



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“Perfil de Citocinas en Periodontitis Experimental durante la
Gestación en un Modelo Murino”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

Miguel Alejandro Anaya Ortega

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

Dictaminadores: Dra. **Miriam Rodríguez Sosa**

Dra. **Cynthia Georgina Trejo Iriarte**

Los Reyes Iztacala, Edo de México, Noviembre 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de la presente tesis de investigación, se contó con una parte del apoyo del proyecto:

Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Asuntos del Personal Académico en su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica **(PAPIIT), proyecto IN212215.**

Agradezco la asesoría brindada a lo largo del desarrollo de la presente tesis de licenciatura a mi comité tutor:

Mtra. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez.

Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte.

Mtra. Imelda Juárez Avelar.

Mtra. Rosario Morales de la Luz.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a mis padres, Miguel y Blanca, que me han apoyado durante todo este recorrido a lo largo de mi carrera, gracias por toda su colaboración, comprensión, paciencia y guía, sin ustedes no habría sido posible, los quiero.

Brian, hermano, gracias por acompañarme en este tiempo y suerte ahora que tú también te adentraste en esta aventura.

Mtra. Betsaida, gracias por apoyarme en estos años que hemos trabajado juntos, gracias por la ayuda y la paciencia tanto en el servicio social como en el desarrollo de esta tesis (Al fin está terminada!).

Dra Miriam, gracias por su orientación en este proyecto, gracias por hacerlo posible.

Mtra. Imelda, gracias por toda tu ayuda en el laboratorio, sin ti no habría aprendido de manera tan sencilla todas las cosas del laboratorio con las que no estaba familiarizado.

Salvador, gracias por tu amistad, sin tu apoyo todo este proceso habría sido muy distinto (y menos entretenido).

Victor, Tona y Thali, gracias por su apoyo con toda la parte creativa, ha sido un gran gusto encontrarme con ustedes y además brindarme su amistad.

Enrique, Dan, Alexia, Oscar, Octavio y todos los integrantes del laboratorio 5, gracias por su compañía, consejos y sugerencias.

A mis amigos (por no decir hermanos) Mauricio, Samuel, Eduardo, Huriel, Galo, gracias infinitas por todo su apoyo, compañía, consejos y todas experiencias que hemos compartido (y las que aún faltan), comparto este logro con ustedes.

Miguel, Samir, Fernando, gracias por vivir (literalmente) conmigo en la etapa más interesante de este viaje, para mí son como hermanos, los quiero 212.

A todos mis amigos que viven muy al sur, Ignacio, María José, Ale, Kevin, gracias por hacerme sentir en casa aunque estuviera tan lejos.

Juan, Susana, Itzel, Paola, Yadira, Kari, gracias por estar conmigo a lo largo de estos días, sacarme de muchos apuros y brindarme muchos buenos momentos y su amistad a lo largo de estos años, los quiero.

A todos mis abues, tios, familiares y amigos que aunque no mencione directamente siempre han estado ahí, apoyándome y dándome toda su buena energía ¡gracias!.

Índice

Listado de figuras	V
Lista de abreviaturas	VI
Resumen.....	1
1. Introducción	2
1.1. Periodonto.....	2
1.2. Periodontitis	2
1.3. Modelo murino	4
1.4. Periodontitis inducida	4
1.5. Células T y la reacción inmunitaria.....	4
1.6. Citocinas involucradas en la respuesta Th1 y Th2.....	5
1.7. Perfiles inmunológicos y enfermedad periodontal	6
1.8. Gestación.....	7
1.9. Factor de inhibición de migración de macrófagos (MIF)	7
2. Justificación	9
3. Planteamiento del Estudio	9
4. Hipótesis.....	10
5. Objetivos	11
5.1. Objetivo General	11
5.2. Objetivos Particulares	11
6. Consideraciones éticas y legales	12
7. Diseño experimental	12
7.1. Confirmación del genotipo por PCR	12
7.2. Amplificación del gen	14
7.3. Electroforesis.....	14
7.4. Inducción de periodontitis	15
7.5. Obtención de suero sanguíneo	16
7.6. Protocolo ELISA	17
7.7. Sacrificio y obtención de maxilares.....	18
7.8. Análisis estadístico	18
8. Resultados y discusion	19
8.1. Signos clínicos.....	19

8.1.1. Signos clínicos entre los grupos experimentales WT	19
8.1.2. Signos clínicos entre los grupos experimentales Mif-/-	20
8.1.3. Comparación de signos clínicos	21
8.2. Niveles de citocinas	22
8.2.1. Niveles de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en suero, por el metodo de ELISA en ratones WT.	22
8.2.2. Niveles de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en suero, por el metodo de ELISA en ratones Mif -/-	26
8.2.3. Comparativo de citocinas entre WT Y Mif -/-	30
9. Conclusión	34
10. Referencias	36

Listado de figuras

Figura 1. Factores que intervienen en la severidad de la periodontitis.....	3
Figura 2. Linfocitos: A) Th1 y B) Th2. Tomado de la referencia 19 (Abbas, 2015).....	5
Figura 3. Citocinas y enfermedad periodontal. Tomado de la referencia 22 (Silva, 2015).	6
Figura 4. Ratones BALB/c	12
Figura 5. PCR.....	13
Figura 6. Ejemplo de fotografía de un gel de agarosa.....	15
Figura 7. Proceso de colocación de ligadura	16
Figura 8. Proceso de obtención de suero sanguíneo	16
Figura 9. Fotografía representativa de placa de ELISA.....	18
Figura 10. Características clínicas de tejidos periodontales, representativo de periodontitis experimental en WT.....	19
Figura 11. Características clínicas de tejidos periodontales, representativo de periodontitis experimental en Mif -/-.....	20
Figura 12. IL-6	22
Figura 13. TNF- α	23
Figura 14. IFN- γ	24
Figura 15. IL-10.....	25
Figura 16. IL-6 Mif -/-.....	26
Figura 17. TNF- α Mif -/-.....	27
Figura 18. IFN- γ Mif -/-	28
Figura 19. IL-10 Mif -/-.....	29
Figura 20. Comparativo IL-6	30
Figura 21. Comparativo TNF- α	31
Figura 22. Comparativo IFN- γ	32
Figura 23. Comparativo IL-10	33

Lista de abreviaturas

μ l	Microlitro
ANEST	Anestesia
APC	Célula presentadora de antígeno
BSA	Albúmina sérica bovina
CTL	Control
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunológico ligado a enzimas
EP	Enfermedad periodontal
Fig.	Figura
Gest	Gestante
I.M.	intramuscular
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
<i>Mif</i>	Factor de inhibición de la migración de macrófagos (gen)
MIF	Factor de inhibición de la migración de macrófagos (molécula)
mL	mililitro
MPM	Marcador de peso molecular
ng	Nanogramo
NK	Células asesinas naturales (“natural killer”)
nm	Nanómetro
PBS	Solución reguladora de fosfatos

PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PE	Periodontitis experimental
RNA	ácido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
Th	Linfocito T helper
TNF	Factor de necrosis tumoral
WT	Wild Type

Resumen

La periodontitis es una de las infecciones más comunes en el mundo. Afecta a más de 23% de mujeres en edades entre los 23 y los 54 años, y está presente en el 56% de las mujeres gestantes. Esta enfermedad si bien está ligada a bacterias patógenas, se encuentra asociada también a otros factores como la edad, enfermedades sistémicas, predisposición genética y tabaquismo. Además, la predisposición a desarrollar periodontitis también ha sido asociada al aumento de mediadores pro-inflamatorios asociados a la presencia de hormonas sexuales. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es un mediador pro-inflamatorio de la respuesta inmune innata y que actúa como inhibidor de los glucocorticoides. Con la finalidad de establecer la relación que existe entre periodontitis, embarazo y la expresión de MIF desarrollamos un modelo murino de periodontitis por ligadura en ratones hembra WT y knockout para MIF (*Mif*^{-/-}), ambos de fondo genético BALB/c de 8-10 semanas de edad. Establecimos 5 grupos experimentales: 1) sanos no gestantes (control), 2) no gestantes con anestesia (Anest), 3) gestante con ligadura (Gest+Lig), 4) no gestante con ligadura (No Gest+L) y 5) gestante sin ligadura (Gest-L). Se observaron las características clínicas en los diversos grupos experimentales, y se determinaron los niveles de citocinas MIF, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ en suero, durante y después de la gestación. Se observó que los grupos WT con periodontitis tenían maxilares con características de inflamación severa, mientras que los ratones *Mif*^{-/-} presentaron inflamación moderada.

En los ratones WT se observaron aumentos significativos en las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IFN- γ en los grupos con ligadura (Gest +L y No Gest+L) respecto a los controles; en el caso de los ratones *Mif*^{-/-} se observó el aumento significativo de los niveles de IFN- γ en los grupos con ligadura (Gest +L y No Gest+L) respecto a los controles. En el comparativo entre ratones WT y *Mif*^{-/-} se observaron concentraciones similares en ambos grupos, sin embargo, el grupo no gestante con ligadura (No Gest+L) presentó un aumento significativo en IL-6 en los ratones WT, mientras que en los ratones *Mif*^{-/-} presentó un aumento significativo en IFN- γ . Estos resultados sugieren que MIF es una molécula que participa de manera importante en el desarrollo de periodontitis y que la gestación no tiene influencia sobre la producción de MIF.

1. Introducción

1.1. Periodonto

El periodonto se define como el grupo de tejidos que rodean al diente y está compuesto por cemento radicular, ligamento periodontal, hueso alveolar y encía (1). Cada uno de estos tejidos posee una estructura especializada la cual define su función (2-4).

Pöllänen (2003) define a la unión dentogingival como el punto en el cual el diente se une por medio del epitelio de unión a los tejidos gingivales y periodontales, este tipo de epitelio ayuda a prevenir la colonización de bacterias patógenas en tejidos más profundos formando una barrera física y por medio de células del sistema inmune (5).

1.2. Periodontitis

Una de las enfermedades más comunes en este complejo de tejidos es la enfermedad periodontal o periodontitis (3). Esta consiste en un padecimiento crónico inflamatorio que afecta a los tejidos que rodean al diente causando una destrucción del hueso alveolar. Es una de las infecciones más comunes en el mundo (3). Afecta a más de 23% de mujeres en edades entre los 23 y los 54 años, y está presente en el 56% de las mujeres gestantes (6).

Esta enfermedad si bien está ligada a bacterias patógenas, también se encuentra asociada a otros factores. Nanci (2006) menciona la edad, enfermedades sistémicas, predisposición genética y tabaquismo (4) como factores asociados. Así mismo Steffens (2015) atribuye su predisposición al aumento de mediadores pro-inflamatorios asociados a la presencia de hormonas sexuales (7). La susceptibilidad del individuo es un factor de gran importancia para el desarrollo de la enfermedad periodontal (EP) (8).

En general los tejidos periodontales se encuentran sometidos a 2 distintos tipos de factores ambientales:

- 1) Factores mecánicos: existen distintas tensiones durante la masticación, lo cual requiere la constante modulación del cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar.
- 2) Ecosistema bacteriano (8).

A pesar de que la EP inicialmente se desencadena por factores microbianos, el daño a los tejidos del huésped es mediado principalmente por respuestas inmunológicas (9). El progreso de la

enfermedad regularmente es lento, sin embargo puede verse acelerado debido a factores sistémicos, ambientales y conductuales (10, 11) (Figura 1).

La periodontitis afecta tanto al hueso alveolar por medio de reabsorción ósea, como a las fibras del ligamento periodontal, lo cual en conjunto produce una bolsa periodontal (12). En otros casos la pérdida de inserción se encuentra acompañada de recesión gingival, en estos casos la profundidad de las bolsas periodontales es superficial (10).

La periodontitis constituye una infección de los tejidos, en la cual existe un aumento de las citocinas proinflamatorias (13) y puede ser exacerbada por alteraciones vasculares y hormonales (12). Tanto Morimoto (2003) como Eley (2010) reportan que la periodontitis se encuentra caracterizada por la presencia de linfocitos T en fases iniciales, y posteriormente por células plasmáticas (8, 14).

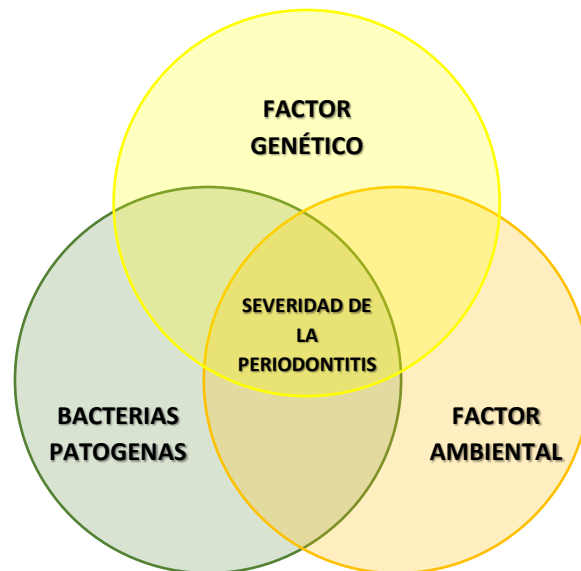


Figura 1. Factores que intervienen en la severidad de la periodontitis. Modificado de la referencia 11 (Mariano, 2010).

Para su diagnóstico clínico se evalúa la presencia de cambios inflamatorios, la presencia de bolsas periodontales por medio de sondaje y la pérdida de inserción clínica. Además de esto se utiliza evidencia radiográfica para evaluar la pérdida ósea (10).

1.3. Modelo murino

El uso de modelos animales ha resultado de gran ayuda para investigar enfermedades periodontales. Esto ha permitido eliminar múltiples variantes que no se pueden controlar en humanos (15); algunos de los modelos animales usados con más frecuencia son los modelos murinos, es decir, aquellos que son realizados en roedores, esto se debe a la amplia variedad de ratones transgénicos, así como con genes deletados lo cual ha permitido el estudio de moléculas específicas que pudieran estar involucradas en la patología de la periodontitis (16).

1.4. Periodontitis inducida

Tanto Duan (2015), como De Molon (2015) concuerdan que para el estudio específico de la periodontitis existen diversos modelos de inducción. como la periodontitis inducida por medio del cultivo de bacterias. Y el modelo usado con más frecuencia y mejor aceptado, la periodontitis inducida por medio de ligadura (15, 16). Esto debido a que al utilizar el cultivo de bacterias existen concentraciones bacterianas distintas a las encontradas en el proceso normal de la enfermedad (15).

La técnica de inducción por medio de ligadura consiste en rodear la corona de un molar de ratas Wistar, con hilo de sutura 5-0 (15) o 6-0 (16) y anudándolo, dejando el lado contralateral sin tratar, permitiendo así tener un control sin ligadura (17); De Molon (2015) y Bain (2009) reportan la realización de este tratamiento bajo anestesia general utilizando los anestésicos Ketamina o Xylacina (16); esta técnica facilita la colonización de bacterias de manera “natural” y favorece la inflamación (16-18).

1.5. Células T y la reacción inmunitaria

Existen distintos tipos de células T, dentro de estas divisiones se encuentran las células T colaboradoras (Th, T helper) y estas a su vez se subdividen en grupos más pequeños, los grupos Th1 y Th2 son los más representativos.

Generalmente las células Th1 secretan IFN- γ , estas células actúan tanto en la inmunidad celular como en la inmunidad humoral, participan en la activación de macrófagos y aumentan su capacidad fagocítica. Además participan en la opsonización por medio de la producción de inmunoglobulinas en las células B, es por ello que a este tipo de células se les atribuye una acción inflamatoria.

Por otra parte las células Th2 están asociadas a un perfil anti inflamatorio, se caracterizan por la secreción de IL-4 y favorecer la producción de anticuerpos (8, 19) (Figura 2).

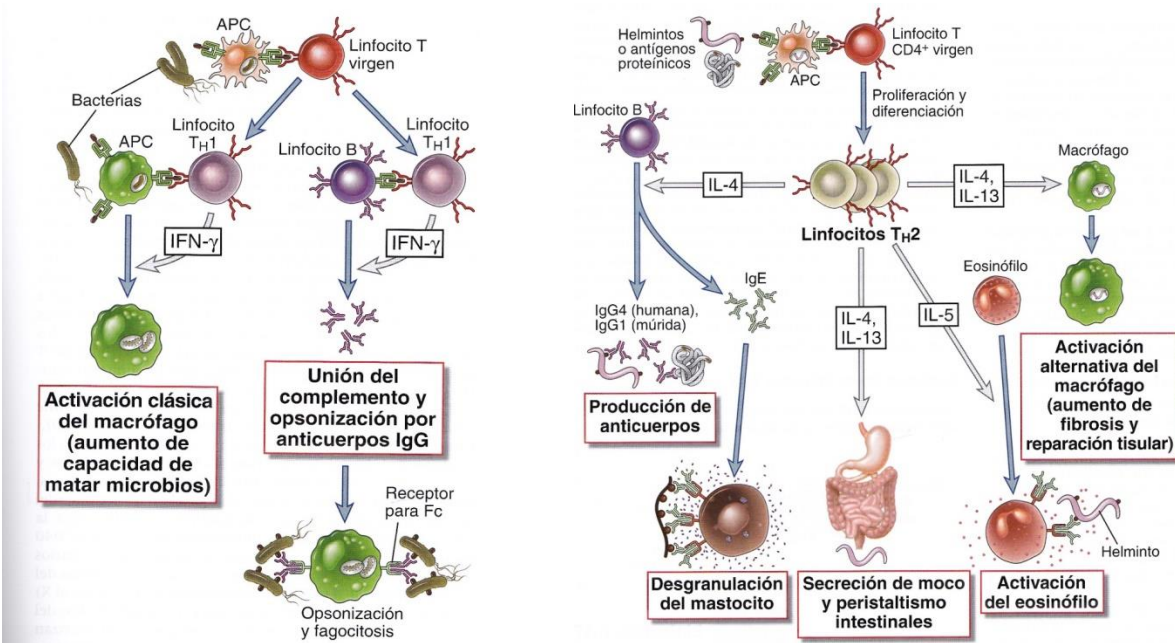


Figura 2. Linfocitos: A) Th1 y B) Th2. Tomado de la referencia 19 (Abbas, 2015).

1.6. Citocinas involucradas en la respuesta Th1 y Th2

Las citocinas son un grupo de proteínas producidas por distintas células del organismo y pueden actuar de distintas maneras tanto en las células que la producen (autócrina), células cercanas (parácrina) o a células distantes (endócrina). Una de sus funciones principales es participar como mediadores en procesos inflamatorios (20, 21). Algunas de estas regulan la inmunidad adaptativa mientras que otras regulan la inmunidad innata (22).

El nombre interleucina (IL) es seguido por un número, esto se debe a un intento por estandarizar su nomenclatura en este tipo de moléculas (21).

IL-10 es una citocina que presenta efectos reguladores y tiene la capacidad de inhibir la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias como es el caso de TNF-α (23) (Figura 3).

IL-6 es producida por distintos grupos celulares y su producción es estimulada por la acción de otras citocinas como son IL-1 y TNF- α , además por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos en una infección. A diferencia de citocinas pro inflamatorias como TNF- α , los efectos de IL-6 dependen del contexto, su concentración y la presencia de otras citocinas, a esto se le llama pleiotropismo (20) (Fig. 3).

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) es una citocina que posee múltiples funciones celulares, esta ha sido relacionada con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias, incluyendo la enfermedad periodontal (Fig. 3) (24).

Interferón- γ (IFN- γ) es una citocina cuya función en el sistema inmunológico aumenta la actividad citotóxica y fagocítica de los macrófagos, también incrementa el desarrollo y diferenciación de linfocitos Th1, razón por la cual IFN- γ tiene un papel importante en el control de infecciones (25).

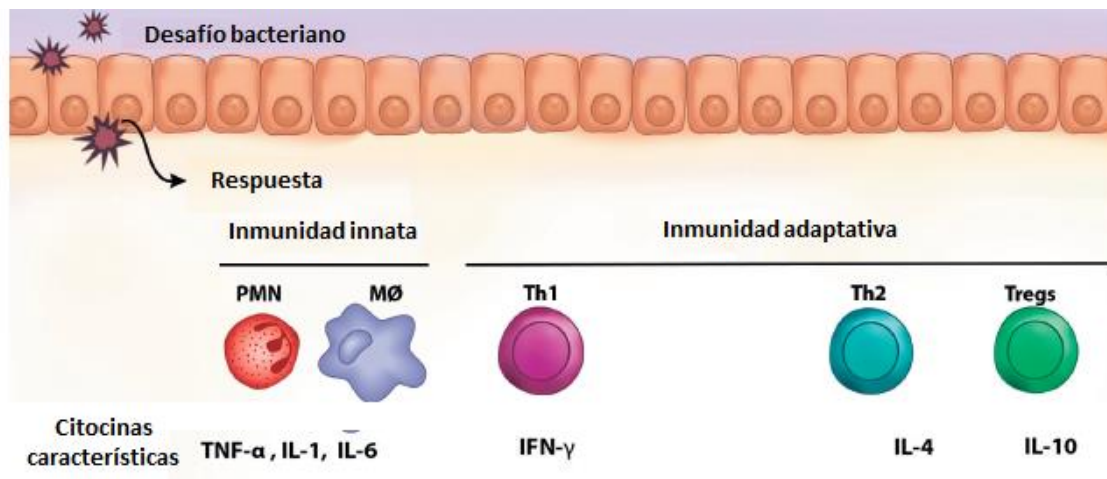


Figura 3. **Citocinas y enfermedad periodontal.** Tomado de la referencia 22 (Silva, 2015).

1.7. Perfiles inmunológicos y enfermedad periodontal

Pacientes con inflamación periodontal existe una elevada concentración de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α en el líquido crevicular, también menciona que altos niveles de IL-6, TNF- α e IFN- γ en tejidos gingivales, se encuentra asociado a enfermedad periodontal destructiva (10).

Existe un debate referente al perfil de citocinas específico asociado con la EP, Rossa (2014) menciona que en modelos *in vivo* se ha asociado un perfil Th1 en EP progresivas, y la EP inducida

con *Porphyromona gingivalis*, el aumento de linfocitos Th2 resultó en la disminución en la pérdida ósea (10), por otra parte Eley (2010) menciona que otros estudios han presentado cambios de un perfil Th1 a un perfil Th2 (8).

1.8. Gestación

Durante la gestación existe un aumento en la prevalencia de algunas alteraciones orales, la gingivitis una de las más comunes. Esta se caracteriza por edema, hiperemia y tendencia al sangrado. La severidad de estas alteraciones tiende a aumentar gradualmente hasta la semana 36 de la gestación (12).

Un punto de gran importancia para el correcto desarrollo la gestación, así como del establecimiento de la tolerancia inmunológica del producto es el establecimiento de un punto de equilibrio entre los factores tanto inflamatorios como anti-inflamatorios (23).

Durante la gestación, en la respuesta inmunológica de la madre predomina el perfil Th2 mientras el perfil Th1 se mantiene regulado negativamente (23, 26). Vázquez-Rodríguez (2011) menciona que durante ciertas etapas de la gestación, la presencia de citocinas pro-inflamatorias resulta perjudicial, debido a que se ha demostrado que TNF- α e IFN- γ favorecen la apoptosis de las células del trofoblasto (26).

Por otro lado, recientemente se ha sugerido que las infecciones primarias en sistemas distantes pueden guiar a una gestación con termino anormal (27); por lo tanto, al considerarse a la periodontitis como un proceso en el cual existe infección de los tejidos periodontales, además de un aumento en la presencia de citocinas pro-inflamatorias (9, 13), se ha sospechado de una posible relación entre la presencia de periodontitis y la gestación con termino anormal, sin embargo no existen evidencias sólidas que soporten esta presunción, y los resultados reportados hasta ahora no han sido claramente concluyentes.

1.9. Factor de inhibición de migración de macrófagos (MIF)

MIF es una citocina involucrada en algunos procesos fisiológicos importantes, incluyendo la reparación de tejidos (28), inicialmente se detectó como un factor de secreción de linfocitos T activados (29, 30). MIF fue descubierto en 1966 y posteriormente se logró identificar su localización cromosómica. Ahora se reconoce ampliamente como un importante modulador pro-inflamatorio, así como de procesos inmunes (30).

Al estar vinculada con procesos inflamatorios, MIF también ha sido asociado a procesos similares, tales como la ovulación, ciclo menstrual y embarazo (29). Estudios en modelos murinos han detectado un aumento en la concentración de MIF en la ovulación, así como su expresión durante el embarazo temprano (29). Ietta (2002) realizó un estudio en humanos en el cual comprobó que la presencia de MIF en suero era mucho mayor durante el parto y embarazo a término que durante el segundo trimestre del mismo, por lo cual se puede asociar a estos eventos (29).

Morimoto (2003) sugiere que MIF tiene importantes funciones fisiopatológicas en el tejido gingival, sin embargo solo se logró demostrar su presencia en tejidos periodontales, principalmente en encía libre y epitelio de unión, así como en queratinocitos, células basales y fibroblastos (14).

2. Justificación

La etiología multifactorial de la enfermedad periodontal y las diversas variables que participan en las modificaciones que suceden durante la gestación en los humanos resulta compleja, por lo que los modelos animales se han utilizado para comprender la patogenia de la enfermedad periodontal y evaluar su evolución al poder limitar las variables (31).

Las ratas y ratones han sido ampliamente utilizadas debido a la similitud en la arquitectura periodontal, su bajo costo, la facilidad de manejo, y la posibilidad de disponer de diferentes estados inmunológicos y microbiológicos (32). En modelos animales es de suma importancia establecer el momento en que se establece la patología e identificar los factores externos que podrían influir en el progreso de la enfermedad, en éste trabajo de tesis, utilizamos ratones deficiente del gen de *Mif* *-/-*. Con este estudio contribuiremos a identificar la evolución de la enfermedad periodontal bajo diferentes condiciones provocadas por el desarrollo de la gestación en un modelo murino en ratones hembras BALB/c WT y *Mif* *-/-*.

3. Planteamiento del Estudio

Identificar si la evolución de la periodontitis experimental en murinos es dependiente de la molécula pro-inflamatoria MIF, bajo diferentes condiciones provocadas por el desarrollo del embarazo.

4. Hipótesis

MIF participa en el desarrollo de la patología de la periodontitis experimental desarrollada en hembras gestantes en un modelo murino.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Error! Marcador no definido.

Determinar el efecto de la gestación en el desarrollo de la periodontitis experimental en ratones hembras gestantes WT y *Mif*^{-/-}.

5.2. Objetivos Particulares

1. Identificar los signos clínicos de inflamación provocado por periodontitis experimental por ligadura de Nylon 6-0 entre los grupos de ratones hembras WT y *Mif*^{-/-} gestantes con respecto al grupo de ratones no gestantes.
2. Observar por ELISA la expresión de Citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 en periodontitis experimental por ligadura de Nylon 6-0.
3. Asociar los signos clínicos de la periodontitis con la gestación de ratones hembras WT y *Mif*^{-/-}.

6. Consideraciones éticas y legales

Todos los experimentos del proyecto que incluyan 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. Aprobado por la comisión de ética de FES-Iztacala No. CE/FESI/082014/1031, por la comisión de bioseguridad de la FES-Iztacala septiembre 2014.

7. Diseño experimental

Se utilizaron ratones hembras de 8–10 semanas de edad de la cepa BALB/c (Bioterio FES-I) (Figura 4), los ratones *Mif*^{-/-} fueron desarrollados normalmente de las cepas B6/129Sv. Posteriormente los ratones *Mif*^{-/-} fueron retro-cruzados por más de 12 generaciones en ratones BALB/c. Estos animales fueron donados por el doctor John R. David de la escuela de salud pública de Harvard, y se han atendido en reproducción bajo condiciones estándares en el bioterio de la facultad de estudios superiores Iztacala, UNAM, donde son checados genéticamente de manera rutinaria. Fueron mantenidos en grupos de 5 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 UBIMED.



Figura 4. Ratones BALB/c

7.1. Confirmación del genotipo por PCR

Todos los ratones fueron genotipificados para determinar la ausencia de *Mif* por PCR. Se utilizó material nuevo, estéril y libre de DNAsas-RNAsas, se realizó un corte de aproximadamente 0.5-1 cm de parte final de la cola de los ratones experimentales, se llevó a cabo la digestión en tubos de

1.8 ml (Eppendorf) previamente identificados, en cada tubo se colocó el tejido junto con 500 μ l de buffer de lisis y 20 μ l de proteinasa K (Invitrogen No. Cat: 25530049) (100 μ g/muestra) la cual se dejó incubar toda la noche a 56°C.

Una vez disgregada la cola, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, a su vez se colocaron 500 μ l isopropanol frio en tubos Eppendorf nuevos, tras finalizar el centrifugado, posteriormente se tomó el sobrenadante con micropipeta y se vació en las paredes de los tubos con isopropanol, se homogenizó invirtiéndolos de manera suave hasta que la precipitación del ADN se hizo evidente. Después de esto se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 1 minuto para concentrar el precipitado y posteriormente decantar la fase liquida. El botón de ADN se lavó con etanol frio al 75% en el mismo tubo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, por último se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras haberse secado, se resuspendió el botón de ADN con 200 μ l de agua grado biología molecular, para después incubarlo toda la noche a 56°C. (Figura 5).



Figura 5. PCR

a) secciones de cola de ratón sumergidas en buffer de lisis y proteinasa k. b) Thermoblock y termociclador. c) Campana de PCR.

La cuantificación de DNA se realizó utilizando una dilución de 1:200 de muestra de DNA en agua en un espectrofotómetro (Jenway, Genova). Se calibró con agua grado molecular hasta obtener los blancos en las celdas transparentes del lector, las muestras se colocaron en las celdas calibradas y se leyeron las muestras a 260/280 nm, finalmente el espectrofotómetro por medio de la absorción de radiación UV brinda la concentración de DNA.

7.2. Amplificación del gen

Para el reconocimiento del gen para MIF se utilizaron seadores específicos.

En este proceso de PCR se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas con capacidad de 0.2 ml, los cuales en una reacción final de 25 μ l se colocaron los siguientes reactivos (Kit taq Platinum polimerase, IN vitrogen) en el siguiente orden:

	<i>Mif</i>	NEO
Buffer 10x	2.5	2.5
DNTP mix (10mM)	0.4	0.4
Primer F (50 pM)	4.6	3
Primer R (50 pM)	5.4	3.6
DNA taq polimerase (5U/μl)	0.4	0.4
Agua (Sigma)	12.7	12.7
Muestra DNA	100 ng	100 ng

Una vez que se tuvieron los tubos rotulados y con los respectivos reactivos se colocaron en el termociclador (Cobett Research).

7.3. Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) 1% en Buffer TBE 1x sobre un molde y un peine de 20 pozos, que se mantuvo a 4 °C por 30 minutos para que el gel solidificara (Figura 6).

Una vez solidificado el gel se colocó en la cámara de electroforesis con Buffer de TBE 1x y se colocaron por pozo 2 μ l de muestra previamente diluidos en 3 μ l de Buffer de carga Blue juice (In vitrogen), y 3 μ l de Sybr Green. A partir del segundo pozo ya que en el primero se colocaron 2 μ l de marcador de peso molecular 100 pb (In vitrogen).

Se colocaron las muestras en la cámara de electroforesis hacia el extremo negativo y se corrió a 90 volts, 150 mA durante 50 minutos. Finalmente se observó en un transiluminador con luz UV (ultravioleta) y la imagen se capturó utilizando el programa Alphaimagen.

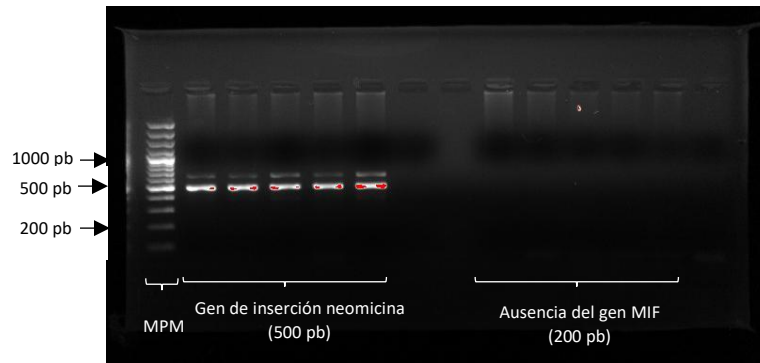


Figura 6. Ejemplo de fotografía de un gel de agarosa
 Se observa de izquierda a derecha marcador de peso molecular (MPM) y en las 5 columnas siguientes la expresión del gen de inserción neomicina (500 pb) correspondiente a los ratones *Mif*^{-/-} y en las columnas 8 a 12 la no expresión del gen MIF (200 pb).

7.4. Inducción de periodontitis

Se valoró periodontalmente bajo anestesia general (Anestesia, Xylacina: pre-anestésico, dosis ponderal 10 mg/kg, dilución 10%, 20 mg/1ml, 0.2mg/20g, I.M. Ketamina: anestésico, dosis ponderal 100 mg/kg, dilución 10%, 2 mg / 1 ml, 0.1mg/ 20 g I.M. (33). Para asegurar así que no presentaran signos de inflamación periodontal clínica. Posteriormente, se separaron en grupos, de 5 especímenes cada uno.

Dos grupos principales: 1) Sin periodontitis experimental (sin ligadura -Lig) y 2) con periodontitis experimental (con ligadura +Lig). El primer grupo sin ligadura se separó en tres bloques de 5 ratones cada uno: a) no gestante (CTL), b) Control anestesia (Anest), para determinar si el anestésico tenían algún efecto en el desarrollo de la periodontitis, c) Gestante (Gest-Lig), para el segundo grupo, para inducir la periodontitis experimental, se colocó una sutura Nylon 6-0 (Ethicon) como variante a la técnica tradicional con seda 5-0 (34), como ligadura alrededor del segundo molar superior derecho, se separaron en 2 bloques de 5 ratones cada uno: a) hembras no gestantes con periodontitis inducida (No Gest +Lig) y b) Gestantes con periodontitis inducida (Gest +Lig).

Para la inducción de la periodontitis se colocó ligadura alrededor del segundo molar superior derecho utilizando sutura Nylon 6-0 (Ethicon)(18, 35-37). Esto se realizó bajo anestesia general (Xilacina: pre-anestésico, dosis ponderal 10 mg/kg, Ketamina: Anestésico, dosis ponderal 100

mg/kg) utilizando una mesa de trabajo y separadores con la finalidad de mejorar la visibilidad, así mismo se utilizaron lupas 2.3x (Heine) (Figura 7). Se esperó durante 2 semanas para el establecimiento de la periodontitis, se verificó la presencia de las ligaduras cada semana.

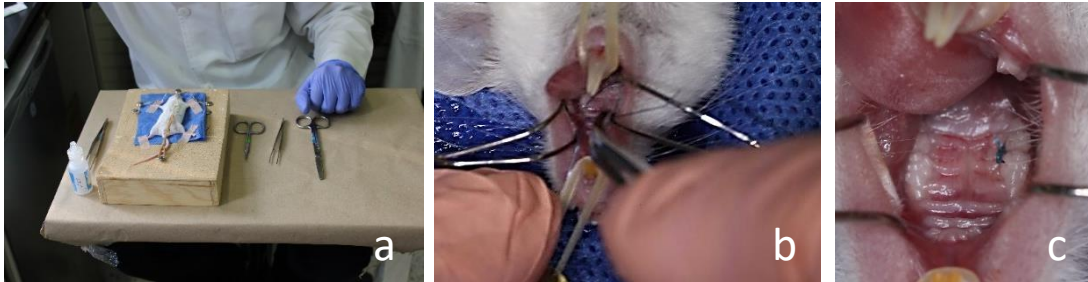


Figura 7. Proceso de colocación de ligadura

a) Mesa de trabajo con el ratón sujeto para la colocación de ligadura. b) Colocación del hilo de sutura alrededor del segundo molar superior derecho. c) Ligadura colocada.

Fueron seleccionadas hembras con periodontitis establecida por dos semanas, fueron apareadas con los machos con la finalidad de que quedaran preñadas, se consideró la gestación a partir del tapón positivo (+) a 3 días. Otro grupo sin periodontitis también fue apareado, para formar los grupos gestantes (Gest +Lig y Gest -Lig).

El tiempo experimental total fue de 10 semanas, esto considerando que el tiempo de gestación en ratones es de 19-21 días, entre 18.5 y 19.5 días en las hembras primíparas, y entre 19 y 21 días en las múltiparas (38). Mas dos semanas de espera para el establecimiento de la periodontitis.

7.5. Obtención de suero sanguíneo

A todos los grupos se les extrajo sangre *in vivo* por dilatación de la vena caudal una vez a la semana. La sangre se recuperó en microtubos de 1.5 ml, que fueron centrifugados a 2500 rpm, se recuperó el suero, se repitió el centrifugado, se recuperó nuevamente suero y se mantuvo en refrigeración a -70 °C hasta su uso., las muestras se utilizaron para determinar las concentraciones de citocinas, por la técnica de ELISA (Peprotech-México) (Figura 8).



Figura 8. Proceso de obtención de suero sanguíneo

a) Obtención de sangre de la vena caudal. b) Centrifugado de las muestras para la separación suero/coagulo. c) Separación suero/coagulo.

7.6. Protocolo ELISA

Se determinó la concentración de citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10 por medio de ELISA-sandwich tanto para los sueros obtenidos de los ratones BALB/c como para los ratones *Mif*^{-/-}.

Se utilizaron placas de 96 pozos, para su preparación fueron previamente sensibilizadas, para esto se diluyó en anticuerpo de captura con PBS en una concentración de 2 μ g/ml. Después de esto se agregaron 100 μ l de esta dilución en cada pozo de la placa, se selló e incubó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se removió la solución y se lavó 4 veces cada placa utilizando 300 μ l de buffer de lavado (PBS-Tween-20 al 0.05%) por pozo, después del último lavado se invirtió la placa y se sacudió en una toalla de papel con el fin de remover los residuos de buffer y anticuerpos, se agregaron 300 μ l de buffer de bloqueo (PBS-BSA al 1%) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, finalmente se repitió el lavado 4 veces con buffer de lavado. Posterior a ello se colocaron las citocinas con recombinante murino para realizar las curvas por duplicado en las dos primeras filas de pozos en la placa de ELISA, con una concentración inicial de 4 ng/ml y final de 0, se hicieron diluciones seriadas 1:2 y se dejó el último pozo como blanco (22 pozos y 2 blancos).

En el mismo proceso, en el resto de los pozos se colocaron 100 μ l de suero en cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de incubar se realizaron 4 lavados con buffer de lavado, se agregó el anticuerpo de detección en dilución en una concentración de 0.5 μ g/ml y se agregaron 100 μ g de esta dilución a cada pozo, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después del periodo de incubación se realizaron 4 lavados con buffer de lavado, se diluyeron 5.5 μ l de conjugado estreptavidina-HRP 1:2000 (INC Biomedicals) en un volumen total de 11 ml. Se agregaron 100 μ l en cada pozo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se realizaron 4 lavados con buffer de lavado, se agregaron 100 μ l de solución de sustrato (ABTS) (INC Biomedicals) a cada pozo, se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta el cambio de coloración y finalmente se leyeron las placas en un lector para ELISA (Mertertech S960) a una longitud de onda de 405 nm, todas las placas se analizaron en intervalos de 5 minutos por aproximadamente 35 minutos (Figura 9).



Figura 9. Fotografía representativa de placa de ELISA

7.7. Sacrificio y obtención de maxilares

Para poder unificar el tiempo entre los grupos con periodontitis, con o sin gestación, así como el grupo sin periodontitis gestante, fueron sacrificados después de 10 semanas, a partir de la colocación de la ligadura. Los ratones control fueron sacrificados en los mismos tiempos que los grupos experimentales. El grupo de anestesia fue sacrificado una semana después de haber recibido anestesia. Al término de estos periodos se realizaron los sacrificios, se obtuvo una última muestra sanguínea a través de punción cardiaca y se removieron los maxilares.

7.8. Análisis estadístico

Las comparaciones de los niveles de citocinas entre los diferentes grupos se llevó a cabo mediante la prueba ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis), además de esto se realizó el post-test de Dunn, utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95%. Se consideraron significativas las comparaciones con valores de $p < 0.05$. Las comparaciones de los niveles de citocinas en el comparativo WT/*Mif*^{-/-} se realizó por medio de la prueba *t* de student, utilizando un coeficiente de confiabilidad del 95%.

8. Resultados y discusión

8.1. Signos clínicos

8.1.1. Signos clínicos entre los grupos experimentales WT

Debido al tamaño de los tejidos, no fue posible evaluar los cambios clínicos de manera cuantitativa, sin embargo, al evaluar cualitativamente. Los grupos con ligadura se observó la pérdida de integridad del periodonto, en el cuello anatómico del diente sobre el cual fue colocada la ligadura (2º molar superior derecho), además se observó el desplazamiento hacia apical en la zona afectada, sumado a esto se observaron signos clínicos de inflamación, tales como enrojecimiento y aparente edema de la zona, estas diferencias se contrastaron con su contraparte (segundo molar superior izquierdo)(Figura 10).

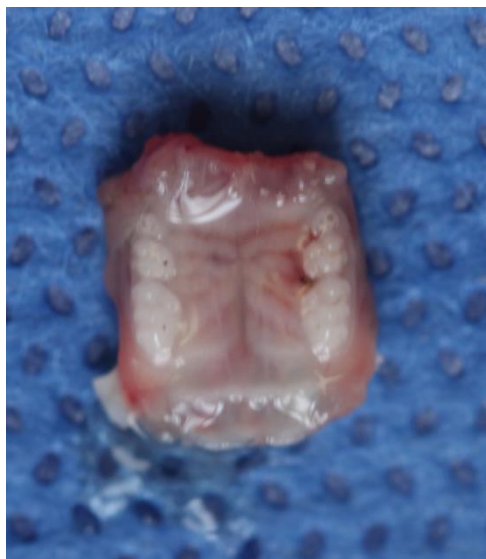
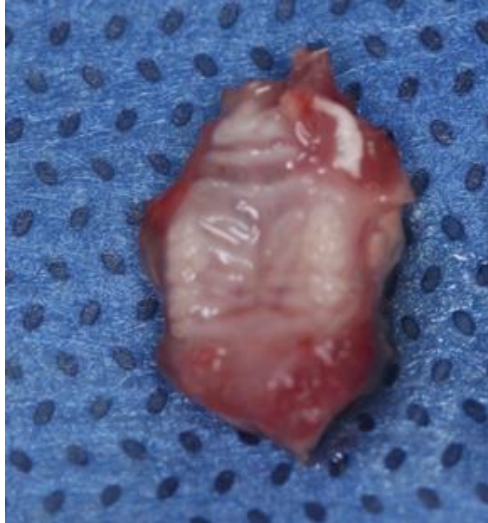


Figura 10. Características clínicas de tejidos periodontales, representativo de periodontitis experimental en WT

Se colocó una sutura nylon 6-0 alrededor del segundo molar superior derecho en ratones hembra BALB/c, durante 10 semanas, después fueron sacrificados y se obtuvo el maxilar, al retirar la sutura se observan los cambios clínicos de inflamación.

8.1.2. Signos clínicos entre los grupos experimentales *Mif*^{-/-}

Debido al tamaño de los tejidos, no fue posible evaluar los cambios clínicos de manera cuantitativa. En la evaluación cualitativa no se observaron cambios clínicos severos (Figura 11).



*Figura 11. Características clínicas de tejidos periodontales, representativo de periodontitis experimental en *Mif*^{-/-}*

*Se colocó una sutura nylon 6-0 alrededor del segundo molar superior derecho en ratones hembra *Mif*^{-/-}, durante 10 semanas, después fueron sacrificados y se obtuvo el maxilar, al retirar la sutura no se observan los cambios clínicos de inflamación severos.*

8.1.3. Comparación de signos clínicos

Siguiendo el modelo de inducción de periodontitis experimental propuesto por Abe (18), De Molon (16) y Duan (15) por medio de ligadura, el cual originalmente está diseñado para la inducción de PE en ratas Wistar con sutura Seda, encontramos que al realizarse en ratones con sutura Nylon 6-0, obtenemos los mismos resultados, por lo cual pudimos establecer que esta variante es un modelo efectivo y reproducible para el desarrollo de PE en murinos.

Al evaluar clínicamente los maxilares de ratones WT, se pudo observar que en los grupos con ligadura (Gest +L y No Gest +L) existían características clínicas de la inflamación únicamente en la zona en la cual se colocó la ligadura, sin embargo, debido al tamaño de las muestras no se pudo realizar una evaluación cuantitativa de los mismos.

Por otra parte, al comparar los maxilares obtenidos de ratones WT con los obtenidos de ratones *Mif*^{-/-}, se pudo observar que en los grupos *Mif*^{-/-} con ligadura, no se apreciaban cambios significativos en las características del periodonto, esto puede estar ligado a la ausencia de MIF, ya que al ser una citocina pro-inflamatoria, en su ausencia no se presentó la reacción inflamatoria que se observó en los ratones que si expresaban MIF (WT).

8.2. Niveles de citocinas

8.2.1. Niveles de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en suero, por el metodo de ELISA en ratones WT.

Se determinó la concentración en suero de las citocinas IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-10 en los grupos experimentales de ratones WT por ELISA. En los grupos gestantes se evaluó en dos momentos, durante la gestación (dur) y después de la gestación (desp).

IL-6

No se observó diferencia en la concentración de IL-6 entre los grupos control y anestesia. Por otra parte, se observó una concentración elevada en el grupo No Gest +Lig, esta diferencia fue significativa con respecto al control (* $p < 0.05$) coincidiendo con lo reportado por Rossa (2014), esto pudo estar asociado a la inflamación generada por la ligadura. Al revisar el grupo Gest +Lig, este presentó diferencia significativa al compararlo con el grupo No Gest +Lig, tanto durante como después de la gestación (* $p < 0.05$), estas concentraciones fueron inferiores al ser comparadas con el grupo control, esto puede ser debido a que la gestación estuvo asociada a un perfil anti-inflamatorio.

En el caso del grupo gestante Gest -L se observó un aumento en la concentración durante la gestación, el cual se vio disminuido tras finalizar la misma (desp), en este grupo se observó una diferencia significativa al compararse con el grupo No Gest +Lig (**** $P = 0.0001$) (Figura 12).

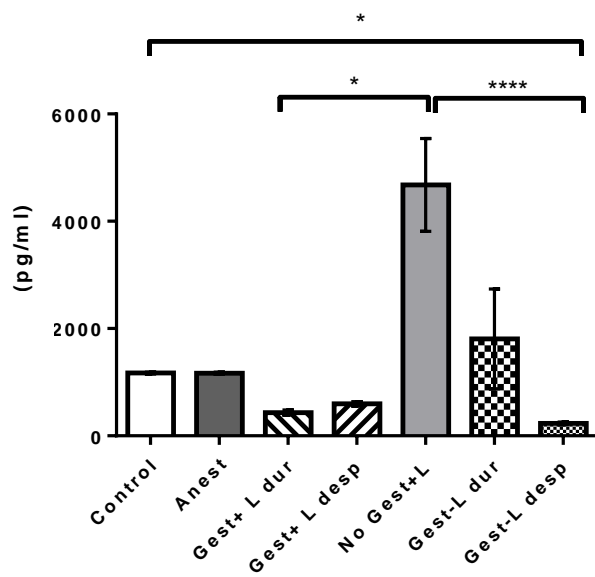


Figura 12. IL-6

Concentraciones de IL-6 en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), no gestante con ligadura (No Gest+L), gestante con ligadura (Gest+Lig) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

* $P < 0.05$

**** $P = 0.0001$

TNF- α

No se observó diferencia significativa en la concentración de TNF- α entre los grupos experimentales. Sin embargo, se observó un ligero aumento en la concentración de esta citocina en los grupos con ligadura con respecto al control. En los grupos gestantes se observó un aumento de la concentración, sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos (Figura 13).

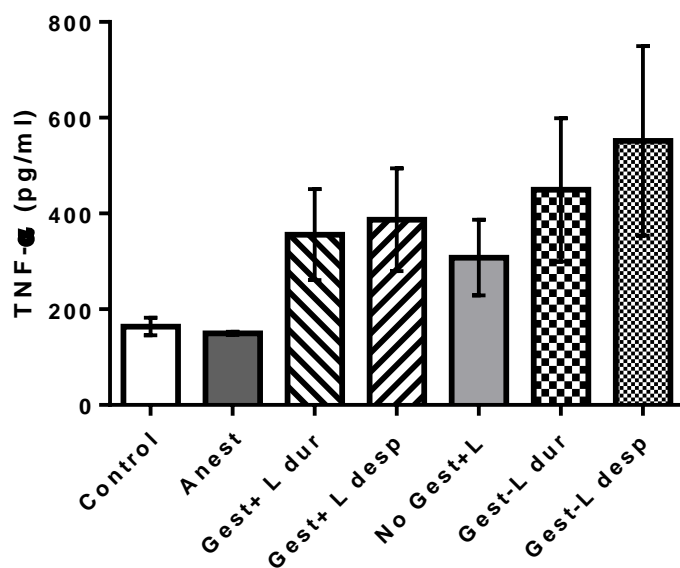


Figura 13. TNF- α

Concentraciones de TNF- α en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), no gestante con ligadura (No Gest+L), gestante con ligadura (Gest+Lig) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

IFN- γ

No se observó diferencia significativa entre los grupos control y anestesia, sin embargo, se observó un aumento en la concentración en los demás grupos experimentales. El grupo Gest –L dur presentó un aumento significativo con respecto al grupo control y al grupo anestesia (*P<0.05). Sin embargo, esta concentración disminuyó tras finalizar la Gest –L desp, aunque no fue significativo (Figura 14).

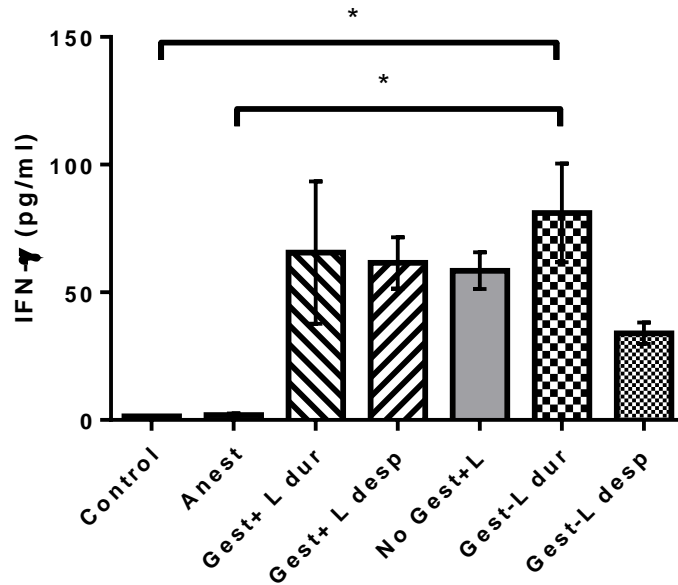


Figura 14. IFN- γ

Concentraciones de IFN- γ en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), no gestante con ligadura (No Gest+L), gestante con ligadura (Gest+Lig) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

*P= 0.05

Estos resultados en los grupos WT la presencia de citocinas pro inflamatorias con PE concuerdan con lo mencionado por Rossa (2014) (10). Se observó un aumento en IL-6, aunque difirió en que el aumento observado en las concentraciones de TNF- α no fueron significativas estadísticamente.

IL-10

No se observó diferencia significativa entre los grupos control y anestesia, sin embargo la concentración de IL-10 fue menor en el grupo con anestesia. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la concentración en los demás grupos experimentales. En los grupos gestantes se observó una tendencia a aumentar la concentración de IL-10 tras finalizar la gestación (desp), sin embargo estos no fueron significativos. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Vázquez-Rodríguez (26) al verse favorecido un ambiente anti inflamatorio. La concentración observada en el grupo No Gest + L puede ser explicada debido a que el desarrollo de PE favorece la inflamación y con ello una menor expresión de esta citocina (Figura 15).

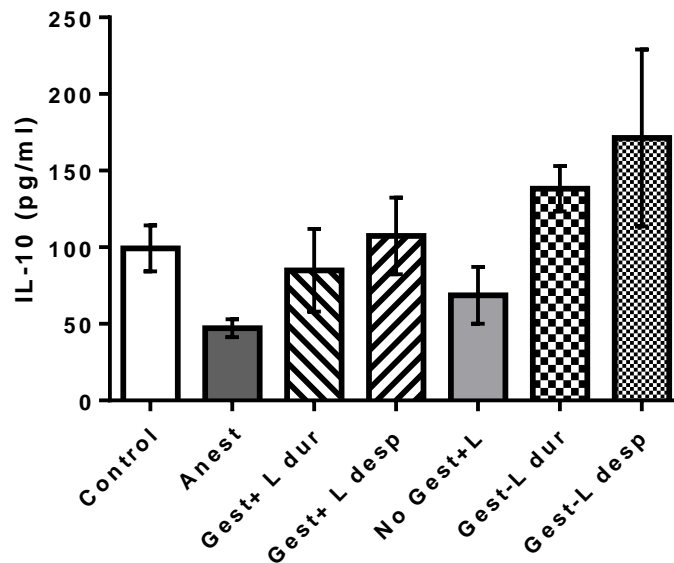


Figura 15. IL-10

Concentraciones de IL-10 en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), no gestante con ligadura (No Gest+L), gestante con ligadura (Gest+Lig) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

8.2.2. Niveles de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en suero, por el metodo de ELISA en ratones *Mif*^{-/-}

Se determinó la concentración en suero de las citocinas IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-10 en los grupos experimentales de los ratones *Mif*^{-/-}. En los grupos gestantes se evaluó en dos momentos, durante la gestación (dur) y después de la gestación (desp).

IL-6

No se observó diferencia en la concentración de IL-6 entre los grupos control y anestesia, se pudieron observar ligeras diferencias en los grupos experimentales sin embargo estas no fueron estadísticamente significativas. En el grupo Gest -L se observó la disminución de la concentración de IL-6 tras finalizar la gestación (desp). Tomando en cuenta lo mencionado por Ietta (29), se puede considerar que MIF está asociado a la inflamación, por lo tanto en su ausencia en los ratones *Mif*^{-/-} no existe el aumento que se observó en los ratones WT (Figura 16).

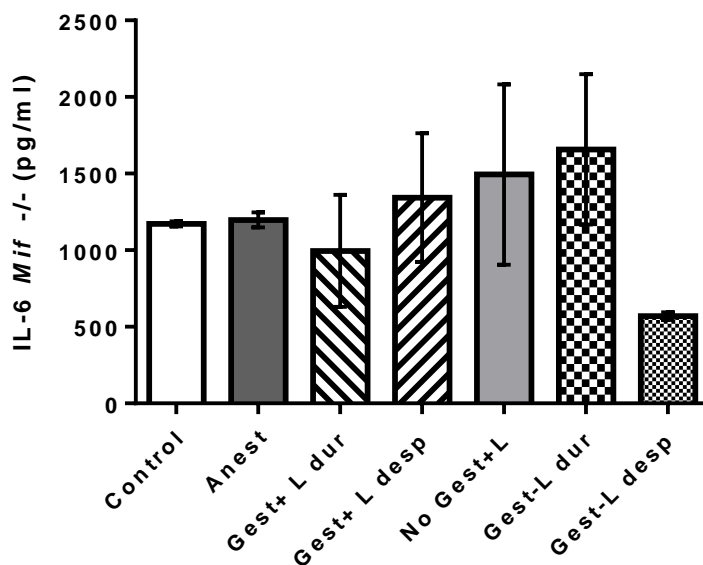


Figura 16. IL-6 *Mif*^{-/-}

Concentraciones de IL-6 en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), no gestante con ligadura (No Gest+L), gestante con ligadura (Gest+Lig) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

TNF- α

En los grupos *Mif*^{-/-}, no se observaron diferencias estadísticas en la concentración de TNF- α entre los grupos control y anestesia. Se observó un aumento de la concentración de TNF- α en los demás grupos experimentales, sin embargo, ninguno de estos fue significativo entre si y todos presentaron concentraciones similares (Figura 17).

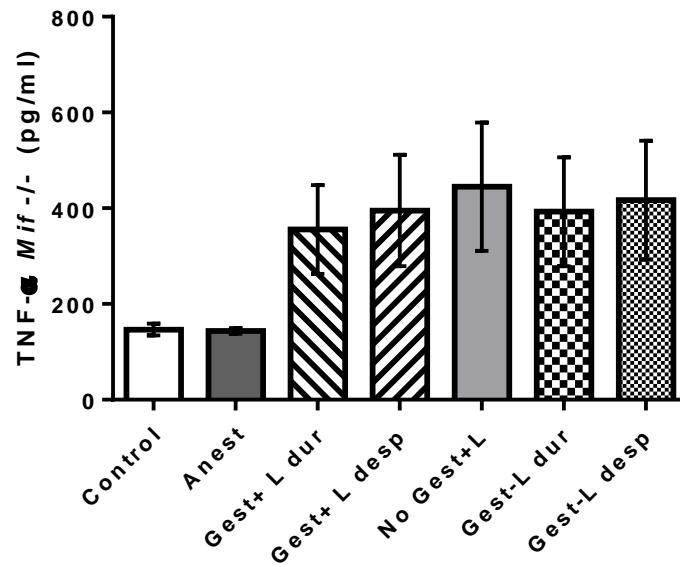


Figura 17. TNF- α *Mif*^{-/-}

Concentraciones de TNF- α en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), no gestante con ligadura (No Gest+L), gestante con ligadura (Gest+Lig) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

IFN- γ

No se observaron diferencias significativas en la concentración de IFN- γ entre los grupos control y anestesia. Por otra parte, se observó un aumento significativo en el grupo No Gest +Lig con respecto al control (**P=0.01) y al grupo de anestesia (*P<0.05), también se observó un aumento significativo en el grupo Gest +Lig dur con respecto al control (***P= 0.001) y con respecto al grupo anestesia (*P<0.05), en los demás grupos se pudo observar un aumento en las concentraciones de IFN- γ . Sin embargo, estas no fueron significativas. estos datos concuerdan con el perfil descrito durante la gestación mencionados por Pavón y Vázquez-Rodríguez (23, 26), al encontrarse disminuida la presencia de IFN- γ durante la misma, esto respecto al grupo con PE no gestante (Figura 18).

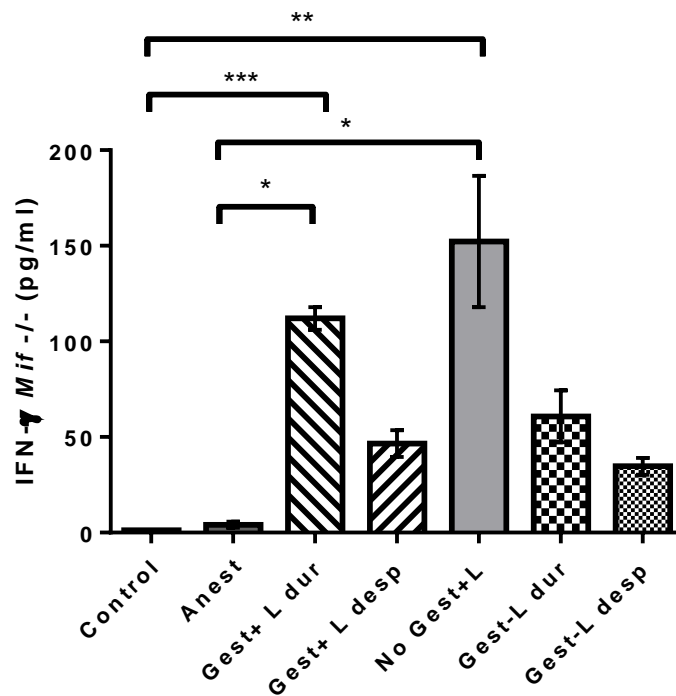


Figura 18. IFN- γ Mif -/-

Concentraciones de IFN- γ en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), no gestante con ligadura (No Gest+L), gestante con ligadura (Gest+Lig) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

*P= 0.05

** P= 0.01

*** P= 0.001

IL-10

No se observaron diferencias significativas en la concentración de IL-10 entre los grupos control y anestesia. Sin embargo, se observó un aumento que no resultó significativo en la concentración en el resto de los grupos experimentales. En los grupos gestantes se observó una tendencia al aumento de la concentración de IL-10 tras finalizar la gestación (desp). (Figura 19).

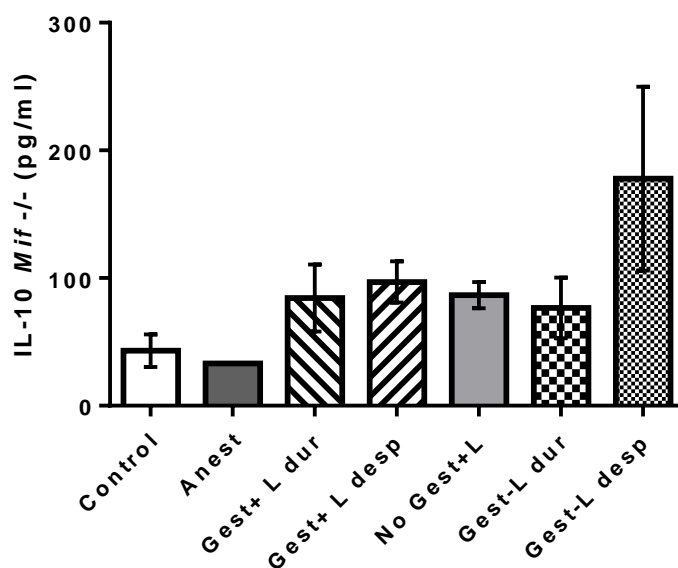


Figura 19. IL-10 Mif^{-/-}

Concentraciones de IL-10 en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), no gestante con ligadura (No Gest+L), gestante con ligadura (Gest+Lig) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

8.2.3. Comparativo de citocinas entre WT Y *Mif* -/-

IL-6

Al comparar los grupos WT contra los *Mif* -/- no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y anestesia, por otra parte al comparar los grupos Gest + L se observaron mayores concentraciones en los ratones *Mif* -/-, sin embargo estas diferencias no resultaron significativas. En el grupo No Gest + L se observó una concentración mayor en los ratones WT, esta diferencia fue significativa (* $P < 0.05$), en el caso de los grupos gestantes sin ligadura se encontraron concentraciones similares durante la gestación, sin embargo, la concentración de IL-6 disminuyó en los ratones WT después del nacimiento, presentando una diferencia significativa (** $P = 0.01$). (Figura 20)

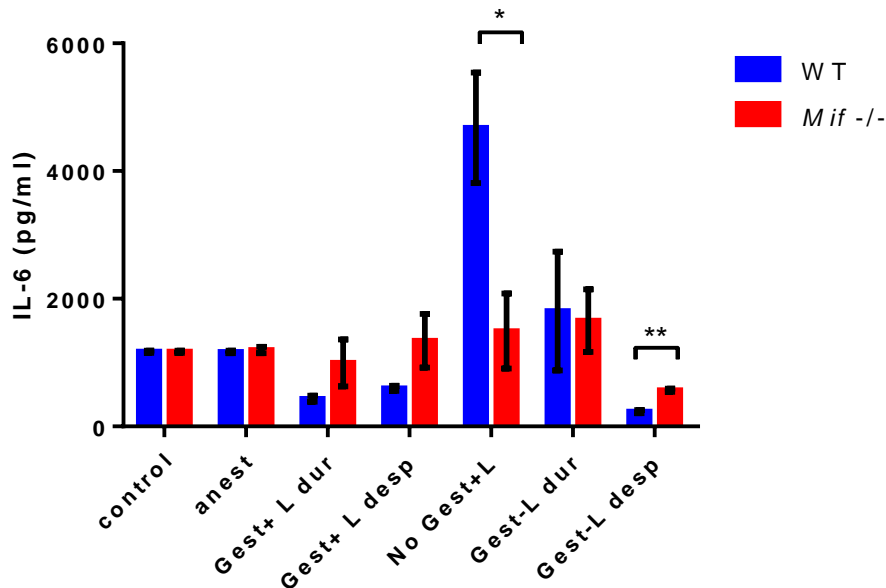


Figura 20. Comparativo IL-6

Comparativo de concentraciones de IL-6 en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), gestante con ligadura (Gest+Lig), no gestante con ligadura (No Gest+L) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

* $P < 0.05$

** $P = 0.01$

TNF- α

Al realizar el comparativo en las concentraciones de TNF- α , no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y Anest. El grupo Gest+L durante y después de la gestación tampoco hubo diferencias. En los grupos no gestantes con ligadura se observó una concentración mayor en los ratones *Mif*^{-/-}, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En el caso del grupo gestante sin ligadura se observaron concentraciones menores en los ratones *Mif*^{-/-} con respecto a los ratones WT tanto durante como después de la gestación, a pesar de esto las diferencias encontradas no fueron significativas (Figura 21).

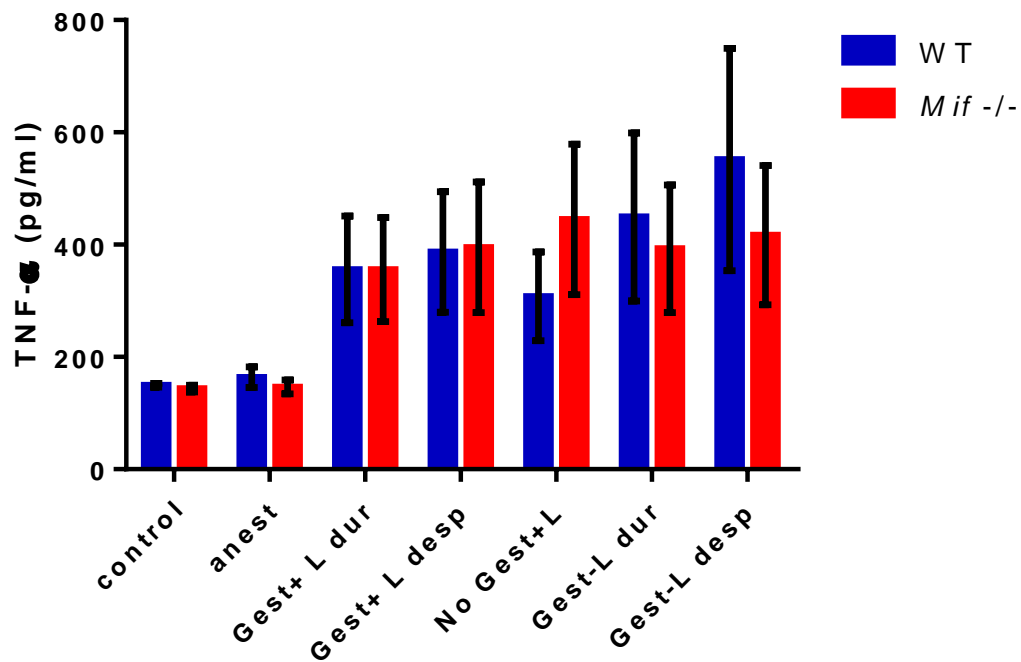


Figura 21. Comparativo TNF- α

Comparativo de concentraciones de TNF- α en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), gestante con ligadura (Gest+Lig), no gestante con ligadura (No Gest+L) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

IFN- γ

En la comparativa de las concentraciones de IFN- γ no se encontraron diferencias entre los grupos control y anestesia, en el grupo Gest+L dur, la concentración de IFN- γ fue mayor en los ratones *Mif*^{-/-}, tras finalizar la gestación, Gest+L desp la concentración fue menor con respecto a los ratones WT, sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. En el caso del grupo No Gest+L, la concentración fue mayor en los ratones *Mif*^{-/-}, esta diferencia fue significativa (**P=0.01). Por último, al comparar los grupos Gest-L no se encontraron diferencias significativas (Figura 22).

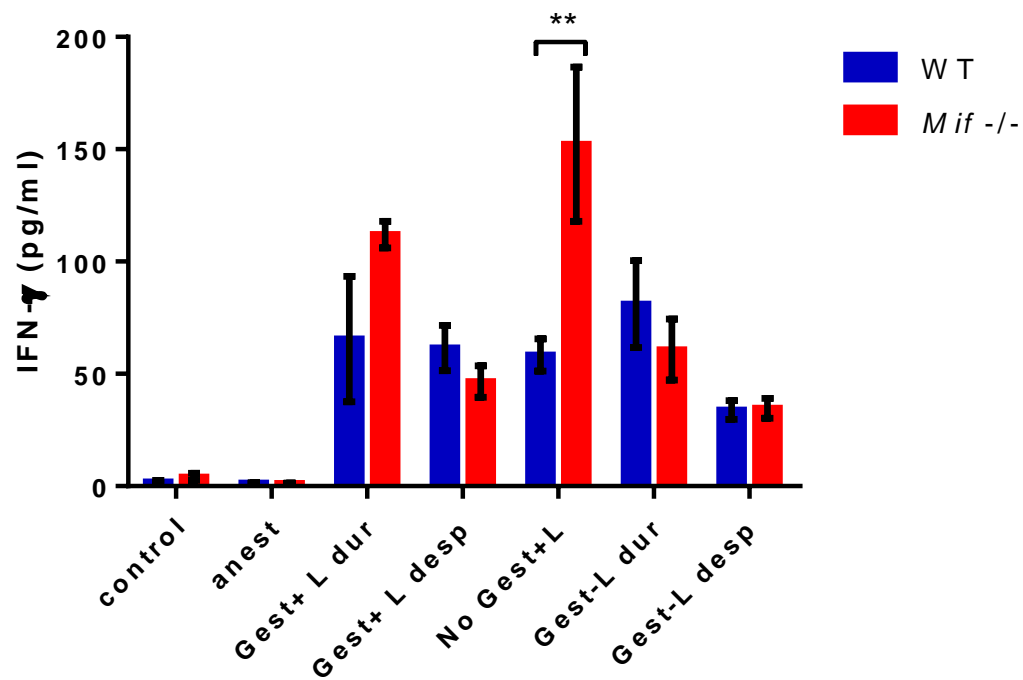


Figura 22. Comparativo IFN- γ

Comparativo de concentraciones de IFN- γ en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), gestante con ligadura (Gest+Lig), no gestante con ligadura (No Gest+L) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

**P=0.01

IL-10

Al comparar las concentraciones de IL-10 en los grupos experimentales encontramos diferencias significativas en los grupos control y anestesia, las concentraciones fueron mayores en los ratones WT (* $P < 0.05$) en comparación a los ratones *Mif*^{-/-}. En el resto de los grupos las concentraciones fueron similares tanto en los ratones WT como en los *Mif*^{-/-}, únicamente en el grupo Gest-L la concentración fue mayor en los ratones WT, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 23).

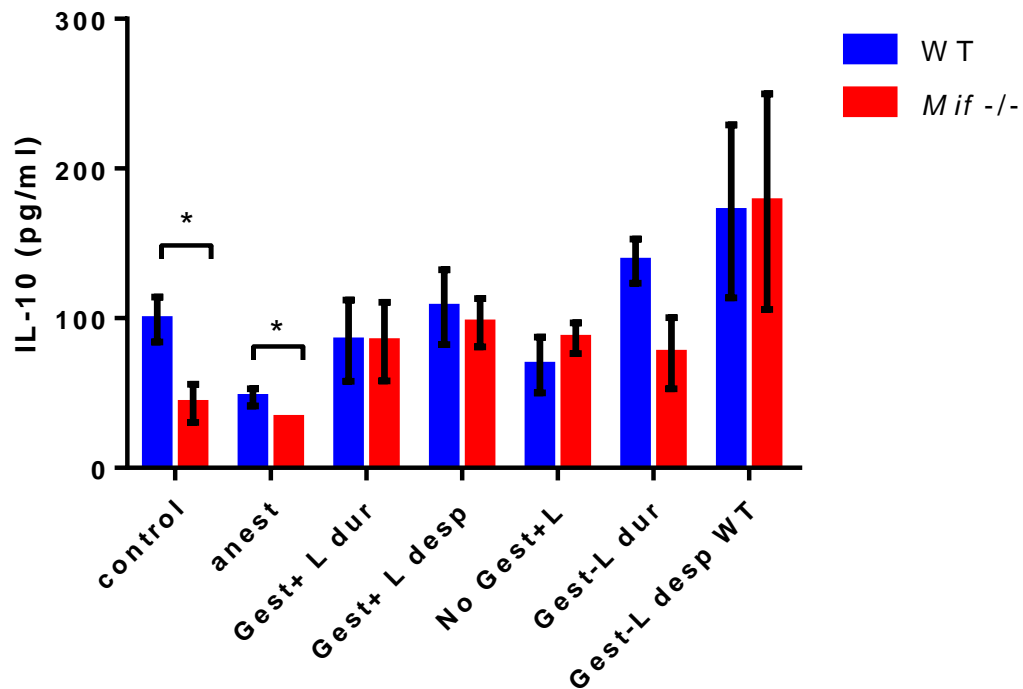


Figura 23. **Comparativo IL-10**

Comparativo de concentraciones de IFN- γ en los 5 grupos experimentales: Control, Anestesia (Anest), gestante con ligadura (Gest+Lig), no gestante con ligadura (No Gest+L) y gestante sin ligadura (Gest-L), en los grupos gestantes se evaluó tanto durante (dur) como después (desp) de la gestación.

* $P < 0.05$

9. Conclusión

En el presente trabajo establecimos periodontitis experimental de manera adecuada en un modelo murino, esto por medio de una modificación a la técnica reportada Abe (2013), utilizando sutura 6-0 de nylon en lugar de la sutura 5-0 de seda propuesta por Abe.

Al observar clínicamente los maxilares de los ratones WT con ligadura, se apreciaron los signos de inflamación y destrucción de tejidos asociados a la enfermedad periodontal, estos signos fueron congruentes con los reportados en el modelo de inducción propuesto por Abe, mientras que en los ratones *Mif*^{-/-} los signos de inflamación fueron menos severos y no hubo destrucción significativa del tejido periodontal.

Tras revisar las concentraciones de citocinas a nivel sistémico, en ratones WT observamos aumentos estadísticamente significativos en citocinas pro-inflamatorias (IL-6 e IFN- γ), los cambios en IL-6 se encontraron respecto al grupo no gestante con ligadura y en IFN- γ en el grupo gestante sin ligadura (Gest-L) respecto a los controles.

En el caso de los ratones *Mif*^{-/-} se observaron aumentos significativos en los niveles de IFN- γ , estas diferencias se encontraron en los grupos con ligadura (Gest +L y No gest+L) con respecto a los controles

El aumento en los niveles de IL-6 e IFN- γ en los grupos con ligadura concuerda con el aumento en citocinas pro-inflamatorias en presencia de enfermedad periodontal descrito por Rossa (2014).

Al comparar los ratones WT contra los ratones *Mif*^{-/-}, encontramos concentraciones similares en ambos grupos, sin embargo, se observaron concentraciones más elevadas de IL-6 en el grupo No Gest+L en los ratones WT y en el grupo Gest-L desp en los ratones *Mif*^{-/-}; en IL-10 las concentraciones en los controles fueron mayores en los ratones WT; finalmente la concentración de IFN- γ en el grupo No Gest+L fue mayor en los ratones *Mif*^{-/-}.

La gestación influyó en las concentraciones de IL-6 en los ratones WT, los cuales presentaron una concentración menor, sin embargo, esta diferencia solo fue significativa estadísticamente en el grupo Gest-L desp. La gestación también influyo en un aumento en las concentraciones de IFN- γ tanto en los ratones WT como en los *Mif*^{-/-}.

El gen de MIF parece influir de manera negativa en el desarrollo severo de la enfermedad periodontal, esto de manera independiente a la gestación.

Estos resultados pueden ser profundizados tras realizarse el análisis local de las concentraciones de citocinas, ya que, los resultados aquí presentados al ser sistémicos, podrían brindar un panorama distinto al comportamiento local de la enfermedad.

10. Referencias

1. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease*. *Periodontology 2000*. 2006;40(1):11-28.
2. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*. 2013;7(5):1016-25.
3. Slavkin HC. Does the mouth put the heart at risk? *The Journal of the American Dental Association*. 1999;130(1):109-13.
4. Bartold PM, McCulloch CA. Information generation and processing systems that regulate periodontal structure and function. *Periodontology 2000*. 2013;63(1):7-13.
5. Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth–epithelial interface in health and disease. *Periodontology 2000*. 2003;31(1):12-31.
6. Webb DA, Mathew L, Culhane JF. 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;14:368.
7. Steffens JP, Wang X, Starr JR, Spolidorio LC, Van Dyke TE, Kantarci A. Associations Between Sex Hormone Levels and Periodontitis in Men: Results From NHANES III. *J Periodontol*. 2015;86(10):1116-25.
8. Eley BM, Manson JD, Soory M. *Periodoncia*: Elsevier España; 2011.
9. Khan SA, Kong EF, Meiller TF, Jabra-Rizk MA. Periodontal diseases: bug induced, host promoted. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):e1004952.
10. Carranza FA, Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR. *Periodontología clínica de Carranza: Actualidades Médicas (AMOLCA)*; 2014.
11. Mariano FS, Sardi JdCO, Duque C, Höfling JF, Gonçalves RB. The role of immune system in the development of periodontal disease: a brief review. *Revista Odonto Ciência*. 2010;25(3):300-5.
12. Piscoya MDBdV, Ximenes RAdA, Silva GMd, Jamelli SR, Coutinho SB. Periodontitis-associated risk factors in pregnant women. *Clinics*. 2012;67(1):27-33.
13. Alonso Rosado A, Pérez Gómez R, Criado Pérez L, Duque Alonso N, Hernández Marcos C, Hernández Martín M, et al. Enfermedades periodontales durante el embarazo y su asociación con parto prematuro y bajo peso al nacimiento: Evidencias y controversias. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2010;22(2):85-9.
14. Morimoto T, Nishihira J, Kohgo T. Immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human gingival tissue and its pathophysiological functions. *Histochemistry and cell biology*. 2003;120(4):293-8.
15. Duan X, Gleason R, Li F, Hosur K, Huang D, Wang H, et al. Sex dimorphism in periodontitis in animal models. *Journal of periodontal research*. 2015.
16. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, Finoti LS, Toffoli GB, Spolidorio DMP, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clinical oral investigations*. 2016;20(6):1203-16.
17. Bain J, Lester S, Henry W, Bishop C, Turnage A, Naftel J, et al. Comparative gender differences in local and systemic concentrations of pro-inflammatory cytokines in rats with experimental periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2009;44(1):133-40.
18. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of Immunological Methods*. 2013;394(1–2):49-54.
19. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular+ StudentConsult*: Elsevier España; 2015.

20. Saavedra Ramírez PG, Vásquez Duque GM, González Naranjo LA. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*. 2011;24:157-66.
21. Kenneth M, Travers P, Walport M. *Inmunología de Janeway*. México: Editorial Mc Graw Hill interamericana. 2009.
22. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*. 2015;23:329-55.
23. Pavon L, Jimenez MDC, Garces ME. *Inmunología Molecular, Celular y Traslacional*: Lippincott Williams & Wilkins; 2016.
24. Lona JMF, Martínez MS, Alarcón GV, Rodas AB, Bello JR. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*. 2013;149(5):521-30.
25. Mata-Espinosa DA, Hernández-Pando R. Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Revista de Investigación Clínica*. 2008;60(5):421-31.
26. Vázquez-Rodríguez S, Bouchan-Valencia P, González-Jiménez MA, Paredes-Vivas LY, Calixto-González R, Cébulo-Vázquez A. Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Perinatol Reprod Hum*. 2011;25(1):39-45.
27. Offenbacher S, Lieff S, Boggess KA, Murtha AP, Madianos PN, Champagne CM, et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Ann Periodontol*. 2001;6(1):164-74.
28. Marsh LM, Cakarova L, Kwapiszewska G, von Wulffen W, Herold S, Seeger W, et al. Surface expression of CD74 by type II alveolar epithelial cells: a potential mechanism for macrophage migration inhibitory factor-induced epithelial repair. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2009;296(3):L442-L52.
29. Ietta F, Todros T, Ticconi C, Piccoli E, Zicari A, Piccione E, et al. Macrophage migration inhibitory factor in human pregnancy and labor. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2002;48(6):404-9.
30. Donn R, Ray D. Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. *Journal of Endocrinology*. 2004;182(1):1-9.
31. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 1999;26(6):335-40.
32. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *Journal of periodontology*. 1991;62(1):59-73.
33. Hawk T, Leary SL, Morris TH. *Formulary for laboratory animals*. Blackwell Publishing. 2005.
34. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013 Aug 30;394(1-2):49-54.
35. Labelle RE, Schaffer EM. The effects of cortisone and induced local factors on the periodontium of the albino rat. *Journal of periodontology*. 1966;37(6):483-90.
36. Björnsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *Journal of periodontal research*. 2003;38(6):543-50.
37. Benzen B, Grauballe MCB, Björnsson M, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, Holmstrup P. A comparison of two models of experimental periodontitis in rats. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*. 2005;32(2):73-80.
38. Gordillo Aguilar AG. Validación de un método para la detección de la gestación mediante la determinación del peso corporal en ratones de la cepa Balb/C. 2013.