



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Estudio Comparativo de la Expresión Local de Citocinas IL-6, IL-4, IFN- γ , TNF- α y MIF, en Periodontitis Experimental Previo y Durante la Gestación en un Modelo Murino”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A

Andres Guzmán Flores

Director: Mtra. **Betsaida Julieta Ortiz Sánchez**

Dictaminadores: Dra. **Miriam Rodríguez Sosa**

CD. **Fernando Galván Toledo**





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi familia, quienes siempre me han apoyado y han hecho de mi lo que soy.

A mi mamá y mi papá; son ustedes un gran ejemplo de seres humanos.

A mi hermana; de quien espero grandes logros.

AGRADECIMIENTOS

A la Mtra. Betsaida Ortiz Sánchez, pilar fundamental de este trabajo y una profesora comprometida con la enseñanza de sus alumnos, gracias por su apoyo y tiempo.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa por sus grandes aportes y dirección en la realización de esta tesis, le debo muchos buenos momentos y aprendizajes.

Al C.D. Fernando Galván Toledo por su cooperación y consejos, un gran profesor y mejor ser humano.

A la Dra. Cynthia Trejo por sus aportaciones al trabajo y su ayuda para que esto fuera posible.

A la Mtra. Imelda Juárez Avelar por su conocimiento compartido, por su paciencia y sus palabras de aliento.

A mis padres y hermana, a quienes les debo todo lo que tengo y mucho más, son para mí una gran inspiración y no tengo palabras para describir cuanto los amo.

A mi familia quienes nunca han dudado en tenderme su mano y apoyarme, a mis tíos, mis abuelos y mis primos, en especial a “Chino” por creer en mí y motivarme a realizar este trabajo.

A mis amigos, Enrique, Joss, Brench, Iván, Teniza y mi novia, Ere, por su apoyo incondicional y su cariño, que son recíprocos.

A mis compañeros del laboratorio 5 de la UBIMED con quienes compartí muchas risas y buenos momentos, fueron un gran apoyo durante mi estancia.

Para la realización de este trabajo de investigación se contó con el apoyo financiero de CONACyT (A1-S-10463) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (209718) de los cual es responsable la Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Tejido periodontal	3
Encía	4
Ligamento periodontal	5
Surco periodontal	8
Hueso alveolar	8
Cemento radicular	9
Tejido periodontal sano	9
Enfermedades periodontales (periodontitis)	10
Etiología	12
Gestación	13
Gestación y su relación con la enfermedad periodontal	14
Inmunología de la cavidad oral	16
Inmunología adaptativa en la enfermedad periodontal	17
Citocinas	19
Interleucina 6	19
Interleucina 4	19
Interferón γ	20
Factor de necrosis tumoral α	20
Factor de inhibición de migración de macrófagos	20
Acción de las citocinas en la enfermedad periodontal	21
Justificación	22

Planteamiento del problema	22
Pregunta experimental	22
Hipótesis	23
Objetivos	23
Materiales y métodos	24
Análisis estadístico	34
Análisis de resultados	35
Fondo genético	35
Establecimiento del modelo de periodontitis experimental y su severidad clínica	36
Cuantificación de la expresión de citocinas	37
Discusión	41
Conclusiones	43
Bibliografía	44
Anexos	
Aval de Comisión de Ética	46
Aval de Comisión de Bioseguridad	47

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Tejidos periodontales	3
Figura 2. Esquema y corte histológico del epitelio de la encía	5
Figura 3. Esquema del desarrollo de los principales grupos de fibras del ligamento periodontal	6
Figura 4. Fibras de colágena en la encía	7
Figura 5. Fotografía clínica de un tejido periodontal sano	10
Figura 6. Fotografía y esquema de un periodonto sano y uno con periodontitis	11
Figura 7. Inmunología adaptativa en la enfermedad periodontal	18
Figura 8. Ratones <i>Mus musculus</i> de la cepa BALB/c	24
Figura 9. Cronograma	25
Figura 10. Fórmulas de las dosis de Xilacina y Ketamina	27
Figura 11. Organización de los grupos	28
Figura 12. Inducción de periodontitis	29
Figura 13. Obtención y macerado del maxilar	30
Figura 14. Técnica de RT-PCR para la obtención de cDNA	32
Figura 15. Genotipo para confirmar ratones <i>Mif</i> ^{-/-}	35
Figura 16. Fotografía macroscópica de los grupos PE WT y PE <i>mif</i> ^{-/-}	36
Figura 17. Fotografía macroscópica de los grupos PAG WT y PAG <i>mif</i> ^{-/-}	36
Figura 18. Gráfica de la expresión relativa de <i>tnf-α</i>	38
Figura 19. Gráfica de la expresión relativa de <i>ifn-γ</i>	38
Figura 20. Gráfica de la expresión relativa de <i>il-6</i>	39
Figura 21. Gráfica de la expresión relativa de <i>mif</i>	40
Tabla 1. Tabla de los diferentes genes con sus oligonucleótidos específicos, temperatura de alineación y producto de pares de bases correspondientes	33
Tabla 2. Panel representativo de la fluorescencia de las diferentes citocinas	37

ABREVIATURAS

<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
APC	Célula presentadora de antígeno
CTL	Grupo control
EP	Enfermedad periodontal
FGC	Fluido gingivo-crevicular
G	Grupo gestante
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacáridos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Factor de inhibición de migración de macrófagos
<i>Mif</i> ^{-/-}	Genéticamente deficiente para MIF
NK	Célula asesina natural (del inglés Natural Killer)
PAG	Grupo periodontitis asociada a gestación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Grupo periodontitis experimental
<i>Pg</i>	<i>Porphyromona gingivalis</i>
<i>Pi</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa reversa
Tc	Células T citotóxicas
<i>Tf</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
Th	Células T helper
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
WT	Wild type

RESUMEN

Los tejidos periodontales: la encía, el hueso alveolar, el ligamento periodontal y el cemento radicular, tienen la función de dar soporte y mantener al diente en su sitio, cuando estos tejidos se ven afectados, el padecimiento recibe el nombre de enfermedad periodontal (EP). Existen muchos estudios que han relacionado a la gestación como un factor para la presencia de EP o el agravamiento de ésta, debido a los diversos cambios sistémicos y primordialmente endocrinos (aumento de hormonas sexuales femeninas) que sufre el cuerpo durante los 9 meses que dura el embarazo teniendo diferentes modificaciones de acuerdo con el trimestre en que se encuentre la mujer gestante. Aunado a esto, se ha reportado que la gestación es un estado que modifica la expresión de diversas citocinas. Debido a que en los tejidos periodontales existen receptores de dichas citocinas en este trabajo se cuantificaron la expresión relativa de las citocinas IL-6, IL-4, IFN- γ , TNF- α y MIF a nivel local en un modelo murino de EP. Objetivo: Encontrar una relación entre la expresión de estas citocinas y la destrucción de los tejidos periodontales. Metodología: Se utilizaron 6 ratones hembra BALB/c silvestres (Wild-type - WT) y 6 deficientes para MIF (*Mif*^{-/-}) de 8 a 10 semanas de edad que fueron mantenidos en condiciones estériles (Bioterio FES-I). Se registraron los cambios clínicos de la EP mediante fotografía microscópica y se cuantificó la expresión relativa del transcrito de IL-6, IL-4, IFN- γ , TNF- α y MIF a nivel local mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR). Resultados: Clínicamente, los ratones *Mif*^{-/-} mostraron una menor destrucción tisular en comparación con los WT. La presencia de *ifn*- γ fue mayor en los grupos WT que en los *Mif*^{-/-}, mostrando diferencias solo los grupos G y PE. La expresión relativa de *tnf*- α no mostró significancia estadística. Aunque estadísticamente la citocina IL-6 no mostró diferencias, se puede observar una tendencia al aumento en los grupos con gestación. La citocina IL-4 no pudo ser amplificada en ninguno de los casos. Conclusión: En este trabajo se logró mostrar parte de la participación de MIF durante el desarrollo de la EP y su papel en la secreción de citocinas como IFN- γ e IL-6.

INTRODUCCIÓN

Se estima que aproximadamente del 50 al 90% de la población mundial adulta padece de gingivitis, mientras que la periodontitis afecta a más del 10% [1]. La principal causa de la enfermedad periodontal (EP) son los microorganismos que colonizan los tejidos periodontales, tanto subgingival como supragingivalmente, sin embargo, para que la enfermedad se desarrolle, no solo se requiere de la presencia de microorganismos, también depende de la susceptibilidad del hospedero [2]. En el caso específico de las mujeres, se ha reportado que el 23% de las mujeres de entre 23 y 54 años (edad reproductiva) padecen periodontitis. Durante la gestación el cuerpo se ve afectado por diversos cambios en todos los sistemas, en especial el endocrino que presenta un aumento en la expresión de hormonas (estrógenos, progesterona, gonadotropinas, relaxina, entre otras) lo que influye incluso en la salud de la cavidad oral, favoreciendo la EP en las mujeres gestantes desde un 35 hasta el 100% [3, 4].

Existen microorganismos específicos que se han detectado en prácticamente cualquier proceso infeccioso de los tejidos periodontales [5]. Estos microorganismos, principalmente son bacterias anaerobias gram negativas que colonizan los tejidos periodontales y que tienen antígenos como lipopolisacáridos (LPS), endotoxinas que activan al sistema inmune del hospedero, induciendo la expresión de diversas citocinas que inician la respuesta inflamatoria [3]. Dicha respuesta se agrava con la condición del embarazo debido a que la prevalencia y severidad de la EP aumentan [3]. Por lo que la Academia Americana de Periodontología recomienda que se realicen exámenes y tratamientos periodontales en especial a las mujeres que planean tener un hijo [6].

Tejido periodontal

El periodonto está conformado por los tejidos de soporte y protección del diente. Se describen dos partes: la encía, que tiene la función de proteger los tejidos subyacentes y el aparato de inserción, que incluye el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar, que en conjunto ayudan a la inserción del diente dentro del alveolo (Figura 1). Se considera al periodonto una unidad de desarrollo, biológica y funcional, que a través de las diferentes etapas de la vida, salud y enfermedad al estar en relación con el medio ambiente sufre alteraciones morfológicas y funcionales [7, 8].

Durante la odontogénesis, de manera paralela al desarrollo del germen dentario se desarrollan los tejidos periodontales. Es un proceso que comienza en la etapa embrionaria: las células de la cresta neural migran al interior del primer arco branquial. Estas células forman una banda de ectomesénquima por debajo del epitelio del estomodeo, el cual libera factores que inician interacciones epitelio-ectomesénquima. Posteriormente, se forma la lámina dental que después de pasar por los estadios de yema y casquete forma la papila dental de la que se originan la dentina y la pulpa, y el folículo dental del que se originan los tejidos periodontales y después del último estadio, el de campana, se forma el diente y con él se desarrollan por completo los tejidos periodontales que lo rodean [7].

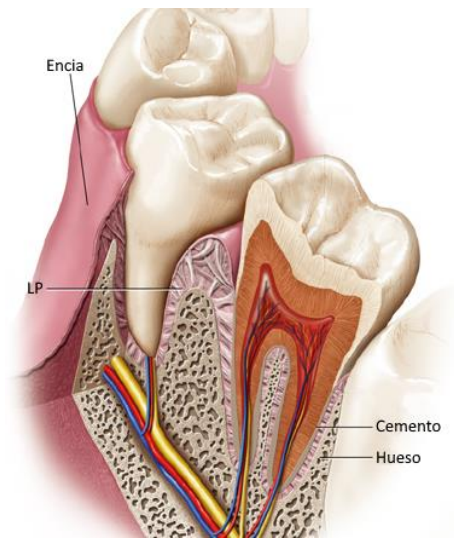


Figura 1. Tejidos Periodontales. LP: Ligamento Periodontal. Modificado de Nanci A., 2008 [9]

Encía

La encía es parte de la mucosa masticatoria, se encuentra rodeando el cuello de los dientes y recubriendo la apófisis alveolar del maxilar y la mandíbula. Presenta dos capas, una de epitelio escamoso estratificado y la otra de tejido conectivo cuyo límite presenta una forma ondulada, llamada rete pegs. Su color en condiciones de salud es rosa coral, opaca, de consistencia firme, su forma y textura están determinadas por la anatomía de los dientes a los que rodea, es festoneada en los cuellos de los dientes y en forma de pirámide en el espacio interdental y con puntilleo [7, 8].

Anatómicamente, la encía se divide en tres tipos: marginal, insertada e interdental. La primera se ubica en el borde de encía que rodea los cuellos de los dientes, a veces presenta una ligera depresión, mide 1 mm de ancho aproximadamente y forma el surco gingival. La segunda continúa apicalmente a la primera terminando en la unión mucogingival, es más firme y resiliente. Por último, la encía interdental ocupa el espacio interproximal que puede ser en forma piramidal o de col dependiendo del punto o área de contacto entre los dientes [8].

El epitelio a su vez puede dividirse en tres áreas de acuerdo con su función y forma: epitelio oral, epitelio del surco y epitelio de unión (Figura 2). El epitelio oral corresponde a la zona más superficial y es queratinizado o paraqueratinizado. El epitelio del surco se encuentra recubriendo el surco gingival y no es queratinizado. El epitelio de unión es una banda que rodea al diente en forma de collar y es no queratinizado [8].

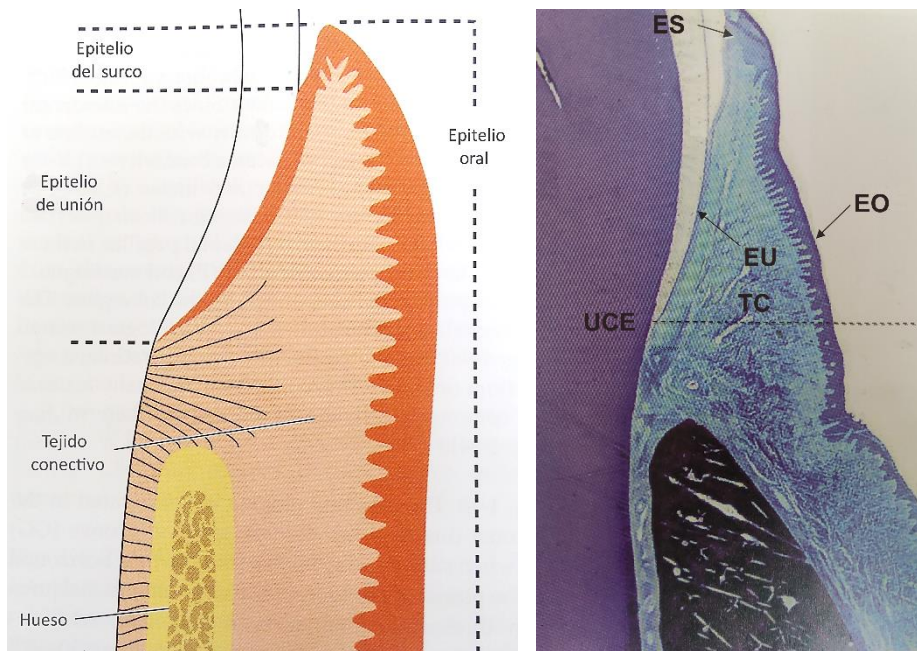


Figura 2. Esquema y corte histológico del epitelio de la encía. ES: Epitelio del surco, EU: Epitelio de unión, EO: Epitelio oral, TC: Tejido conectivo, UCE: Unión cemento-esmalte. Modificados de Lindhe J. 2009 [7]

La principal función del epitelio gingival es la protección de las estructuras profundas y el permitir un intercambio selectivo con el medio bucal, estas funciones se cumplen gracias a la proliferación y diferenciación de los queratinocitos [8].

Las células presentes en el tejido gingival son queratinocitos (productores de queratina), melanocitos (productores de melanina), células de Langerhans (células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) y linfocitos), células de Merkel (función sensitiva) y células inflamatorias [7, 8].

Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es el tejido conectivo blando altamente vascularizado y celular que se dispone alrededor de la raíz dentaria, une a ésta a través del cemento radicular con el hueso alveolar. Se compone de una red de haces de fibras de colágena. El extremo de estas fibras que se insertan en el cemento radicular y en el hueso alveolar recibe el nombre de fibras de Sharpey. Sus funciones son: absorber las fuerzas de la masticación y de otros contactos dentarios y distribuirlos en la apófisis alveolar; unir al diente con el hueso;

formación y resorción del cemento y del hueso; inervación sensitiva y vascularización de los tejidos periodontales. Se desarrolla a partir del tejido conectivo laxo que rodea al germen dental (Figura 3). Se suelen clasificar en seis grupos: transeptales, crestales, horizontales, oblicuas, apicales e interradiculares [7, 8].

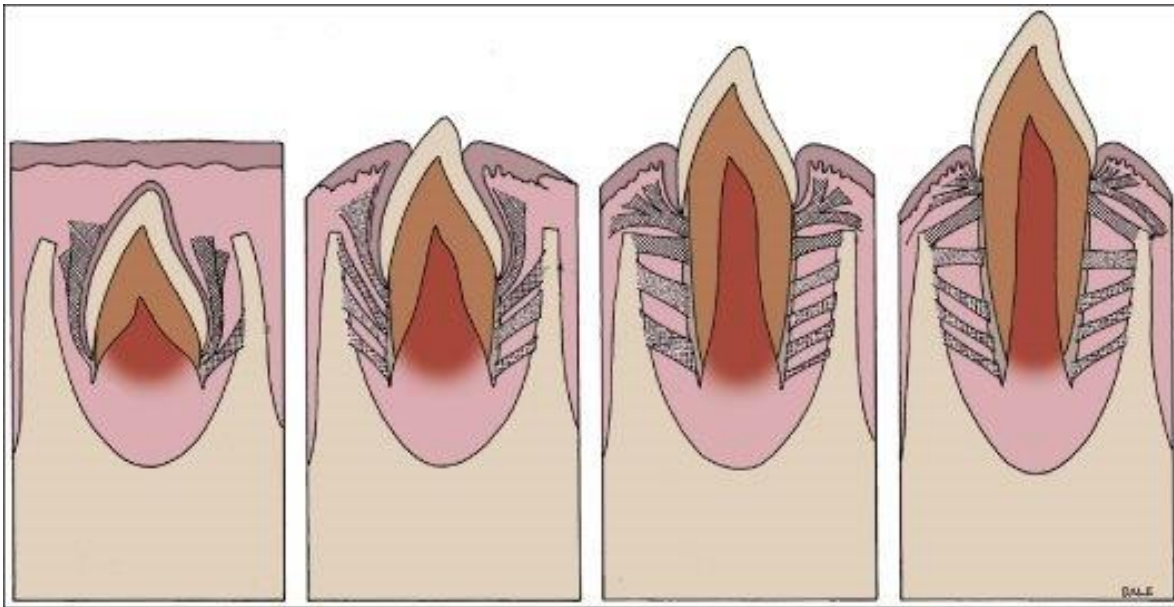


Figura 3. Esquema del desarrollo de los principales grupos de fibras del ligamento periodontal.
Modificado de Nanci A., 2008 [9]

Las células principales de este tejido son los fibroblastos, sin embargo, también se hallan osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos, odontoclastos, células epiteliales y fibras nerviosas. También se reconoce la aparición de células inmunes como neutrófilos, linfocitos, macrófagos, mastocitos y eosinófilos. Las funciones de los fibroblastos son la síntesis de colágena, la remodelación de las fibras, y la eliminación de fibras de colágena no funcionales mediante hidrólisis enzimática [7, 8].

En la encía marginal se encuentra tejido conectivo, el cual se compone de una red de haces de fibras colágenas (integradas por colágena de tipo I) que reciben el nombre de fibras gingivales. Estas fibras poseen tres funciones: 1) mantener firme al diente contra la encía marginal, 2) ayudar a soportar las fuerzas de la masticación sin separarse de la superficie dentaria, gracias a la rigidez que

proveen y 3) unir a la encía marginal libre con el cemento de la raíz y la encía insertada contigua [7].

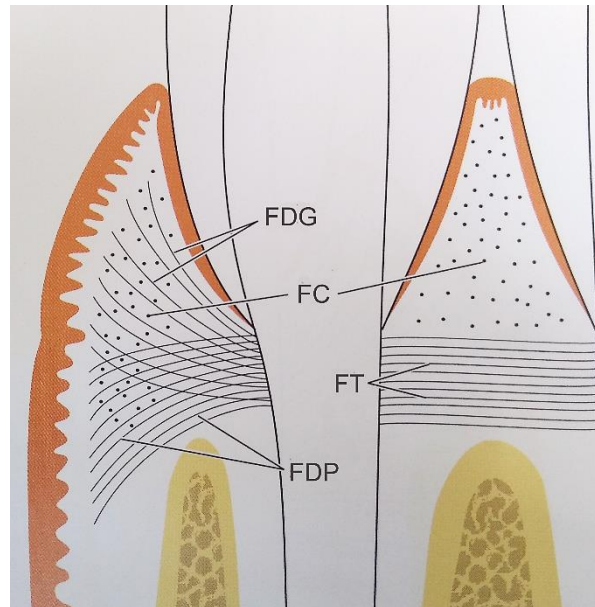


Figura 4. Fibras de colágena en la encía. FDG: Fibras dento-gingivales, FC: Fibras circulares, FT: Fibras transeptales, FDP: Fibras dento-periostales. Modificado de Lindhe J., 2009 [7]

Se les clasifica en cuatro grupos: gingivodental, circular, transeptal y dento-periostales (Figura 4). Las primeras corresponden a las superficies interproximales, linguales y vestibulares. Se insertan en el cemento, por debajo del epitelio, en la base del surco gingival. En las superficies vestibulares y linguales del diente se distribuyen en forma de abanico desde el cemento hacia la cresta y la superficie externa de la encía marginal. Las del segundo grupo, como su nombre lo indica son circulares y atraviesan el tejido conectivo de la encía marginal e interdental y rodean al diente a manera de anillo. Las transeptales se localizan en el espacio interproximal formando haces horizontales que se extienden entre el cemento de dientes adyacentes en los cuales se insertan. Las del último grupo van de la misma porción de cemento que las gingivodentales, pero su curso es hacia apical de la cresta ósea vestibular y lingual y terminan en el tejido de la encía adherida [7, 8].

Surco periodontal

Espacio que rodea al diente y se encuentra delimitado por la encía libre, se forma al momento de la erupción dental y en condiciones de salud debe medir entre 1 y 3 mm, se considera un lugar donde se puede alojar el biofilm. Este espacio cuenta con propios mecanismos de defensa como lo es el fluido gingival-crevicular (FGC), que es considerado un exudado inflamatorio, que mediante su constante flujo a través del surco logra remover microorganismos y otros residuos, además contiene lisozimas, inmunoglobulinas (IgG e IgA) y neutrófilos polimorfonucleares (PMN) [10]. Gracias a este contenido el FGC se utiliza como método de identificación y diagnóstico de EP activa y su progresión, como indicador de pérdida de tejido y se puede reconocer la predisposición a padecerla [8, 11].

Hueso alveolar

El hueso o apófisis alveolar está comprendido por la parte del maxilar y la mandíbula que contiene los alvéolos dentarios y rodea al diente hasta aproximadamente 1 mm hacia apical de la unión cemento-esmalte. Se compone tanto de hueso formado por células del folículo dental como por células independientes del desarrollo dentario. Su formación ocurre durante el desarrollo fetal por osificación intramembranosa. El hueso posee dos terceras partes de materia inorgánica (calcio y fosfato, principalmente) y una de materia orgánica (colágena tipo I, principalmente). La función que cumple es distribuir y absorber las fuerzas que se generan por la masticación y los contactos dentarios, esto en conjunto con el ligamento periodontal y el cemento radicular [7, 8].

Las células del hueso alveolar son los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, las primeras son las encargadas de sintetizar matriz orgánica, ésta matriz calcifica y mantiene a los osteocitos en espacios llamados lagunas. El hueso sufre durante toda la vida diversas fases de remodelado y renovación gracias a la acción conjunta de osteoblastos y osteoclastos, mediante un mecanismo de resistencia de fuerzas, cambios de forma, reparación de heridas y homeostasis de calcio y fosforo [8].

Cemento radicular

Es el tejido que recubre las raíces anatómicas de los dientes y pequeñas porciones de las coronas dentales, es mineralizado y aunque posee características del tejido óseo, está exento de vasos sanguíneos, linfáticos, nervios, y no experimenta el proceso de remodelado y resorción ósea. Su constitución principal es de hidroxiapatita y su función como parte del tejido periodontal es ser el lugar de inserción de las fibras del ligamento periodontal y contribuir en el proceso restaurador de una superficie radicular dañada [7].

Se distinguen dos tipos de cemento: acelular (primario) y celular (secundario), ambos con matriz interfibrilar calcificada y fibrillas de colágena. El cemento acelular es el primero en formarse (se forma antes de que el diente erupcione) y cubre los tercios cervical y medio de la raíz del diente, no contiene células y se constituye principalmente por las fibras de Sharpey y cumple la función de soporte dentario. Mientras que el cemento celular que se forma una vez el diente haya hecho erupción, se encuentra menos calcificado y contiene cementocitos, este se considera mixto estratificado cuando ocupa el tercio apical de la raíz dental y furcaciones y contiene fibras extrínsecas e intrínsecas, y se considera cemento celular con fibras intrínsecas cuando se halla en lagunas de resorción y solo contiene fibras intrínsecas [7, 8].

Tejido periodontal sano

Según la más reciente clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y peri-implantes, la salud gingival clínica (Figura 5) se presenta en pacientes con el periodonto intacto o en tratamiento contra la gingivitis, tejidos sin sangrado al sondeo (se considera ausencia cuando el sangrado es menor al 10% y la profundidad menor a 3 mm), sin eritema y edema, sin presencia de síntomas y sin pérdida de tejido de unión o hueso, cuyo nivel varía de 1 a 3 mm hacia apical de la unión cemento-esmalte. En el caso de pacientes con el periodonto afectado o que se mantienen bajo tratamiento contra la periodontitis, en los que ya hubo pérdida

de unión y de hueso, también se les puede considerar sanos mientras no tengan ningún otro signo clínico [12].



Figura 5. Fotografía clínica de un tejido periodontal sano. Tomado de Newman M., 2004 [8]

Enfermedades periodontales (periodontitis)

Las enfermedades periodontales se dividen en gingivitis y periodontitis, las cuales son procesos inflamatorios generalmente crónicos de los tejidos periodontales. Estas pueden ser inducidas por el biofilm y favorecidas por alguna enfermedad o condición sistémica. La gingivitis es provocada por la acumulación de microorganismos que se organizan en un biofilm sobre la superficie dental y los tejidos que lo rodean, lo que causa inflamación y sangrado en el tejido gingival, mientras que la periodontitis, tiene la misma etiología, provoca inflamación en los tejidos más profundos (ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar), lo que conlleva a la pérdida del tejido conectivo de soporte, del hueso alveolar y la formación de una bolsa periodontal, inicia un proceso crónico que puede derivar incluso en la pérdida de los órganos dentales involucrados [3, 10, 12-14].

Para el diagnóstico de estas enfermedades es necesaria una historia clínica general y bucodental además del examen clínico, esto con el fin de acercarnos lo más posible al diagnóstico correcto [15].

Los signos clínicos de la gingivitis son: encía enrojecida, con sangrado al sondeo y a pequeños estímulos, eritema, engrosamiento del margen gingival, papilas interdentarias con hiperplasia y posibilidad de formación de pseudobolsas periodontales, los sitios más comúnmente afectados suelen ser los dientes anteriores y los espacios interdentales, además el paciente puede reportar halitosis [3, 12]. En el caso de la periodontitis la inflamación se extiende a los tejidos de soporte (ligamento periodontal, cemento y hueso) (Figura 6). También existe sangrado al sondeo, se forma una bolsa periodontal cuya profundidad se relaciona con la gravedad de la EP, lo que implica pérdida de inserción y pérdida ósea que puede observarse a través de una radiografía, lo que, a mayor profundidad provoca movilidad dental. Otros signos que pueden presentarse en la periodontitis son: recesión gingival, supuración, migración dental patológica y dolor [16, 17].

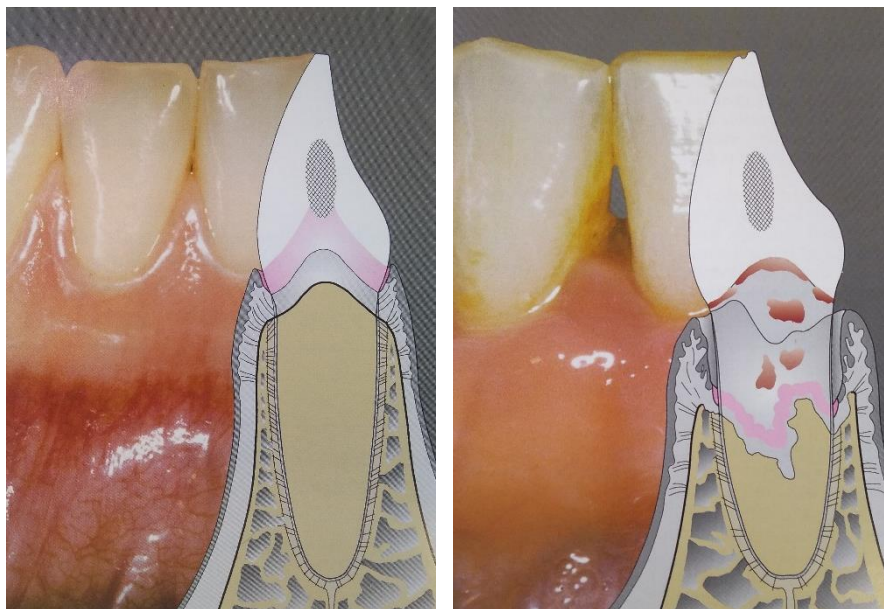


Figura 6. Fotografía y esquema de un periodonto sano y uno con periodontitis. Tomado de Wolf H., 2009 [17]

La nueva clasificación de la salud de los tejidos periodontales divide a la periodontitis en cuatro diferentes etapas de acuerdo a su severidad, complejidad, extensión y distribución y en tres diferentes grados de acuerdo a la evidencia de progresión y factores de riesgo del paciente [18].

La epidemiología de las enfermedades periodontales es muy amplia, puesto que puede presentarse en cualquier etapa de la vida. A nivel mundial entre el 50 y el 90% de la población padece algún grado de gingivitis y un porcentaje mayor al 10% se ve afectada por la periodontitis. Diversos factores de riesgo se han descrito para las EP, estos se clasifican en locales; factores de retención de biofilm (anatomía y posición dental, facilidad de adherencia y maduración de los microorganismos) y la humedad oral; y sistémicos; uso de cigarrillo, existencia de enfermedades sistémicas, la dieta, consumo de medicamentos, cambios hormonales y existen otros factores externos como genéticos y socioeconómicos. En particular con la gestación, existen diversos estudios que la relacionan con la periodontitis, los cuales han reportado desde un 35 a un 100% de prevalencia [1, 3, 12, 14].

Etiología

La etiología de estos padecimientos también es compleja y se considera multifactorial. Para que la EP se desarrolle se requiere de ciertos microorganismos que se han identificado como específicos de esta enfermedad y su interacción con un hospedero susceptible, esta interacción es afectada por factores de riesgo sistémicos, genéticos y ambientales. Sin embargo, es importante considerar que los microorganismos en si no son los que causan el daño y destrucción de los tejidos, si no que estos son provocados por la respuesta del hospedero ante la presencia de las bacterias y su disbiosis [19].

El principal factor etiológico de las EP son las bacterias gram-negativas anaerobias: *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Tannerella forsythia* (*Tf*) y *Prevotella intermedia* (*Pi*). La interacción con los demás microorganismos del biofilm al generarse una disbiosis es que logran ser infecciosos para el huésped. Las características de los microorganismos gram negativos son: LPS, cápsula, hemaglutininas, fimbrias, proteína sérica B y unas proteínas mejor conocidas como “gingipains” para *Pg*; proteínas de adherencia, polisacáridos de la placa, LPS y toxinas, en el caso de

Aa y; sialidasa, una proteína similar a la tripsina, actividad inductora de apoptosis, alfa-D-glucosidasa, hemaglutinina, entre otras para *Tf* [3, 13, 14, 19].

Los microorganismos del biofilm del hospedero, mediante sus factores de patogenicidad como el LPS y el ácido lipoteicoico, al entrar en contacto con las células del epitelio del surco, específicamente con las células del epitelio de unión inducen la producción de citocinas y quimiocinas por el epitelio de la encía, lo que favorece la expresión de moléculas de adhesión, incremento de la permeabilidad de los capilares gingivales y quimiotaxis de PMNs a través del epitelio de unión y dentro del surco gingival, los PMNs inducen la liberación de otras moléculas que son perjudiciales para las bacterias, sin embargo, también pueden afectar a los tejidos periodontales [16].

Gestación

La gestación se define como un estado fisiológico que involucra distintas modificaciones; sistémicas, como el aumento del volumen plasmático, de gasto cardíaco, de volumen de aire circulante, cambios en la dieta (especialmente, el incremento en el consumo de azúcares), presencia de náuseas y vómitos, disminución del hematocrito, de la tasa de hemoglobina y del número total de eritrocitos y; especialmente endocrinas, entre las que se puede mencionar el incremento de la producción de estrógenos, progesterona, gonadotropinas y relaxina, que a medida que avanza la gestación, van tomando mayor relevancia y conducen a la producción de los cambios en todo el organismo de la mujer. La cavidad oral no está exenta de estos cambios, como: modificaciones en la composición y pH de la saliva, y su capacidad neutralizadora. Que causan que el medio oral sea favorable para el desarrollo de los microorganismos patógenos [20].

Las concentraciones de progesterona y estrógenos aumentan gradualmente durante la gestación, logrando aumentar hasta 10 veces más la concentración de progesterona y 30 veces más la concentración de estrógenos durante el último trimestre de embarazo, en comparación con los niveles de las mismas hormonas

durante el ciclo menstrual normal de la mujer. Lo que deriva en una respuesta inflamatoria intensa y aumento de la permeabilidad vascular y del exudado gingival lo que apoya la infiltración de líquidos en tejidos perivasculares. [15, 21].

Gestación y su relación con la enfermedad periodontal

Las modificaciones provocadas por la gestación pueden favorecer la aparición o agravamiento de la periodontitis, puesto que en ausencia de biofilm, generalmente no se desarrollan las enfermedades periodontales, sin embargo, durante la gestación si se les considera de importancia en el incremento de incidencia de éstas. También se ha reportado en la literatura que la severidad de la EP va en aumento en relación con el progreso de la gestación iniciando en el segundo mes de embarazo y alcanzando su punto máximo durante el octavo mes, en el tercer trimestre, a pesar de que la mujer presente una buena y constante higiene oral [3, 21, 22].

A nivel clínico cuando existe una EP durante el embarazo, la inflamación gingival va en aumento con respecto al paso del tiempo, aunado a esto también se ha encontrado un aumento del sangrado a la estimulación mecánica, de la profundidad de sondaje, del flujo del FGC y de la movilidad dental [15].

La gestación provoca cambios en el biofilm subgingival, que se ve colonizado por la bacteria gram negativa *Pi*, esto ocurre aproximadamente a partir del tercer o cuarto mes de embarazo, estudios sugieren que esto es debido a que esta bacteria utiliza a los estrógenos, progesterona y estradiol como sustrato alimenticio, debido a su parecido estructural con la naftoquinona, también conocida como vitamina K, que funge como su alimento [15, 21, 23].

Existen algunos estudios que afirman que la EP está implícita como consecuencia del embarazo, ya que se suele presentar a pesar de una adecuada higiene y el control de factores de riesgo. Y hay otros más que apuntan a que la progesterona tiene un papel activo como inmunosupresor en los tejidos periodontales durante el embarazo, de manera que previene de colonizaciones agudas, no obstante facilita las condiciones para el establecimiento de EP crónica [21].

Otra hormona que se ha mencionado puede estar relacionada con la EP es la relaxina que participa en la facilitación de la labor de parto al relajar las articulaciones, también se le ha atribuido la función de provocar una ligera movilidad dentaria, lo que facilitaría la colonización de la microbiota y posterior inflamación de los tejidos [21].

Los cambios en los niveles hormonales pueden provocar inflamación gingival pero no aumenta usualmente la susceptibilidad para padecer la EP [14].

Algunos estudios han logrado demostrar que la encía contiene receptores de las hormonas progesterona y estrógenos localizados en las capas basal y espinosa del epitelio, en fibroblastos del tejido conectivo, células endoteliales y pericitos de la lámina propia, lo que indica que, un aumento sistémico de estas hormonas también tiene influencia en los tejidos periodontales. Aunque el efecto de estas hormonas sobre estos tejidos aún no han sido esclarecidos totalmente se sospecha que pueden involucrar cambios vasculares, celulares, inmunológicos y microbiológicos [3].

Los cambios vasculares afectan la microvascularización de la encía, lo que aumenta la permeabilidad y severidad de la gingivitis: aumento del edema, eritema, exudado del FGC, según estudios hasta un 54% comparado con el nivel posparto y hemorragia en los tejidos gingivales [3].

Dentro de las modificaciones celulares, el epitelio gingival sufre queratinización, lo que disminuye su capacidad para evitar invasión de los microorganismos. Además, se afectan los mecanismos de reparación y mantenimiento debido a la alta concentración de progesterona [3].

Y por último, en los cambios inmunológicos se puede mencionar que los estrógenos y la progesterona pueden causar la disminución en la actividad de algunas células y citocinas, como: linfocitos T CD4, T CD8, linfocitos B, IL-1, IL-2, IL-6 e IFN como un mecanismo de protección para evitar que la madre rechace al feto [3].

Por otro lado, también se conoce que naturalmente durante la gestación, los niveles de prostaglandinas y TNF- α aumentan, lo que tiene como objetivo lograr la inducción de la dilatación cervical al momento del parto, sin embargo, se ha descrito que patologías como la EP o infecciones urinarias también pueden aumentar los niveles de prostaglandinas y TNF- α [8, 24].

Inmunología de la cavidad oral

En la cavidad oral se encuentran dos formas en las que el sistema inmune puede actuar: de manera local, a través de las glándulas salivales, y de manera sistémica, a través del FGC. La boca es la vía de entrada de microorganismos a dos sistemas: el digestivo y el respiratorio, generalmente estos microorganismos no son patógenos, sin embargo, existen mecanismos en la cavidad oral para evitar interacciones nocivas con los microorganismos como: la integridad de la mucosa oral, el mecanismo de limpieza de la saliva, los componentes inmunitarios en el FGC y el drenaje linfático intraoral: amígdalas palatinas, amígdalas linguales y amígdalas faríngeas que forman el llamado anillo amigdalino de Waldeyer y extraoral: nódulos linfáticos submandibular, submentoniano, cervicales profundos superiores y retrofaríngeos, los cuales drenan superficialmente estructuras como la lengua, piso de boca, paladar, carrillos, labios y encía [25].

En el caso de las glándulas salivales también se pueden hallar linfocitos B y células plasmáticas, éstas secretan IgA principalmente, IgM e IgG en menor cantidad [25].

La saliva es una secreción muco-serosa que contiene lisozimas, peroxidasas, lactoferrinas, aglutininas y componentes del complemento, se mantiene en constante flujo a través de toda la cavidad oral. Las funciones de la saliva son: humectar, lubricar, así como, limpieza y arrastre de alimentos, bacterias y leucocitos del FGC, además de mantener el pH básico [25].

La función primordial de la mucosa es fungir como barrera para evitar que los microorganismos penetren hacia los tejidos subyacentes, esto sucede gracias a la presencia de queratina, las células de la capa granular del epitelio, la formación de

complejos antígeno-anticuerpo, la membrana basal del epitelio, la presencia de linfocitos, la descamación del epitelio [25].

En la encía sana existe infiltrado de células linfoides que incluyen neutrófilos, linfocitos, monocitos, macrófagos y células plasmáticas diversas. En el surco predominan los neutrófilos, sin embargo, cuando existe un proceso inflamatorio aumentan el número de linfocitos y células plasmáticas [25].

Inmunología adaptativa en la enfermedad periodontal

Además de la acción de los mecanismos efectores de la primera línea de defensa (inmunidad innata) para eliminar a un patógeno determinado, la respuesta inmune adaptativa es activada. La respuesta adaptativa utiliza estrategias de reconocimiento y memoria para apoyar a los sistemas efectores en la eliminación de elementos dañinos para el hospedero [7].

Los antígenos característicos de cada patógeno son reconocidos por las APC. Estas poseen la habilidad de internalizar y procesar los antígenos contribuyendo a su reconocimiento y a la activación de una temprana respuesta de la defensa del hospedero. El antígeno procesado se une a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), el cual lleva al antígeno del patógeno volviéndolo identificable para las células T [7].

Los receptores de las células T son los encargados de interactuar con el antígeno procesado pudiendo desatar diferentes tipos de respuesta inmune dependiendo del tipo de célula T CD4+ que sea activada.

Las células T CD4+ pueden ser de diferentes tipos, siendo los más comunes, T helper 1 (Th1) o T helper 2 (Th2), entre otros. Se distinguen entre sí, por las citocinas que producen. Las células Th1 producen IL-2, IFN- γ y TNF- α , estas citocinas tienen diversas funciones y pueden activar otras células T, incluyendo a las llamadas T citotóxicas (Tc). Las Tc expresan el marcador CD8+ y protegen al organismo de microorganismos capaces de invadir células del hospedero. Se ha determinado que las células CD8+ se hallan en menor cantidad que las CD4+ en

lesiones por EP, debido a que los microorganismos invasivos constituyen la menor parte de los antígenos en esta patología [7].

Por otro lado, las células Th2 producen IL-4, IL-6, IL-10, entre otras citocinas que contribuyen al proceso de activación y diferenciación de células B, las cuales en su última fase de proliferación (células plasmáticas) producen anticuerpos. Estos anticuerpos se encuentran en fluidos tales como: el plasma y el FGC, tienen la habilidad de unirse a los antígenos microbianos, activando otros sistemas efectores como el del complemento que ayuda a mediar la migración de macrófagos y PMNs al sitio e iniciar la fagocitosis (Figura 7). Este tipo de respuesta inmune es conocido como humoral [7].

Cuando una célula B produce anticuerpos capaces de unirse a los antígenos microbianos, se le conoce como célula B convencional o B2, sin embargo, pueden darse casos en los que células B produzcan anticuerpos que actúen en contra de los componentes de los tejidos del hospedero, a estas células se les denomina células B autorreactivas o B1 [7].

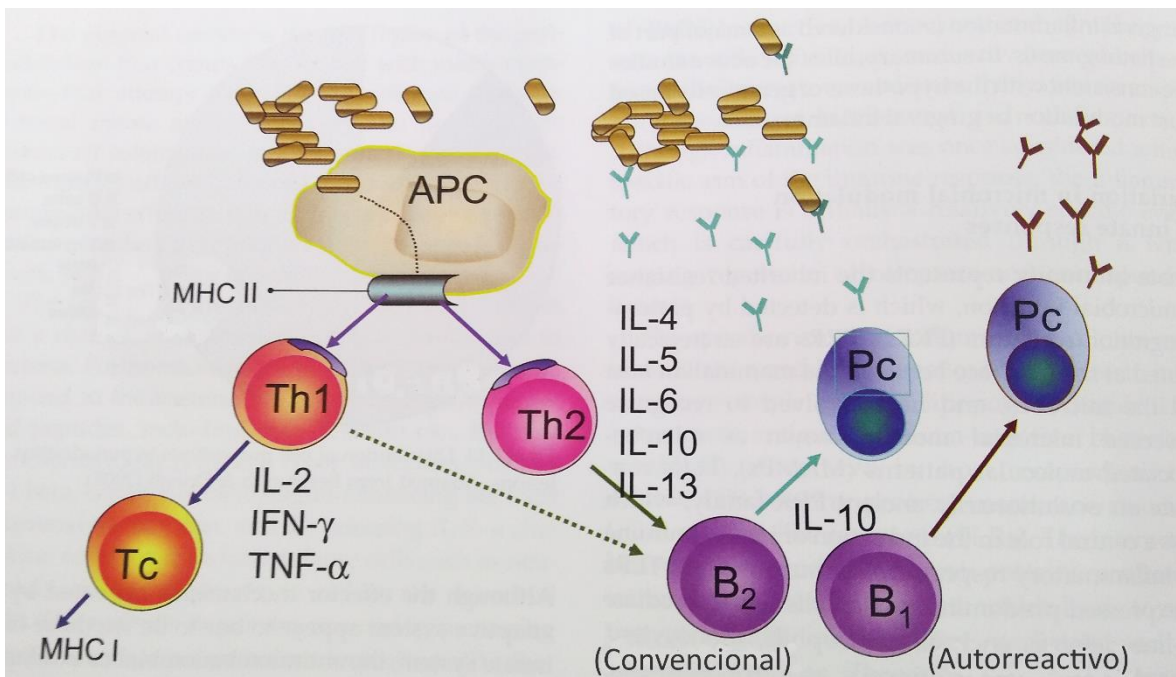


Figura 7. Inmunología adaptativa en la enfermedad periodontal. APC: Célula presentadora de antígeno, Th1: Célula T helper 1, Th2: Célula T helper 2, Tc: Célula T citotóxica, Pc: Célula plasmática, Modificado de Lindhe J., 2009 [7]

Citocinas

Las citocinas son polipéptidos estructural y funcionalmente diversos, poseen propiedades inflamatorias, metabólicas e inmunoreguladoras. Son detectadas por células del sistema inmune gracias a sus receptores y las activan formando una compleja red de control biológico. Se les atribuye poder tener efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos. No requieren de altas concentraciones para lograr sus efectos y su síntesis generalmente, ocurre después de la estimulación antigénica, aunque se ha observado una pequeña cantidad de citocinas proinflamatorias presente en tejidos clínicamente sanos a la que se le atribuye la función de mantener la homeostasis. Sin embargo, en el caso de EP, estas citocinas tienden a sobreexpresarse, teniendo como consecuencia la adopción de patrones proinflamatorios destructivos, caracterizados por la inducción de enzimas que degradan el tejido conectivo, la reabsorción ósea y la probable apoptosis de fibroblastos impidiendo la reparación del tejido dañado [26-28].

Interleucina 6

La IL-6 puede ser producida por distintas células, como linfocitos B, T, macrófagos, monocitos, fibroblastos, hepatocitos, neuronas y células endoteliales. Se ha descrito que IL-1, TNF y LPS estimulan su síntesis. Sus funciones son diversas; diferenciación de células B a plasmáticas, activación de células T, activación de la cascada del complemento y parece que puede estimular y diferenciar a los precursores de los osteoclastos. Se han detectado altos niveles en el FGC, y en sangre en infecciones virales y bacterianas, neoplasias, traumas, enfermedades crónicas inflamatorias y situaciones de estrés [26-29]. Se ha determinado que esta citocina es un indicador de pérdida incipiente de inserción y de actividad de la enfermedad [28].

Interleucina 4

La IL-4 es sintetizada principalmente por linfocitos T CD4+ del subgrupo Th2 y mastocitos activados. Su principal función es polarizar la respuesta inmune a Th2, también induce la proliferación de linfocitos B y su maduración a células

plasmáticas, aumenta la expresión del MHC 2, estimula la síntesis de IgE. Regula junto con IL-10 respuestas inflamatorias excesivas de TNF- α [26-29].

Interferón γ

El IFN- γ tiene como células productoras a las células T, B y NK. Tiene como función actividades proinflamatorias e inmunomoduladoras y actúa en conjunto con IFN- α e IFN- β en actividades antivíricas y antiparasitarias. Se le ha catalogado como un potente activador de macrófagos. Específicamente, inhibe la proliferación de células sintetizadoras de algunas interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13); disminuye la producción de IgG e IgE en algunos escenarios específicos; aumenta la expresión de varias proteínas de la membrana, como las del MHC de tipo 1 y 2; estimula la producción de IgG e induce la síntesis de TNF- α por monocitos y macrófagos. Además, se ha demostrado que el IFN- γ tiene presencia en el FGC y saliva [11, 26, 27, 30].

Factor de necrosis tumoral α

El TNF- α es sintetizado por macrófagos, aunque algunas células como: monocitos, macrófagos, neutrófilos, células T, B y NK, fibroblastos y queratinocitos lo sintetizan también, después de la estimulación con LPS. Su actividad principal consiste en la citólisis y citoestasis en neoplasias, es el principal mediador del debilitamiento y deterioro orgánico en neoplasias malignas. Se le ha encontrado relacionada a pacientes con periodontitis, y se ha asociado con la reabsorción ósea. Además, se encarga de atraer monocitos y neutrófilos e inducir y regular mediadores inflamatorios, siendo trascendental en infecciones bacterianas. Se ha descrito su sobreproducción como consecuencia de procesos crónicos [26-28].

Factor inhibidor de la migración de macrófagos

MIF fue descubierto hace poco más de medio siglo, es identificado como una molécula parecida a una hormona. Entre sus funciones se encuentran la sobreexpresión de TLR-4 y la activación de macrófagos, de manera que contribuye a la eliminación de microorganismos intracelulares. Se le considera un

importante mediador de la respuesta inmune, especialmente en patologías inflamatorias crónicas. Algunas investigaciones han logrado detectar la presencia de MIF en los tejidos periodontales y en el FGC aunque su participación en la patogénesis de esta enfermedad aun es incierta [31].

Se ha reportado que las concentraciones de MIF aumentan en situaciones de estrés y enfermedades infecciosas e inflamatorias, y se ha descrito su participación como un regulador mayor de la inflamación, pues estimula la liberación de otras citocinas, como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12. También ha sido descrito como un contraregulador de las respuestas antiinflamatorias inducidas por glucocorticoides. Además, ha sido utilizado como un biomarcador en enfermedades inflamatorias e inmunes, como: aterosclerosis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, obesidad y diabetes, incluso se ha relacionado con la regulación del crecimiento de tumores, el control de proliferación celular y la angiogénesis [32-34].

Acción de las citocinas en la enfermedad periodontal

En la EP las citocinas, presentes en el FGC, tienen la función de participar mediando la respuesta inmune del mismo fluido y la destrucción de los tejidos periodontales. Las principales citocinas que suelen identificarse en el FGC son: IL-1, IL-6, IL-8, IL-11 y TNF [11].

En este padecimiento la acción de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-6 al ser proinflamatorias se considera que tienen una acción destructiva sobre los tejidos del periodonto, sobre todo cuando sus niveles son elevados en procesos patológicos. Mientras que el aumento de citocinas antiinflamatorias como el caso de IL-10 serían beneficiosas para la salud de estos tejidos [15].

JUSTIFICACIÓN

La EP comparte algunas características patogénicas, como el incremento de la actividad osteoclástica, con la artritis reumatoide, patología en la cual, se ha demostrado que MIF logra mediar la inflamación y la pérdida de hueso. Sin embargo, la participación de MIF en el contexto de la EP aún es desconocida [35].

Debido a que no existen trabajos que describan la importancia de MIF durante el desarrollo de la EP y su participación en la producción de citocinas como IL-6, IL-4, IFN- γ y TNF- α , en este trabajo proponemos cuantificar la expresión local de estas citocinas al final de la gestación en un modelo murino de periodontitis experimental en ratones BALB/c WT y *Mif*^{-/-}.

Este trabajo podrá ser abordado en futuros estudios, con el fin de obtener información básica sobre la influencia de MIF en la expresión local de IL-6, IL-4, IFN- γ , TNF- α , durante el proceso inflamatorio y su participación en la degradación de los tejidos durante la periodontitis en mujeres gestantes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EP es un problema de salud que afecta a la mayoría de la población mundial y un grupo que se considera vulnerable ante esta patología son las mujeres gestantes, cuyo estado fisiológico se ha relacionado con el inicio o agravamiento de la enfermedad. Por otro lado, dado que la destrucción tisular en la EP es causada por la respuesta inmune del hospedero ante los factores de patogenicidad de los microorganismos que constituyen el biofilm y esta respuesta es mediada principalmente por citocinas, es de gran relevancia conocer la influencia de estas en la destrucción de los tejidos.

PREGUNTA EXPERIMENTAL

¿Influye MIF en la expresión relativa de las citocinas IL-6, IL-4, TNF- α e IFN- γ en un modelo de periodontitis experimental al final de la gestación?

HIPÓTESIS

La expresión relativa de *il-6*, *il-4*, *ifn- γ* y *tnf- α* en el tejido periodontal sí se modificará, a causa de la ausencia de MIF, durante la EP y al final de la gestación en un modelo murino.

OBJETIVOS

Objetivo General: Cuantificar la expresión relativa de *il-6*, *il-4*, *ifn- γ* , *tnf- α* y *mif* en tejido periodontal en ratones hembra gestantes WT y *Mif-/-* de fondo genético BALB/c al final de la gestación para establecer relación entre la expresión relativa y la severidad de la periodontitis clínica.

Objetivos Particulares:

1. Desarrollar el modelo de periodontitis experimental con ligadura de Nylon 6-0 en grupos de ratones hembra gestantes WT y *Mif-/-* de fondo genético BALB/c.
2. Identificar la severidad clínica de la periodontitis experimental entre los grupos de ratones hembra gestantes WT y *Mif-/-*.
3. Establecer relaciones entre la severidad de la periodontitis clínica y la cuantificación de la expresión relativa de *il-6*, *il-4*, *ifn- γ* , *tnf- α* y *mif* con la condición de gestación en ratones hembra gestantes WT y *Mif-/-*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Se utilizaron ratones hembra de 8–10 semanas de edad de la cepa BALB/c (Bioterio FES-I) (Figura 8), 12 ratones WT y 12 ratones *Mif*^{-/-}. Mantenidos en grupos de 4 animales por jaula, provistos de agua y alimento balanceado *ad libitum*. El trabajo con animales de experimentación se llevó a cabo en el laboratorio 5 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) siguiendo un cronograma de actividades (Figura 9). Todos los experimentos del proyecto que incluyeron animales de experimentación fueron realizados bajo estricto cumplimiento de las normas enunciadas en el “Marco Ético de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de Laboratorio” en apego a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. El manejo de Residuos Peligrosos Biológicos – Infecciosos se realizó en apego a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-2002. Este proyecto es para la obtención del título de Cirujano Dentista, y está basado en la continuación del proyecto de Doctorado realizado por la M. en C. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez, el cual cuenta con la aprobación por la comisión de ética de FES-Iztacala No. CE/FESI/062017/1182 y por la Comisión de Bioseguridad de la FES-Iztacala en agosto de 2017.



Figura 8. Ratones *Mus musculus* de la cepa BALB/c

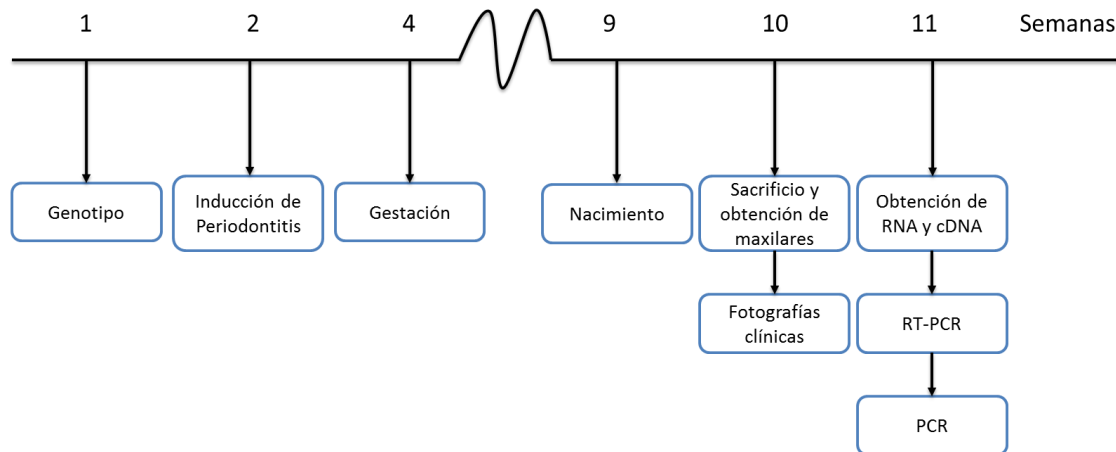


Figura 9. Cronograma

Obtención de genotipo de los ratones: Para verificar que los ratones utilizados en los experimentos sean silvestres (WT) o genéticamente deficientes para MIF (*Mif*^{-/-}). Se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las secuencias de oligonucleótidos correspondientes a MIF:

1. Cortar aproximadamente 0.5 cm. de la cola del ratón.
2. Colocar la cola cortada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, con 500 µL de buffer de lisis y 20 µL de proteinasa K (pK), dar un ligero vórtex e incubar en el termociclador a 56°C durante toda la noche.
3. Centrifugar los tubos con el residuo de las colas con pK-buffer de lisis a 14,000 rpm durante 10 minutos.
4. Agregar el sobrenadante en tubos de 1.5 ml con 500 µL de Isopropanol frío. Invertir los tubos lentamente de 10 a 20 veces para formar el precipitado.
5. Centrifugar los tubos a 14,000 rpm durante 10 minutos.
6. Retirar el sobrenadante.
7. Agregar 500 µL de etanol al 75%. Resuspender con un giro de vórtex ligero.

8. Centrifugar por 5 minutos a 14,000 rpm. Remover el sobrenadante (esperar durante mínimo 1 hora para asegurarse de que el etanol se evapore completamente).
9. Resuspender con 200 µL de H₂O MQ.
10. Incubar a 55°C hasta que el DNA se disuelva.
11. Realizar PCR con la siguiente reacción por cada muestra (Kit Taq DNA polymerase, thermoscientific):

• Buffer	2.5 µL
• dNTP's	0.6 µL
• MgCl	1.3 µL
• Primer Forward <i>Neo</i>	1 µL
• Primer Reverse <i>Neo</i>	1 µL
• Primer Forward <i>Mif</i>	1 µL
• Primer Reverse <i>Mif</i>	1 µL
• H ₂ O	15.1 µL
• Taq	0.5 µL
• DNA	1 µL
12. Colocar en el termociclador con el programa de PCR que corresponde al genotipo de *Mif/Neo*.

El gen *Mif* es reconocido al utilizar los siguientes oligonucleótidos específicos:

- *Mif*-Forward 5'-AGACCACGTGCTTAGCTGAG-3'
- *Mif*-Reverse 5'-GCATCGCTACCGGTGGATAA-3'

La amplificación es de un producto de 200 pb.

Mientras que para el casete de neomicina los oligonucleótidos específicos son:

- *Neo*-Forward 5'-ATTGAACAAGATGGATTGCAC-3'
- *Neo*-Reverse 5'-ATACTTTCTCGGCAGGAGCA-3'

Y la amplificación es de un producto de 500 pb.

13. Preparar gel de agarosa a 1.5%.

- 40 ml de TBE
- 0.60 g de agarosa
- 5.3 μ L de bromuro de Etidio

Agregar la agarosa al TBE, calentar en el horno de microondas por 30 segundos, agitar para disolver la agarosa, agregar el bromuro de etidio (In vitrogen), agitar para integrar y antes de que comience a polimerizar verter sobre el molde con el peine.

14. Una vez terminado el ciclo en el termociclador, colocar Blue Juke (In vitrogen) (6 μ L) a todas las muestras.

15. Cargar las muestras y el marcador de peso molecular en el gel de agarosa con bromuro de etidio.

16. Realizar electroforesis, durante 45 minutos.

17. Leer en el fotodocumentador (BioRad) con la bandeja para geles con bromuro de etidio.

Anestesia de ratones: Los ratones se anestesian con xilacina (relajante muscular) y ketamina (anestésico), en una dilución 1:10. Las dosis específicas para cada ratón se calculan con respecto al peso (Figura 10). El objetivo de anestesiar a los ratones es poder colocarles la ligadura. El efecto anestésico se mantiene aproximadamente 30 minutos.

$$Xi = \frac{(\text{Peso del ratón (90 } \mu\text{L)})}{20 \text{ gr}} \quad Ke = Xi(2)$$

Figura 10. Fórmulas de las dosis de Xilacina y Ketamina

Inducción de periodontitis: Se colocaron ligaduras de sutura Nylon 6-0 (Ethicon) alrededor del segundo molar superior derecho en 6 ratones de cada grupo, con apoyo de lentes con aumento, bajo anestesia con xilacina y ketamina, se esperó durante 2 semanas para que se estableciera la periodontitis, las ligaduras se verificaron cada semana. Una vez establecido el modelo de periodontitis experimental fueron seleccionadas 3 hembras con EP establecida por dos semanas (PE), y otras 3 para ser apareadas con los machos, con la finalidad de que quedaran preñadas (verificación del tapón positivo) (PAG). Como controles se utilizaron hembras solo gestantes (G) y hembras sanas (CTL) tanto para WT como *Mif*^{-/-} (Figura 11).

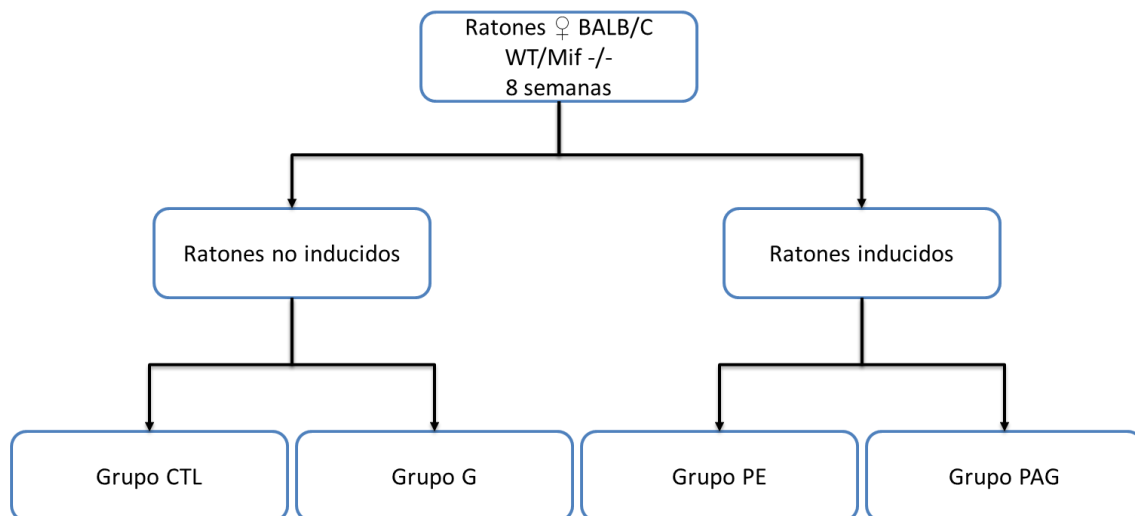


Figura 11. Organización de los grupos. n=3

El fundamento para la inducción de periodontitis mediante esta técnica es que la ligadura provoca mayor acumulación de biofilm provocando una periodontitis crónica localizada (Figura 12). A pesar de que existen otros modelos de inducción de periodontitis, este fue elegido porque tiene como ventajas: el establecimiento rápido de la periodontitis (días), la elección del momento de inicio del proceso de enfermedad, de la eliminación de la ligadura y poder verificar su estado en el momento deseado [36].

Para poder unificar el tiempo entre los grupos con periodontitis, gestantes y no gestantes. Los grupos con periodontitis, con o sin gestación, así como el grupo sin

periodontitis gestante, fueron sacrificados después de 9 semanas, considerando el tiempo a partir de la colocación de la ligadura. Los ratones control fueron sacrificados en los mismos tiempos que los grupos experimentales.



Figura 12. Inducción de periodontitis. a) Ratón anestesiado y en posición para colocarle ligadura. b) Proceso de colocación de ligadura con ayuda de lentes con aumento. c) Ligadura finalizada rodeando el segundo molar superior derecho del ratón

Sacrificio y obtención de maxilares: Los ratones fueron sacrificados para la obtención de sus maxilares. Se obtuvo la mitad derecha debido a que en esta se colocó la ligadura. Posterior a la obtención del tejido, se maceró con ayuda de nitrógeno líquido en mortero, el contenido se colocó en un tubo Eppendorf con 200 μ l de Trizol (Figura 13).

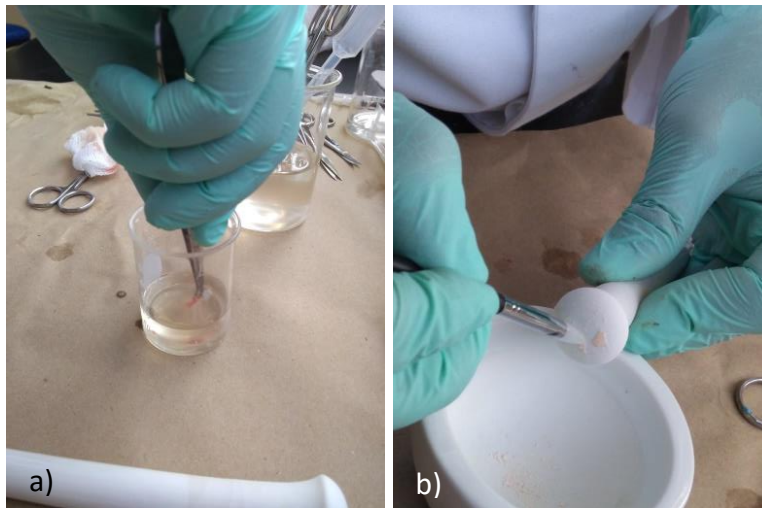


Figura 13. Obtención y macerado del maxilar. a) Lavado del maxilar en PBS. b) Obtención del maxilar macerado

RT-PCR: Las maxilas fueron procesadas para realizar RT-PCR y extraer mRNA, del cual posteriormente se obtuvo cDNA (Figura 14):

– Extracción de RNA

1. Agregar 40 μ L de cloroformo grado molecular al tejido que se encontraba en un tubo con 200 μ L de trizol y mezclar en el vórtex.
2. Incubar a temperatura ambiente 10 minutos.
3. Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
4. Después de centrifugar quedan tres fases. Tomar solamente el sobrenadante, colocar en un tubo Eppendorf nuevo, agregar 50 μ L de isopropanol frío y mezclar en el vórtex de forma ligera.
5. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

6. Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 7. Tirar el sobrenadante y resuspender con 500 μ L de etanol al 70%, mezclar en el vórtex de forma ligera.
 8. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C.
 9. Secar el botón a temperatura ambiente al menos por 1 hora. Ya seco resuspender con 20 μ L de H₂O DEPC.
 10. Cuantificar en espectrofotómetro a 260 nm.
- Obtención de cDNA a partir de RNA
1. Tomar los μ L resultantes de las muestras en los tubos para PCR y ajustar a 2000 ng de RNA.
 2. Agregar 1 μ L de dNTP's y 1 μ L de OligoDT y aforar a 10 μ L con H₂O.
 3. Colocar en el termociclador con el programa de RT-PCR.
 - a. 65°C por 5 minutos. Durante este tiempo se prepara la siguiente solución:
 - 2 μ L de Buffer RT
 - 4 μ L de MgCl
 - 2 μ L de DTT
 - 1 μ L de RNA OUT
 - b. 4°C por 1 minuto. Durante este tiempo agregar la solución preparada a la muestra.
 - c. 42°C por 2 minutos.
 - d. 4°C por 1 minuto. Durante este tiempo agregar 0.5 μ L de SSIIRT.
 - e. 42°C por 50 minutos.

• MgCl	1.3 µL	*Los primers a utilizar corresponden a la secuencia del gen que se quiere cuantificar en cada reacción.
• Primer Forward*	1 µL	
• Primer Reverse*	1 µL	
• H ₂ O	16.1 µL	
• Taq	0.5 µL	
• cDNA	2 µL	

- Colocar en el termociclador con el programa de PCR que corresponde a los gradientes de temperatura de amplificación de los genes (Tabla 1).
- Preparar gel de agarosa a 1.5%.
- Cuando el termociclador ha terminado, colocar Blue Juke (6 µL) a todas las muestras.
- Cargar las muestras y el marcador de peso molecular en el gel de agarosa con bromuro de etidio.
- Realizar electroforesis durante 45 minutos.
- Leer en el fotodocumentador y realizar la cuantificación con el programa Biorad Image Lab.

GEN	5'PRIMER	3'PRIMER	TEMP.	PRODUCTO
<i>gapdh</i>	CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC	CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	54	201 pb
<i>ifn-γ</i>	AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG	GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG	57	247 pb
<i>il-4</i>	CGA AGA ACA CCA CAG AGA GTG AGC T	GAC TCA TTC ATG GTG CAG CTT ATC G	58	181 pb
<i>tnf-α</i>	GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C	ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G	59	300 pb
<i>mif</i>	GGA CCG GGT CTA CAT CAA CT	CTC AAA GAA CAG CGG TGC AG	60	110 pb
<i>il-6</i>	GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA	60	141 pb

Tabla 1. Tabla de los diferentes genes con sus oligonucleótidos específicos, temperatura de alineación y producto de pares de bases correspondientes

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía (Test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn) para comparar entre los grupos con mismo fondo genético y distinto tratamiento y una prueba U de Mann-Whitney para establecer las comparaciones entre los grupos WT y *Mif*^{-/-} con el mismo tratamiento con ayuda del software GraphPad Prism 7 utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95% ($p \leq 0.05$).

Se utilizaron estas pruebas estadísticas no paramétricas a causa de que se requería comparar más de dos grupos, el tamaño de las muestras era pequeño y los datos no mostraban una distribución normal.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Fondo Genético

El fondo genético de los ratones *Mif*^{-/-} fue confirmado, a través del genotipo por PCR, los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostraron la expresión de una banda correspondiente a los 500 pb, peso molecular propio del casete de Neomicina y la ausencia de una banda a las 200pb que corresponde a MIF (Figura 15).

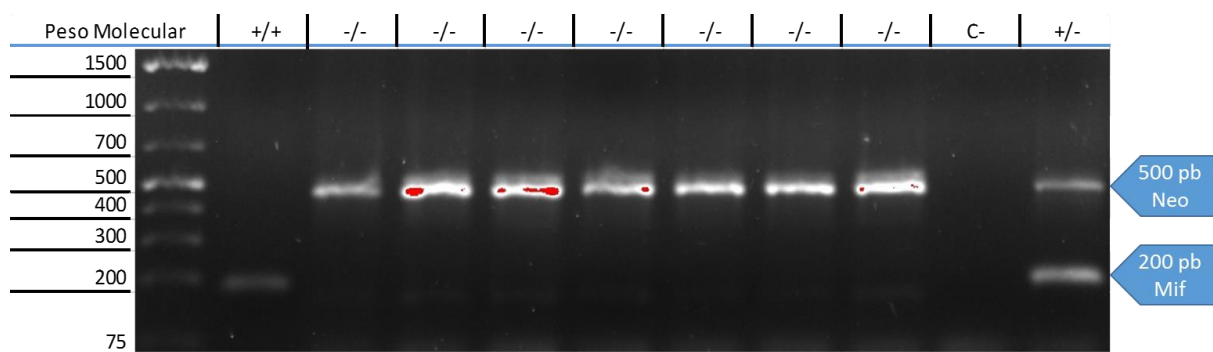


Figura 15. Genotipo para confirmar ratones *Mif*^{-/-}

Establecimiento del modelo de periodontitis experimental y su severidad clínica

Se estableció el modelo de periodontitis experimental con sutura de nylon 6-0 en ratones hembra. A los cuales se les realizaron revisiones semanales para comprobar que se mantuvieran en su lugar.

Se identificó la severidad clínica de la periodontitis experimental con ayuda de fotografía macroscópica confirmando que existe mayor destrucción tisular en los grupos con fondo genético WT. En las fotografías pudimos observar que en los ratones WT en la encía que rodea el segundo molar derecho existe una recesión gingival evidente (Figuras 16 y 17).



Figura 16. Fotografía macroscópica de los grupos PE WT y PE *Mif*^{-/-}



Figura 17. Fotografía macroscópica de los grupos PAG WT y PAG *Mif*^{-/-}

Cuantificación de la expresión de citocinas

Una vez terminado el modelo de periodontitis experimental se obtuvieron los maxilares de los ratones a la semana posparto, de estos, la mitad derecha se procesó para extraer mediante RT-PCR el mRNA y posteriormente cDNA. Más adelante, se realizó mediante PCR la amplificación de las secuencias específicas para cada citocina (*il-4*, *il-6*, *tnf- α* , *ifn- γ* , *mif* y *gapdh*) (Tabla 2). Posteriormente, las imágenes fueron analizadas con el programa Image Lab (BioRad) normalizado con *gapdh* obteniendo así la Unidad Relativa de Fluorescencia (URF) para cada una de las citocinas.

	WT				<i>Mif</i> ^{-/-}			
	CTL	G	PE	PAG	CTL	G	PE	PAG
<i>gapdh</i>								
<i>tnf-α</i>								
<i>ifn-γ</i>								
<i>il-6</i>								
<i>il-4</i>								
<i>mif</i>								

Tabla 2. Panel representativo de la fluorescencia de las diferentes citocinas

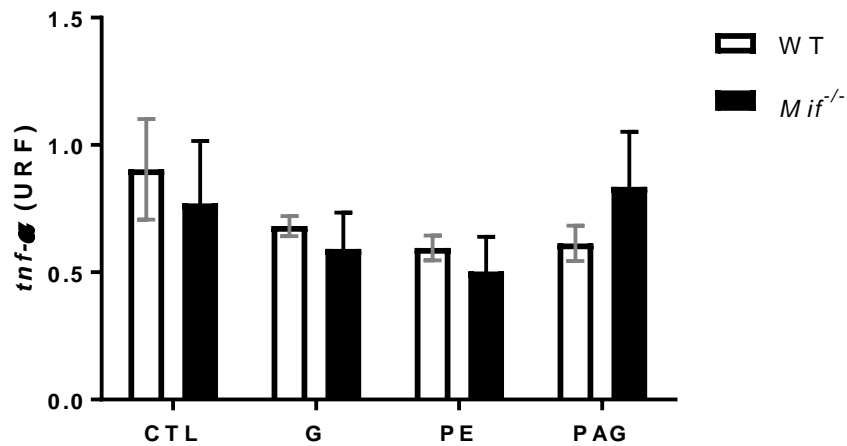


Figura 18. Gráfica de la expresión relativa de *tnf-α*

Los transcritos para *tnf-α* fueron muy similares entre el grupo CTL, G, PE y PAG, pues no mostraron diferencia estadística, de igual manera no hubo diferencias entre los grupos WT y *Mif*^{-/-} (Figura 18).

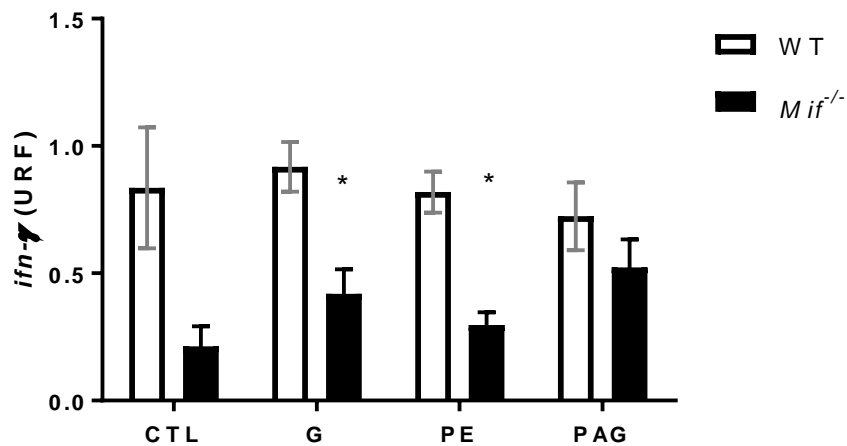


Figura 19. Gráfica de la expresión relativa de *ifn-γ*

Por otra parte, en lo que respecta a los resultados que corresponden a *ifn-γ* se encontraron diferencias significativas en los grupos G y PE entre los ratones WT y *Mif*^{-/-}. Aunque entre los ratones WT no se observaron diferencias entre los grupos. La disminución observada en los ratones *Mif*^{-/-} comparados con los WT sugiere

que en estos últimos, en general existe una mayor producción y atracción a los tejidos periodontales de IFN- γ . A pesar de no mostrar diferencias estadísticas, existe un ligero aumento de la expresión relativa en los ratones *Mif*^{-/-} de los grupos G y PAG en comparación con los no gestantes (Figura 19).

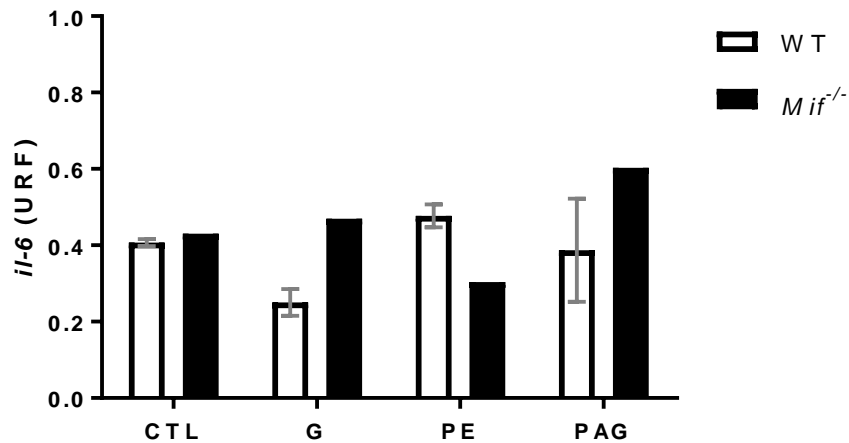


Figura 20. Gráfica de la expresión relativa de *il-6*

Para el caso de *il-6* no se registraron diferencias, aunque se pueden observar la tendencia en el caso de los ratones *Mif*^{-/-} de aumentar la expresión de IL-6 en los grupos G y PAG, mientras que en los ratones WT del grupo G disminuye (Figura 20).

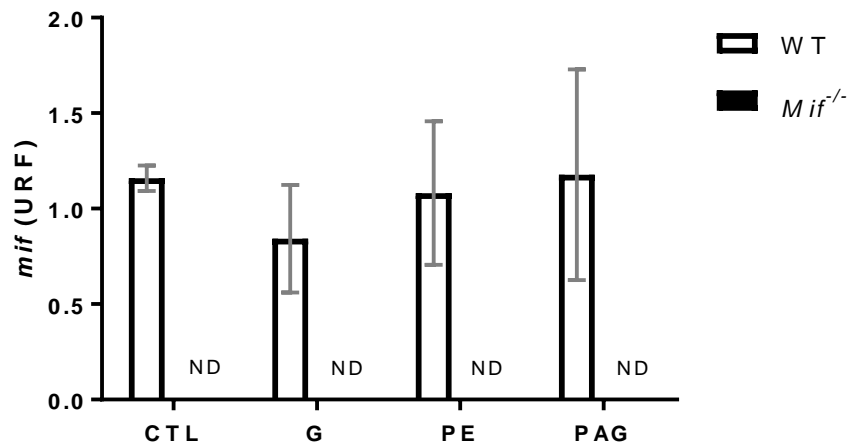


Figura 21. Gráfica de la expresión relativa de *mif*. ND: No hay datos

La cuantificación de la expresión relativa de *mif* en los ratones WT no mostró diferencias significativas, sin embargo, se puede observar una sutil disminución en el grupo G en comparación con los demás (Figura 21).

El transcrito de *il-4* no pudo ser amplificado en ninguno de los grupos.

DISCUSIÓN

La EP es un problema de salud grave en el mundo debido a su alta prevalencia [1]. Tomando en cuenta que es un padecimiento inducido por diferentes factores, tanto sistémicos como locales [3]. Es esencial diseñar planes de prevención y tratamiento integrales, que no sólo funcionen como paliativo de los síntomas, sino que además combatan los agentes causales de la enfermedad. Sin embargo, en el caso de la EP aún no se han descubierto progresos en este rubro, por lo cual en este trabajo pretendimos escalar los conocimientos sobre el papel de MIF en la respuesta inflamatoria de la EP, con ayuda de un modelo murino de periodontitis inducida por ligadura, tanto en ratones hembra gestantes como no gestantes.

Herane, Rotemberg y Nápoles han evidenciado que la EP tiene una mayor incidencia en mujeres que se encuentran en edad reproductiva [3, 15, 20]. Aunado a esto, también, se ha estudiado el efecto de las hormonas sexuales femeninas en la historia natural de la enfermedad y hay estudios que demuestran que estas promueven el inicio o agravamiento de la misma [21, 23].

Por otro lado, diversos autores se han interesado en describir el papel de diversas citocinas en la EP [27, 28, 31], acreditando su papel en el inicio y avance de la enfermedad.

En el caso de *tnf- α* la expresión relativa en ambos grupos, WT y *Mif*^{-/-}, es similar sin llegar a mostrar significancia estadística. Como refieren Abbas y Varella esta citocina es principalmente producida por macrófagos, por lo que podría considerarse que MIF no es el principal promotor de secreción, durante procesos inflamatorios crónicos como el caso de la EP en cuestión o incluso el estudiar algún otro tipo celular que pudiera estar promoviendo su producción en ausencia de MIF.

Se puede observar cómo en ausencia de MIF la expresión relativa de *ifn- γ* es menor que en el grupo WT mostrando diferencias significativas solo en los grupos G y PE, correspondiendo a lo mencionado por Ortiz-García [34] quien atribuye que la presencia de MIF estimula la liberación de IFN- γ . Isaza-Guzmán y Rotemberg

[15, 30] han descrito a IFN- γ como una citocina proinflamatoria, característica que se relaciona con la destrucción tisular, lo que tiene sentido al ver que los ratones deficientes de MIF sufrieron una menor destrucción tisular que los WT como consecuencia de una respuesta inflamatoria menor.

Continuando con IL-6, los resultados no mostraron significancia estadística alguna, sin embargo, debe considerarse el hecho de que en los grupos *Mif*^{-/-} G y PAG, su expresión relativa aumenta, lo que hace sentido si se considera que Carrillo [28] menciona la presencia de IL-6 como un indicador de actividad de la enfermedad y pérdida de inserción, correspondiendo a su vez con los estudios Figuero-Ruiz y Rodríguez [21, 23] que mencionan a la gestación como un factor de riesgo de presencia y agravamiento de la EP.

La citocina MIF en los ratones WT no mostró diferencias estadísticas en ninguno de los grupos, no obstante, se puede apreciar una ligera disminución en el grupo G, misma que coincide con la disminución de la expresión de *il-6* en el mismo grupo, resultado que armoniza con lo hallado por Ortiz-García quien destaca a MIF como un estimulador de la liberación de IL-6 [34].

Para la citocina IL-4 no se obtuvieron transcritos en el presente trabajo, resultado que es fundado, considerando lo que se ha descrito por Carrillo [28], quien menciona que esta citocina se presenta para regular las respuestas inflamatorias exacerbadas de TNF- α , las cuales durante este estudio no se presentaron.

Finalmente, en este trabajo se logró demostrar parte de la participación de MIF durante el desarrollo de la EP y su papel en la secreción de citocinas como IFN- γ e IL-6. Siendo IFN- γ la citocina que mostró una relación directa con la presencia de MIF, ya que los ratones *Mif*^{-/-} registraron valores menores de esta citocina. Sin embargo, es necesario realizar más estudios enfocados en describir la participación de MIF en la respuesta inmunológica durante la EP.

CONCLUSIONES

Se logró establecer el modelo de periodontitis experimental.

Se observó que clínicamente existe una menor destrucción tisular en los ratones deficientes de MIF en comparación con los WT, probablemente porque tiene una influencia importante en la inducción del IFN- γ durante la EP.

La presencia de IFN- γ fue mayor en los grupos WT que en los *Mif*^{-/-}, probablemente debido a que MIF estimula la liberación de IFN- γ y que la destrucción tisular en los *Mif*^{-/-} fue menor, mostrando significancias solo los grupos G y PE.

La expresión relativa de *tnf- α* no mostró significancia estadística considerando que MIF puede no ser el principal promotor de la liberación de esta citocina.

Aunque estadísticamente la citocina IL-6 no mostró diferencias, se puede observar una tendencia al aumento en los grupos con gestación, probablemente debido a que se considera a la IL-6 como indicador de EP.

Estadísticamente MIF no presentó diferencias, sin embargo, en el grupo G su expresión disminuyó, coincidiendo con la disminución de expresión de *il-6* en el mismo grupo.

La citocina IL-4 no pudo ser amplificada en ninguno de los casos, debido a que suele presentarse en respuestas inflamatorias exacerbadas de TNF- α , las cuales no se presentaron en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Daalderop, L., et al., *Periodontal disease and pregnancy outcomes: overview of systematic reviews*. JDR Clinical & Translational Research, 2018. **3**(1): p. 10-27.
2. Escudero-Castaño, N., M. Perea-García, and A. Bascones-Martínez, *Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica*. Avances en Periodoncia e Implantología Oral, 2008. **20**(1): p. 27-37.
3. Herane, B.M.D.L.Á., C.C. Godoy, and C.P. Herane, *Enfermedad periodontal y embarazo. Revisión de la literatura*. Revista Médica Clínica Las Condes, 2014. **25**(6): p. 936-943.
4. Webb, D.A., L. Mathew, and J.F. Culhane, *Lessons learned from the Philadelphia Collaborative Preterm Prevention Project: the prevalence of risk factors and program participation rates among women in the intervention group*. BMC pregnancy and childbirth, 2014. **14**(1): p. 368.
5. Page, R.C. and K.S. Kornman, *The pathogenesis of human periodontitis: an introduction*. Periodontology 2000, 1997. **14**(1): p. 9-11.
6. Govindasamy, R., et al., *Knowledge, awareness, and practice among gynecologists, medical practitioners and dentists in Madurai regarding association between periodontitis and pregnancy outcomes*. Journal of Indian Society of Periodontology, 2018. **22**(5): p. 447.
7. Lindhe, J., T. Karring, and N.P. Lang, *Periodontología clínica e implantología odontológica/Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Vol. 1. 2009: Ed. Médica Panamericana.
8. Newman, M.G. and H.H. Takei, *CARRANZA. Periodontología clínica*. 2004.
9. Nanci, A., *Ten Cate's Oral Histology. Development, Structure, and Function*. Mosby Elsevier, 2008.
10. Botero, J.E., *Respuesta inmune en las enfermedades del periodonto: desde salud hasta enfermedad y sus implicaciones terapéuticas*. Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia, 2009. **21**(1).
11. Castro, C.E., M.A. Koss, and M.E. López, *Marcadores bioquímicos de la enfermedad periodontal*. Med Oral, 2003. **8**: p. 322-328.
12. Chapple, I.L., et al., *Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. Journal of clinical periodontology, 2018. **45**: p. S68-S77.
13. Silva, N., et al., *Host response mechanisms in periodontal diseases*. Journal of Applied Oral Science, 2015. **23**(3): p. 329-355.
14. Kinane, D.F., P.G. Stathopoulou, and P.N. Papapanou, *Periodontal diseases*. Nature Reviews Disease Primers, 2017. **3**: p. 17038.
15. Rotemberg Wilf, E. and K. Smaisik Frydman, *Manifestaciones periodontales de los estados fisiológicos de la mujer*. Odontostomatología, 2009. **11**(13): p. 16-26.
16. Botero, J. and E. Bedoya, *Determinantes del diagnóstico periodontal*. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral, 2010. **3**(2): p. 94-99.
17. Wolf, H.F. and T.M. Hassell, *Atlas a color de periodontología*. 2009: AMOLCA.
18. Papapanou, P.N., et al., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. Journal of periodontology, 2018. **89**: p. S173-S182.
19. Alvear, F.E., M.E. Vélez, and L. Botero, *Factores de riesgo para las enfermedades periodontales*. Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia, 2010. **22**(1).

20. Nápoles García, D., et al., *Estado de salud periodontal en embarazadas*. MEDISAN, 2012. **16**(3): p. 333-340.
21. Rodríguez Chala, H.E. and M. López Santana, *El embarazo: Su relación con la salud bucal*. Revista cubana de estomatología, 2003. **40**: p. 0-0.
22. Lacalzada-Pastor, M., et al., *Estado periodontal y de la mucosa oral en un grupo de embarazadas: Estudio clínico*. Avances en Periodoncia e Implantología Oral, 2011. **23**(2): p. 123-128.
23. Figuero-Ruiz, E., I. Prieto Prieto, and A. Bascones-Martínez, *Cambios hormonales asociados al embarazo: Afectación gingivo-periodontal*. Avances en Periodoncia e Implantología Oral, 2006. **18**(2): p. 101-113.
24. Peña Sisto, M., et al., *La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas*. Revista cubana de estomatología, 2008. **45**(1): p. 0-0.
25. Mendoza, A.Y.A. and M.C.S. Carmona, *Inmunología e inmunopatología oral*. 2009: El Manual Moderno.
26. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Inmunología celular y molecular+ StudentConsult*. 8th ed. 2015: Elsevier Health Sciences Spain.
27. Varella, P.P. and W.C.N. Forte, *Citocinas: revisão*. Revista Brasileira de alergia e imunopatología, 2001. **24**(4): p. 146-154.
28. Carrillo de Albornoz Sainz, A., A. García Kass, and A. Bascones Martínez, *Papel de la IL-6 y TNF-alfa en la enfermedad periodontal*. Avances en Periodoncia e Implantología Oral, 2006. **18**(2): p. 83-89.
29. Romero, L.P., M. del Carmen Jiménez, and M.E.G. Alvarez, *Inmunología molecular, celular y traslacional*. 2016: Wolters Kluwer.
30. Isaza-Guzmán, D., et al., *Association study between salivary levels of interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-17, IL-21, and IL-22 with chronic periodontitis*. Archives of oral biology, 2015. **60**(1): p. 91-99.
31. Li, X., et al., *Expression profile of macrophage migration-inhibitory factor in human gingiva and reconstituted human gingival epithelia stimulated by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide*. Journal of periodontal research, 2013. **48**(4): p. 527-532.
32. Xu, L., et al., *Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors*. Drug discovery today, 2013. **18**(11-12): p. 592-600.
33. Nonnenmacher, C., et al., *Effect of age on gingival crevicular fluid concentrations of MIF and PGE2*. Journal of dental research, 2009. **88**(7): p. 639-643.
34. Ortiz-García, Y.M., et al., *Factor inhibidor de la migración de macrófagos en la enfermedad periodontal*. Revista Mexicana de Periodontología, 2018. **9**(1-2): p. 14-19.
35. Madeira, M.F.M., et al., *MIF induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice*. Microbes and infection, 2012. **14**(2): p. 198-206.
36. Abe, T. and G. Hajishengallis, *Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice*. J Immunol Methods, 2013. **394**(1-2): p. 49-54.
37. Bartlett, J.M. and D. Stirling, *A short history of the polymerase chain reaction*, in *PCR protocols*. 2003, Springer. p. 3-6.



Los Reyes Iztacala a 19/06/2017

Oficio: **CE/FESI/062017/1182**

M. EN C. ORTIZ SANCHEZ BETSAIDA JULIETA

Presente:

En atención a su solicitud de aval, por la Comisión de Ética de esta facultad, para su proyecto denominado **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE MIF EN PERIODONTITIS EXPERIMENTAL, PREVIO Y DURANTE LA GESTACIÓN EN UN MODELO MURINO**, que va a someter a **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, PAPCA 2017**.

Esta comisión acordó la siguiente opinión técnica:

Avalado sin recomendaciones

Sin otro particular por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración y aprovechamos la oportunidad para enviarle un atento saludo y nuestro respeto académico.

Atentamente

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido
Presidente





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Comisión de Bioseguridad



M. EN C. ORTIZ SANCHEZ BETSAIDA JULIETA
PRESENTE

Por este medio informo a Usted que su proyecto:

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE MIF EN PERIODONTITIS EXPERIMENTAL, PREVIO Y DURANTE LA GESTACIÓN EN UN MODELO MURINO

que será sometido a la convocatoria: PAPCA.

Cumple con los requisitos establecidos por las leyes y normas en materia de Bioseguridad, razón por la cual se avala para su desarrollo.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

Los Reyes Iztacala, a los 8 días del mes de agosto del 2017

Biol. MUÑOZ LOPEZ JOSE LUIS
Presidente

