relaciones entre factores genéticos y ambientales y recientemente se ha propuesto que la DM2 tiene un componente desregulador en el sistema inmune importante ya se ha asociado con el incremento de citocinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF $\alpha$  que pueden provocar resistencia a la insulina. (Kerner and Bruckel 2011)

La diabetes mellitus tipo 2 ha sido postulada como una enfermedad inflamatoria, provocada por la pre activación de las células que componen sistema inmune innato, propiciando un estado inflamatorio persistente. (King 2008, Harpreet and Luthra 2013)

1.1.3 La Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) es una condición de intolerancia a la glucosa durante el embarazo. Aunque en la mayoría de los casos, la DM se resuelve después del nacimiento del producto, en algunos casos puede persistir la intolerancia a la glucosa y se ha considerado que es un factor predisponente importante para el desarrollo de DM2 tanto para la madre como para el producto. (Assoc 2011)

1.1.4 Otros tipos específicos de diabetes

- a) Defectos genéticos de la acción de la insulina.
- b) Enfermedades exocrinas del páncreas.
- c) Endocrinopatías.
- d) Inducción química o drogas.
- e) Infecciones.
- f) Síndromes genéticos asociados con diabetes mellitus. (Assoc 2011)  
(Kerner and Bruckel 2011)

Actualmente la DM se ha convertido en una epidemia a nivel mundial (FDI. 2015) y según la OMS lo fue desde el 2005 (Smyth and Heron 2006). A nivel mundial existen aproximadamente, 415 millones de personas con DM, y según predicciones de Federación Internacional de

Diabetes (IDF) para el año 2040 habrá 642 millones de personas diagnosticadas con esta enfermedad.

Tan sólo en México existen 11.5 millones de personas diagnosticadas con DM siendo el 6to país con mayor cantidad de diabéticos en el mundo. (Guariguata et al. 2014) (FDI. 2015)

La DM representa un problema de salud, no sólo por su gran incidencia, sino también por el gran número de complicaciones asociadas, que incluyen microangiopatías, nefropatías, retinopatías, neuropatías, desordenes cardiovasculares y periodontitis. (King 2008, Harpreet and Luthra 2013)

## **1.2 Enfermedad periodontal.**

La enfermedad periodontal incluye todas las alteraciones de cualquier origen que afecta las estructuras de inserción del diente y se caracteriza por una exposición bacteriana que puede fomentar una respuesta destructiva del huésped, lo que lleva a la pérdida de inserción periodontal, ósea y por último la posible pérdida de los dientes (Peña et al. 2008)

Según la Academia Americana de Periodontología desde el 2000 las alteraciones periodontales son clasificadas de la siguiente manera:

### **1.2.1 Enfermedades gingivales.**

- a. Enfermedades gingivales asociada únicamente a placa dentobacteriana.
- b. Enfermedades gingivales influenciadas por factores sistémicos.
- c. Enfermedades gingivales influenciadas por medicación.
- d. Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición.

### **1.2.2 Enfermedades gingivales no asociadas a placa dentobacteriana.**

- e. Lesiones originadas por bacterias específicas.
- f. Enfermedades gingivales de origen viral.
- g. Enfermedades gingivales de origen fúngico.
- h. Lesiones gingivales de origen genético.
- i. Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas.
- j. Lesiones traumáticas.
- k. Reacciones a cuerpo extraño.
- l. No especificadas. (NES)



### 1.2.3 Periodontitis.

- a) Periodontitis crónica (PC).
  - i. Localizada.
  - ii. Generalizada.
- b) Periodontitis agresiva.
  - i. Localizada.
  - ii. Generalizada.
- c) Periodontitis con manifestaciones de enfermedades sistémicas.
- d) Enfermedades periodontales necrotizantes.
  - Abscesos en el periodonto.
  - Periodontitis asociada a lesiones endodóncicas.
  - Deformidades y condiciones de desarrollo adquiridas.

(A. A. o. Periodontology 2000a) (T. A. A. o. Periodontology 2000c)

La más común de las enfermedades periodontales es la gingivitis ya que es una patología localizada, seguido por la periodontitis crónica generalizada. (Wiebe and Putnins 2000)

#### **1.2.1 Periodontitis crónica**

La periodontitis crónica (PC) es una enfermedad inflamatoria y destructiva crónica que afecta a los tejidos de soporte del diente, el hueso alveolar, el ligamento periodontal, el cemento radicular y la encía. (A. A. o. Periodontology 2000a) (T. A. A. o. Periodontology 2000c)

Una de las causas reportadas y desencadenantes de esta enfermedad es la interacción de los tejidos periodontales con la placa dentobacteriana. La placa dentobacteriana es un sistema ecológico formado por una densa capa de gérmenes que se desarrollan en las superficies dentales donde los mecanismos de limpieza oral son escasos o nulos y mientras más tiempo permanece sobre las estructuras dentarias comienza a organizarse para aumentar su patogenicidad. (Poyato et al. 2001)

El desarrollo de la periodontitis crónica está limitada a los tejidos blandos (encía) debido a colonización bacteriana de la placa dental localizada en las superficies dentales, provocando su inflamación, esta condición es conocida como gingivitis. (A. A. o. Periodontology 2000b)

Si el estímulo bacteriano y físico que causa la inflamación no es retirado este invade tejidos más profundos por medio del surco gingival, que aunado a mecanismos físicos y la propia respuesta inmune del individuo ante la infección periodontal causa inflamación y contribuye de manera importante a la destrucción de los tejidos periodontales, (Nassar et al. 2007) desencadenando la destrucción de la inserción de la encía al diente, destrucción de las fibras de ligamento periodontal y del cemento radicular, propiciando la formación de bolsas periodontales y la destrucción del tejido óseo alveolar, lo que provoca movilidad de los dientes y finalmente su extrusión. (Carranza 2004).

La respuesta inmune de un individuo con periodontitis crónica está caracterizada por la producción de metaloproteasas (matriz metaloproteasa 1, MMP1) y mediadores inflamatorios como citocinas (IL-1, IL-6, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y TNF $\alpha$ , e IL-8), quimiocinas (IL-8). (Nassar et al. 2007)

### **1.3 Relación entre la diabetes mellitus tipo 2 y la periodontitis crónica.**

Se ha propuesto que la DM y la PC son enfermedades bidireccionales, es decir, el desarrollo de una de estas enfermedades puede afectar el desarrollo o la severidad de la otra y viceversa. (Nishimura et al. 2007)

De hecho la PC es la sexta complicación asociada a la DM (King 2008, Harpreet and Luthra 2013) y se asocia a la DM con una mayor prevalencia (de 2 a 3 veces) así como en la extensión y severidad de la EP además de que la destrucción de los tejidos periodontales es extensa por una respuesta inflamatoria excesiva.(Pranckeviciene et al. 2014), pero también en sentido contrario, se ha propuesto que una inflamación o infección crónica local pueden contribuir al desarrollo de la diabetes, por lo que la infección de la PC provocada por bacterias induce un incremento de citocinas inflamatorias a nivel sistémico, tales como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  que provocan resistencia a la insulina. (Grover and Luthra 2013)

Se ha reportado que los pacientes con DM2 son más susceptibles a infecciones como la PC, algunos factores propuestos en esta asociación son la hiperglucemia, el incremento de ácidos grasos saturados en plasma, la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) y la formación elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS), que en conjunto provocan susceptibilidad de las estructuras periodontales a ser destruidos por medio de la activación de receptores. Por ejemplo, los AGEs producen un retraso de la cicatrización y reparación de los tejidos por cambios en la síntesis y función del colágeno (Grover and Luthra 2013), la hiperglicemia es capaz de activar a monocitos y macrófagos (Nishimura et al. 2007) y producir

altas concentraciones de ROS e inducir un ambiente de estrés oxidativo que incrementa la respuesta inflamatoria y activa señales de daño metabólico en las células.

Además, se sabe que las citocinas pro inflamatorias como la IL-6 y TNF $\alpha$ , leptina, resistina y adiponectina incrementadas en la diabetes mellitus pueden aumentar la inflamación local de los tejidos periodontales.(Mealey 2006)

Estas evidencias sugieren que la DM2 puede exacerbar la PC y a su vez, la PC puede contribuir al desarrollo de la DM2 siendo el factor común la sobreproducción de mediadores inflamatorios como las citocinas TNF $\alpha$ , IL-6, proteína C reactiva, leptina, resistina y adiponectina, IL-18 e IL-1 $\beta$ . (Grover and Luthra 2013; Reynolds et al. 2012)

Por lo que investigar el origen y producción de citocinas inflamatorias que han sido reportadas en procesos de destrucción de los tejidos de soporte dental y en procesos inflamatorios crónicos como es la IL-1 $\beta$  (Garlanda et al. 2013; Ruscitti et al. 2015) es importante para poder entender esta bidireccionalidad entre ambas patologías.

El precursor inactivo de la IL-1 $\beta$  es la proIL-1 $\beta$  el cual es escindido por la caspasa-1 a una citocina activa a través de un complejo de proteínas llamado inflamosoma.(Garlanda et al. 2013; Kolly et al. 2010; Dinarello 2013; Garlanda et al. 2013; Ruscitti et al. 2015)

#### **1.4 Inflamosoma.**

Los inflamosomas son un grupo de complejos proteínicos multimericos que se ensamblan en el citosol, consisten en una molécula activada NLR (receptor tipo NOD), ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) y la pro-caspasa 1. (Bo-Zong , 2015) (Triantafilou et al. 2016)

La formación del complejo del inflamosoma es iniciado por una variedad de sustancias derivadas de una infección, tejido dañado o daño metabólico (Martinon et al. 2009). El producto final del ensamble del complejo del inflamosoma es la activación de la pro-caspasa-1 en caspasa-1, la cual, activa proteolíticamente las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18. (Triantafilou et al. 2016) (Figura 1)

Se han identificado diversos inflamosomas incluyendo el NLRP1, NLRP2, NLRP3, AIM2 (double-stranded DNA sensors absent in melanoma 2) y el NLRC4 (Ozaki et al. 2015). El más caracterizado es el NLRP3. (Bo-Zong 2015)

En ausencia de activadores inmunológicos, la interacción interna ocurre entre el dominio NACHT y las repeticiones ricas en leucina, suprimiendo la interacción entre NLRP3 y ASC, por lo tanto previene el ensamblaje del inflamosoma (Inoue and Shinohara 2013).

En presencia de activadores inmunológicos como los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) o DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) u otros invasores exógenos o estrés ambiental, el NLRP3 permite la interacción entre sus dominios pirinas (PYDs) y el ASC. Posteriormente el dominio reclutador de caspasa (CARD) del ASC se une a la pro-caspasa-1, lo que da lugar a la formación del inflamosoma NLRP3. (Figura 1).

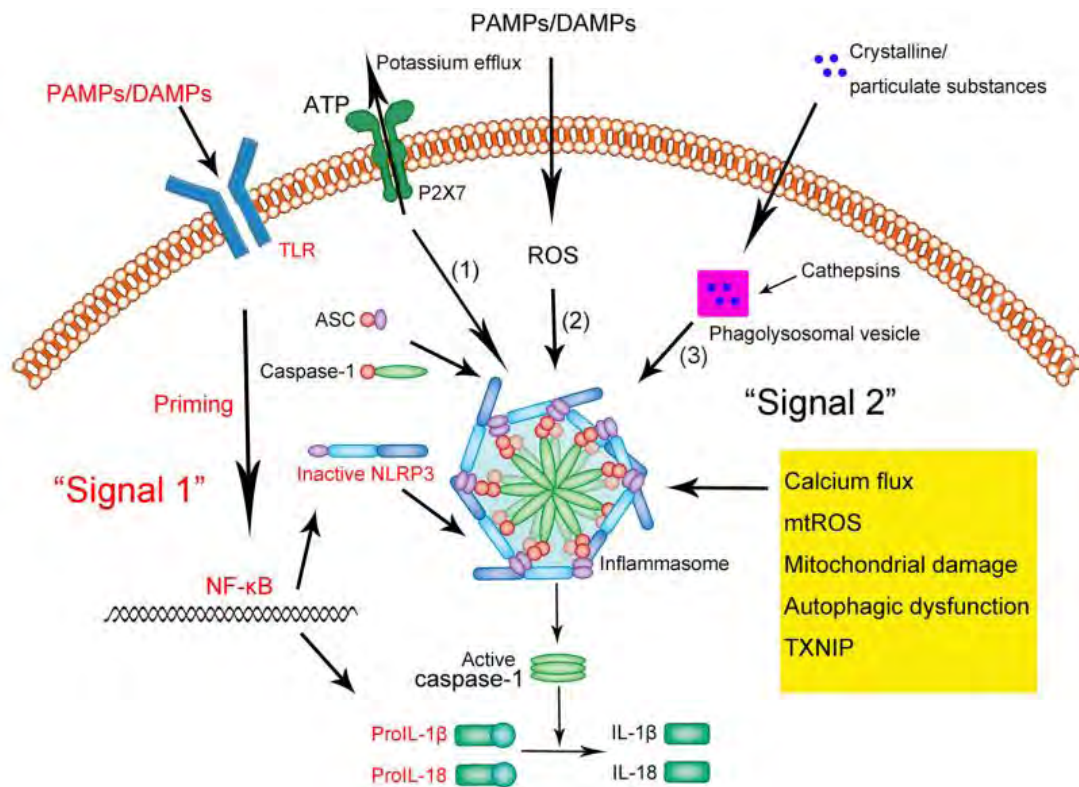
La formación de este complejo proteico rompe la pro-caspasa 1, dejando libre el tetrámero de la caspasa-1 activa, que a su vez induce la conversión de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 de sus formas inmaduras "pro" a citocinas activas, que son secretadas. La formación del inflamosoma también desencadena un proceso de muerte celular relacionada a la inflamación llamada piroptosis. (Jorgensen and Miao 2015; Schroder and Tschopp 2010; Willingham et al. 2009; Zhong et al. 2013).

El inflamosoma NLRP3 está presente sobre todo en células inflamatorias o del sistema inmunitario después de la activación por estímulos inflamatorios, como macrófagos, monocitos, células dendríticas y neutrófilos. (Guarda et al. 2011; Zhong et al. 2013)

La activación del inflamosoma NLRP3 parece ocurrir en dos etapas. La primera implica una señal de iniciación en la que muchos PAMPs o DAMPs son reconocidos por TLRs (receptores tipo Toll), que permite la activación de la vía de señalización del factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ), este factor de transcripción regula la transcripción de los componentes del inflamosoma incluyendo el NLRP3 inactivo, la pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, como se muestra en la figura 1 en la señal 1 marcado en color rojo. (Bauernfeind et al. 2009; Franchi et al. 2012; Franchi et al. 2014). El segundo paso de la activación del inflamosoma es la oligomerización del NLRP3 y el posterior montaje con ASC y pro-caspasa-1, que induce la transformación a la caspasa-1, la producción y secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 maduras. (Kim et al. 2015; Ozaki et al. 2015; Rabeony et al. 2015; Bo-Zong 2015)

Se han identificado una diversidad de agonistas endógenos y exógenos como activadores del inflamosoma NLRP3, sin embargo se ha asumido que el NLRP3 no interactura directamente con los activadores exógenos, debido a esto se ha propuesto que NLRP3 detecta cambios en el medio celular. (Ventura-Gallegos et al. 2012). Entre los activadores identificados se encuentran: las especies reactivas de oxígeno (ROS), cristales de colesterol, cristales de urato

manosódico e hidroxapatita, ATP extracelular, asbesto, ácidos grasos libres, hialurato, radiación UV, toxinas formadoras de poros, toxinas letales como flagenina y péptido muramil, RNA, DNA y flujo de potasio (K). (Sutterwala et al. 2014) (Hinojosa-Azaola and Alcocer-Varela 2012) (Masters 2013) (Bo-Zong 2015)



La figura 1. Esquema de la activación del inflamosoma por activación de NLRP3. Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los receptores tipo Toll (TLRs) son fosforilados y subsecuentemente activan el factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ). El NF- $\kappa$  $\beta$  promueve la transcripción de NLRP3, pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, después de la translación permanece en el citoplasma en forma inactiva. Esta señal se encuentra marcada en rojo. Un estímulo subsecuente activa el NLRP3 el cual facilita la oligomerización de las proteínas NLRP3, ASC y pro-Caspasa-1. Este complejo conocido como inflamosoma cataliza la conversión de pro-Caspasa-1 a Caspasa-1 la cual contribuye a la maduración y secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18. Se han propuesto y descrito tres modelos que activan la segunda señal. (1) ATP extracelular puede inducir Flujo de potasio (K) y activar el receptor P2X7 que a su vez promueve la activación del inflamosoma a través del NLRP3. (2) PAMPs y DAMPs desencadenan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que promueven el

ensamblaje y activación del inflamosoma por activación de NLRP3 (3) Fagocitosis de irritantes ambientales. (Bo-Zong 2015)

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1 La inflamación como vínculo entre la DM2 y la PC.**

La respuesta innata descontrolada parece contribuir a la exacerbación del estado inflamatorio crónico presente en la diabetes y en la periodontitis crónica, así mismo el estado inflamatorio contribuye a la asociación de ambas patologías, en concordancia con esta propuesta en un trabajo previo del laboratorio realizado en pacientes con PC y PC-DM2 se encuentro sobre expresión los receptores tipo Toll (TLR`s) en los estratos histológicos de los tejidos de la encía.

indicando que existe una mayor susceptibilidad a desarrollar una mayor respuesta inmune o una presente en la respuesta inflamatoria exacerbada presente en estos pacientes y en la severidad de la enfermedad periodontal, por medio de la activación de los TLR`s (Rojo-Botello et al. 2012)

Además de los TLR`s otros mecanismos de la inmunidad innata podrían estar sobre regulados y contribuir en la severidad de la PC por lo que es importante estudiarlos a detalle.

### **2.2 Participación del inflamosoma en la DM2 y la PC**

La relación entre la IL-1 y la DM2 ha sido bien estudiada ya que induce resistencia a la insulina (Grover and Luthra 2013; Reynolds et al. 2012), y de hecho se ha observado que esta relacionado con la activación del inflamosoma.

Se sabe que la hiperglicemia característica de la DM2 es capaz de inducir estrés oxidativo incrementando las ROS mitocondriales (Nishikawa et al. 2000), estas a su vez, son capaces de activar el ensamblaje del inflamosoma y la producción de IL-1 $\beta$  relacionada con la resistencia a la insulina e IL-18. (Esser et al. 2014) (Zhu and Nikolajczyk 2014)

Más aún, la inhibición del inflamosoma ha mostrado tener efectos positivos para una mejor señalización de la insulina en el tejido adiposo, musculo esquelético e incrementa la secreción de insulina en el páncreas. En un estudio realizado en modelos murinos se observó que la inhibición del inflamosoma puede llevar a una mejor señalización de la insulina en musculo

esquelético e incrementa la secreción de insulina en el páncreas, para estos fines se utilizaron ratones knockout de NLRP3 en comparación con ratones silvestres, ambos grupos fueron alimentados con dietas altas en ácidos grasos provocando en ellos síndrome metabólico para después ser sometidos a pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina. Se observó que los ratones knockout NALP3 con síndrome metabólico presentaban una sensibilización mayor a la acción de la insulina que los ratones silvestres con síndrome metabólico (Vandanmagsar et al. 2011).

Incluso se han realizado estudios usando un antagonista del receptor de IL-1 (anakinra) o los antagonistas específicos de IL-1 $\beta$  (gevokizumab, canakizumab y LY2189102) mostrando un efecto benéfico disminuyendo la hemoglobina glicosilada induciendo la función de las células  $\beta$  del páncreas y disminuyendo mediadores inflamatorios a nivel sistémico. (Larsen 2007 N Engl J Med; Ridker 2012 Circulation; Cavelti-weder 2012 Diabetes care; Sloan-Lancaster 2013 Diabetes care) lo que significa que contribuye a un mejor control de la hiperglicemia en pacientes con DM2.

Por otro lado, se ha estudiado poco la expresión y activación del inflamosoma en la enfermedad periodontal. Bostanci evaluó la expresión de NLRP3, ASC, IL-1 $\beta$  e IL-18 por PCR en tiempo real en diferentes grados de enfermedad periodontal, para lograrlo obtuvieron biopsias de tejido gingival de 58 pacientes los cuales fueron seleccionados y divididos en 4 grupos. Los grupos consistían en pacientes sanos, con gingivitis, con periodontitis crónica y con periodontitis agresiva generalizada. Observaron que la expresión relativa del ARN mensajero del receptor NLRP3 y las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 se encuentran sobre expresados en los pacientes con gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva generalizada en comparación con los pacientes sanos, lo que demostró un aumento en la producción de proteínas que conforman el inflamosoma en diferentes estadios de la enfermedad periodontal.(Bostanci et al. 2009a).

También se ha estudiado la activación del inflamosoma en cultivos celulares de monocitos ante el estímulo con *p. gingivalis*, los resultados indicaron que la bacteria periodonto patógena *p. gingivalis* es capaz de activar NALP3 y ASC mediada por el incremento de ATP y su receptor transmembranal P2X7, lo que produjo un incremento de IL1 $\beta$ . (Park et al. 2014).

A pesar de que se ha observado la expresión y activación del inflamosoma en la DM2 y la PC, no se ha estudiado la activación y expresión de este mecanismo inductor de inflamación en la asociación de la DM2 y PC.

### **3.- JUSTIFICACIÓN.**

La relación que guarda el Inflamosoma en la Diabetes mellitus y la enfermedad periodontal, nos hace pensar que la activación de este complejo multiproteico puede estar involucrada de manera importante en la relación viciosa de la PC y DM2. La activación del inflamosoma puede contribuir a la destrucción agresiva de los tejidos periodontales a través de la producción de IL-1 $\beta$  observada en pacientes con PC y DM2, pero al mismo tiempo la producción de la IL-1 $\beta$  producida por la PC puede llevar al desarrollo de resistencia a la insulina.

Por lo que la determinación de la expresión de las proteínas del Inflamosoma en biopsias de encía y la cuantificación de IL-1 $\beta$  e IL-18 en LGC de pacientes sanos, con PC y PC asociada a DM2, podrían ser útiles para el entendimiento de la interacción y relación entre ambas enfermedades y aportaría datos importantes para el desarrollo de futuras terapias que desvinculen ambas enfermedades.



#### **4.- HIPÓTESIS.**

El inflamosoma se encuentra sobre expresado y activado en la cavidad oral de pacientes con periodontitis crónica y DM2 en comparación con pacientes que sólo tienen PC.

#### **5.- OBJETIVOS.**

##### **5.1 Objetivo general.**

Determinar la expresión de las proteínas que componen el Inflamosoma en tejido gingival y la cantidad de citocinas IL1 $\beta$  e IL18 contenidas en el líquido gingival crevicular de pacientes con periodontitis crónica y diabetes mellitus tipo 2.

##### **5.2 Objetivo específico.**

Determinar en pacientes sanos y pacientes con periodontitis crónica con y sin diabetes mellitus tipo 2:

- 5.2.1 Expresión del ARNm de NLRP3, ASC Y Caspasa -1 en tejido gingival.
- 5.2.2 Expresión proteica de NLRP3 Y ASC en tejido gingival.
- 5.2.3 Determinar la cantidad de citocinas proinflamatorias IL1 $\beta$  e IL18 en líquido gingivocrevicular.

## **6.-MATERIAL Y METODOS.**

### **6.1 Tipo de investigación.**

Investigación observacional, longitudinal y correlacional de varias cohortes.

### **6.2 Población de Estudio.**

Pacientes de la clínica de especialización en endoperiodontología y de ortodoncia de la FES Iztacala UNAM. Los pacientes seleccionados para este estudio siguiendo los criterios de inclusión y exclusión, fueron divididos en 3 grupos: pacientes sanos sin PC o DM2, pacientes con PC de moderada a severa y pacientes con PC de moderada a severa y DM2.

### **6.3 Parámetros de Inclusión.**

Los parámetros de inclusión para cada grupo de pacientes se resumen en la tabla 1. Brevemente. Los criterios de inclusión de los pacientes sanos componen la ausencia de manifestaciones clínicas de EP, por lo menos 20 dientes naturales presentes, prueba de tolerancia a la glucosa normal, glucosa plasmática en ayunas dentro del rango normal (60 a 110 mg/dl), sin historia de tratamiento periodontal y sin antecedentes de enfermedades sistémicas. Los criterios de inclusión para pacientes con PC fueron aquellos que tenían como mínimo 20 dientes naturales y por lo menos 6 bolsas periodontales >4mm que sangraban al sondaje, pérdida de inserción clínica >1mm, en combinación de evidencia radiográfica de pérdida ósea cortical, detectando una distancia >3mm entre la cresta alveolar y el cemento-esmalte alrededor de los dientes afectados. Los criterios de inclusión para los pacientes con PC y DM2 fueron: pacientes con PC previamente descrita y que han sido diagnosticados con DM2 al menos 6 meses antes de la cirugía de curetaje abierto y con niveles de glucosa plasmática en ayunas >120 mg/dl.

Todos los pacientes incluidos en el estudio deberán estar con plenas facultades psíquicas y mentales, siendo su voluntad participar en el estudio.

Tabla 1. Criterios de inclusión para cada grupo de pacientes.

	SANO	PERIODONTITIS CRONICA (PC)	PERIODONTITIS CRONICA Y DIABETES MELLITUS 2 (PC-DM2)
Bolsas periodontales	0	>6 bp	>6 bp
Sondeo periodontal	<3 mm	>4 mm	>4 mm
sangrado al sondeo	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
Desinserción clínica	0	>1 mm	>1 mm
Glucosa	60-110 mg/dl	60-110 mg/dl	>120 mg/dl
Hemoglobina Glicosilada	HGB 1c <5.1	HGB 1c <5.1	HGB 1c >5.1

#### 6.4 Criterios de exclusión.

Los criterios de Exclusión fueron pacientes menores de 30 años y mayores de 70, pacientes fumadores, pacientes embarazadas o en lactancia, pacientes con alguna otra enfermedad sistémica tales como hipertensión, epilepsia, enfermedades hematológicas, pacientes con terapia con antibióticos, cortico esteroides o inmunosupresores 6 meses antes de la toma de muestras y pacientes que no quieran participar en el estudio.

Esta investigación se realizó de conformidad con la declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki y bajo la autorización del comité de ética local de la FES Iztacala UNAM (CE/FESI/062014/1005). Se obtuvieron los consentimientos informados de todos los participantes del estudio previo a la obtención de muestras biológicas.

Los pacientes seleccionados para el estudio se llevaron a fase 1 periodontal considerando los parámetros del índice de placa de O' Leary se incluyeron a los pacientes que tuvieran un índice de placa dentobacteriana apto y excelente. Los parámetros de inclusión y el índice de O' Leary consistieron en teñir la placa dentobacteriana con pastillas reveladoras de la fucsina básica y eritrosina, una vez teñida se contaron las caras teñidas por presencia de placa dentobacteriana y se compararon con la totalidad de las caras presentes en el paciente para obtener el porcentaje de caras teñidas.

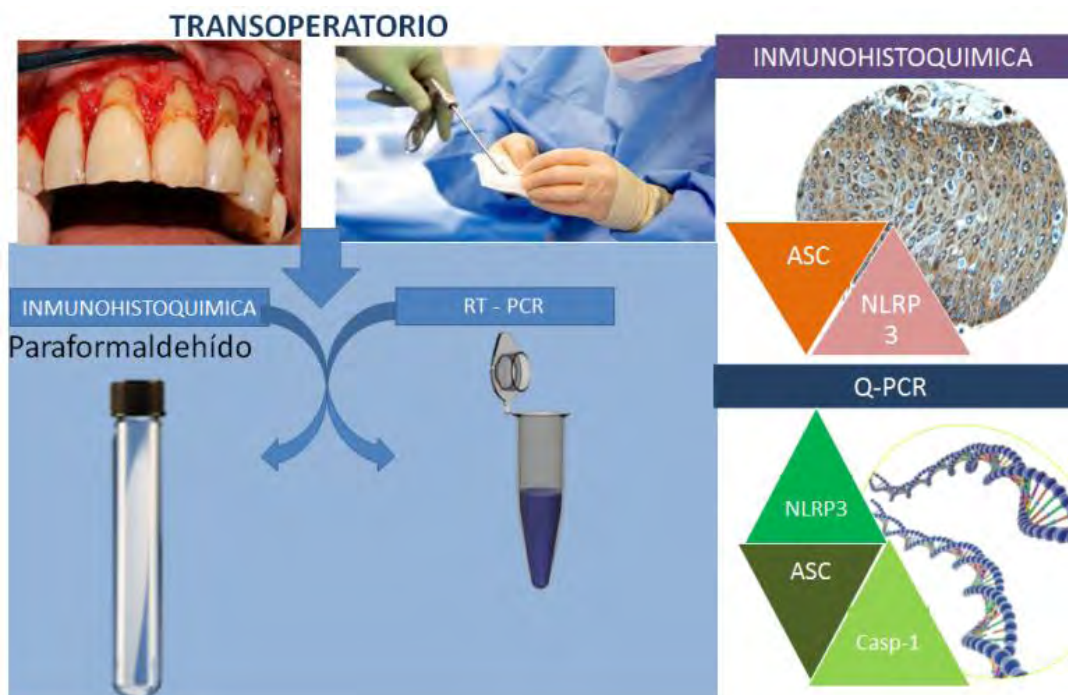
Se eligieron los pacientes que tuvieran un índice de placa dentobacteriana de 0-12% y de 12%-25% los cuales se catalogaron como pacientes con control de placa excelente y pacientes con control de placa apto, respectivamente, mientras que se rechazaron a los pacientes con índices superiores a un control de placa mayor al 25% catalogados como pacientes con control de placa dentobacteriana deficiente y nulo control.

### 6.5 Toma y manipulación de las biopsias de tejido gingival.

Las biopsias de tejido gingival fueron tomadas como producto de tratamientos estéticos como alargamiento de corona y motivos ortodónticos para pacientes sanos y de raspado y alisado de las superficies dentales y curetaje abierto para pacientes con PC y PC-DM2.

Una vez que se realizaba el procedimiento quirúrgico, las biopsias obtenidas fueron lavadas con PBS 1x estéril y separadas en 2 partes, una parte de la muestra fue introducida en un tubo con 8mL de para formaldehído al 4% (pH 7.4) para análisis histológico y proteico mientras que la otra parte del tejido fue introducido en RPMI estéril para ser trasladado al laboratorio para su posterior extracción de RNA total. Figura 2.

Figura 2. Toma y procesamiento de biopsia de encía.



## 6.6 Obtención de RNA total.

Una vez en el laboratorio se utilizó una campana de esterilidad para en ella macerar el tejido con una organza y Trizol, hasta degradar el tejido. El Trizol es fenol y tiocianato de guanidina, que permite la desintegración de las membranas celulares liberando los ácidos nucleicos.

La extracción de RNA se realizó mediante el método de Trizol (Rio et al. 2010), brevemente, el tejido macerado en trizol, se congelo a  $-70^{\circ}\text{C}$  por un mínimo de 48 hrs., se separaron los ácidos nucleicos de las proteínas mediante centrifugación. El RNA total se precipitó con isopropanol por 48 hrs., la pastilla obtenida se lavó con etanol y se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC.

Se midió la concentración del RNA total por medio de su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm y se verifico la pureza a 260 nm. La calidad del RNA obtenido se verificó mediante un gel para RNA de agarosa al 1%.

## 6.7 Preparación de RNA.

Se cargó en el gel la muestra de RNA con el siguiente protocolo:

4 $\mu\text{L}$  Max de RNA con 2 $\mu\text{g}$  de RNA + 5 $\mu\text{L}$  de Formamida + 1 $\mu\text{L}$  de Buffer de carga

$$\left[ \frac{(\lambda_{260} * \text{factor } 10) \mu\text{g}}{2 \mu\text{g}} \right] = \frac{1 \mu\text{L}}{x} + 5 \mu\text{L de Formamida} + 1 \mu\text{L de Buffer de carga}$$

Se encubo en el Master Cyder<sup>®</sup> a una temperatura inicial de  $50^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y con una temperatura final de  $4^{\circ}\text{C}$ . Figura 3.



Figura 3. RNA total obtenido de biopsias de pacientes en gel de agarosa al 1%

### 6.8 Síntesis de cDNA.

Para lograr la síntesis del cDNA se utiliza la técnica de reacción de transcripción inversa (RT) para lo que se usó el siguiente protocolo según el fabricante (fermentas) para una sola reacción:

Reactivo	Cantidad
<b>RNAasas out</b>	1 $\mu$ L
<b>Amortiguador 5x</b>	4 $\mu$ L
<b>dNTPs mix 10 Mm</b>	4 $\mu$ L
<b>DTT 0.1 M</b>	1 $\mu$ L
<b>Oligo Dt 20 <math>\mu</math>g/ <math>\mu</math>L</b>	1 $\mu$ L
<b>M-MLV 200 <math>\mu</math>U/ <math>\mu</math>L</b>	0.5 $\mu$ L
<b>1-2 <math>\mu</math>g RNA total ajustado con H2O DEPC</b>	x $\mu$ L+ H2O DEPC
<b>Total de la reacción</b>	20 $\mu$ L

Para calcular los 2  $\mu$ g del RNA se utilizó la siguiente equivalencia  $\frac{((\lambda 260) * Factor 10) \mu g}{2 \mu g} = \frac{1 mL}{X}$

La reacción se cataliza a una temperatura inicial de 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos, posteriormente se coloca a 4°C en hielo.

### 6.9 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT).

Se realizó la PCR con el kit PCR Master Mix (fermentas, Harrington Court, Canada) para estandarizar la temperatura de alineación y número de ciclos por cada oligo utilizado. Se hizo la PCR en tiempo real con el kit Maxima SYBR-Green/ ROX q PCR Master Mix (Fermentas). Se tomó el gen 18S ribosomal como gen constitutivo.

Los oligos utilizados se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligos usados para PCR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	No. de ciclos	Producto (pb)
<b>Caspasa 1.</b>	F: TCCAATAATGGACAAGTCAAGCC R: GCTGTACCCCAGATTTTGTAGCA	60	35	139
<b>ASC.</b>	F: GCCTGCACTTTATAGACCAGC R: GCTCCGCATCTTGCTTGG	60	35	153
<b>NLRP3.</b>	F: GATCTTCGCTGCGATCAACAG R: CGTGCATTATCTGAACCCAC	59	40	81

### 6.10 Procedimiento histopatológico.

El proceso de fijación tuvo como finalidad la preservación estructural y química de las moléculas y materiales extracelulares. Usamos formaldehído al 4%. Los tejidos fijados por 24 hrs., se deshidrataron en alcoholes crecientes y se incluyeron en parafina.

Se realizaron cortes de 5-6 micras de espesor con un micrótopo Leica y se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), extendiendo los tejidos en baño María por debajo del punto de fusión de la parafina.

### 6.11 Tinción con hematoxilina y eosina.

Todas las muestras se cortaron de forma seriada en donde 1 de 6 cortes fue teñido por técnica de hematoxilina y eosina (H y E), técnica de rutina histológica que tuvo como finalidad analizar las características que compuso cada grupo y revisar la integridad del tejido que se sometería a técnica de inmunohistoquímica. La hematoxilina tiñe componentes nucleares desde azul con buen detalle intranuclear, mientras que la eosina lo hace con el citoplasma de las células y casi todas las fibras de tejido conectivo variando en intensidad entre rosa, naranja y rojo.

Las muestras histológicas teñidas por H y E fueron sometidas a un estudio doble ciego, que consistió en someter las muestras a estudio histopatológico sin mencionar el grupo de estudio al que pertenecía de acuerdo a su diagnóstico periodontal y sistémico.

Una vez examinadas por el histopatólogo fueron divididas con respecto a sus características histopatológicas, lo que dio como resultado la correlación diagnóstica con las características histológicas de las muestras.

### 6.12 Inmunohistoquímica.

Se usó la técnica de inmunohistoquímica por Peroxidasa para la detección de NALP3 y ASC con el kit 36000 Peroxidase Detection Reagent Pack (Thermo Scientific, Rockford, USA).

Las muestras que fueron desparafinadas en Xilol ( I , II , III ) por 10 minutos cada uno e hidratadas en alcoholes graduados (Etanol 100%,96% ) respectivamente en sesiones de 3 minutos cada uno. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% en metanol y se realizó la recuperación antigénica con Buffer de Citratos (pH 6.0) en un Copplin alto el cual fue introducido en olla de presión con 500 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y se calentó en horno de micro ondas por 5 minutos con potencia 100% y 10 minutos con potencia atenuada al 50%.

Se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo con Buffer de Bloqueo (Universal Bloker Blocking Buffer) por 30 minutos agregando 120 µL por laminilla.

Los tejidos se dejaron incubando por 12 horas con una dilución 1:100 µl del anticuerpo NALP3 Y ASC en Buffer de Bloqueo (Universal Bloquer Blocking).

Se colocó el anticuerpo secundario mause antigoat Biotinilado en una concentración 1:100µL en Bloqueador Universal y se incubo por 120 minutos (2 Horas)

Se agredo Avidina – HRP en una concentración 1:100 en Bloqueador Universal por 60 minutos a 4 grados centígrados.

Se sacaron los portaobjetos de la cámara de capilaridad. Se añadió DAB 1x (Metal Enhanced DAB Substrate Working) y verifico la reacción en microscopio. Se usó el mismo tiempo para todas las muestras una vez estandarizada en el microscopio.

Se lavaron las laminillas con H<sub>2</sub>O bidestilada y realizo una contra tinción con hematoxilina de Harris por 30 segundos.



### 6.13 Recolección de líquido gingival crevicular.

El líquido gingivocrevicular se tomó antes de cualquier intervención quirúrgica de la zona comprometida, se aislaba la zona de recolección de forma relativa apoyada de torundas de algodón, el eyector y la jeringa triple. Fue importante no desecar el sitio de la toma, si esto sucedía, esperábamos 30 segundos para hacer la toma. Una vez aislada el área se tomaba una tira de papel Watman #3 pre cortada, estéril y se introducía en el surco dejándose en él 30 segundos. Los sitios de toma fueron: mesio vestibular, medio vestibular, disto vestibular, mesiopalatino/lingual, medio palatino/lingual y distopalatino/lingual. La muestra se colocaba en un eppendorf con filtro, estéril, rotulado la cual se colocaba inmediatamente en hielo para su transporte para ser colocado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### 6.14 Manipulación de las muestras de líquido gingivocrevicular.

Una vez que se obtuvieron las muestras suficientes se sacaron las muestras y se colocaron en hielo a aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}$ . Se procedió a lavar las tiras con 100ul PBS 1x estéril.

Se centrifugo a 11,000 revoluciones por minuto con 4 de freno y 4 de aceleración a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Una vez obtenidas las muestras se hizo la dilución al 50% se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de muestra y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de PBS1x estéril. Figura 4.

Figura 4. Toma y procesamiento de LGC.



## 6.15 Técnica de ELISA para detección de citocinas

Se utilizó el kit Human IL-1 $\beta$  (eBioscienc, San Diego, CA) y kit Human IL-18

### 6.15.1 Kit Human IL1 $\beta$

Las muestras de líquido gingival crevicular se prepararon en una placa para técnica de ELISA Nuc de 96 pozos sin tapa. Se colocó el anticuerpo de captura

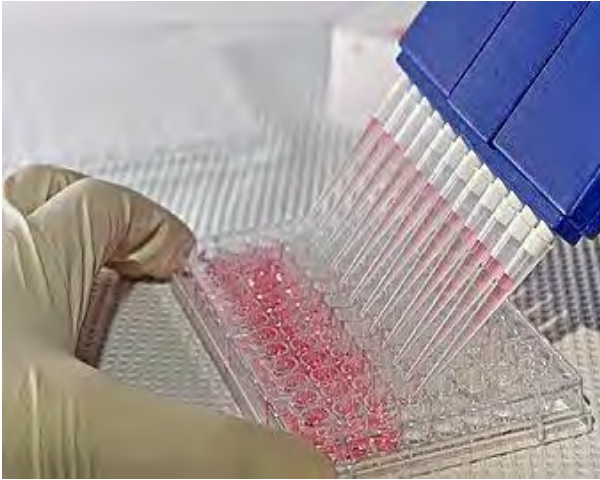


Figura 5.- Fotografía que ejemplifica la preparación de la placa de 96 pozos con multipipeta.

Se procedió a procesar las muestras de líquido gingivocrevicular, para lo que se colocaron las muestras en hielo a 4°C. Se recuperando por medio de centrifugación.

Se tomaron 50  $\mu$ L de la muestra y se dejó incubando a 4°C por 12 horas. Una vez cumplido

el tiempo de incubación se procedió lavar 5 veces con Buffer de lavado por 1 minuto. Después se agregó anticuerpo de detección (anti- IL1 $\beta$  conjugado con biotina) y se incubo por 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron Avidina peroxidada (Avidina-HRP) y se incubo por 30 minutos .

Se colocaron 100  $\mu$ L de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzsidina (TMB) como solución sustrato a cada pozo y se incubo por 15 minutos a temperatura ambiente. Se colocó ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 N, como solución stop, para detener la reacción y se leyó a 450nm de longitud de onda en un espectrofotómetro.

### 6.15.2. Kit Human IL-18

Se utilizó la placa que incluye el kit, la cual tiene un adhesivo de protección para las pastillas de reacción que contiene en cada pozo. Se retiró esta protección adhesiva y se siguió el protocolo estipulado. Se añadió H<sub>2</sub>O bidestilada en cada pozo con una multi pipeta. Inmediatamente después se agregaron 50  $\mu$ L de muestra. Se cubrió la placa con el plástico protector y se incubo toda la noche a 4°C en movimiento.

Se colocó la solución sustrato (3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB)) en todos los pozos. Inmediatamente que el valor más alto de la curva es de 0.9 de absorbancia se agregaron 100  $\mu$ L de solución stop (ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 N) en cada pozo e inmediatamente se leyó a 450nm en el espectrofotómetro.

#### **6.16 Análisis estadístico.**

Todos los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el post-hot de Tukey, utilizando el software GraphPad Prism6. Los datos de los diferentes grupos de pacientes se compararon con el grupo de sanos y con el grupo de PC. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar (SE). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a \* $p \leq 0.05$  contra el grupo de sanos, y # $p \leq 0.05$  contra el grupo con PC.

## 7.- RESULTADOS.

### 7.1 Análisis de los parámetros clínicos de la población de estudio.

Severidad y extensión de la periodontitis crónica en los pacientes con y sin DM2.

La Tabla 4 muestra las características clínicas y patológicas de los sujetos de investigación. El promedio de edad de los pacientes sanos fue de 34, para los pacientes con periodontitis crónica fue de 46 y para los pacientes con PC y DM2 fue de 58. El % de mujeres en sanos y PC fue mayor, mientras que para el grupo PC-DM2 el % de hombre y mujeres fue parecido. La evaluación clínica periodontal de cada grupo de pacientes mostro valores bajos de PDB, valores normales de PBP, DCG y SPAG y no se observó pérdida ósea radiográfica. (Tabla 4). Para las características clínicas de glicemia de los grupos sanos y PC, se observaron valores normales de glucosa en sangre y de hemoglobina glicosilada. El grupo de pacientes PC presentaban periodontitis de moderada a severa evidenciada por el número de bolsas peridontales (PBP), la desinserción clínica gingival (DCG), los SPAG y la pérdida ósea evidenciada radiográficamente. El grupo de pacientes con PC-DM2 mostraron tener mayor destrucción periodontal evidenciada por una mayor DCG, SPAG y mayor pérdida ósea radiográfica en comparación con los pacientes sólo con PC a pesar de tener valores similares de PDB. Este grupo de pacientes, a pesar de haber sido diagnosticados por los menos con 10 años antes con DM2 tenían niveles casi normales de glicemia ( $117.77 \pm 13.3$  mg/dl), sin embargo al revisar los parámetros de hemoglobina glicosilada observamos que los pacientes con PC-DM2 presentan valores elevados ( $8.47 \pm 1.72$  %). (Tabla 3)

Tabla 3. Características clínicas, periodontales y glicémicas de los grupos de pacientes.

<b>Características</b>	<b>Sanos (n=12)</b>	<b>PC (n=18)</b>	<b>PC-DM2 (n=14)</b>
Edad (años)± SD	34.84 ± 5.6	46.4 ± 6.9	58 ± 1.6
<b>Género (%)</b>			
Femenino	84.7	92.8	53.8
Masculino	14.3	7.1	46.1
<b>Parámetros clínicos periodontales</b>			
PDB (%) ± SD	9±3	20 ± 4.7	18.44 ± 5.28
PBP (mm) ± SD	1.47 ± 0.28	4.06 ± 0.69*	4.22 ± 0.25*
DCG (mm) ± SD	0	2.23 ± 1.11*	3.47 ± 1.24 *#
SPAG (%)± SD	1.5 ± 0.7	43 ± 3*	69 ± 8*#
Pérdida ósea radiográfica (mm) ± SD	0	4.07 ± 1.08 *	5.86 ± 0.86*#
<b>Parámetros glicémicos</b>			
Glucosa (mg/dl) ± SD	90 ± 2.9	89.8 ± 9.9	117.77 ± 13.3
HbA1C (%) ± SD	4.7 ± 0.6	4.96 ± 0.28 *	8.47 ± 1.72 *#

PDB. Placa dento-bacteriana, DCG. Desinserción clínica gingival, PBP. Profundidad de bolsa periodontal, SPAG sitios de perdida de adherencia gingival, HbA1C. Hemoglobina glicosilada.

\*p<0.05 con respecto a los sanos, # p<0.05. con respecto a los pacientes con PC.

## 7.2 Análisis de los parámetros clínicos de la población con DM2.

En la tabla 4 se muestra la población con diabetes mellitus y los medicamentos con los cuales se tratan los sujetos del estudio, en donde observamos que la Metformina es el medicamento que más consumían los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (9 pacientes), seguido de la unión entre Metformina e insulina (4 pacientes), siendo el tratamiento con insulina el menos usado (1 paciente). No se encontró relación con el control glicémico o hemoglobina glicosilada y el tipo de medicamento tomado.

Tabla 4. Tipo de medicamentos tomados de los pacientes con PC-DM2.

	PC-DM2 (n= 14)
<b>Duración del diagnóstico con DM2 (años)±SD</b>	9.8 ± 4
Tratamiento (n)	
Insulina	1
Metformina	9
Metformina + Insulina	4

### **7.3 Características histológicas de las muestras gingivales.**

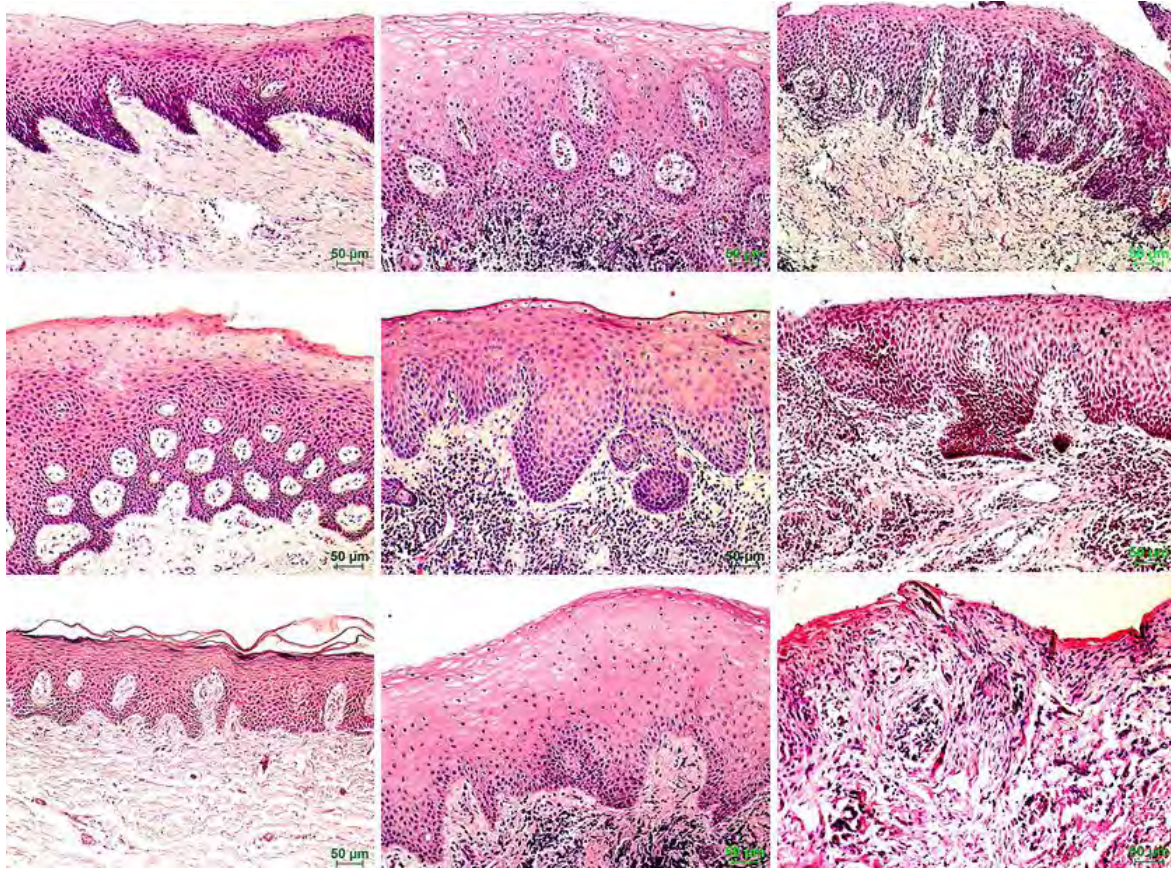
Con el objetivo de analizar las características de los tejidos de cada grupo de pacientes, se realizaron cortes histológicos, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se mandaron al patólogo para su análisis histopatológico.

Sanos: observamos muestras con tejido de epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado bien estructurado, adyacente se observa un tejido conectivo con abundantes fibras de colágeno y fibroblastos con un leve infiltrado de células polimorfo nucleares.

PC: Observamos un epitelio escamoso estratificado queratinizado hiperplásico con crestas epiteliales, se observan células acantocíticas, presenta abundantes células inflamatorias de tipo linfocitario formando acúmulos densos en el tejido conectivo, adyacente se observan escasas fibras de colágena.

PC-DM2: Observamos un epitelio escamoso estratificado queratinizado hipertrofico con células acantomocíticas, adyacente se observa tejido fibroconectivo con presencia de fibroblastos activos, con infiltrado de células inflamatorias de predominio linfoplasmocitario y células polimorfonucleares.

Lo que muestra que los pacientes con PC-DM2 presentan una mayor destrucción periodontal y mayor infiltrado inflamatorio en comparación con los pacientes con periodontitis crónica y más aún que los pacientes sanos.

**SANO****PC****PC-DM2**

La Figura 6 está compuesta por microfotografías representativas de los cortes histológicos de los grupos de estudio, sanos, PC y PC-DM2. El estrato corneo del tejido epitelial está dispuesto hacia arriba, mientras que la parte inferior de las microfotografías corresponde al tejido conectivo.



#### 7.4 Detección del RNAm de NLRP3, ASC y Caspasa-1 en las muestras gingivales.

Con el objetivo de determinar la expresión del inflamósoma en el tejido gingival, se realizó la extracción del RNA total y el PCR en tiempo real para el RNAm de NLRP3, ASC y caspasa 1. Se observa una mayor expresión de los componentes del inflamósoma (NLRP3, ASC y caspasa-1) en los pacientes con PC y PC-DM2 en comparación con los pacientes sanos. El RNAm de la caspasa-1 se encuentra sobre expresado en los pacientes con PC-DM2 en comparación con los pacientes con PC lo que demuestra que el requerimiento molecular de esta proteína es mayor en estos pacientes, como lo observamos en la 3 grafica correspondiendo a la Caspasa-1

(Figura 7)

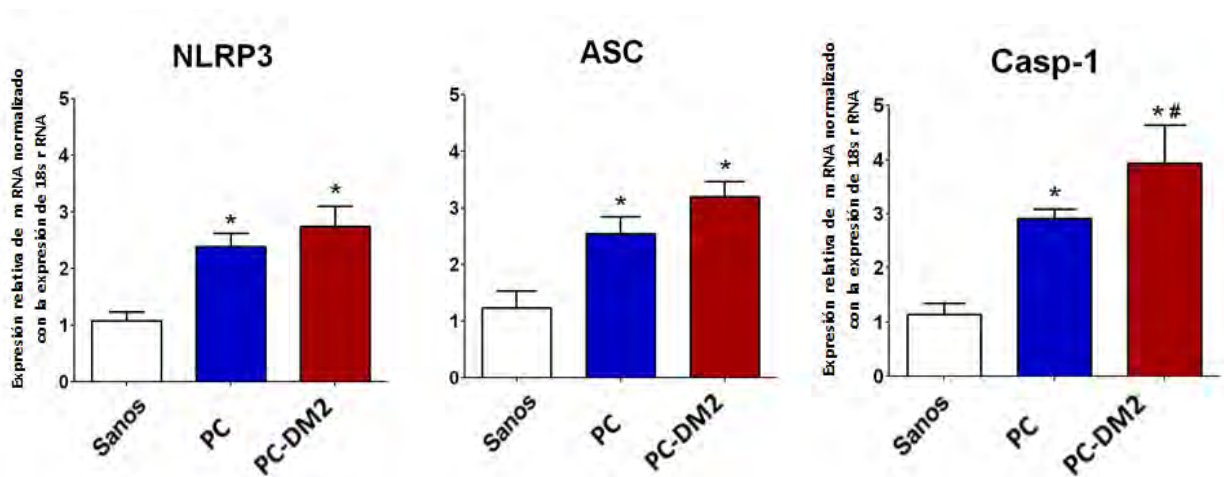
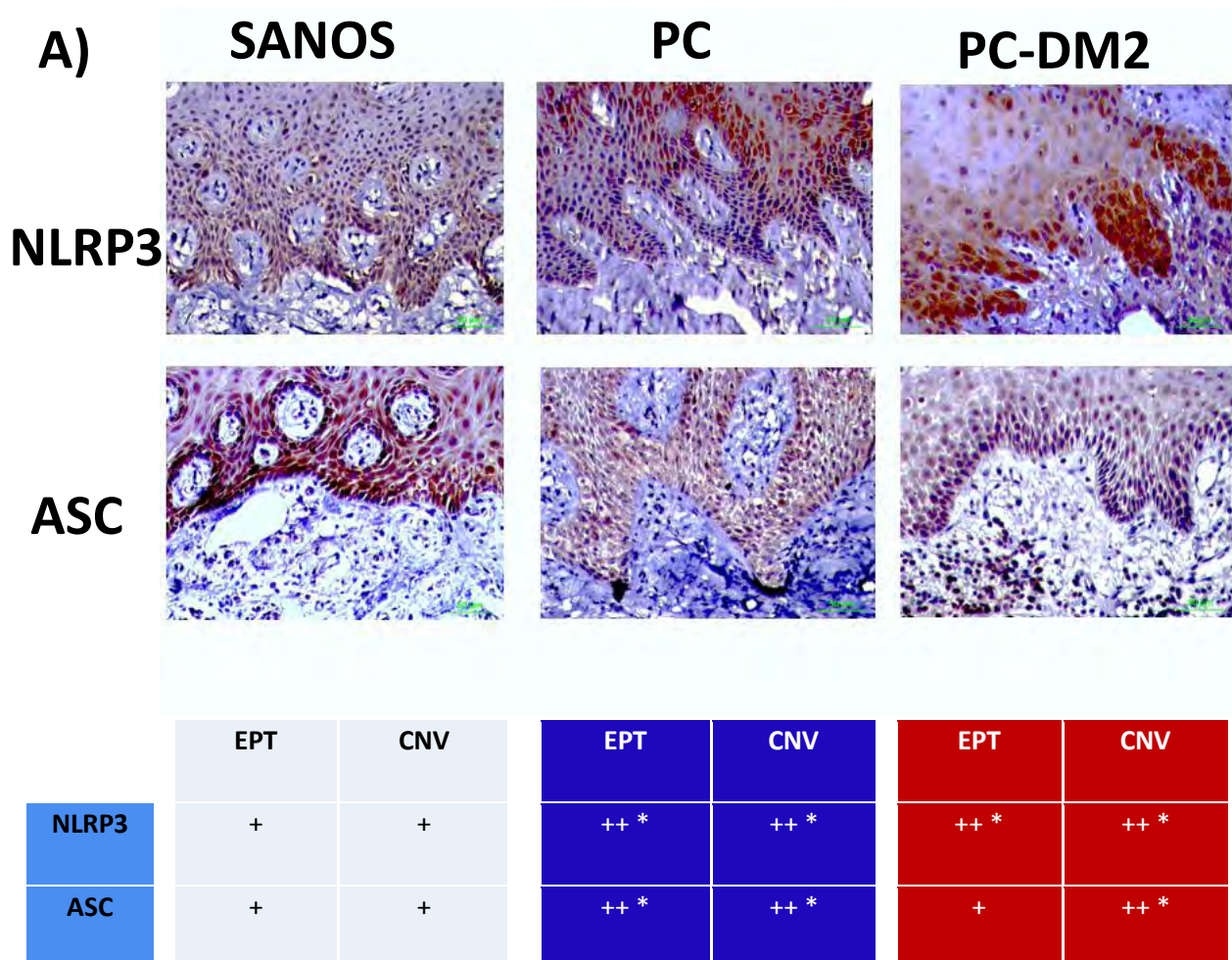


Figura 7. Análisis de la expresión relativa del ARNm del inflamósoma (NLRP3, ASC y CASPASA-1) por PCR en tiempo real. La expresión del inflamósoma está incrementada en los pacientes con PC (NLRP3  $2.519 \pm 0.3$ , ASC  $1.454 \pm 0.226$ , Caspasa-1  $3.18 \pm 0.2214$ ) y PC-DM2 (NLRP3  $2.55 \pm 0.7$ , ASC  $2.7 \pm 0.461$ , Caspasa-1  $3.69 \pm 0.754$ ) en comparación con los pacientes sanos (NLRP3  $1.08 \pm 0.1$ , ASC  $1.23 \pm 0.263$ , Caspasa-1  $1.44 \pm 0.178$ ). La expresión de la caspasa 1 es mayor en los pacientes con PC-DM2 en comparación con los pacientes con PC. Los datos fueron normalizados a la expresión del ARNm del 18S ARNr. Los gráficos representan la media  $\pm$  ES \* $p < 0.05$  con respecto a los sanos, # $p < 0.05$  con respecto a los pacientes con PC. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey.

### 7.5 Características proteicas de las muestras de tejido gingival.

Con el objetivo de determinar la expresión proteica del inflamósoma en el tejido gingival, se realizó la inmunohistoquímica por reacción de Peroxidasa en las biopsias obtenidas para el NLRP3 y ASC. Observamos la sobreexpresión de NLRP3 y ASC en epitelio y tejido conectivo de pacientes con PC (epitelio  $641.4 \pm 181$  células positivas, tejido conectivo  $295.6 \pm 115$  células positivas) y PC-DM2 (epitelio  $752 \pm 46$  células positivas, tejido conectivo  $241.6 \pm 73$  células positivas) en comparación con los pacientes sanos (epitelio  $351 \pm 96$  células positivas, tejido conectivo  $91 \pm 20$  células positivas), sin embargo no encontramos diferencias en la expresión de estas proteínas entre el grupo de pacientes con PC-DM2 vs PC.



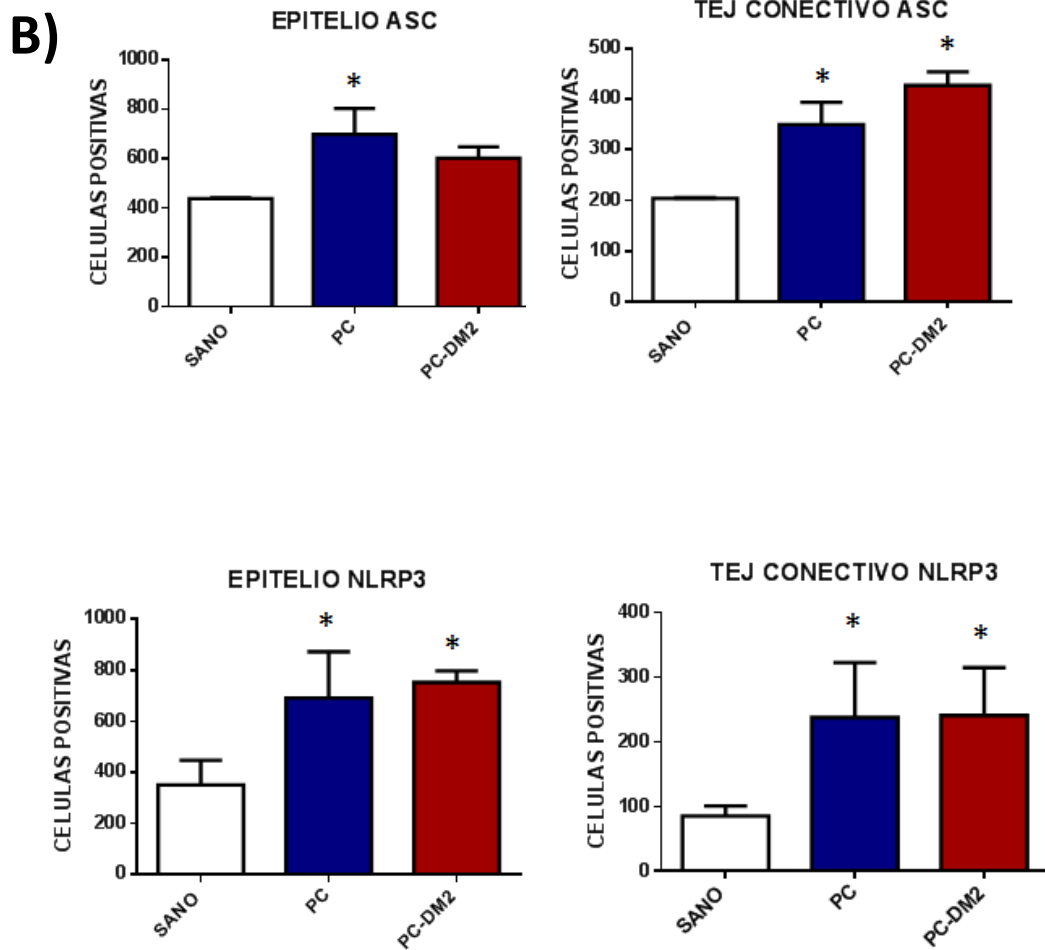


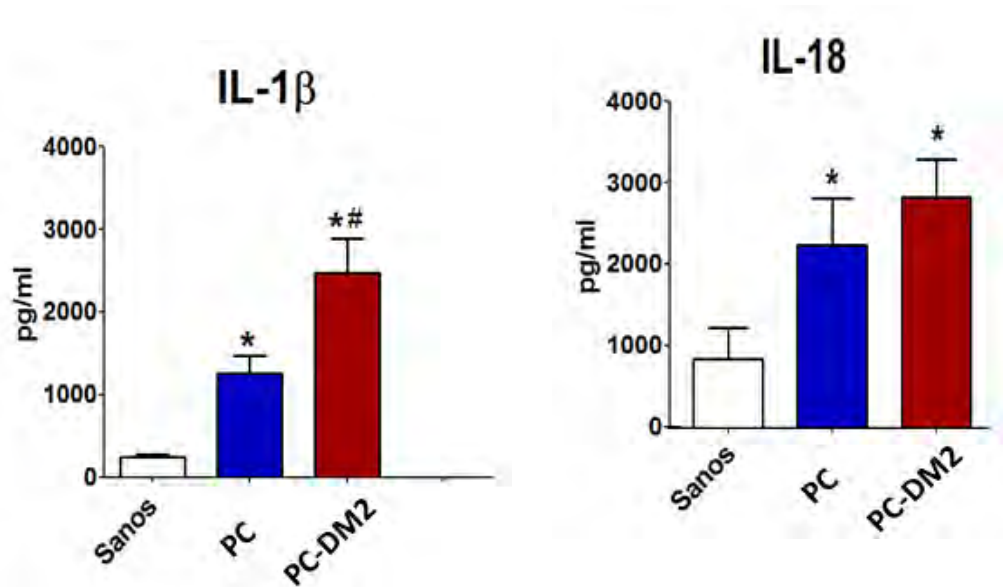
Figura 8. A) Microfotografías representativas de las muestras incluidas en el estudio. Se observan las células positivas para NLRP3 o ASC en color café. B) Se observa un mayor número de células positivas en las biopsias de pacientes con PC y PC-DM2. Los gráficos representan la media  $\pm$  ES del número de células positivas \* $p < 0.05$  con respecto a los sanos. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey.

## 7.6 Detección de citocinas en líquido gingivocrevicular.

Se cuantificaron las citocinas proinflamatorias resultantes de la activación del Inflamosoma en líquido gingival crevicular. La concentración de IL1 $\beta$  e IL18 se obtuvieron por técnica de ELISA.

Encontramos que la expresión de IL-1 $\beta$  es significativamente más alta en pacientes con PC-DM2 (2466  $\pm$  1343 pg/ml) en comparación con los pacientes con PC (1257  $\pm$  616.8pg/ml) y más aun con los pacientes sistémicamente sanos (245.7  $\pm$  132.5pg/ml).

La expresión de IL18 es significativamente más elevado en los grupos de pacientes con PC (2699  $\pm$  1951 pg/ml) y además en pacientes con PC-DM2 (3403  $\pm$  1578 pg/ml) en comparación con el grupo sistémicamente sanos (1018  $\pm$  1126pg/ml). No hubo diferencias significativas en la concentración de IL-18 entre el grupo de pacientes con PC vs PC-DM2 como se muestra en la figura 9.



Los gráficos representan la media  $\pm$  ES \*p<0.05 con respecto a los sanos, #p<0.05. con respecto a los pacientes con PC. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey.

## **8.-DISCUSIÓN.**

La diabetes mellitus y la periodontitis son enfermedades de alta prevalencia en el mundo. Frecuentemente ambas enfermedades se encuentran presentes en la población mundial y de igual forma habían sido tomados como procesos individuales con relaciones clínicas.

Se ha demostrado en otros estudios que existe una fuerte asociación entre la diabetes mellitus y la enfermedad periodontal ya que se sabe que ambas influyen en la progresión de la otra y se ha sugerido que la DM puede provocar el desarrollo de la periodontitis al incrementar la prevalencia y la agresividad de la enfermedad periodontal (Pranckeviciene et al. 2014) (Paraschiv et al. 2014) (Grover and Luthra 2013). En esta investigación, nosotros observamos en nuestra población de estudio una mayor severidad de la periodontitis en los pacientes con DM2 vs pacientes sólo con PC, a pesar de tener valores similares de placa dentobacteriana que pudiera ser la causante de una mayor inflamación, por lo que, la mayor destrucción periodontal en los pacientes con DM2 puede deberse a otros factores endógenos.

Las muestras de los pacientes incluidos en este estudio mostraron histológicamente diferencias muy marcadas y patológicamente indicativas del grupo al que pertenecen, resultado de un estudio de análisis doble ciego aplicado a las mismas. Lo que nos indica que efectivamente los pacientes con PC aunada a DM2 incluidos en este estudio tenían periodontitis más agresiva y destructiva que los pacientes con periodontitis crónica.

Se ha descrito que en pacientes con PC y PC-DM2 se encuentran sobre expresados los receptores tipo Toll, en comparación con los pacientes sanos (Rojo-Botello et al. 2012), lo que podría indicar que existe una mayor susceptibilidad a desarrollar una mayor respuesta inmune o una respuesta inmune exacerbada, y que la activación de los TLRs puede llevar a la inducción de citocinas proinflamatorias. Esto podría representar la primera señal de la activación de inflamósoma, para la síntesis de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18.

El NLRP3 es un mecanismo que puede intervenir en el aumento de los mediadores inflamatorios en la enfermedad periodontal por que se encuentra sobre expresado en tejido gingival.

Bostanci et al, en el 2009, encontraron que el RNAm de NLRP3, la IL-1 $\beta$  e IL-18 en biopsias de pacientes estaban incrementados en pacientes con gingivitis, periodontitis crónica y periodontitis agresiva(Bostanci et al. 2009b). En esta investigación se realizó la detección del inflamósoma nivel de RNAm y proteico, y en el mismo sentido encontramos que el NLRP3,

ASC, caspasa-1, la IL-1 $\beta$  e IL-18 se encuentran incrementadas en biopsias y LGC de pacientes con periodontitis crónica.

La expresión del inflamosoma también se ha estudiado en relación a la diabetes, incluso se ha propuesto como un blanco terapéutico para la tolerancia a la glucosa, debido a que la inhibición del NLRP3 induce una mejor tolerancia a la glucosa en modelos murinos.(Vandanmagsar et al. 2011)

Sin embargo, hasta el día de hoy no se había estudiado la expresión del inflamosoma en la periodontitis y DM2. Este es el primer reporte sobre la expresión del inflamosoma en la relación de la PC-DM2. La caspasa-1 e IL-1 $\beta$  se encuentran sobre expresado en los pacientes con PC-DM2 en comparación con los pacientes sólo con PC, sin embargo el NLRP3, ASC e IL-18 no, nosotros hipotetizamos que es posible que no se requiera una mayor expresión de NLRP3 o ASC para activar más caspasa-1, debido a que la formación del multicomplejo NLRP3-ASC es capaz de cortar varias pro-caspasa-1 y convertirla a caspasa-1 activa, y esta a su vez activar a la IL-1 $\beta$ . La IL-18 no ha sido reportada como una citocina importante en la enfermedad periodontal, por lo que puede ser que no sea una citocina que este directamente involucrada a nivel local en el periodonto, sin embargo si se sabe que la IL1- $\beta$  participa por un lado en la destrucción de los tejidos periodontales, en el hueso alveolar y puede producir resistencia a la insulina.

Es posible que la segunda señal para la activación del inflamosoma en los pacientes con PC-DM2 se deba a un factor endógeno como la formación de productos de glicación avanzada, el estrés oxidativo provocado por la hiperglicemia. Estos estímulos son capaces de activar la segunda señal que lleve al incremento de IL-1 $\beta$ .

Las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 fueron medidas en liquido gingivocrevicular el cual es un transudado de los vasos sanguíneos del plexo crevicular, producido por gradiente osmótico y en él podemos encontrar electrolitos, proteínas, anticuerpos, enzimas, antígenos bacterianos y citocinas, que nos dan como resultado un panorama del estado periodontal y del ambiente en el que se encuentran las estructuras de soporte dentario.

El incremento de la cantidad de IL-1 $\beta$  e liquido gingivocrevicular parece estar acorde a la destrucción de los tejidos periodontales ya que esta citocina ha sido ligada a la activación de los osteoclastos provocando reabsorción ósea y ligada a provocar resistencia a la insulina, que son condiciones presentes en los pacientes con periodontitis crónica y diabetes mellitus tipo 2.

Sin mencionar que se encuentra presente en enfermedades inflamatorias crónicas exigiendo por lo tanto la activación de producción de IL-1 $\beta$  más activamente en pacientes que sufren diabetes mellitus tipo 2 y periodontitis crónica, provocando de esta forma una respuesta inflamatoria mayor.

Estos resultados en conjunto indican que el inflamosoma puede ser un mediador importante en la relación de la PC con la DM2. Es necesario hacer más estudios sobre los mecanismos moleculares activadores del inflamosoma en la PC-DM2, así como el desarrollo de terapias moleculares a nivel local que tengan como blanco la inhibición del inflamosoma que puedan romper esta relación viciosa patológica.

## 9.- CONCLUSION.

La presente investigación demuestra la sobreexpresión del complejo del inflamosoma en pacientes con PC y PC-DM2 evidenciado por:

- La sobreexpresión del RNAm de NLRP3, ASC y Caspasa-1 y las proteínas de NLRP3, ASC y una mayor cantidad de IL-1 $\beta$  e IL-18 en pacientes con PC y PC-DM2 en comparación con pacientes sanos.
- La sobreexpresión del RNAm de caspasa 1 y mayor cantidad del IL-1 $\beta$  en pacientes con PC-DM2 en comparación con pacientes sólo con PC.



## 10.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Assoc, Amer Diabet (2011), 'Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus AMERICAN DIABETES ASSOCIATION', *Diabetes Care*, 34, S62-S69.
- Bauernfeind, F. G., et al. (2009), 'Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression', *J Immunol*, 183 (2), 787-91.
- Bostanci, N., et al. (2009a), 'Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases', *Clinical and Experimental Immunology*, 157 (3), 415-22.
- (2009b), 'Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases', *Clin Exp Immunol*, 157 (3), 415-22.
- Carranza, P. (2004), *Periodontología Clínica* (9 ed. edn.).
- Dinarello, C. A. (2013), 'Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors', *Semin Immunol*, 25 (6), 389-93.
- Esser, N., et al. (2014), 'Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 105 (2), 141-50.
- Franchi, L., Munoz-Planillo, R., and Nunez, G. (2012), 'Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes', *Nat Immunol*, 13 (4), 325-32.
- Franchi, L., et al. (2014), 'Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K<sup>+</sup> efflux', *J Immunol*, 193 (8), 4214-22.
- Garlanda, C., Dinarello, C. A., and Mantovani, A. (2013), 'The interleukin-1 family: back to the future', *Immunity*, 39 (6), 1003-18.
- Grover, H. S. and Luthra, S. (2013), 'Molecular mechanisms involved in the bidirectional relationship between diabetes mellitus and periodontal disease', *J Indian Soc Periodontol*, 17 (3), 292-301.
- Guarda, G., et al. (2011), 'Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells', *J Immunol*, 186 (4), 2529-34.
- Guariguata, L., et al. (2014), 'Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103 (2), 137-49.
- Harpreet, S and Luthra, Shailly (2013), 'Molecular mechanisms involved in the bidirectional relationship between diabetes mellitus and periodontal disease. Indian Society of Periodontology'.

- Hinojosa-Azaola, Andrea and Alcocer-Varela, Jorge (2012), 'Enfermedades auto inflamatorias: una mirada a la inmunidad innata y su patología', *Revista de Investigación Clínica*, 64 / 5 (septiembre-octubre), 477-86.
- Inoue, M. and Shinohara, M. L. (2013), 'NLRP3 Inflammasome and MS/EAE', *Autoimmune Dis*, 2013, 859145.
- Jorgensen, I. and Miao, E. A. (2015), 'Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens', *Immunol Rev*, 265 (1), 130-42.
- Kerner, W. and Bruckel, J. (2011), 'Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus', *Diabetologie Und Stoffwechsel*, 6, S107-S110.
- Kim, E. H., et al. (2015), 'Increased expression of the NLRP3 inflammasome components in patients with Behcet's disease', *J Inflamm (Lond)*, 12, 41.
- King, G. L. (2008), 'The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetes and Its Complications', *Journal of Periodontology*, 79 (8), 1527-34.
- Kolly, L., et al. (2010), 'Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium', *Immunology*, 129 (2), 178-85.
- Latz, E. (2010), 'The inflammasomes: mechanisms of activation and function', *Current Opinion in Immunology*, 22 (1), 28-33.
- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009), 'The inflammasomes: guardians of the body', *Annu Rev Immunol*, 27, 229-65.
- Masters, S. L. (2013), 'Specific inflammasomes in complex diseases', *Clinical Immunology*, 147 (3), 223-28.
- Mealey, B. L. (2006), 'Periodontal disease and diabetes. A two-way street', *J Am Dent Assoc*, 137 Suppl, 26S-31S.
- Nassar, H., Kantarci, A., and van Dyke, T. E. (2007), 'Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation', *Periodontol 2000*, 43, 233-44.
- Nishikawa, T., et al. (2000), 'Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage', *Nature*, 404 (6779), 787-90.
- Nishimura, F., Iwamoto, Y., and Soga, Y. (2007), 'The periodontal host response with diabetes', *Periodontol 2000*, 43, 245-53.
- Ozaki, E., Campbell, M., and Doyle, S. L. (2015), 'Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives', *J Inflamm Res*, 8, 15-27.
- Park, E., et al. (2014), 'Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* infection', *Infect Immun*, 82 (1), 112-23.

- Periodontology, American Academy of (2000a), 'Parameter on Chronic Periodontitis With Slight to Moderate Loss of Periodontal Support', *J Periodontol*, 71, 853-55.
- (2000b), 'Parameter on Plaque-Induced Gingivitis', *J Periodontol* 71, 851-52.
- Periodontology, The American Academy of (2000c), 'Parameter on Chronic Periodontitis With Advanced Loss of Periodontal Support', *J Periodontol* 71, 856-58.
- Poyato, et al. (2001), 'Periodoncia para el higienista dental', *J Periodoncia*, 11(2) 5, 149-64.
- Pranckeviciene, A., et al. (2014), 'Severity of periodontal disease in adult patients with diabetes mellitus in relation to the type of diabetes', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158 (1), 117-23.
- Rabeony, H., et al. (2015), 'IMQ-induced skin inflammation in mice is dependent on IL-1R1 and MyD88 signaling but independent of the NLRP3 inflammasome', *Eur J Immunol*, 45 (10), 2847-57.
- Reynolds, C. M., et al. (2012), 'Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance', *Mol Nutr Food Res*, 56 (8), 1212-22.
- Rio, D. C., et al. (2010), 'Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent)', *Cold Spring Harb Protoc*, 2010 (6), pdb prot5439.
- Rojo-Botello, N. R., Garcia-Hernandez, A. L., and Moreno-Fierros, L. (2012), 'Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis', *J Periodontal Res*, 47 (1), 62-73.
- Ruscitti, P., et al. (2015), 'The role of IL-1beta in the bone loss during rheumatic diseases', *Mediators Inflamm*, 2015, 782382.
- Schroder, K. and Tschopp, J. (2010), 'The inflammasomes', *Cell*, 140 (6), 821-32.
- Smyth, S. and Heron, A. (2006), 'Diabetes and obesity: the twin epidemics', *Nature Medicine*, 12 (1), 75-80.
- Stienstra, R., et al. (2011), 'Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (37), 15324-29.
- Sutterwala, F. S., Haasken, S., and Cassel, S. L. (2014), 'Mechanism of NLRP3 inflammasome activation', *Year in Immunology: Myeloid Cells and Inflammation*, 1319, 82-95.
- Triantafyllou, M., et al. (2016), 'Complementing the inflammasome', *Immunology*, 147 (2), 152-64.
- Vandanmagsar, B., et al. (2011), 'The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance', *Nat Med*, 17 (2), 179-88.

- Ventura-Gallegos, E.O, Gómez-González, and Zentella-Dehesa A (2012), 'Caspasas: una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis', *DEB* 18(4), 153-65.
- Wiebe, C. B. and Putnins, E. E. (2000), 'The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update', *J Can Dent Assoc*, 66 (11), 594-7.
- Willingham, S. B., et al. (2009), 'NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and - independent pathways', *J Immunol*, 183 (3), 2008-15.
- Zhong, Y., Kinio, A., and Saleh, M. (2013), 'Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases', *Front Immunol*, 4, 333.
- Zhu, M. and Nikolajczyk, B. S. (2014), 'Immune Cells Link Obesity-associated Type 2 Diabetes and Periodontitis', *Journal of Dental Research*, 93 (4), 346-52.