



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Odontología

INMUNOEXPRESIÓN DE CÉLULAS T GAMMA-DELTA
($\gamma\delta$) E INTERLEUCINA 17 (IL-17) EN MUCOSA ORAL
SANA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

PRESENTA

Saide Alquicira Rodríguez

TUTORA

Dra. Claudia Patricia Pedraza Zamora

ASESORES

Dra. Ingeborg Becker Fauser

Dr. Higinio Arzate



CDMX

2021

Este proyecto fue financiado por PAPIIT IA205520



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

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser y al Dr. Higinio Arzate por su valiosa colaboración y apoyo técnico en la realización de este proyecto.

A Marco Elías Gudiño Zayas, por su gran apoyo en la parte gráfica y el análisis digital de imágenes de este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la DEPeI, FO, UNAM, por el apoyo técnico en la realización de este proyecto.

Al Programa de Apoyos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA205520) por el apoyo financiero durante la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Guadalupe, por apoyarme incondicionalmente, llenarme de cariño, fortaleza y sabiduría; por siempre creer en mí e impulsarme a seguir adelante. Gracias por todo.

A Marta, por guiar cada uno de mis pasos, ser mi motivación día con día y brindarme todo el amor que solo una madre sabe dar.

A Antonio, por ser siempre incondicional; por enseñarme a ser fuerte y a trabajar para lograr todas mis metas. Tienes plata en el pelo y oro en el corazón.

A Adrián, por cuidarme y acompañarme en todo momento.

A Belén y Marco, por hacer de mí una mujer fuerte e independiente; por darme siempre cariño y lo mejor de ustedes.

A Alma y Enrique, por enseñarme a ser valiente; por cada consejo y palabras de aliento. Gracias por recibirme siempre con los brazos abiertos.

A Erik, por protegerme y hacerme feliz; por amarme como lo haces y estar siempre conmigo. Un paso más juntos.

A Arely, por darme tantas risas y momentos felices; porque tenerte me llena el corazón.

A Mafer, por escucharme e inspirarme a ser mejor persona; por enseñarme todo el cariño y confianza que una amistad puede tener.

A Dani, Dina, Diana y Anaid, por compartir conmigo amistad, cariño y alegría en este camino.

A la Dra. Claudia Pedraza, a quien admiro por ser una gran profesora y un ser humano formidable.

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 4 |
| CAPÍTULO 1 - ANTECEDENTES | 5 |
| Enfermedad Periodontal..... | 5 |
| <i>Epidemiología</i> | 6 |
| <i>Factores de Riesgo</i> | 7 |
| <i>Características Clínicas e Histológicas de la Enfermedad Periodontal</i> | 7 |
| <i>Microbiología de la Enfermedad Periodontal</i> | 9 |
| Clasificación de la enfermedad periodontal..... | 11 |
| <i>Clasificación actual de las enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias de 2017</i> | 11 |
| Métodos de diagnóstico de la enfermedad periodontal..... | 16 |
| Tratamiento de la Enfermedad Periodontal..... | 17 |
| CAPÍTULO 2 | 17 |
| Inmunopatogenia de la enfermedad periodontal..... | 17 |
| <i>Lesión inicial</i> | 17 |
| <i>Lesión temprana</i> | 18 |
| <i>Lesión establecida</i> | 18 |
| <i>Lesión tardía</i> | 19 |
| Respuesta inmune de la enfermedad periodontal..... | 19 |
| <i>Mediadores inflamatorios de la enfermedad periodontal</i> | 20 |
| CAPÍTULO 3 | 21 |
| Células T gamma-delta ($\gamma\delta$)..... | 21 |
| <i>Origen/Ontogenia</i> | 21 |
| <i>Activación</i> | 22 |
| <i>Funciones</i> | 22 |
| Células T $\gamma\delta$ en enfermedades inflamatorias | 23 |
| Células T $\gamma\delta$ y su relación con la enfermedad periodontal..... | 23 |



| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 4 | 24 |
| Interleucina-17 (IL-17)..... | 24 |
| <i>IL-17 y células T $\gamma\delta$</i> | 25 |
| <i>IL-17 y la enfermedad periodontal</i> | 25 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 26 |
| JUSTIFICACIÓN | 26 |
| HIPÓTESIS | 27 |
| Hipótesis nula..... | 27 |
| Hipótesis alterna | 27 |
| OBJETIVOS..... | 28 |
| Objetivo general | 28 |
| Objetivos específicos | 28 |
| TIPO DE ESTUDIO..... | 28 |
| VARIABLES..... | 28 |
| Independientes | 28 |
| Dependientes | 28 |
| UNIVERSO DE ESTUDIO..... | 28 |
| RECURSOS | 29 |
| Físicos | 29 |
| Materiales y equipo | 29 |
| Reactivos | 29 |
| METODOLOGÍA..... | 31 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 31 |
| Obtención de muestras | 31 |
| <i>Criterios de inclusión</i> | 31 |
| <i>Criterios de exclusión</i> | 32 |
| <i>Muestras de tejido gingival</i> | 32 |
| Procesamiento de muestras..... | 32 |
| <i>Fijación y deshidratación</i> | 33 |
| <i>Aclaramiento o Diafanización</i> | 33 |



| | |
|--|-----------|
| <i>Infiltración</i> | 33 |
| <i>Inclusión o Impregnación</i> | 33 |
| <i>Corte y Montaje de la muestra</i> | 33 |
| <i>Tinción de Hematoxilina – Eosina</i> | 33 |
| <i>Diagnóstico histopatológico y clasificación de muestras</i> | 34 |
| <i>Inmunohistoquímica</i> | 36 |
| Análisis microscópico..... | 37 |
| <i>Análisis digital de fotomicrografías</i> | 37 |
| Análisis de datos y estadístico | 40 |
| RESULTADOS | 41 |
| OBTENCIÓN DE MUESTRAS..... | 41 |
| ANÁLISIS HISTOLÓGICO | 41 |
| Diagnóstico histológico (H/E)..... | 41 |
| Inmunohistoquímica..... | 45 |
| ANÁLISIS DE IMÁGENES Y DATOS | 50 |
| Tablas de frecuencia | 50 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 52 |
| T de Student no pareada | 52 |
| Inmunoexpresión de células T $\gamma\delta$ | 55 |
| Inmunoexpresión de IL-17..... | 57 |
| RESUMEN DE RESULTADOS | 60 |
| DISCUSIÓN | 62 |
| CONCLUSIÓN | 68 |
| ANEXOS | 69 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |
| REFERENCIAS DE IMÁGENES..... | 86 |



RESUMEN

La enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte del diente (encía, ligamento periodontal y hueso alveolar). En cuya respuesta inmune participan diferentes citocinas, células innatas y adaptativas. Las células T $\gamma\delta$ combinan inmunidad innata con adaptativa; son fuente importante en la liberación de interleucina 17 (IL-17), citocina proinflamatoria implicada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. La respuesta clínica de los tejidos, ante la presencia de microorganismos patógenos, varía según el tipo de células y citocinas presentes en el infiltrado inflamatorio.

El objetivo de este estudio fue analizar el grado de inflamación histológica relacionada a la presencia de células T $\gamma\delta$ e IL-17 en tejido gingival.

Se analizaron 20 muestras de tejido gingival de pacientes sistémica y periodontalmente sanos, provenientes de cirugías por indicaciones ortodóncicas y/o periodontales con fines estéticos. Se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina. Se realizó tinción H/E para su diagnóstico y obtuvimos un grupo de 6 tejidos sanos y uno de 14 tejidos inflamados. Se realizó inmunohistoquímica para la identificación de células T $\gamma\delta$ e IL-17 y se obtuvieron fotomicrografías, que fueron analizadas con el software Fiji (Image J). Los resultados mostraron una mayor expresión de células T $\gamma\delta$ en el grupo inflamado (81%) respecto a los tejidos sanos (23%). La expresión de IL-17 fue similar en ambos grupos (7% y 8 %).

Concluimos que las células T $\gamma\delta$ e IL-17 se localizaban distribuidas en tejido epitelial y tejido conectivo. La expresión de IL-17 fue similar en todos los tejidos, sin embargo, observamos diferencias significativas en la inmunoexpresión de células T $\gamma\delta$ en los tejidos con inflamación en comparación con el grupo sano; lo que sugiere que las células T $\gamma\delta$ llevan a cabo un papel inmunoregulador en el tejido gingival.

ABSTRACT

Periodontal disease is a chronic inflammatory disease characterized by the destruction of the supporting tissues of the tooth (gingiva, periodontal ligament and alveolar bone), in whose immune response participate different cytokines, innate and adaptive cells. The $\gamma\delta$ T cells combine innate and adaptive immunity; they are an important source of the release of interleukin 17 (IL-17), a pro-inflammatory cytokine involved in the development of inflammatory or autoimmune diseases. The clinical response of tissues to the presence of pathogenic microorganisms varies according to the type of cells and cytokines present in the inflammatory infiltrate.

The objective of this study was to analyze the degree of histological inflammation related to the presence of $\gamma\delta$ and IL-17 T cells in gingival tissue.

20 gingival tissue samples were obtained from systemic and periodontal healthy patients, from surgeries with orthodontic and/or periodontal indications for aesthetic purposes. They were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. H/E staining was performed and we obtained a group of 6 healthy tissues and one of 14 inflamed tissues. Immunohistochemistry was performed for the identification of $\gamma\delta$ T cells and IL-17 and photomicrographs were obtained and analyzed with the Fiji software (Image J). The results showed a higher expression of $\gamma\delta$ T cells in the inflamed group (81%) in comparison to the healthy group (23%). IL-17 expression were similar in both groups (7% and 8 %).

We conclude that $\gamma\delta$ T cells and IL-17 are distributed in epithelial and connective tissues. IL-17 was similar in all tissues, however, we observed statistical differences in the immunoexpression of $\gamma\delta$ T cells in the inflamed tissues in comparison with the healthy ones. This suggest that $\gamma\delta$ T cells play an immunoregulatory role in the gingival tissues.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es caracterizada por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte del diente (encía, ligamento periodontal y hueso alveolar) (1) y que, en algunos pacientes, da como resultado la pérdida de dientes (2); además en casos severos también puede afectar la salud sistémica, al aumentar el riesgo de desarrollar aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes, cáncer, enfermedad cerebrovascular y el parto prematuro de bebés con bajo peso al nacer (3). Constituye una de las enfermedades más importantes y frecuentes en la población. Afecta a un 15% a 20% de los adultos de edad media (35-44 años) y se estima que el 11% de la población mundial se encuentra afectada por periodontitis severa (4); mientras que, alrededor del 30% de la población con edades comprendidas entre los 65 y 74 años no tiene dientes naturales y la enfermedad periodontal es una de las principales causas de esta pérdida (5).

La etiología de esta enfermedad es multifactorial, entre los estos factores se encuentran el microbioma oral, una higiene oral deficiente, tabaquismo (6), diabetes mellitus (7), enfermedades cardiovasculares, trastornos inducidos por medicamentos, estrés, obesidad, así como ciertos síndromes congénitos (tales como síndrome Chediak-Higashi, síndrome de Papillon-Lefèvre, neutropenia y Deficiencia de Adhesión Leucocitaria) (3), osteoporosis, trastornos hematológicos y alteraciones hormonales.

La respuesta inmune llevada a cabo durante el desarrollo de la enfermedad periodontal es compleja; ya que diversos mecanismos innatos y adaptativos de defensa son activados para mantener la homeostasis de los tejidos periodontales. De esta manera, uno de los factores determinantes en la evolución de la enfermedad periodontal es la respuesta inmune del huésped, quien se enfrenta a un complejo muy amplio de microorganismos que se comportan como agentes oportunistas (8), activando una respuesta inmune de tipo innato, donde se sugiere que las células T gamma/delta ($T\gamma\delta$) (células que combinan la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa (9)) y los neutrófilos juegan un papel

importante en la respuesta inflamatoria, al ser células que forman parte de la primera línea de defensa en entrar en contacto con los microorganismos.

La respuesta clínica de los tejidos ante la presencia de bacterias patógenas, se ve determinada y es variable de acuerdo al tipo de células presentes en el infiltrado inflamatorio, así como al tipo y niveles de citocinas secretadas en el microambiente inflamatorio inducido en la enfermedad periodontal.

CAPÍTULO 1 - ANTECEDENTES

Enfermedad Periodontal

La enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por la destrucción progresiva de los tejidos de soporte (encía, ligamento periodontal y hueso alveolar) del órgano dental (1). La historia natural de la enfermedad periodontal, en algunos pacientes, da como resultado la pérdida de dientes (2); además en casos severos también puede afectar la salud sistémica al aumentar el riesgo de desarrollar aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes, cáncer, enfermedad cerebrovascular y el parto prematuro de bebés con bajo peso al nacer (3).

Esta enfermedad no solamente afecta la integridad de los tejidos duros y blandos, sino también la calidad de vida del paciente, causándole una alimentación deficiente, pérdida dental, problemas psicológicos, sociales y económicos, así como una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades sistémicas (2).

La etiología de la enfermedad es multifactorial, aunque se ha demostrado que la presencia de algunos microorganismos Gram negativos específicos en la biopelícula dental subgingival, como *Actinomices sp*, *Veillonella parvula*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* (10), entre otras, juegan un papel importante en el inicio y la progresión de la periodontitis. La severidad de la enfermedad depende de factores ambientales y de riesgo, los cuales pueden ser modificables (higiene oral deficiente, tabaquismo) y no modificables (susceptibilidad, síndromes) (11).

Epidemiología

La enfermedad periodontal constituye una de las enfermedades más importantes y frecuentes en la población. Afecta en un 15 a 20% de los adultos de edad media (35-44 años) y se estima que el 11% de la población mundial se encuentra afectada por periodontitis severa (12); mientras que, alrededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y 74 años no tiene dientes naturales y la enfermedad periodontal es una de las principales causas de esta pérdida (13).

Los países industrializados muestran una baja prevalencia de periodontitis en contraste con las naciones subdesarrolladas y grupos socioeconómicos bajos (14). Aunque esto es indefinido, ya que algunos estudios muestran que la periodontitis se encuentra presente entre 11-15% en poblaciones adultas, tanto de países desarrollados como países en desarrollo (15).

La etnicidad México-americana ha sido fuertemente asociada con un mal estado periodontal (11). Respecto a nuestro país, México, la población se caracteriza por ser diversa en etnia; gran parte de esta población vive en zonas rurales aisladas y de extrema pobreza, por lo que los programas de salud en dichas zonas son deficientes (16). Sin embargo, se sabe que los principales problemas de salud oral son la caries, gingivitis y las enfermedades periodontales.

En el 2008, la Secretaría de Salud realizó un censo en el que se agrupó a las personas por edad. Se encontró que en el grupo de personas de 25 a 44 años se presentaba la mayor incidencia de enfermedades periodontales; mientras que en los grupos 45 a 49 años y de 60 a 64 años hubo una incidencia estable. Se encontró también, que, del total de la población diagnosticada con gingivitis y enfermedades periodontales, las mujeres contribuyeron con la mayor proporción (62%) con un registro de 317, 214 casos nuevos y con una incidencia de 585.1 casos por cada 100 mil habitantes; en lo que corresponde a los hombres (38%), se registraron 196, 242 casos nuevos con una incidencia de 374 casos por cada 100 mil habitantes (17).

Factores de Riesgo

En epidemiología, un factor de riesgo es cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión (13).

En la cavidad oral, la presencia de ciertas bacterias provenientes de la biopelícula dental son esenciales para el inicio de la enfermedad periodontal, pero existen factores predisponentes como la susceptibilidad del huésped, que influyen en la patogénesis de la enfermedad (18). Por ejemplo, la susceptibilidad a la periodontitis se triplica en personas con hiperglucemia, lo que agrava la destrucción del tejido y la periodontitis (3).

Los factores de riesgo identificados para la enfermedad periodontal son los siguientes:

- Higiene oral nula o deficiente.
- Enfermedades sistémicas como diabetes mellitus, hipertensión arterial y obesidad (6).
- Predisposición genética/susceptibilidad del huésped (11).
- Tabaquismo
- Estrés
- Osteoporosis
- Artritis reumatoide
- Alteraciones hormonales femeninas (19, 20).

Características Clínicas e Histológicas de la Enfermedad Periodontal

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social, no solo la ausencia de afecciones o enfermedades.

En el periodonto, salud se describe como un estado de ausencia de inflamación, ya sea asociada a gingivitis o periodontitis (21). En el que podemos observar una arquitectura gingival con forma de filo de cuchillo (festoneado), con un puntilleo con textura de cáscara de naranja (debido a las interdigitaciones entre el tejido conectivo y el epitelio) y con una coloración rosa coral o rosa pálido en poblaciones caucásicas, o con distintos grados de

pigmentación en poblaciones de color. La profundidad de sondeo será de 3 mm o menor, sin presencia de sangrado (22) (Figura 1).

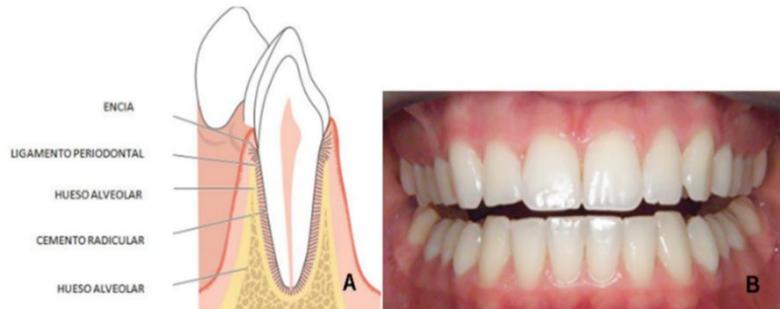


Figura 1 (68). Características de un periodonto en estado de salud. **A.** Esquema que nos muestra la adecuada relación entre los tejidos de soporte y **B.** Fotografía clínica en la cual se puede observar un periodonto sano.

Las características clínicas de la enfermedad periodontal (Figura 2) varían de acuerdo a la severidad y avance de la enfermedad, se puede caracterizar en función de la cantidad de pérdida de inserción. Sin embargo, de forma general se presenta inflamación, enrojecimiento y sangrado de los tejidos blandos, incremento en la producción del fluido crevicular, pérdida ósea e incluso pérdida dentaria (22).

A continuación, se describen las características clínicas de la enfermedad periodontal:

- Gingivitis. Se puede observar la encía con un tono rojo intenso y brillante o azul violáceo. Pérdida del puntilleo y del festoneado debido a la inflamación. Presencia de pseudobolsas y de sangrado al sondeo.
- Periodontitis inicial. Existe una pérdida de inserción de 1 a 2 mm, es decir, la profundidad al sondeo será de 4 a 5 mm.
- Periodontitis moderada. El sondeo, dará como resultado bolsas periodontales con una profundidad de 5 a 6 mm. Puede haber movilidad dental grado I o II.
- Periodontitis severa. En estos casos la pérdida de inserción será de 5mm aproximadamente, lo que dará una profundidad al sondeo de 7 mm o más. Por lo que puede existir movilidad dental grado III o bien, pérdida dental.



Figura 2 (69). Progresión de la enfermedad periodontal, desde el (A) periodonto sano, (B) gingivitis, en donde clínicamente la encía se aprecia de un color rojo brillante, bordes agrandados con pérdida del festoneado y apariencia lisa. En el estado inicial de la EP se pueden encontrar bolsas de 4-5 mm. (C) Periodontitis moderada, con bolsas de 5-6 mm aprox. y, (D) periodontitis severa, en la cual hay presencia de bolsas de 7 mm en adelante.

Se ha reportado que, en encía ligeramente inflamada, hay presencia de un infiltrado leucocitario en el tejido conectivo subyacente, así como, linfocitos, neutrófilos, macrófagos, aumento de la distribución de las fibras colágenas y alteraciones de los vasos sanguíneos.

Cuando la inflamación es moderada o intensa, es posible apreciar un mayor número de células plasmáticas (o plasmocitos) que invaden el tejido conectivo por lo que el epitelio de unión desarrolla prolongaciones que protruyen hacia el tejido conectivo fomentando la destrucción de fibras colágenas alrededor del infiltrado plasmocitario (23).

Una vez establecida la periodontitis, se forma un infiltrado inflamatorio constituido por diferentes tipos de células como macrófagos, neutrófilos y linfocitos, que producirán distintas citocinas y otros mediadores biológicos responsables de la inmunopatología de diversas enfermedades inflamatorias (18).

Microbiología de la Enfermedad Periodontal

Dentro de los microorganismos responsables del desarrollo de la enfermedad periodontal se encuentran: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*, las cuales forman un consorcio en el biopelícula dental subgingival y son consideradas como las principales bacterias periodontopatógenas. Otros microorganismos que han sido implicados como especies predominantes en el proceso de la enfermedad son: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra* y *Eikenella corrodens* (10). En la

periodontitis, el inicio de la enfermedad se da con la colonización e invasión de estas especies patógenas en los tejidos y continua con la interacción de sus subproductos con las células de la respuesta inmune del huésped, lo que provoca directa e indirectamente la degradación de los tejidos del periodonto, dando como resultando su destrucción (24).

A continuación, se muestra el actual sistema de clasificación de las bacterias responsables de la enfermedad periodontal, de acuerdo al complejo al que pertenecen (10) (Tabla 1); así como al cuadro clínico que desarrollan dichas bacterias (Tabla 2).

| Tabla 1. Clasificación bacteriana (10) | | |
|---|---|---|
| Complejo | Bacteria | Papel en la enfermedad periodontal |
| Amarillo | <i>Streptococcus sanguis</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus intermedius</i> | Colonizadores primarios |
| Verde | <i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Capnocytophaga ochracea</i> <i>Capnocytophaga sputigena</i> <i>Campylobacter concisus</i> | Colonizadores secundarios |
| Naranja | <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Streptococcus constellatus</i> <i>Eubacterium nodatum</i> <i>Campylobacter showae</i> <i>Campylobacter gracilis</i> <i>Campylobacter rectus</i> | Colonizadores puente. Antecedan a las bacterias del complejo rojo |
| Morado | <i>Veillonella parvula</i> <i>Actinomyces odontolyticus</i> | Colonizadores puente entre el complejo naranja y el complejo rojo |
| Rojo | <i>Tannerella forsythia</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Treponema denticola</i> | Colonizadores secundarios Patógenos reconocidos, asociados con el sangrado al sondeo |

| Tabla 2. Especies bacterianas involucradas en diferentes condiciones clínicas (10) | |
|--|---|
| Enfermedad | Bacteria involucrada |
| Gingivitis | <i>Actinomyces sp.</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Susubacterium nucleatum</i> |
| Periodontitis | <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Treponema denticola</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Fusubacterium nucleatum</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Selenomonas noxia</i> |

Clasificación de la enfermedad periodontal

Durante años, los investigadores y clínicos en periodoncia, han reconocido que existen diferencias en la presentación de las enfermedades periodontales, por lo que estas se han clasificado en base a las características clínicas y teorías sobre su etiología. Sin embargo, una clasificación, no debe considerarse como una estructura permanente, debe ser adaptable para cambiar y evolucionar con el desarrollo de nuevos conocimientos.

Clasificación actual de las enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias de 2017

En 2017 se realizó un nuevo esquema de clasificación para las enfermedades y condiciones periodontales así como las periimplantarias en el contexto del World Workshop del 2017 por parte de un comité formado por las dos organizaciones científicas más importantes a nivel mundial en el ámbito periodontal: la Federación Europea de Periodoncia (EFP) y la Academia Americana de Periodoncia (AAP); las cuales se reunieron para encontrar un consenso para aprobar una clasificación actual global y poder brindar una mejor comprensión de estas enfermedades y condiciones, bajo la cual puedan basarse tanto clínicos como investigadores para profundizar sobre la etiología, patogénesis, historia natural y tratamiento.

Una de las principales novedades de esta clasificación es la catalogación de la periodontitis en estadios y grados (clasificando a la periodontitis en cuatro estadios y tres grados) con lo que desaparecen los conceptos de periodontitis agresiva y periodontitis crónica, además de la incorporación del término de salud periodontal y gingival, así como el de salud prístina, el cual nos dice que es algo excepcional y limitado en gran medida a los libros de texto (<5% de la población) (25). Esta clasificación en estadios se establece dependiendo de su severidad y la complejidad de su tratamiento, y en grados de acuerdo a su agresividad y a los factores de riesgo que puede presentar el paciente. Por otro lado, la nueva clasificación cubre, además de todas las enfermedades periodontales y periimplantarias, las condiciones que se asocian a distintas enfermedades y que son frecuentemente tratadas en la práctica clínica, como los abscesos periodontales e igualmente se introduce el concepto de enfermedades periimplantarias. Esta clasificación se muestra a continuación:

- Salud periodontal, enfermedades y condiciones gingivales
 1. Salud periodontal y gingival
 - a. Salud gingival clínica en un periodonto intacto
 - b. Salud gingival clínica en un periodonto reducido
 - I. Paciente de periodontitis estable
 - II. Paciente sin periodontitis
 2. Gingivitis inducida por biopelícula dental
 - a. Asociada solamente con la biopelícula dental
 - b. Mediada por factores de riesgo sistémicos o locales
 - c. Agrandamiento gingival inducido por medicamentos
 3. Enfermedades gingivales no inducidas por biopelícula dental
 - a. Trastornos genéticos/del desarrollo
 - b. Infecciones específicas
 - c. Condiciones inflamatorias e inmunes
 - d. Procesos reactivos

- e. Neoplasias
- f. Enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas
- g. Lesiones traumáticas
- h. Pigmentación gingival
 - Formas de periodontitis
- 1. Enfermedades periodontales necrosantes
 - a. Gingivitis necrosante
 - b. Periodontitis necrosante
 - c. Estomatitis necrosante

2. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas

La clasificación de estas condiciones debe basarse en la enfermedad sistémica primaria de acuerdo a los códigos de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas de Salud Relacionados (ICD).

3. Periodontitis

a. Estadios: Basados en la Severidad (nivel de inserción clínico interdental (CAL) en el sitio con mayor pérdida; pérdida ósea radiográfica y pérdida dental) y Complejidad de Manejo (profundidad al sondeo, patrón de pérdida ósea, lesiones de furca, número de dientes remanentes, movilidad dental, defectos del reborde alveolar, disfunción masticatoria).

I. Estadio I: Periodontitis Inicial

II. Estadio II: Periodontitis Moderada

III. Estadio III: Periodontitis Severa con potencial para pérdida dental adicional

IV. Estadio IV: Periodontitis Severa con potencial para pérdida de la dentición

b. Extensión y distribución: localizada (<30% de los dientes); generalizada (>30% de los dientes); distribución molar-incisivo

c. Grados: Evidencia o riesgo de progresión rápida (evidencia con radiografías periapicales o pérdida de nivel de inserción (NIC), o directa (proporción pérdida

ósea/edad)), respuesta anticipada al tratamiento y efectos en la salud sistémica (fenotipo, tabaquismo, hiperglicemia).

I. Grado A: Tasa lenta de progresión

II. Grado B: Tasa moderada de progresión

III. Grado C: Tasa rápida de progresión

- Manifestaciones periodontales de las enfermedades sistémicas y condiciones del desarrollo y adquirida

1. Enfermedades sistémicas y condiciones que afectan los tejidos de soporte periodontal

2. Otras condiciones periodontales

a. Abscesos periodontales

b. Lesiones endodóncico-periodontales

3. Deformidades mucogingivales y condiciones alrededor de los dientes

a. Fenotipo gingival

b. Recesión gingival/de tejido blando

c. Falta de encía

d. Profundidad vestibular reducida

e. Frenillo aberrante/posición del músculo

f. Exceso gingival

g. Color anormal

h. Condición de la superficie radicular expuesta

4. Fuerzas oclusales traumáticas

a. Trauma oclusal primario

b. Trauma oclusal secundario

c. Fuerzas ortodóncicas

5. Factores protésicos y dentales que modifican o predisponen a las enfermedades gingivales/periodontales inducidas por placa

a. Factores localizados relacionados con dientes

b. Factores localizados relacionados con prótesis dentales

- Enfermedades y condiciones periimplantarias

1. Salud periimplantarias
2. Mucositis periimplantaria
3. Periimplantitis
4. Deficiencias de los tejidos blandos y duros periimplantarios

Tabla 3. Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias 2017 (26, 27)

| Enfermedades y condiciones periodontales | | | |
|---|---|---|--|
| Salud periodontal, Enfermedades y condiciones gingivales | Periodontitis | Otras condiciones que afectan el periodonto | |
| <p>Salud gingival y periodontal</p> <p>Gingivitis: inducida por biopelícula periodontal</p> <p>Enfermedades gingivales: no inducidas por biopelícula dental</p> | <p>Periodontitis</p> <p>Enfermedades necrosantes periodontales</p> <p>Periodontitis como manifestaciones de enfermedades sistémicas</p> | <p>Enfermedades o condiciones sistémicas que afectan los tejidos de soporte periodontal</p> <p>Abscesos periodontales y lesiones periodontales-endodóncicas</p> <p>Condiciones y deformidades mucogingivales</p> <p>Fuerzas traumáticas oclusales</p> <p>Factores relacionados al diente y prótesis</p> | |
| Enfermedades y condiciones periimplantarias | | | |
| Salud periimplantaria | Mucositis periimplantaria | Periimplantitis | Deficiencias de los tejidos blandos y duros periimplantarios |

Métodos de diagnóstico de la enfermedad periodontal

El diagnóstico, es el reconocimiento de la presencia de una enfermedad. Para dar un diagnóstico de enfermedad periodontal, es necesario conocer el periodonto en estado de salud. Mayoritariamente, el diagnóstico de enfermedad periodontal se realiza mediante la clínica, requiere el registro de variables (28); reconociendo los diferentes signos y síntomas que muestran una ausencia de salud. Aunque, algunos autores reconocen que existen métodos bioquímicos, los cuales se realizan en laboratorio y son auxiliares de diagnóstico. Algunos de estos métodos son:

- Sondeo periodontal. La sonda periodontal es el principal instrumento de evaluación en periodoncia. Este instrumento ha evolucionado según la necesidad de precisión en la medición del nivel de inserción (NI) (29). El sondeo periodontal es entonces, la unidad de medida que determina la profundidad en milímetros del surco o bien, la existencia de bolsa periodontal, sangrado o supuración. Se evalúan seis sitios por diente (mesial, medio y distal, por vestibular y palatino/lingual), tomando como referencia el margen gingival (30).
- Muestras a partir del fluido crevicular. El fluido crevicular contiene enzimas, células descamadas y derivados del epitelio. Obteniendo una muestra de este fluido se puede determinar la presencia de células y marcadores de la inflamación asociados a periodontitis. El fluido crevicular se puede obtener por medio de micropipetas, microjeringas y tiras de plástico o papel (31).
- Hibridaciones DNA-DNA (Checkerboard). Es una técnica que consiste en identificar hasta 40 especies bacterianas a través de su genoma. Esto se logra colocando en una membrana dentro de un miniblotteder, las muestras de DNA de las especies bacterianas, posteriormente la membrana se gira 90° y se colocan sondas genómicas en el mismo dispositivo (32).

Tratamiento de la Enfermedad Periodontal

El tratamiento se enfoca fundamentalmente en el control de la infección y reducción de la inflamación. Generalmente, se realiza por fases una vez que se determina un diagnóstico:

- Fase I: consiste en realizar control personal de placa, así como la eliminación de cálculo y raspados y alisados radicular.
- Fase II: son procedimientos quirúrgicos periodontales, que tienen como finalidad eliminar el tejido que continúa dañado o bien, regenerar el tejido perdido.
- Mantenimiento periodontal: es la evaluación de los tejidos después de haber sido tratados, mediante la exploración, el sondeo y la fase I.

CAPÍTULO 2

Inmunopatogenia de la enfermedad periodontal

La patogenia es una serie de acontecimientos celulares y tisulares, los cuales llevan al desarrollo de alguna enfermedad. En el caso de la enfermedad periodontal Page y Schroeder en 1976 (33) desarrollaron un sistema para clasificar en cuatro etapas los cambios clínicos e histológicos de la enfermedad: las lesiones gingivales iniciales, tempranas, establecidas y una lesión periodontal avanzada o tardía.

Lesión inicial

Aparece de dos a cuatro días después de la acumulación de la biopelícula dental en el surco gingival; no es una lesión clínicamente visible, únicamente puede ser observada histológicamente, en donde se podrá observar el epitelio de unión y la parte más coronal del tejido conectivo, así como dilatación de las arteriolas, capilares y vénulas del plexo dento-gingival; situación que se conoce como edema (formado a consecuencia de la interacción del ácido lipoteicoico y los péptidoglicanos -componentes de la pared celular- de los colonizadores tempranos con el sistema del complemento del huésped). En esta lesión inicial existe también, un mayor flujo de líquido crevicular y migración de neutrófilos

polimorfonucleares (PMNs) hacia el surco gingival, sitio en el que estas células producen y liberan diversas citocinas como la IL-17, la cual, puede inducir la llegada de células inflamatorias. El infiltrado inflamatorio formado por proteínas séricas y células inflamatorias ocupa en este momento del 5% al 10% del tejido conectivo gingival debajo del epitelio (23, 34).

Lesión temprana

Aparece después de 7 días de la acumulación de la biopelícula dental, clínicamente es visible la presencia de edema e histológicamente un infiltrado de leucocitos mononucleares se desarrolla en el sitio, los vasos debajo del epitelio de unión permanecen dilatados y el número aumenta debido a la formación de vénulas postcapilares. Existe un número escaso de células plasmáticas y predominan en la periferia los linfocitos, como lo son las células T $\gamma\delta$ y los macrófagos, liberando citocinas como IL-17, la cual puede inducir la llegada de otras citocinas proinflamatorias como IL-8. La naturaleza del líquido del surco gingival cambia de líquido intersticial a exudado inflamatorio. En esta etapa, el infiltrado inflamatorio ocupa aproximadamente el 15% del tejido conectivo gingival (23, 24).

Lesión establecida

Después de 2 o 3 semanas de la acumulación de la biopelícula dental, se considera la presencia de una lesión establecida, en la cual clínicamente habrá una inflamación edematosa, considerada como una gingivitis establecida; histológicamente habrá un aumento en el tamaño del área afectada, el epitelio de unión ya no está íntimamente adherido a la superficie dentaria, dando como resultado una bolsa periodontal, tejido en el cual habrá un predominio de células plasmáticas y linfocitos. En la periferia de la lesión (lámina propia de la bolsa gingival) estarán presentes macrófagos y linfocitos.

El surco gingival se profundiza y la porción coronal del epitelio de unión se convierte en epitelio de la bolsa, el cual no está unido a la superficie del diente y en cuyo infiltrado inflamatorio habrá leucocitos y predominaran neutrófilos, que eventualmente migran a través del epitelio hacia la bolsa (23, 24).

Lesión tardía

Las características de la lesión tardía son las mismas que las de la lesión establecida. La diferencia principal radica en la pérdida de inserción, la cual es mayor histológicamente y clínicamente es evidente. Así como también, la destrucción ósea y la pérdida de ligamento periodontal (23, 24).

Respuesta inmune de la enfermedad periodontal

La inmunidad es el acto de protección del huésped ante la enfermedad. De forma más específica, frente a las enfermedades infecciosas. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario y a la respuesta de este sistema se le llama respuesta inmune.

La inmunidad innata (también llamada natural o nativa) es la primera línea de defensa del huésped, está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos, los cuales existen incluso antes de que se desarrolle la infección. Producen respuestas rápidas a los microorganismos. Los componentes principales son: barreras físicas y químicas, células fagocíticas, células productoras de citocinas y proteínas plasmáticas (principalmente el sistema del complemento). En el periodonto, la inmunidad innata incluye las barreras físicas, como lo es la superficie epitelial, cuyas células son el primer contacto con los microorganismos, por lo que responden a la adhesión y colonización bacteriana de la región dentogingival mediante diferentes mecanismos, como son:

- Producir o liberar citocinas y otras moléculas que destruyen a los microorganismos
- Liberar moléculas capaces de inducir o incrementar la inflamación, como las interleucinas.
- Aumento de la expresión de las moléculas de la superficie, como citocinas y quimiotácticos que atraen a los linfocitos de la región.

La inmunidad adaptativa (también llamada específica o adquirida) se estimula tras la exposición a agentes infecciosos. Se caracteriza por ser capaz de distinguir diferentes

sustancias, a lo que se llama especificidad. Así como también, tiene capacidad de memoria, respondiendo de manera exacta a exposiciones repetidas. Los componentes principales son los linfocitos y sus productos.

Esta respuesta inmune se divide en dos partes: respuesta inmune humoral, donde en presencia de enfermedad periodontal los anticuerpos estarán dirigidos a microorganismos específicos de la cavidad oral; y la respuesta inmune celular, que se inicia cuando un antígeno de la biopelícula dental subgingival penetra en el tejido conectivo a través del epitelio de unión. Las células presentadoras de antígenos, procesan el antígeno y lo alteran a modo de que pueda ser reconocido por el sistema inmune. Como ocurre en la enfermedad periodontal, donde la destrucción de los tejidos es el resultado de las enzimas microbianas que se depositan directamente en el tejido, así como un resultado de la reacción inflamatoria o de la respuesta inmune del huésped a estas enzimas (22).

Mediadores inflamatorios de la enfermedad periodontal

En la enfermedad periodontal hay un constante estado de inflamación, en el cual, las células liberan diferentes mediadores que regulan esta condición, ejemplo de ellos son:

- Prostaglandinas (PGEs). Son derivados del ácido araquidónico, poseen diversas funciones, destacando la mediación del mecanismo de la inflamación. Se han descrito implicadas en la patogenia de la enfermedad periodontal (35).
- Proteinasas. La liberación de proteinasas en el área gingival y crevicular promueve las reacciones inflamatorias y contribuye a la degradación tisular.
- Inhibidores de la proteinasa. Son moduladores de la función de las proteinasas, dificultan el proceso inflamatorio en el surco gingival.
- Metaloproteinasas de la matriz. Se encuentran asociadas con la renovación del tejido, así como con la gingivitis, además de que participan en la degradación de los tejidos periodontales. Las células de los tejidos del periodonto, son capaces de producir colagenasa, la cual se encuentra en altas

concentraciones en los tejidos gingivales inflamados en comparación con los tejidos gingivales sanos.

- Citocinas. Son proteínas solubles secretadas por células. Están presentes en la iniciación y mantenimiento de la inflamación. Ejemplos de ellas son:
 - Factor de Necrosis Tumoral (TFN por sus siglas en inglés). Como TFN α , que regula el mecanismo de la inflamación en la enfermedad periodontal.
 - Interleucinas (IL). Participan en la comunicación de células hacia la respuesta inflamatoria. Como ocurre con las células T $\gamma\delta$, las cuales al interactuar con el antígeno liberan IL-17, citocina que se ha visto presente en la respuesta inflamatoria de diversas enfermedades (36).

CAPÍTULO 3

Células T gamma-delta ($\gamma\delta$)

Las células T o linfocitos T, son los componentes principales del sistema inmune adaptativo, expresan receptores para el antígeno. Como se mencionó anteriormente, esta respuesta inmune se caracteriza por tener capacidad de memoria y especificidad, por lo que dichas células pueden reconocer antígenos específicos (37), expresando receptores distribuidos de forma clonal.

Los linfocitos T se dividen en convencionales y no convencionales, cuya diferenciación dependerá de su función y expresión del receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés). Las células T convencionales expresan la variante $\alpha\beta$ del TCR, junto con el correceptor CD4 o CD8 $\alpha\beta$. Sin embargo, las células T no convencionales pueden expresar TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$ (38). Las células T $\gamma\delta$ forman parte del grupo de células no convencionales del sistema inmune, ya que unen características del sistema inmune innato y adaptativo.

Origen/Ontogenia

Las células T $\gamma\delta$ surgen de una célula progenitora hematopoyética, se forman y alcanzan la maduración en el timo. Después, circulan a los órganos linfáticos secundarios (bazo, ganglios linfáticos, tejidos linfáticos asociados a mucosas) a través de la sangre.

Además de migrar también a tejidos periféricos como peritoneo, pulmones y tractos genitales (38).

Las células T $\gamma\delta$, son las primeras células inmunes que se encuentran en el feto y proporcionan inmunidad a los recién nacidos antes de la activación del sistema inmunitario adaptativo. Representan aproximadamente entre el 3 a 5 % del total de las células del sistema inmune que se encuentran en tejidos linfoides secundarios y en la circulación sanguínea. Sin embargo, se encuentran mayoritariamente en mucosas y epitelios, especialmente en el intestino, sitio en el cual fueron descritas por primera vez (36).

Activación

Al presentar funciones de la inmunidad innata y adaptativa, las células T $\gamma\delta$ pueden ser activadas a través de una CPA mediante un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Aunque también pueden ser activadas a través de un estímulo directo dado por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) mediante la expresión de receptores tipo Toll (TLR) y receptores tipo NOD (NLR). Una vez activadas, pueden producir diferentes citocinas como son IL-17, IL-5 e IL-13 (36).

Funciones

Los linfocitos T $\gamma\delta$ tienen como principal función la cooperación y citotoxicidad, proporcionando una fuente inmediata de citocinas y quimiocinas. Además de funcionar como células presentadoras de antígeno (CPA), reflejando una naturaleza única en la interacción del TCR con el antígeno (39).

Las células T $\gamma\delta$ pueden contribuir a la respuesta inmune contra tumores como linfomas, mielomas, melanomas en mama, colon, pulmón, ovario y cáncer de próstata. Esto, directamente a través de su actividad citotóxica o indirectamente mediante la estimulación o regulación de las funciones biológicas de otros tipos de células, las cuales son requeridas para el inicio de la respuesta inmune antitumoral, como son las células dendríticas y las células T CD8 citotóxicas (40).

Por otro lado, se sabe que las células T $\gamma\delta$ proporcionan inmunotolerancia, produciendo IL-10 (interleucina-10) y TGF- β (factor de crecimiento transformante β) (41). Así como también, se ha encontrado que estas células pueden expresar CD161, una lectina de tipo C, que se encuentra involucrada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias (42).

Las células T $\gamma\delta$ desempeñan un papel patológico en ciertas enfermedades autoinmunes, donde proporcionan una fuente importante de IL-17, citocina relacionada con el desarrollo de enfermedades como encefalomiелitis, artritis reumatoide, colitis y psoriasis (36).

Células T $\gamma\delta$ en enfermedades inflamatorias

Las células T $\gamma\delta$ poseen diversas funciones y pueden estar involucradas en el desarrollo de diversas enfermedades, ejemplos de ellas son las autoinmunes, como encefalomiелitis, artritis y colitis, debido a su activación por proteínas de choque térmico y al incremento en la producción de IL-17 (36). En la mucosa intestinal, desempeñan un papel importante en la homeostasis y en la curación de la mucosa en caso de enfermedad inflamatoria intestinal (38). En pulmones, las células T $\gamma\delta$ tienen una mayor proliferación frente a *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que, en pacientes que padecen fibrosis quística aumentan las cantidades en sangre periférica (43).

Aunque las células T $\gamma\delta$ poseen funciones antitumorales, algunos autores describen que al ser una fuente de IL-17 promueven el desarrollo de cáncer, ya que se ha descrito que esta citocina colabora en la angiogénesis de tumores de vesícula biliar, gástricos y de pulmón. Por otra parte, las células T $\gamma\delta$ fomentan el aumento de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), quienes facilitan la metástasis (44).

Células T $\gamma\delta$ y su relación con la enfermedad periodontal

En condiciones de salud, las células T $\gamma\delta$ se pueden encontrar mayoritariamente en el epitelio de unión ya que este se encuentra cercano al de la biopelícula dental (45); existe una interacción entre las células T $\gamma\delta$ activadas y la microbiota oral residente, dando como

resultado una homeostasis en los tejidos gingivales (46). En el caso la periodontitis el mayor infiltrado se encuentra en el tejido conectivo, mientras que, en gingivitis, únicamente en el epitelio, esto fue descrito en 1995 por Gemmell, quien en su estudio describe que las células T $\gamma\delta$ se encuentran presentes en la enfermedad periodontal en proporciones anormales en comparación con otras células linfocitarias (47).

CAPÍTULO 4

Interleucina-17 (IL-17)

Las interleucinas son pequeñas moléculas peptídicas. Son citocinas producidas por diferentes células que actúan mediando interacciones complejas entre las células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Así como también, colaboran en la diferenciación, maduración y comunicación de células del sistema inmunitario (las funciones dependerán del tipo de citocina). IL-17 es una citocina proinflamatoria que regula la respuesta inmune innata y adaptativa, posee un peso aproximado de 35kDa.

La familia de citocinas de IL-17 es un complejo que está formado por IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también conocida como IL-25) e IL-17F. Estas citocinas tienen una estructura dimérica, es decir, que son un complejo constituido por dos macromoléculas; de esta familia, IL-17A e IL-17F poseen una estructura homodimérica e IL-17A/F es heterodimérica (48). Las citocinas más estudiadas de este complejo son IL-17A e IL-17F. Se sabe que IL-17A participa en el desarrollo de la autoinmunidad, inflamación e inmunidad tumoral, además de colaborar en la respuesta del huésped contra infecciones bacterianas y fúngicas, mientras que, IL-17F se encuentra involucrada en la inmunidad de mucosas (49).

IL-17 reconoce a los receptores IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. Los cuales son proteínas transmembrana de tipo I. De estos receptores, IL-17RA muestra una mayor afinidad por IL-17A, mientras que, el IL-17RC es afín a IL-17F (50).

Como se mencionó anteriormente, las citocinas son secretadas por diversas células. En este caso, IL-17 es producida por gran variedad de células del sistema inmune innato,

como son: células Th17, células T $\gamma\delta$, NKT, NK, células T CD8, células B (51), neutrófilos y monocitos (52).

IL-17 y células T $\gamma\delta$

Las células T se caracterizan por la adquisición de nuevos perfiles de producción de citoquinas activadas por patógenos del sistema inmune innato (53).

Las células T $\gamma\delta$ son una de las fuentes más importantes de producción de IL-17, cuando la IL-17 es secretada por las células T $\gamma\delta$ tiene como principal función la defensa de las mucosas contra infecciones por bacterias hongos y parásitos (36).

IL-17 y la enfermedad periodontal

La IL-17 es una de las citocinas más estudiadas en la inmunología. Como se mencionó anteriormente, es una citocina que juega un papel clave en la activación y reclutamiento de células de la inmunidad; como lo hace con los neutrófilos y células T, las cuales llegan al sitio de lesión o infección mediante señalización de otras citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-8), las cuales, en el caso de los tejidos periodontales, son liberadas por los macrófagos y los fibroblastos a través del estímulo de IL-17 (54).

Como sabemos, IL-17 es una citocina que se encuentra involucrada con el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias o autoinmunes. En este caso, es de particular interés en la patogénesis de la periodontitis debido a su participación en la respuesta inflamatoria, induciendo la producción de IL-1 β en los osteoblastos, así como la expresión del activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa B (RANKL) en las mismas células. También, se ha visto involucrada en la diferenciación y activación de los osteoclastos, los cuales influyen en la resorción ósea (55). Sin embargo, IL-17 participa en la inmunidad antimicrobiana protectora, pudiendo inducir la producción de péptidos antimicrobianos considerados protectores en la periodontitis (56).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad periodontal, según la OMS es el segundo padecimiento más común de la cavidad oral, seguida de la caries dental. Es una enfermedad causada por múltiples factores, siendo el principal una higiene oral deficiente. Afecta principalmente a adultos mayores de 35 años y se estima que el 11% de la población mundial se encuentra afectada por periodontitis.

El progreso de la enfermedad periodontal, puede llevar a la destrucción de los tejidos y a la pérdida dental; ocasionado por un estado de inflamación crónica, debido a la presencia de bacterias periodontopatógenas.

La respuesta inmune en la enfermedad periodontal es variable entre individuos sistémicamente sanos. En el periodonto, la inmunidad innata incluye las barreras físicas, como lo es la superficie epitelial, la cual está conformada por diferentes tipos de células estructurales e inmunes, dentro de las cuales se encuentran las células T $\gamma\delta$, que forman parte del primer contacto con los microorganismos de la biopelícula oral. Por lo que responden a la adhesión y colonización bacteriana de la región dentogingival mediante diferentes mecanismos, como la liberación de citocinas, por ejemplo, la IL-17, que contribuye a la destrucción de los microorganismos. Existen diversas etapas en la evolución de la enfermedad periodontal, las cuales se diferencian por tener diferentes características clínicas e histológicas; por lo que el tipo de células inmunes activadas durante el proceso inflamatorio determina la evolución del paciente.

JUSTIFICACIÓN

Las células T $\gamma\delta$ son células T de tipo innato, no convencionales, que también reúnen características de tipo adaptativo. Se localizan principalmente en mucosas y tejidos de barrera, dentro de sus funciones se encuentra la cooperación en la inmunoregulación y citotoxicidad, proporcionando una fuente inmediata de citocinas y quimiocinas; además de funcionar como células presentadoras de antígeno. Por otro lado, la IL-17 es una citocina

proinflamatoria producida por varios tipos celulares, incluyendo a las células T $\gamma\delta$, las cuales son una de las fuentes más importantes de producción de esta citocina.

Diferentes microorganismos presentes en la biopelícula de cavidad oral y diferentes factores propios del huésped son responsables del desarrollo de la enfermedad periodontal. Entre estos tenemos la respuesta inmune y los tipos celulares activados, los cuales pueden llevar a un estado de inmunotolerancia o una activación de la respuesta inflamatoria de manera crónica, lo que activará el reclutamiento de diferentes células inflamatorias y la producción de distintas citocinas. Por esta razón, es importante conocer la función que presentan las células T $\gamma\delta$, al ser parte de las primeras células innatas que se activan ante la presencia de microorganismos o daño tisular; además es importante conocer si la IL-17 es secretada por las células T $\gamma\delta$ de manera diferencial en tejidos clínicamente sanos pero que presentan o no inflamación a nivel histológico, y así poder relacionar si el grado de inflamación presente en los tejidos está influenciado por estos factores.

HIPÓTESIS

El grado de inflamación histológica presente en tejidos gingivales está relacionado con la expresión de células T $\gamma\delta$ e IL-17, donde una mayor expresión de dichos marcadores promueve un estado inflamatorio en etapas iniciales de la enfermedad.

Hipótesis nula

No existen diferencias en la expresión de células T $\gamma\delta$ e IL-17 entre el grupo de tejidos histológicamente sanos en comparación con los tejidos inflamados.

Hipótesis alterna

La expresión de células T $\gamma\delta$ e IL-17 es diferente entre el grupo de tejidos histológicamente sanos en comparación con los inflamados.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el grado de inflamación histológica relacionada a la presencia de células T $\gamma\delta$ e interleucina 17 (IL-17) en muestras de tejidos gingivales de pacientes periodontalmente sanos sin presencia de enfermedades sistémicas.

Objetivos específicos

- Determinar los niveles de expresión de IL-17 en tejidos gingivales histológicamente sanos e inflamados.
- Analizar la distribución microanatómica de las células T $\gamma\delta$ y de IL-17 dentro de los tejidos gingivales histológicamente sanos y con inflamación.
- Correlacionar la expresión de células T $\gamma\delta$ y de IL-17 respecto al grado de inflamación histológica de los tejidos periodontales sanos e inflamados mediante el análisis digital.

TIPO DE ESTUDIO

Transversal, descriptivo – observacional.

VARIABLES

Independientes

- Tejidos histológicamente sanos
- Tejidos histológicamente inflamados

Dependientes

- Presencia de células T $\gamma\delta$.
- Expresión de interleucina 17.

UNIVERSO DE ESTUDIO

La población correspondiente a este estudio estuvo conformada por 20 muestras de tejidos gingivales clínicamente sanos provenientes de la clínica de Periodoncia en la DEPeI de la Facultad de Odontología de la UNAM; de pacientes sistémica y periodontalmente

sanos, que no recibieron terapia periodontal previa y que no recibieron tratamiento con antibióticos los 3 meses anteriores a la toma de la biopsia.

RECURSOS

Físicos

- Laboratorio de Biología Periodontal, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.
- Laboratorio de Inmunoparasitología, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM- Hospital General de México.

Materiales y equipo

- Portaobjetos tratados con L-polyisina
- Cubreobjetos
- Plataforma térmica de agitación
- Cronómetro
- Probetas
- Matraces
- Tubos eppendorf de 1, 15 y 50 ml
- Pipetas de 2, 20, 200 y 1000 μ l
- Puntas para pipetas
- Pipetas pasteur
- Cámara húmeda para inmunohistoquímica
- Coplins
- Plumón hidrofóbico
- Microscopio

Reactivos

- Xilol
- Alcohol 96°, 80°, 70°
- Buffer de fosfatos

- Peróxido de hidrogeno
- Tris HCl pH 7.6
- Agua destilada
- Metanol – peróxido
- Anticuerpos:
 - Interleucina 17: IL-17 HRP (Cat. SC-374218HRP, Lote F0117, Santa Cruz Biotechnology).
 - Células T $\gamma\delta$: mouse anti human $\gamma\delta$ -TCR (Cat. 14-9959-82, lote E021769, Bioscience)
 - Anticuerpo biotinilado: Biotin goat anti mouse (Cat. sc-53179, Santa Cruz Biotechnology)
 - Tris BSA (albúmina bovina sérica) - tritón
 - DAB (diaminobencidina) (Cat. 11718096001, Roche)
 - HRP (peroxidasa de rábano) estraptavidina (Cat. 434323, Invitrogen)
 - Hematoxilina de Harris
 - Agua amoniacal
 - Resina sintética permount

METODOLOGÍA

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio de tipo transversal, descriptivo – observacional, en el que se analizaron 20 muestras de tejido gingival, provenientes de individuos periodontal y sistémicamente sanos (número de aprobación del comité de ética CIE/0110/11/2018, anexo 1). El tejido fue tomado de casos de extracciones y/o cirugías dentales por indicaciones ortodóncicas, profilácticas o de cirugías periodontales con fines estéticos.

Los tejidos fueron analizados histológicamente en microscopio óptico mediante tinción hematoxilina y eosina (H/E) para ser diagnosticados y clasificados como sanos o inflamados y posteriormente se dividieron en un grupo de 6 tejidos histológicamente sanos y un grupo de 14 tejidos histológicamente inflamados, a ambos grupos se les realizó inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa para la identificación de células T $\gamma\delta$ e IL-17. Después, con ayuda del microscopio Carl Zeiss Axioskop 2 y el software Zen a cada muestra se le tomó 8 fotomicrografías, las cuales fueron analizadas con el software Fiji (ImageJ) para evaluar las densidades ópticas (DO) que presentó cada muestra. El análisis de datos fue graficado con el software Microsoft Office Excel y analizado con el software Prism-6 (GraphPad software, San Diego, CA, EUA) empleando medidas de tendencia central y medidas de dispersión (Media, Error estándar de la media y desviación estándar) en cada grupo.

Para analizar el grado de relación entre células T $\gamma\delta$ y expresión de IL-17 respecto al grado de inflamación presente en el tejido, se utilizó la T de Student no pareada.

Obtención de muestras

Criterios de inclusión

Pacientes que al interrogatorio de la historia clínica refirieron no presentar enfermedades sistémicas y/o autoinmunes; diagnóstico periodontal sano y no haber

recibido terapia periodontal previa y ningún tratamiento con antibióticos los 3 meses previos a la toma de la biopsia.

Pacientes mayores de 18 años que aceptaron formar parte del estudio y firmaron el consentimiento informado (Anexo 2).

Criterios de exclusión

Pacientes menores de 18 años, pacientes embarazadas o en periodo de lactancia, tejido con medidas menores 2 x 2 mm, pacientes con enfermedades autoinmunes, neoplásicas, endócrinas o del desarrollo de la cavidad oral, pacientes diabéticos.

Muestras de tejido gingival

Se obtuvo una muestra de tejido gingival por paciente, obteniendo un total de 20 muestras (N=20); dichos tejidos provienen de pacientes que fueron sometidos a cirugía periodontal o de terceros molares no erupcionados, cuyo tejido se presentaba clínicamente sano*. El tamaño de la muestra de tejido fue variable, ya que dependía del procedimiento quirúrgico realizado; sin embargo, el tamaño mínimo de la muestra fue de 2 x 2 mm.

*Los tejidos gingivales fueron diagnosticados como sanos de acuerdo a los siguientes parámetros clínicos: profundidad al sondaje < 3 mm, sin presencia de biopelícula dental e inflamación, ausencia de sangrado o supuración y una adecuada arquitectura gingival.

Procesamiento de muestras

Una vez obtenida la muestra, se colocó en formol al 10%, marcando previamente el contenedor con los datos del paciente, la muestra fue almacenada a temperatura ambiente.

Posteriormente, las biopsias obtenidas fueron incluidas en parafina para seccionarse en muestras de tejido de 4 µm y después fueron colocadas en portaobjetos de vidrio tratados con L-polyisina para ser procesados mediante tinción de hematoxilina-eosina para su diagnóstico histopatológico y mediante inmunohistoquímica por técnica de peroxidasa para la identificación de células T γδ e IL-17.

Los tejidos fueron procesados de la siguiente manera:

Fijación y deshidratación

Los tejidos se fijaron en formol al 10%. Una vez fijados los tejidos se deshidrataron en el histoquinete con un tren de formol en el primer recipiente y alcoholes en el siguiente orden (OH al 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100% y 100%) con el objetivo de que el agua de los tejidos se libere gradualmente y se evite la deformación del mismo. La deshidratación, aclaramiento e infiltración pueden ser realizadas manualmente pero hoy en día se realizan de modo automático en máquinas específicas.

Aclaramiento o Diafanización

Esto es una continuación del procesamiento que se lleva a cabo en el histoquinete, donde después de haber sido colocadas las muestras en el último Alcohol al 100%, los tejidos se pasan al Xilol (que puede ser puro o mezclado con alcohol en las mismas proporciones 1:1), después a Xilol puro y finalmente al último recipiente que también contiene Xilol puro. Las muestras se dejan durante una hora en cada recipiente.

Infiltración

En este paso el tejido se coloca en parafina histológica líquida. En el paso anterior el tejido está completamente inmerso en xilol, ahora debido a ósmosis, el xilol sale del tejido y permite la entrada de la parafina.

Inclusión o Impregnación

Los tejidos se incluyen en Parafina fundida a 60°C y se orientan en la posición correcta dentro del casete para su posterior corte.

Corte y Montaje de la muestra

Los tejidos embebidos en la parafina fueron cortados en el microtomo a 4 µm y montados en portaobjetos de vidrio tratados con L-polyisina.

Tinción de Hematoxilina – Eosina

Se realizó tinción hematoxilina – eosina (H/E) a las muestras, eliminando la parafina de los portaobjetos, para después rehidratar los tejidos, teñirse, deshidratar, aclarar y

montar con cubreobjetos. Una vez terminada la tinción, se llevó a cabo el diagnóstico histopatológico y se determinaron las muestras como sanas o inflamadas, dividiéndose en dos grupos.

Para realizar la tinción, los tejidos pasaron por un tren de xiloles, alcoholes y colorantes, en el siguiente orden: xilol 1, xilol 2, xilol-alcohol y alcohol 100%, alcohol 95% y alcohol 70%. Posteriormente, se lavaron con agua para eliminar exceso de alcohol y se sumergieron en hematoxilina por 10 minutos. Luego, se lavaron en agua para eliminar el exceso de colorante y se pasaron rápidamente por alcohol ácido. Después, se lavaron nuevamente con agua, se sumergieron 30 segundos en eosina y se pasaron por otra serie de alcoholes, en orden creciente (70%, 95% y 100%), y después fueron sumergidos en un tren de xiloles, de la siguiente manera: xilol-alcohol, xilol 1 y xilol 2. Finalmente, para montar las muestras se colocó una gota de resina permount sobre el tejido y se colocó un cubreobjetos.

Diagnóstico histopatológico y clasificación de muestras

Con la ayuda de un patólogo bucal se realizó el diagnóstico histopatológico de las muestras de tejido gingival. A pesar de que los tejidos fueron diagnosticados clínicamente como sanos y no mostraban signos de inflamación, el análisis histopatológico mostró menor o mayor presencia de infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos y células mononucleares en densidades variables que se observan de manera fisiológica en tejidos clínicamente sanos, tal como lo describe Page y Schroeder en la “lesión inicial” (33) y cuyo espectro de inflamación histológica presenta diferentes grados: normal (quiescente), leve, moderado e intenso (57). En esta fase de lesión inicial, Kinane y Lang, también han reportado también que la presencia de este infiltrado inflamatorio está formado por proteínas séricas y células inflamatorias que ocupan del 5% al 10% del tejido conectivo gingival debajo del epitelio (23, 24); sin embargo estos últimos datos no representan como tal, un índice para la clasificación histológica de la actividad inflamatoria.

Por esta razón, la clasificación histológica de estas muestras de tejido gingival en “sanas” o “inflamadas”, se basó en el grado de inflamación presente en cada biopsia de acuerdo a los criterios del Índice de Actividad Histológica (HAI) mostrados en la tabla 4 (58; 59). El cual evalúa la actividad inflamatoria presente y cuyo puntaje va de 0 a 3; donde el nivel 0 refiere ausencia de infiltración epitelial por neutrófilos, el puntaje 1 muestra una infiltración de neutrófilos menor al 50%, el puntaje 2 presenta infiltración de neutrófilos mayor al 50% sin presentar úlceras ni erosiones en el epitelio y el puntaje 3 corresponde a una actividad acentuada con úlceras o erosiones (60).

Las muestras fueron consideradas como sanas cuando éstas mostraron una actividad inflamatoria inactiva (normal) o leve; mientras que las muestras clasificadas en el grupo de “tejidos inflamados histológicamente” presentaron una actividad inflamatoria moderada (el infiltrado de neutrófilos se encontraba por arriba del 50%).

| Tabla 4. Índice de Actividad Histológica (60) | | |
|--|----------------|---|
| Actividad inflamatoria | Puntaje | Característica histopatológica |
| Inactiva / quiescente / normal | 0 | Sin infiltración epitelial por neutrófilo |
| Actividad leve | 1 | Infiltración de neutrófilos de <50% de las criptas muestreadas o cortes transversales, sin úlceras ni erosiones |
| Actividad moderada | 2 | Infiltración de neutrófilos >50% de las criptas muestreadas o cortes transversales sin úlceras ni erosiones |
| Actividad acentuada | 3 | Erosiones o úlceras, independiente de otras características. |

Inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico se realizó en cortes de tejido de 4 μm , los cuales se encontraban incluidos en parafina. Posteriormente, se desparafinaron los tejidos colocando las muestras en una estufa a 60°C durante 20 minutos. Después, las lamillas se introdujeron en coplins en el siguiente orden: xilol 1 (100%), xilol 2, xilol-OH (50% xilol-50% alcohol), alcohol 96%, alcohol 80% y alcohol 70% durante 20 minutos en cada uno para eliminar los residuos de parafina en su totalidad. Posterior a ello, se realizaron dos lavados con buffer TRIS HCl a un pH de 7.6 durante 5 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Una vez desparafindas las muestras, se realizó la recuperación antigénica de los tejidos, colocando las laminillas en un coplin con buffer de citratos, el cual fue preparado con 9.5 ml de ácido cítrico y 45.5 ml de citrato de sodio, aforados a 100 ml con agua destilada. El coplin fue colocado a baño maría durante 10 minutos a 90°C. Pasado el tiempo, se dejó reposar el coplin durante 10 minutos fuera del baño maría para después colocarlo en un recipiente con agua al tiempo durante 20 minutos más para dejarlo enfriar a temperatura ambiente. Después, se realizaron dos lavados a las muestras con buffer Tris HCL durante 5 minutos en cada uno en una cámara húmeda. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de metanol-peróxido. Se realizaron 3 lavados con TRIS HCl durante 5 minutos cada uno en cámara húmeda a temperatura ambiente; después, se delimitó la muestra con plumón hidrofóbico. Se bloquearon las proteínas inespecíficas con buffer de TRIS HCl y BSA (albúmina bovina sérica)- tritón al 1%, durante 60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se decantó el buffer de bloqueo para colocar el anticuerpo primario durante una noche a 4°C. Para la identificación de células T $\gamma\delta$ se utilizó un anticuerpo (Ab) monoclonal (mouse anti human $\gamma\delta$ -TCR) a una dilución de 1:200. Mientras que, para la identificación de la citocina IL-17 se utilizó el Ab dirigido contra IL-17, a una dilución de 1:100.

Después de la incubación del Ab primario (mouse anti human $\gamma\delta$ -TCR), se realizaron tres lavados con TRIS HCl en cámara húmeda, durante 5 minutos cada uno, para colocar a las muestras incubadas con el Ab $\gamma\delta$ TCR el Ab biotinilado (Ab secundario) (Biotin goat anti

mouse), diluido en TRIS BSA durante 30 minutos. Después, se realizaron 3 lavados con TRIS HCl durante 5 minutos cada uno en cámara húmeda a temperatura ambiente y pasado el tiempo se incubó con estreptavidina conjugada con HRP diluido en TRIS BSA al .1% durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. En las muestras incubadas con IL-17 no fue necesario colocarles el Ab biotinilado y HRP, ya que el HRP se encuentra conjugado con la IL-17.

Finalmente, se realizaron tres lavados con TRIS HCl durante 5 minutos cada uno en cámara húmeda a temperatura ambiente para después revelar las muestras con diaminobencidina (DAB) a una dilución de 1:10, durante 40 segundos. Con agua destilada se lavaron las muestras dos veces para después contrateñir con hematoxilina de Harris con base de alcohol durante 1.30 minutos. Las muestras se lavaron con agua corriente para eliminar el excedente de hematoxilina hasta aclararlas. Se colocaron en agua amoniacal durante 10 segundos para virar el pH; posteriormente se deshidrataron las muestras con alcoholes y xiloles en el siguiente orden: alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 96%, xilol-OH (50%/50%), xilol 1 (100%) y xilol 2 (100%) durante 15 minutos por cada solución. Por último, se montaron las muestras con resina sintética Entellan permount.

Análisis microscópico

Para llevar a cabo el análisis cualitativo del fenómeno inflamatorio se analizaron las muestras procesadas en el microscopio óptico para evaluar la presencia de células T $\gamma\delta$ e IL-17.

Análisis digital de fotomicrografías

Con ayuda del microscopio óptico Axioskop 2, cámara AxioCam MRc 5 y el software ZEN de la marca Carl Zeiss, se obtuvieron 8 fotomicrografías por muestra (176 fotomicrografías en total). Las cuales fueron tomadas con objetivo de 20x, con la misma intensidad de luz (3, en un rango del 1 al 10), diafragma de iris a la misma apertura (3/4), tiempo de exposición del software a 2.75 y con una resolución en pixeles de 2584 x 1936.

Una vez obtenidas las fotomicrografías, se realizó el análisis digital con el software Fiji (ImageJ), midiendo la densidad óptica (DO) que arroja el color café de la tinción por DAB. Lo primero que se hizo fue eliminar el fondo sobrante de la imagen con la finalidad de acercarlo al blanco. Después, se hizo una deconvolución de colores, es decir, se separó la imagen en tres canales de color (azul, café y verde), seleccionando la imagen en tonos cafés, debido a que este color corresponde a la tinción por DAB (Figura 3). Después, la fotomicrografía fue convertida a una imagen de 8 bits, lo que corresponde a tener 264 tonos de grises en la imagen; posteriormente, se delimita la intensidad del color mediante un comando que utiliza un histograma, con la finalidad de descartar la tinción inespecífica que pudiera tener la imagen (Figura 4). Finalmente, en la imagen resultante, el programa delimita las zonas positivas; esta delimitación, es lo que nos dará como resultado un área total afectada en pixeles, un promedio, un máximo y un mínimo de color (Figura 5).

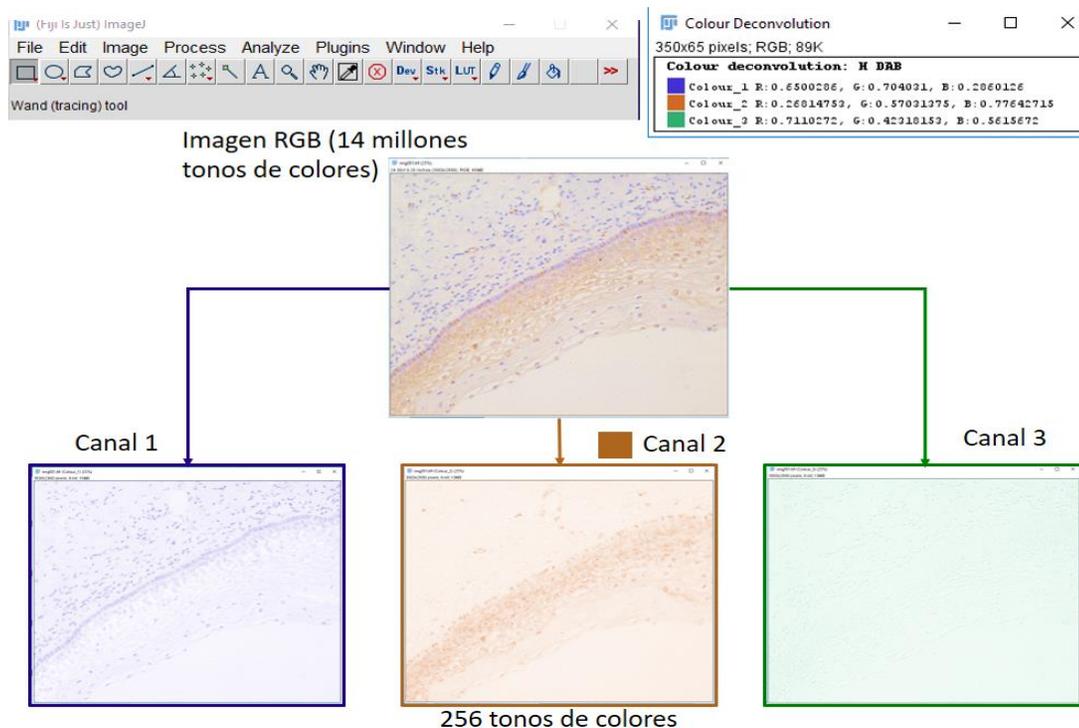


Figura 3. Se muestra la deconvolución de color, es decir, la separación en tres canales de color de la imagen original, con la finalidad de obtener una imagen con la marca analizar. En este caso la marca de Dab (imagen con tonos café).

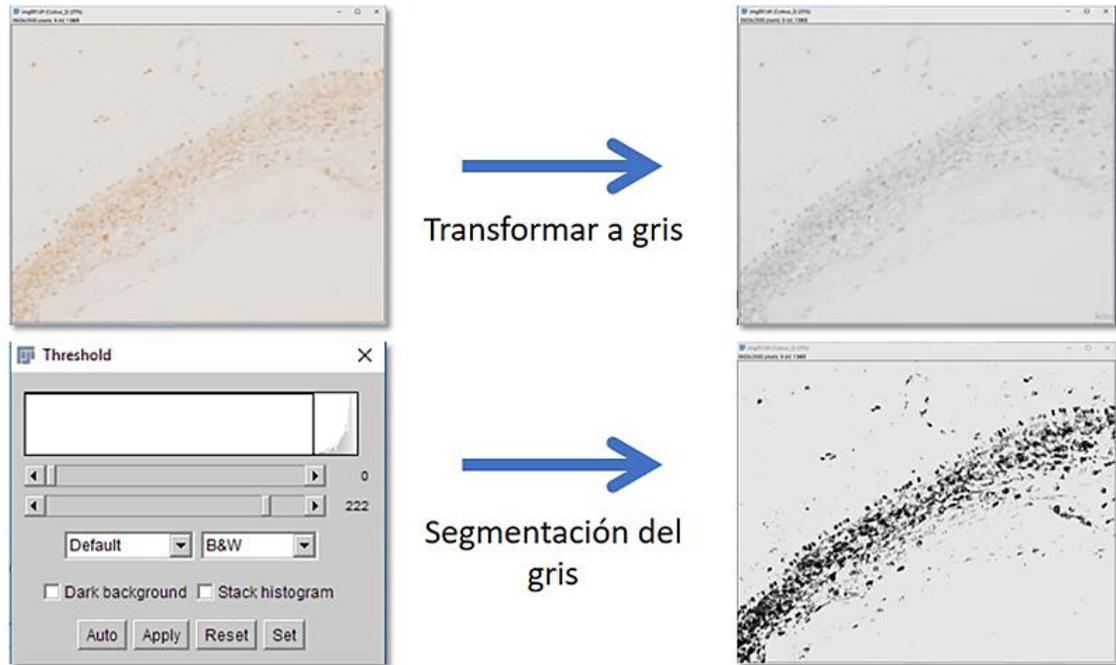


Figura 4. Se muestra la imagen obtenida; la cual fue convertida a blanco y negro. Posteriormente con ayuda de un histograma se delimita la intensidad, con la finalidad de descartar la tinción inespecífica que puede tener la imagen.

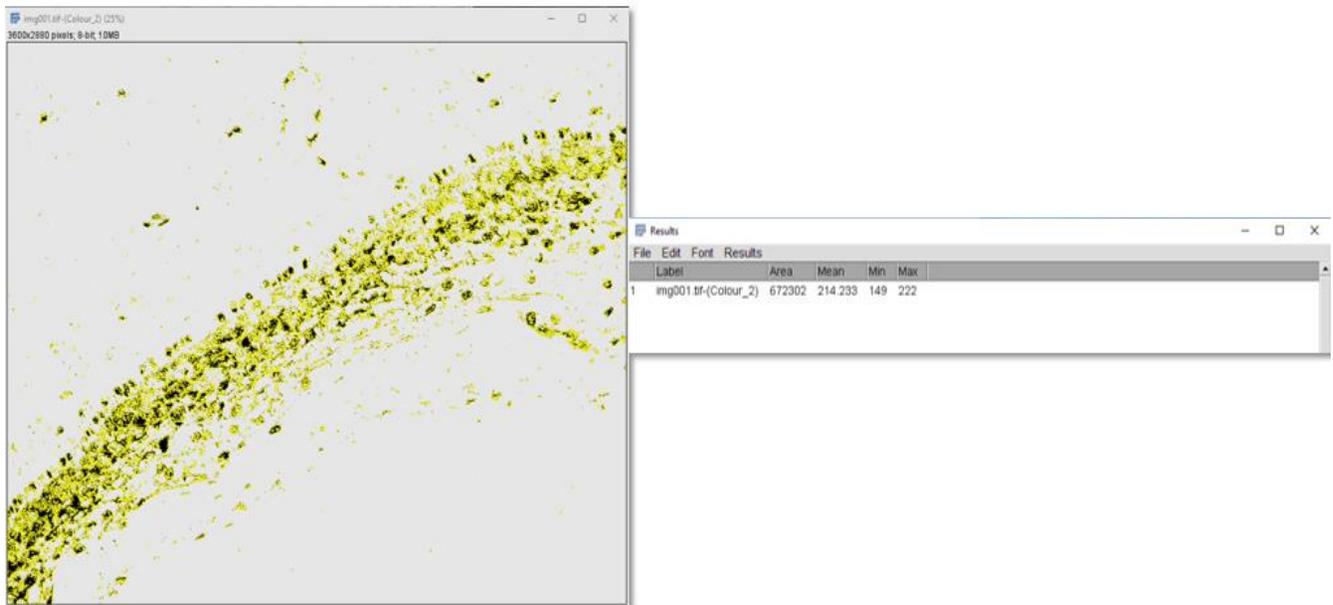


Figura 5. Se muestran las zonas marcadas como positivas en el programa y arroja los resultados, los cuales se expresan como área, que es el total de píxeles marcados como positivos y el promedio de color presente en cada fotomicrografía, así como un máximo y mínimo de color.

Análisis de datos y estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante tablas de frecuencia con el programa Microsoft Office Excel. Posteriormente los datos fueron analizados con el programa Prism-6 (GraphPad software, San Diego, CA, EUA) empleando medidas de tendencia central para obtener la Media, Error Estándar y Rango de cada uno de los grupos (sanos e inflamados). Posteriormente, se realizó la prueba T de Student no pareada para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, así como la correlación que existe entre estas variables (valor R). Un valor de p menor de 0.05 se considera estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

El número total de muestras fue de 20, las cuales se clasificaron en dos grupos con diferentes números de muestras (n):

| Tabla 5. Clasificación de muestras | |
|------------------------------------|------------------------|
| Grupo | Número de muestras (n) |
| Sanos | 6 |
| Inflamados | 14 |

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Diagnóstico histológico (H/E)

El diagnóstico histopatológico arrojó que, del total de 20 muestras obtenidas, 6 muestras fueron sanas (grupos sanos) y 14 muestras inflamadas (grupo inflamados). El resultado se muestra en las siguientes fotomicrografías.

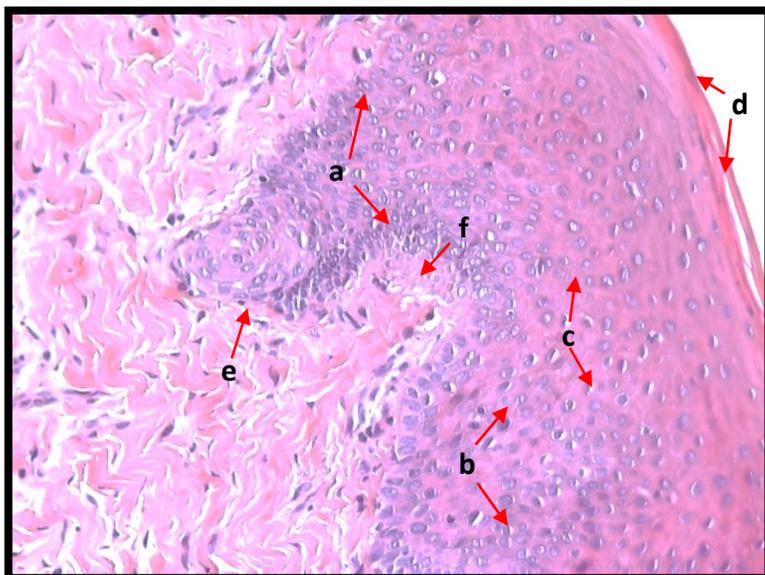


Figura 6. Mucosa sana. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra mucosa oral sana procesada por H/E, caracterizada por la organización del epitelio en sus diferentes estratos y el tejido conectivo subyacente. Se puede observar el estrato basal o germinativo (a), el estrato espinoso (b), estrato granuloso (c) y el estrato corneo (d). Así como las crestas epiteliales (e), la cuales se forman debido a las proyecciones que envía el tejido conectivo, llamadas papilas coriales (f) (Gómez de Ferraris, 2002; Newman, 2010; Lindhe, 2008). Fuente propia.

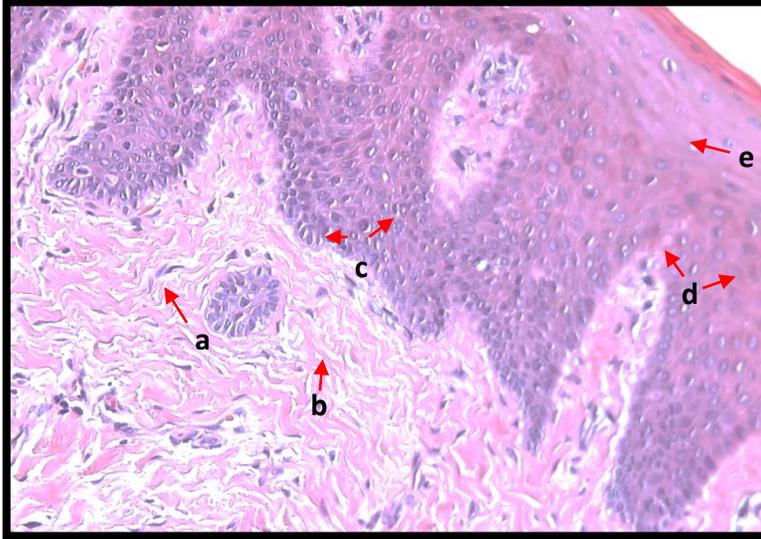


Figura 7. Las células del estrato basal (a) están separadas del tejido conectivo por la membrana basal (b). Las células tienen un aspecto cilíndrico o cuboidal y están unidas a la lámina basal subyacente y entre sí por hemidesmosomas (interdigitaciones elaboradas por las membranas plasmáticas). Las células basales poseen reproducción mitótica por lo que el epitelio se renueva en el estrato basal; también denominado estrato germinativo. El estrato espinoso (c) consta de 10-20 capas de células grandes y poliédricas, con procesos citoplasmáticos cortos con apariencia de espinas. En el estrato granuloso (d) hay presencia de queratohialina y gránulos de glucógeno, los cuales se relacionan con la síntesis de queratina. Las células del estrato córneo (e) poseen núcleos picnóticos, característica de un epitelio paraqueratinizado (Gómez de Ferraris, 2002; Newman, 2010; Lindhe, 2008). Fuente propia.

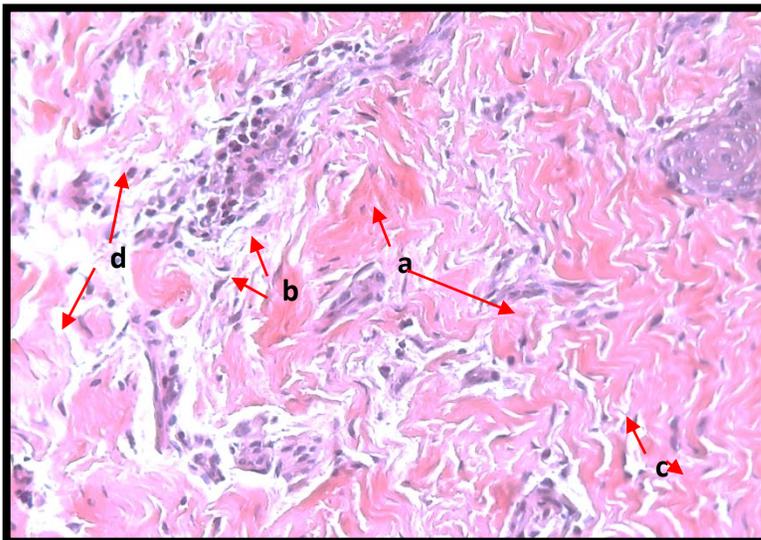


Figura 8. Mucosa sana. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra un tejido gingival sano procesado mediante tinción de hematoxilina – eosina, donde se aprecia el tejido conectivo que se encuentra subyacente al epitelio; posee un compartimento celular formado por células como fibroblastos (a), mastocitos, macrófagos, células cebadas, adipocitos, linfocitos (b) y neutrófilos; y un compartimento extracelular compuesto por fibras de colágeno(c), fibras de reticulina y fibras elásticas. Así, como una sustancia fundamental amorfa (d), la cual da soporte y rellena los espacios entre las fibras y las células y que se encuentra compuesta por ácido hialurónico, sulfato de condroitina, glucoproteínas como fibronectina y agua. Fuente propia.

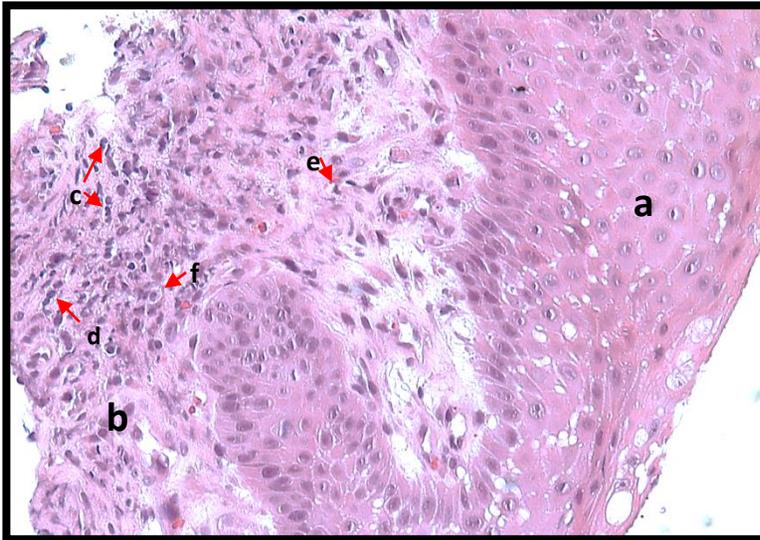


Figura 9. Mucosa inflamada. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra tejido gingival inflamado procesado por hematoxilina eosina. Se observa el tejido epitelial (**a**) y conectivo (**b**), en el cual se aprecia la presencia de células con apariencia de neutrófilos (**c**), linfocitos (**d**), eosinófilos (**e**) y células plasmáticas (**f**). Fuente propia.

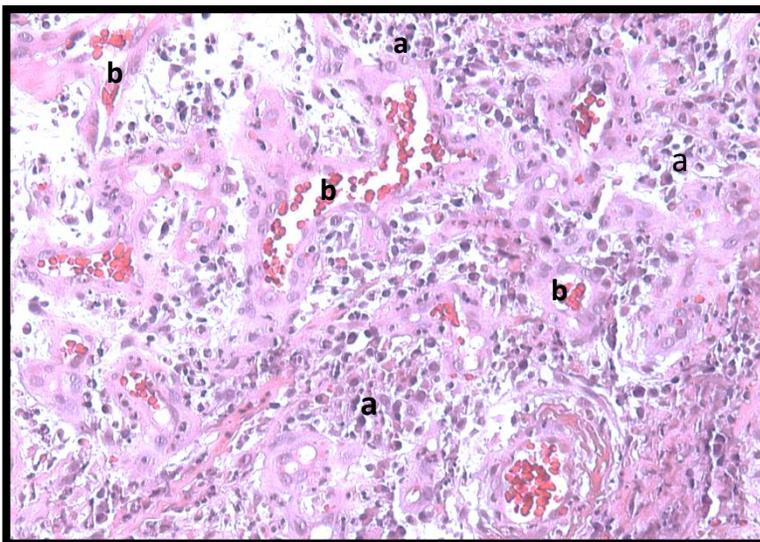


Figura 10. Mucosa inflamada. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra tejido gingival inflamado procesado por hematoxilina eosina donde se puede observar dentro del tejido conectivo la presencia de infiltrado inflamatorio denso (**a**) y presencia de múltiples capilares (**b**) dilatados de diferentes calibres con eritrocitos en la luz de los mismos. Fuente propia.

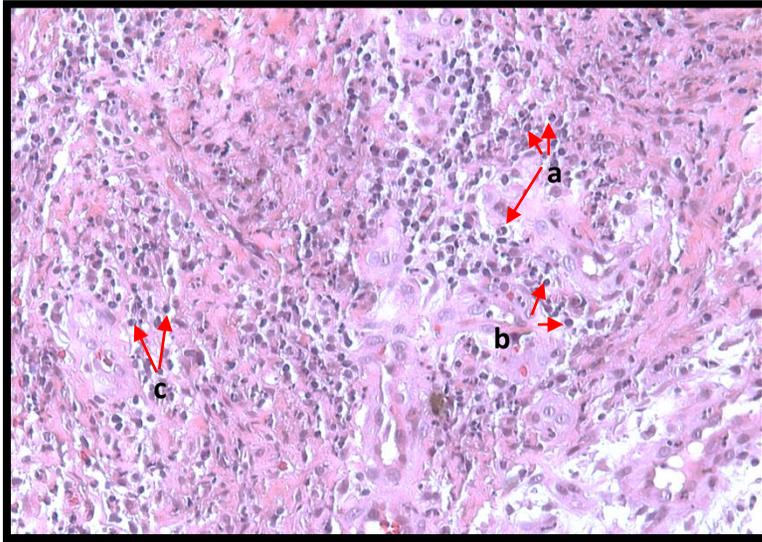


Figura 11. Mucosa inflamada. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra tejido gingival inflamado procesado por hematoxilina eosina, en el que se aprecian células polimorfonucleares (a), linfocitos (b) y células plasmáticas (c). Fuente propia.

| Tabla 6. Diagnóstico histológico (H/E) | | | |
|--|---|--|--|
| Grupo de estudio | Arquitectura tisular | Infiltrado inflamatorio | Vasos sanguíneos |
| Tejidos sanos | Tejido epitelial con adecuada organización en sus estratos. Adecuada organización de las fibras de colágeno del tejido conectivo. | Escaso, compuesto principalmente por células PMN. | Pocos vasos sanguíneos de calibre pequeño |
| Tejidos Inflamados | Tejido epitelial no presenta desorganización. Tejido conectivo con abundante desorganización en sus fibras colágenas | Abundante, compuesto por células polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas en el tejido conectivo | Múltiples vasos sanguíneos dilatados en tejido conectivo |

Inmunohistoquímica

Las muestras procesadas por inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa para la identificación de células T $\gamma\delta$ e IL-17 mostraron mayor expresión de células T $\gamma\delta$ e IL-17 en tejidos inflamados respecto a los tejidos sanos. A continuación, se muestran las fotomicrografías obtenidas.

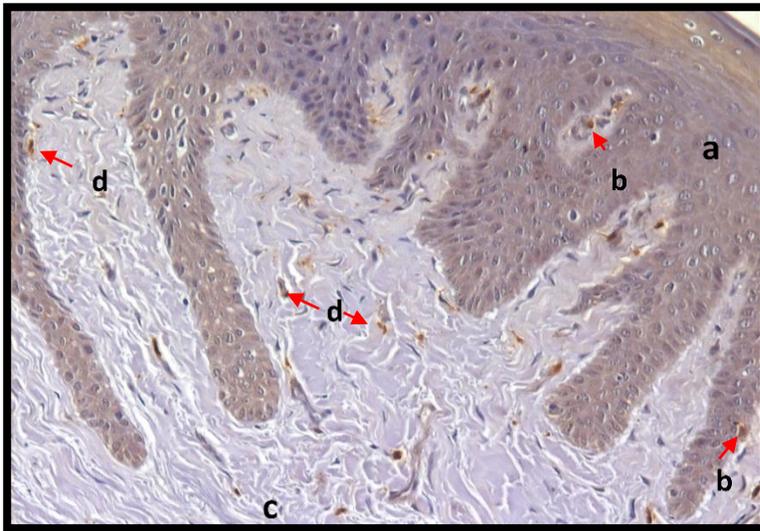


Figura 12. Mucosa sana. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra mucosa oral sana procesada por inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa. Se puede observar el epitelio (a), en el cual hay presencia de algunas células positivas para el receptor T TCR $\gamma\delta+$ (b); subyacente se encuentra el tejido conectivo (c), donde se aprecian algunas células T $\gamma\delta$ marcadas en color café (d). Fuente propia.

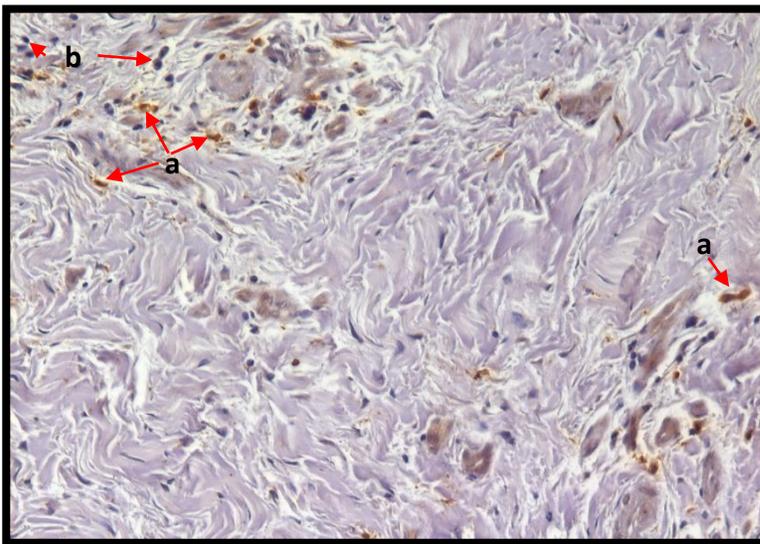


Figura 13. Mucosa sana. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra mucosa oral sana procesada por inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa. Se aprecia el tejido conectivo, en el cual hay presencia de células T $\gamma\delta+$ (a) marcadas en color café, así como células linfocitarias (b). Fuente propia.

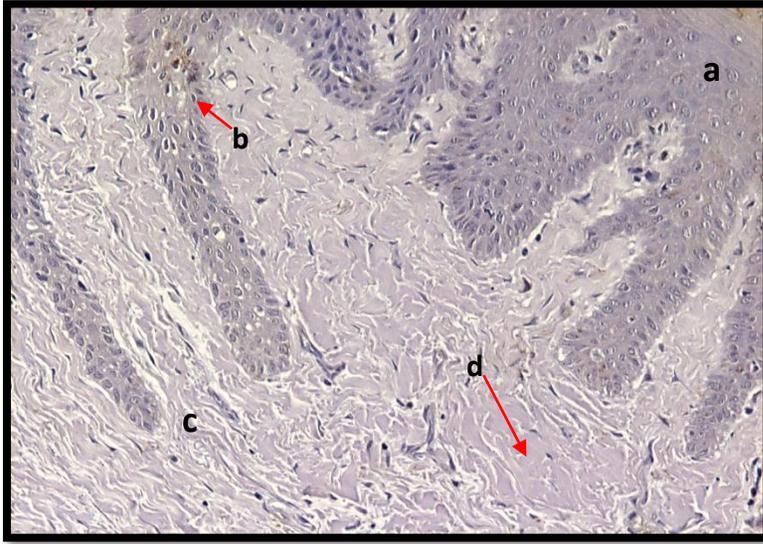


Figura 14. Mucosa sana. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra mucosa oral sana procesada por inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa. Podemos observar en el tejido epitelial (a) zonas correspondientes a la expresión de IL-17 (b). En el tejido conectivo (c) se puede observar también poca pigmentación, correspondiente a la expresión de IL-17 en color café (d). Fuente propia.

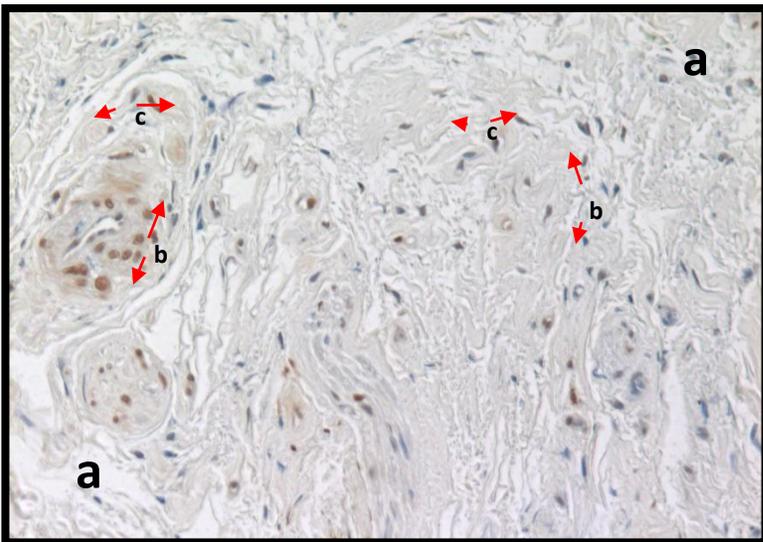


Figura 15. Mucosa sana. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra mucosa oral sana procesada por inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa. Podemos apreciar el tejido conectivo (a), en él, diversas células con apariencia a linfocitarias (b) y a lo largo de las fibras de colágeno podemos observar una pigmentación café (c), correspondiente a la expresión de IL-17 (c), la cual se observa principalmente intracelular. Fuente propia.

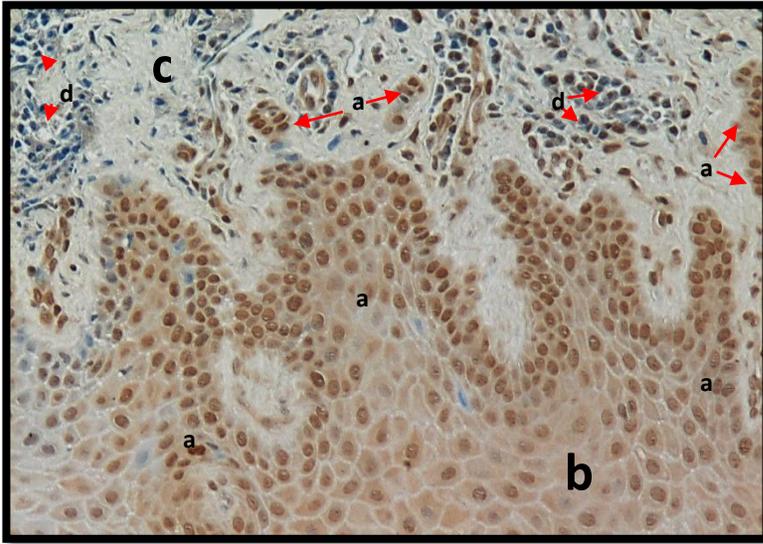


Figura 16. Mucosa inflamada. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra mucosa oral inflamada procesada por inmunohistoquímica, en donde podemos apreciar una mayor expresión de IL-17 (a) tanto en el epitelio (b) como en el tejido conectivo (c), marcadas por peroxidasa en color café; así como la presencia de diversas células con apariencia a linfocitos (d). En el epitelio, el marcaje se observa intracelular y extracelularmente. Fuente propia.

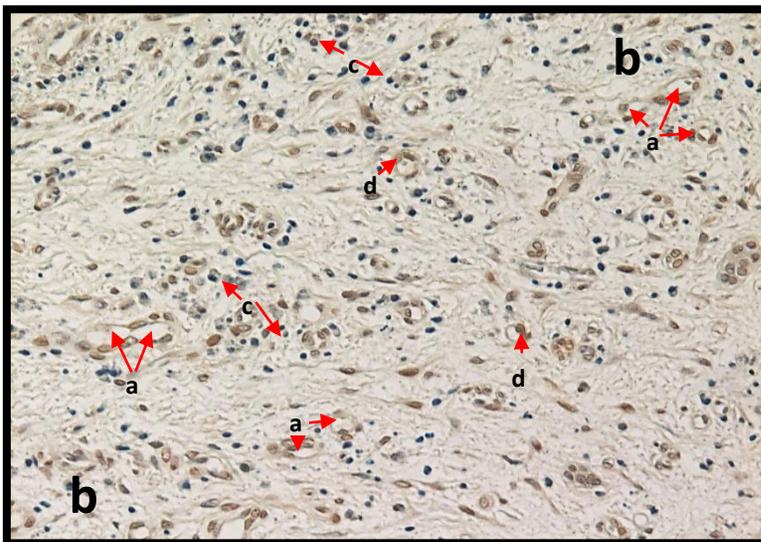


Figura 17. Mucosa inflamada. Microfotografía tomada a 20X donde se muestra mucosa oral inflamada procesada por inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa. Podemos observar la presencia de múltiples vasos sanguíneos (a) en el tejido conectivo (b) y cercanos a zonas de infiltrado linfocitario (c). Se pueden apreciar la expresión de células IL-17 positivas (d) alrededor de los capilares. Fuente propia.

| Tabla 7. Diagnóstico inmunohistoquímico | | | |
|--|--|---|--|
| Grupo de estudio | Expresión de células T $\gamma\delta$ | Expresión de células IL-17 | Vasos sanguíneos |
| Tejidos sanos | Presentes en el estrato córneo y algunas zonas del estrato espinoso del tejido epitelial. Algunas de ellas en fibras del tejido conectivo. | Presencia en estrato basal y espinoso del tejido epitelial, así como en algunas fibras de colágeno del tejido conectivo | Pocos vasos sanguíneos de pequeño calibre |
| Tejidos Inflamados | Abundantes en todos los estratos del tejido epitelial y dispersas en tejido conectivo subyacente. | Abundantes es tejido epitelial y tejido conectivo subyacente. | Múltiples vasos sanguíneos dilatados en tejido conectivo, con presencia de células T $\gamma\delta$ y células IL-17 + alrededor de los mismos. |

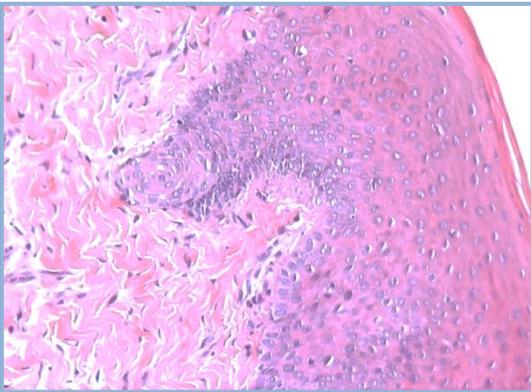
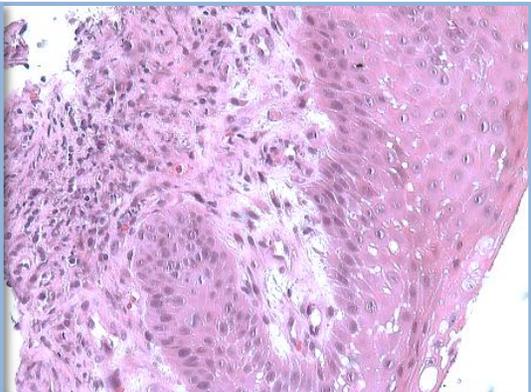
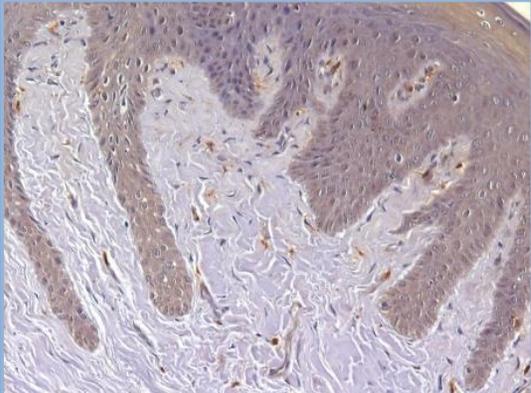
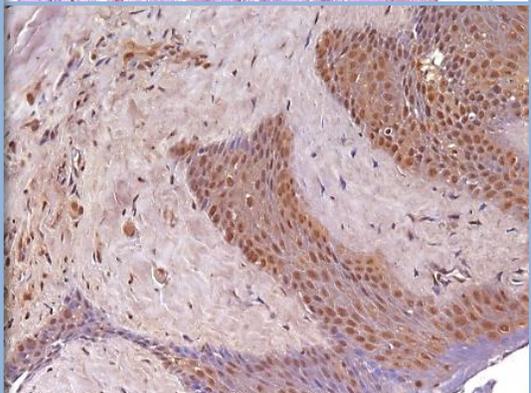
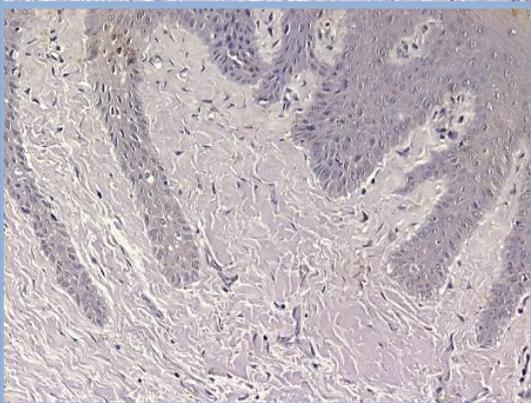
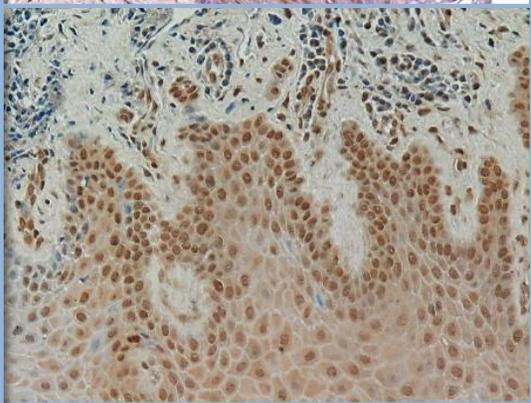
| Tabla 8. Análisis histológico e inmunohistoquímico | | |
|--|---|--|
| | Tejidos sanos | Tejidos inflamados |
| H / E |  |  |
| Células T $\gamma\delta$ |  |  |
| IL-17 |  |  |

Tabla 7. Microfotografías tomadas a 20x en las que podemos observar el análisis histológico e inmunohistoquímico de tejido gingival. **A** Tinción de hematoxilina y eosina de tejido gingival histológicamente sano, la cual muestra una arquitectura normal de tejido epitelial y conectivo. **C** y **E** tejido gingival sano procesado mediante inmunohistoquímica que muestra la expresión del receptor T TCR $\gamma\delta$ + e IL-17. **B** Tinción de H/E de tejido gingival histológicamente inflamado en el cual se observa una arquitectura normal del tejido epitelial y conectivo, así como abundante infiltrado inflamatorio en tejido conectivo. **D** y **F** tejidos gingivales inflamados procesados mediante inmunohistoquímica donde se observa un intenso marcaje en color café del receptor T TCR $\gamma\delta$ + e IL-17 en comparación con los tejidos sanos.

ANÁLISIS DE IMÁGENES Y DATOS

Los resultados se obtuvieron mediante el análisis del 100% de píxeles (correspondiente a 5 002 624) presentes en las fotomicrografías, cuyos resultados se expresan en promedio y porcentaje del área afectada.

Tablas de frecuencia

Las tablas de frecuencias (distribución de frecuencias) son una herramienta estadística que nos permite ordenar los datos obtenidos distribuyéndolos de acuerdo a su frecuencia de aparición; pueden ser empleadas para variables cuantitativas o cualitativas ordinales.

La tabla de frecuencia se conforma por 5 columnas. La primera corresponde a los intervalos de clase, en este sitio se obtienen intervalos de los diferentes valores y se ordenan por rangos de menor a mayor. En la segunda columna se coloca la marca de clase, que es el número intermedio de los intervalos de clase. La tercera columna pertenece a la frecuencia absoluta, que es el número de casos que caen en cada intervalo. La cuarta columna es de la frecuencia relativa, la cual es el resultado de la frecuencia absoluta entre el número total de casos; y finalmente se coloca la columna de la frecuencia acumulada, en donde se colocarán los datos obtenidos de la suma de la frecuencia absoluta del primer intervalo de clase con el segundo y sucesivamente.

La finalidad de realizar tablas de frecuencia en este proyecto fue descartar datos fuera de rango y trabajar con los datos presentes en una distribución normal. Para obtener las tablas de frecuencia se utilizaron los resultados obtenidos en el análisis de imágenes, los cuales arrojaban el área de expresión en píxeles, de células T $\gamma\delta$ e IL-17 de tejidos sanos e inflamados. Dichos resultados se muestran en el anexo 3 y las tablas de frecuencia se muestran a continuación:

| Tabla 9. Tabla de frecuencia de células T $\gamma\delta$ en tejidos histológicamente sanos | | | | |
|--|----------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Intervalos de clase | Marca de clase | Frecuencia absoluta | Frecuencia relativa | Frecuencia acumulada |
| 165267 - 862944 | 514105.5 | 15 | 0.31 | 15 |
| 862945 - 1560622 | 1211783.5 | 13 | 0.27 | 28 |
| 1560623 - 2258300 | 1909461.5 | 10 | 0.208 | 38 |
| 2258301 - 2955978 | 2607139.5 | 5 | 0.104 | 43 |
| 2955979 - 3653656 | 3304817.5 | 5 | 0.104 | 48 |

| Tabla 10. Tabla de frecuencia de células T $\gamma\delta$ en tejidos histológicamente inflamados | | | | |
|--|----------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Intervalos de clase | Marca de clase | Frecuencia absoluta | Frecuencia relativa | Frecuencia acumulada |
| 748727 - 1446543 | 1097635 | 3 | 0.02 | 3 |
| 1446544 - 2144360 | 1795452 | 7 | 0.06 | 10 |
| 2144361 - 2842177 | 2493269 | 12 | 0.107 | 22 |
| 2842178 - 3539994 | 3191086 | 21 | 0.18 | 43 |
| 3539995 - 4237811 | 3888903 | 33 | 0.29 | 76 |
| 4237812 - 4935628 | 4586720 | 36 | 0.32 | 112 |

Tablas 9 y 10. Tablas de frecuencias, en las que se muestran la distribución de los datos obtenidos mediante el análisis digital de imágenes de las células T $\gamma\delta$ en tejidos sanos (tabla 9) y en tejidos inflamados (tabla 10).

| Tabla 11. Tabla de frecuencia de IL-17 en tejidos histológicamente sanos | | | | |
|--|----------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Intervalos de clase | Marca de clase | Frecuencia absoluta | Frecuencia relativa | Frecuencia acumulada |
| 26517 - 577388 | 301952.5 | 33 | 0.66 | 32 |
| 577389 - 1128260 | 852824.5 | 11 | 0.22 | 43 |
| 1128261 - 1679132 | 1403696.5 | 2 | 0.04 | 45 |
| 1679133 - 2230004 | 1954568.5 | 0 | 0 | 45 |
| 2230005 - 2780876 | 2505440.5 | 2 | 0.06 | 48 |

| Tabla 12. Tabla de frecuencia de IL-17 en tejidos histológicamente inflamados | | | | |
|---|----------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Intervalos de clase | Marca de clase | Frecuencia absoluta | Frecuencia relativa | Frecuencia acumulada |
| 22928 - 660642 | 341785 | 54 | 0.48 | 54 |
| 660643 - 1298357 | 979500 | 18 | 0.16 | 72 |
| 1298358 - 1936072 | 1617215 | 12 | 0.107 | 84 |
| 1936073 - 2573787 | 2254930 | 12 | 0.107 | 96 |
| 2573788 - 3211502 | 2892645 | 7 | 0.06 | 103 |
| 3211503 - 3849217 | 3530360 | 9 | 0.08 | 112 |

Tablas 11 y 12. Tablas de frecuencias, en las que se muestran la distribución de los datos obtenidos de la expresión de IL-17 mediante el análisis digital de imágenes en tejidos sanos (tabla 11) y en tejidos inflamados (tabla 12).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

T de Student no pareada

La T de Student es una prueba estadística mediante la cual es posible comparar la media de dos grupos ($F= t_2$). En otras palabras, la prueba de la t, es un caso especial de análisis de la varianza aplicado solamente a dos grupos.

Además de utilizarse para comparar ambas medias de los grupos, también se puede aplicar para comparar a varios grupos, siempre por parejas (61).

Para calcular la proporción de T se deben conocer dos factores: la diferencia de las medias de las muestras y error estándar (EE) de esta diferencia; este razonamiento se muestra a continuación:

$$T = \frac{\text{diferencia de la media de las muestras}}{\text{EE de la diferencia en la media de las muestras}}$$

Los datos fueron analizados mediante el programa Prism 6 (GraphPad software, San Diego, CA, EUA) y los resultados se muestran en las siguientes tablas:

| Tabla 13. Análisis estadístico de células T γδ | |
|---|--|
| Tabla analizada | Prueba de datos no pareados células T γδ |
| Columna B vs. Columna A | Área grupo Inflamados vs. Área grupo sanos |
| Prueba t no pareada | |
| Valor p | < 0.0001 |
| Sumatoria de valor p | **** |
| Diferencia significativa (P < 0.05) | Sí |
| Valor p de una o dos colas | Dos columnas |
| t, df | t=24.41 df=126 |
| ¿Qué tan grande es la diferencia? | |
| Promedio ± SEM de la columna A | 1.154e+006 ± 97118 N=38 |

| | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| Promedio \pm SEM de la columna B | 4.073e+006 \pm 65984 N=90 |
| Diferencia entre promedios | 2.919e+006 \pm 119575 |
| 95% intervalo de confianza | 2.683e+006 to 3.156e+006 |
| R cuadrada | 0.8255 |

Tabla 14. Análisis estadístico de IL-17

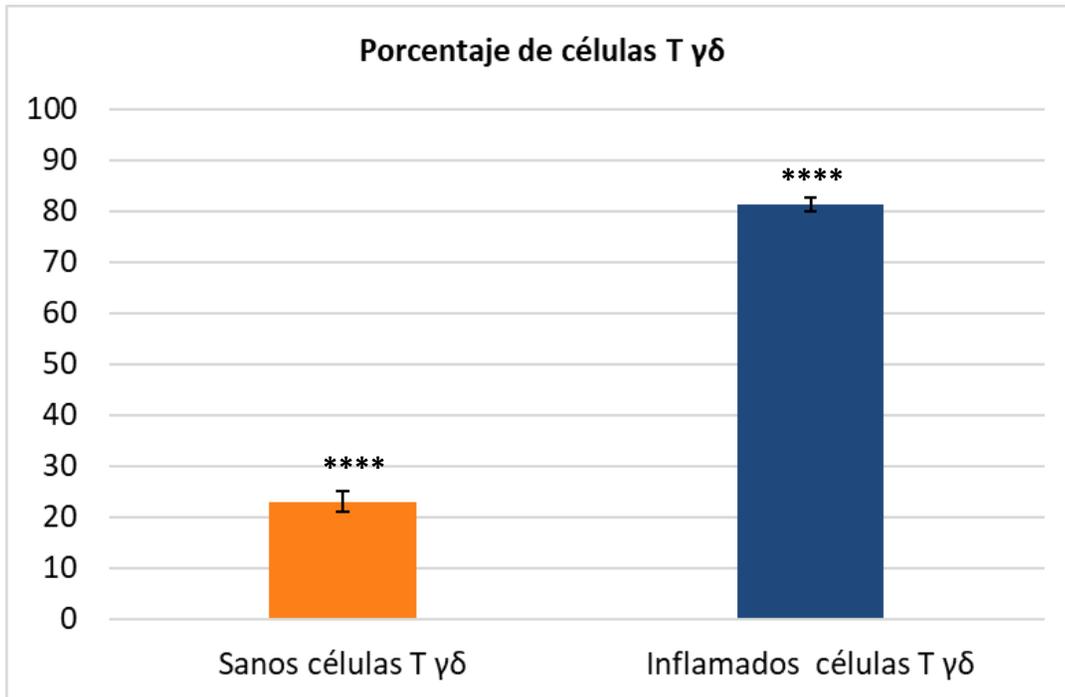
| Tabla analizada | Prueba de datos no pareados de IL-17 |
|-------------------------------------|--|
| Columna B vs Columna A | Área grupo Inflamados vs. Área grupo sanos |
| Prueba t no pareada | |
| Valor p | 0.6651 |
| Sumatoria de valor p | ns |
| Diferencia significativa (P < 0.05) | No |
| Valor p de una o dos colas | Dos columnas |
| t, df | t=0.4342 df=96 |
| ¿Qué tan grande es la diferencia? | |
| Promedio \pm SEM de la columna A | 372599 \pm 43299 N=44 |
| Promedio \pm SEM de la columna B | 393159 \pm 24176 N=54 |
| Diferencia entre promedios | 20561 \pm 47357 |
| 95% intervalo de confianza | -73441 to 114562 |
| R cuadrada | 0.001960 |

Inmunoexpresión de células T $\gamma\delta$

Los resultados del análisis de fotomicrografías de células T $\gamma\delta$ son los siguientes: el porcentaje de expresión en tejidos sanos fue de 23% y en tejidos inflamados de 81%, mostrando una diferencia significativa ($p < 0.0001^{***}$) entre los tejidos inflamados con los sanos (Tabla 15). Los datos se representan en las gráficas 1 y 3, en las cuales se observan las medias \pm EE (error estándar) de cada grupo y cada molécula de interés (células T $\gamma\delta$ e IL-17).

| Tabla 15. Expresión de células T $\gamma\delta$ | | |
|---|-------------------|------------|
| Grupo | Promedio del área | Porcentaje |
| Sanos células T $\gamma\delta$ | 1154304 | 23 |
| Desviación estándar | 598677 | 12 |
| Error estándar | 97118 | 2 |
| Inflamados células T $\gamma\delta$ | 4073473 | 81 |
| Desviación estándar | 625975 | 13 |
| Error estándar | 65984 | 1 |

Tabla 15. Tabla en la que se presenta los promedios y porcentajes de la expresión de células T $\gamma\delta$ en los grupos sanos e inflamados, así como la desviación estándar y error estándar.



Gráfica 1. Gráfica de datos en la cual se compara porcentaje del área afectada en los grupos de tejidos sanos e inflamados de células T $\gamma\delta$. Las barras muestran el promedio, \pm EE del área afectada en pixeles en las fotomicrografías. El eje y representa el porcentaje de expresión evaluado en los tejidos. El valor $p \leq 0.05$ se considera estadísticamente significativo (**** $p \leq 0.0001$) al comparar el grupo sano con el grupo inflamado.

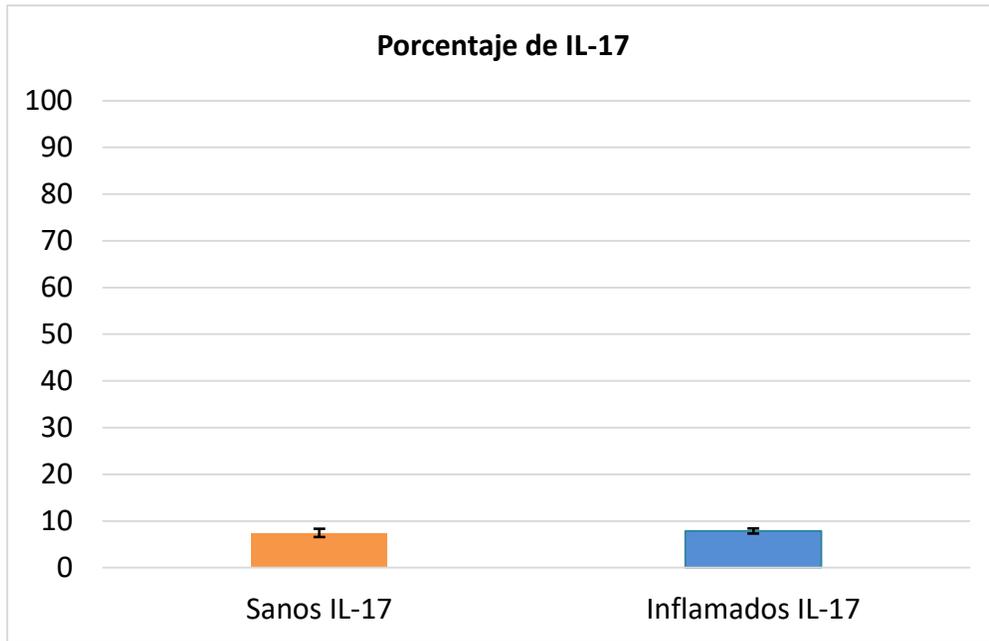
*100 = 5 002 624 pixeles

Inmunoexpresión de IL-17

Los resultados obtenidos en el análisis de fotomicrografías de IL-17 fueron los siguientes: la expresión de IL-17 en tejidos sanos fue de 7% y en tejidos inflamados fue de 8%, mostrando que los grupos son similares y no existe significancia estadística entre ellos ($p= 0.6651$) (Tabla 16). Estos datos están representados en las gráficas 2 y 3.

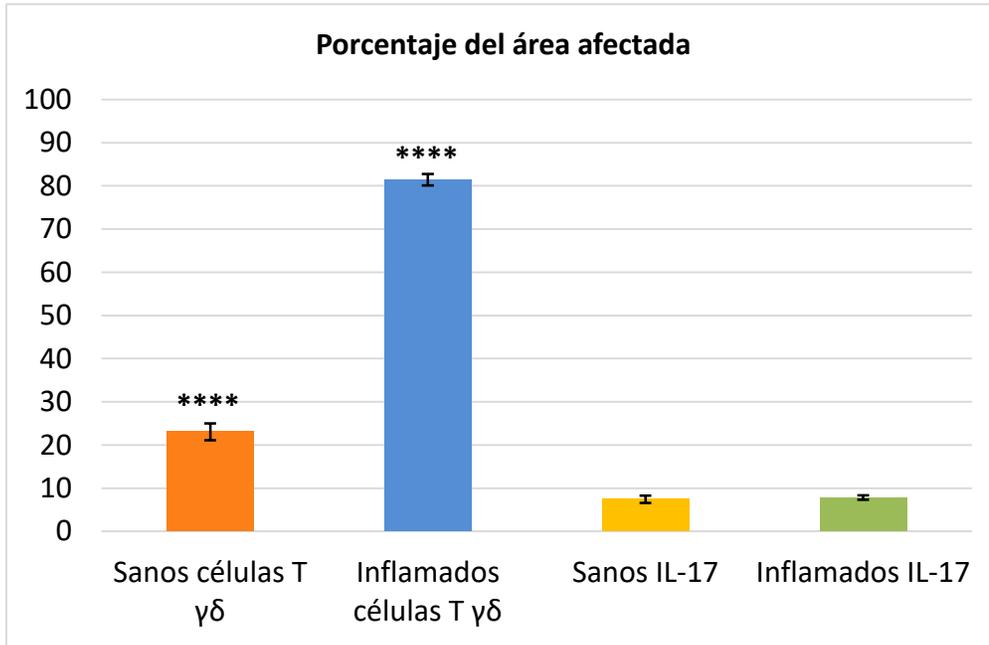
| Tabla 16. Expresión de IL-17 | | |
|------------------------------|-------------------|------------|
| Grupo | Promedio del área | Porcentaje |
| Sanos IL-17 | 372599 | 7 |
| Desviación estándar | 287211 | 6 |
| Error estándar | 43299 | 1 |
| Inflamados IL-17 | 393159 | 8 |
| Desviación estándar | 177657 | 4 |
| Error estándar | 26783 | 1 |

Tabla 16. Tabla en la que se presenta los promedios y porcentajes de la expresión de IL-17 en los grupos sanos e inflamados, así como la desviación estándar y error estándar.



Gráfica 2. Gráfica de datos en la cual se compara porcentaje del área afectada en los grupos de tejidos sanos e inflamados de interleucina 17. Las barras muestran el promedio, \pm EE del área afectada en pixeles en las fotomicrografías. El eje y representa el porcentaje de expresión evaluado en los tejidos. El valor $p \leq 0.05$ se considera estadísticamente significativo, sin embargo, la p obtenida entre estos grupos no mostró diferencias ($p = 0.6651$) al comparar el grupo sano con el grupo inflamado.

*100 = 5 002 624 pixeles



Gráfica 3. Gráfica de datos del porcentaje del área afectada en donde se comparan los grupos sanos e inflamados de células T $\gamma\delta$ e IL-17. Así como porcentaje de expresión evaluado en los tejidos

*100 = 5 002 624 pixeles

RESUMEN DE RESULTADOS

- Se recolectaron un total de 20 muestras. De acuerdo al diagnóstico histopatológico, 6 muestras correspondieron a tejidos sanos (30%) y 14 muestras a tejidos inflamados (70%).
- Los tejidos gingivales mostraron histológicamente una adecuada organización del epitelio en sus diferentes estratos (basal, espinoso, granuloso y córneo); el tejido conectivo subyacente mostró un compartimento extracelular y una sustancia fundamental amorfa con presencia de fibroblastos y algunas células polimorfonucleares, así como pocos vasos sanguíneos de pequeño calibre.
- Los tejidos inflamados mostraron una adecuada organización estructural del epitelio y tejido conectivo, sin embargo, este grupo de tejidos mostró una abundante presencia de células polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas en el tejido conectivo; así como presencia de múltiples capilares dilatados de diferentes calibres con eritrocitos en la luz de los mismos.
- Los resultados provenientes de inmunohistoquímica en tejidos histológicamente sanos mostraron algunas células T $\gamma\delta$ positivas y algunas zonas con expresión de IL-17 en el epitelio y tejido conectivo. En los tejidos inflamados, se observó una mayor expresión de células T $\gamma\delta$ e IL-17 distribuida tanto en el epitelio como en el tejido conectivo y alrededor de los vasos; así como como la presencia de células con morfología similar a linfocitos, células mononucleares y neutrófilos distribuidos en el infiltrado inflamatorio del tejido conectivo.
- Respecto al análisis de células T $\gamma\delta$ el grupo sano mostró un porcentaje de expresión de células T $\gamma\delta$ del 23%; mientras que el grupo de tejidos inflamados obtuvo un 81% de expresión. Los resultados fueron estadísticamente significativos mostrando diferencias entre los dos grupos ($p < 0.0001$ ****)

- Respecto a la IL-17, el grupo de tejidos sanos mostró un porcentaje de expresión del 7% mientras que el grupo de tejidos inflamados mostraron un 8% de expresión. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos ($p= 0.6651$)

DISCUSIÓN

El periodonto representa el soporte del diente y está formado por tejido gingival, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular (22).

Bajo el concepto de salud de la OMS, la salud periodontal debe basarse en la ausencia de enfermedad. En el periodonto, salud se describe como un estado de ausencia de inflamación, ya sea asociada a gingivitis, periodontitis u otras afecciones periodontales. (21). Cabe mencionar que la nueva clasificación del 2017 sobre Condiciones y Enfermedades Periodontales, considera “salud periodontal” incluso en pacientes que han tenido antecedentes de gingivitis, periodontitis u otras afecciones tratadas con éxito, siempre y cuando estos pacientes hayan podido mantener sus tejidos periodontales sin signos de inflamación gingival clínica (25).

La inflamación es normalmente una respuesta saludable y autolimitada, no obstante, la inflamación crónica puede resultar de la persistencia de estímulos inflamatorios o una desregulación de los mecanismos endógenos antiinflamatorios (62).

En la enfermedad periodontal, la inflamación es un determinante clave en la inmunopatogenia de la enfermedad, la cual, de acuerdo a Page y Schroeder, presenta 4 estadios en su desarrollo: 1) Lesión inicial, 2) lesión temprana, 3) lesión establecida y 4) lesión avanzada o tardía. (33, 23, 34).

Las muestras que analizamos en este estudio fueron diagnosticadas como clínicamente sanas, basándonos en los siguientes parámetros clínicos: encía festoneada, con textura de cáscara de naranja, coloración rosa coral o rosa pálido y profundidad de sondeo no mayor a 3 mm; de tal manera que todas las muestras analizadas se encontraban en el primer estadio de desarrollo: lesión inicial. Posteriormente, analizamos la histología de estos tejidos sanos y la mayor parte de ellas (70%) presentaban ligero infiltrado inflamatorio, tal como lo describe Page y Schroeder en la “lesión inicial”; la cual no es una lesión clínicamente visible, únicamente puede ser observada histológicamente, en donde

se podrá observar el epitelio de unión y la parte más coronal del tejido conectivo, así como dilatación de las arteriolas, capilares y vénulas del plexo dento-gingival; situación que se conoce como edema. En esta lesión inicial existe también, un mayor flujo de líquido crevicular y migración de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) hacia el surco gingival, sitio en el que estas células producen y liberan diversas citocinas como la IL-17, la cual, puede inducir la llegada de células inflamatorias (33). En esta fase, Kinane y Lang, reportaron también que la presencia de este infiltrado inflamatorio está formado por proteínas séricas y células inflamatorias que ocupan del 5% al 10% del tejido conectivo gingival debajo del epitelio (23, 34).

En un estudio realizado en 2008, se realizó una evaluación histomorfológica en cortes de mucosa oral normal o bien, mucosa oral sana, teñidos con hematoxilina/eosina, y mostraron las características descritas por Stern (63); esto es, un revestimiento epitelial estratificado paraqueratinizado en la mayoría de las muestras, así como de tipo hiperparaqueratinizado en pocos casos; la lámina propia se encuentra constituida por un tejido conectivo fibroso cuya densidad variaba de fibroso denso a laxo; dichos tejidos los describen como moderadamente vascularizado exhibiendo, ocasionalmente, discreto infiltrado inflamatorio mononuclear de densidad variable en posición predominantemente perivascular, siendo predominantemente intenso en el 24% de los especímenes, moderado en el 64,0% y discreto en el 12,0% de los casos.

Todos los tejidos gingivales analizados en nuestro estudio, mostraron histológicamente una adecuada organización del epitelio en sus diferentes estratos (basal, espinoso, granuloso y córneo); el tejido conectivo subyacente mostró un compartimento extracelular y una sustancia fundamental amorfa con presencia de fibroblastos y algunas células polimorfonucleares, así como pocos vasos sanguíneos de pequeño calibre en tejidos sanos; mientras que los tejidos inflamados mostraron una abundante presencia de células polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas en el tejido conectivo; así como presencia de múltiples capilares dilatados de diferentes calibres con eritrocitos y células inmunes en la luz de los mismos. De este modo, éstos tejidos fueron clasificados

histológicamente como sanos e inflamados basándonos en la ausencia (<5%) o presencia de infiltrado (<10%) inflamatorio, respectivamente; tal como lo reportan algunos autores en esta fase o lesión inicial (33, 62, 64), donde la presencia de este infiltrado se observa en una baja densidad, (62), aunque con densidades variables de discreto a intenso (64); reportando que la mucosa oral en salud se presenta como un tejido moderadamente vascularizado con un discreto infiltrado inflamatorio en el 12% de los casos, moderado en un 64% e intenso en un 24%.

Dichos datos coinciden con nuestros resultados, donde se analizaron un total de 20 muestras de tejido gingival clínicamente sanos, y de acuerdo al diagnóstico histopatológico, 6 de esas muestras correspondieron a tejidos sanos al no mostrar infiltrado inflamatorio (<5%) y 14 muestras a tejidos inflamados, representando así un porcentaje del 30% para tejidos sanos y 70% en los tejidos con inflamación histológica.

Estos resultados sugieren que la presencia de infiltrado inflamatorio en mucosa oral sana puede estar asociado a un proceso de defensa regulado por el sistema inmune ante la presencia de múltiples especies de microorganismos presentes en la biopelícula dental, y ante la cual deben existir mecanismos de compensación para regular el microambiente inflamatorio (62).

Otro de los factores implicados en la activación del microambiente inflamatorio en el desarrollo de la enfermedad periodontal es la composición bacteriana de la biopelícula dental subgingival. Las biopelículas dentales diferencialmente la respuesta inmune epitelial basándose en sus propiedades y su composición (21). Estas comunidades bacterianas representan una colección de microorganismos comensales que coexisten en relativa armonía en condiciones de salud, encontrándose en un estado de simbiosis con los tejidos adyacentes de su hospedador; y pasando a un estado de disbiosis en condiciones inflamatorias implicadas en el desarrollo de gingivitis y periodontitis. Estos estados de disbiosis pueden resultar en la sobreproducción de factores de virulencia provenientes de la biopelícula y son capaces de exacerbar el estado inflamatorio de los tejidos periodontales

(65, 66) al interactuar directamente con receptores de las células que conforman el epitelio, así como con células inmunes que forman parte de la primera línea de defensa del huésped.

En el periodonto, la inmunidad innata incluye las barreras físicas, como lo es la superficie epitelial, la cual está conformada por diferentes tipos de células estructurales e inmunes, dentro de las cuales se encuentran los neutrófilos y las células T $\gamma\delta$, que forman parte del primer contacto con los microorganismos de la biopelícula oral.

Las células T $\gamma\delta$ son un tipo de linfocitos que presentan funciones innatas y adaptativas, tales como presentación de antígenos, vigilancia inmunológica, colaboran en la maduración de células dendríticas y en la activación de células B tras la producción de citocinas y quimiocinas (67). Son células capaces de producir citocinas como IL10, las il-5, il-13, INF- γ (36). Además, representan una de las fuentes más importantes de producción de IL-17, y se ha reportado que cuando la IL-17 es secretada por las células T $\gamma\delta$ tiene como función principal la defensa de las mucosas (36). Sin embargo, también se ha reportado un papel importante para esta citocina en la patogénesis de la periodontitis debido a su participación en la respuesta inflamatoria, induciendo la producción de IL-1 β en los osteoblastos, así como la expresión del receptor activador del ligando del factor nuclear kappa B (RANKL) en las mismas células, y también se ha visto involucrada en la diferenciación y activación de los osteoclastos implicados en la resorción ósea (55).

Nuestros resultados provenientes de inmunohistoquímica en tejidos histológicamente sanos mostraron algunas células T $\gamma\delta$ positivas y algunas zonas con expresión de IL-17 en el epitelio y tejido conectivo. En los tejidos inflamados, se observó una mayor expresión de células T $\gamma\delta$ e IL-17 distribuida tanto en el epitelio como en el tejido conectivo y alrededor de los vasos; así como como la presencia de células con morfología similar a linfocitos, células mononucleares y neutrófilos distribuidos en el infiltrado inflamatorio del tejido conectivo.

Este estudio demostró que existe una mayor expresión de células T $\gamma\delta$ en tejidos histológicamente inflamados, los cuales mostraron un abundante infiltrado inflamatorio en

comparación con los tejidos sanos, y cuyos resultados fueron estadísticamente significativos. En el caso de IL-17, a pesar de también observarse un incremento en el marcaje de esta citocina proinflamatoria en los tejidos inflamados, la diferencia estadística no fue significativa entre los dos grupos; lo que nos sugiere que las células T $\gamma\delta$ presentan funciones inmunoregulatoras en la mucosa oral al observarse un incremento en su número en tejidos cuyo infiltrado inflamatorio es abundante; sin embargo, es importante mencionar que la expresión de IL-17 se mantuvo en niveles similares en ambos grupos, aun cuando las células T $\gamma\delta$ son capaces de producir esta citocina e incluso, han sido reportadas como una de las fuentes más importantes de esta molécula proinflamatoria (36). Por estas razones, creemos que las células T $\gamma\delta$ son unas de las células innatas con funciones regulatorias muy importantes en los tejidos gingivales, al menos en la fase inicial de la inmunopatogenia de la enfermedad periodontal, ya que esta etapa no representa enfermedad, sino salud periodontal y corresponde a una fase inicial de la inmunopatogenia donde no existe eritema, inflamación gingival clínica ni sangrado al sondaje debido a que las estructuras histológicas se encuentran intactas gracias a la homeostasis llevada a cabo por células inmunes y estructurales del tejido, que a pesar de reconocer las especies patógenas a través de receptores innatos como PAMPs o NLR, logran activar una respuesta inflamatoria (que generalmente es de tipo agudo) pero regulando los niveles de activación celular y liberación de moléculas proinflamatorias para evitar desarrollar una cronicidad de la misma y el consecuente daño tisular irreversible sobre los tejidos periodontales (62).

De esta manera, el infiltrado inflamatorio observado en algunos tejidos clínicamente sanos, podría corresponder a respuestas inflamatorias controladas que surgen como resultado de la regulación e inmunovigilancia llevada a cabo por parte de algunas células innatas, tales como las células T $\gamma\delta$, que al estar en constante contacto con los microorganismos y sus productos de la biopelícula oral, generan respuestas de baja activación; tomando en cuenta que la IL-17 secretada por las células T $\gamma\delta$ tiene como función principal la defensa de las mucosas contra infecciones por bacterias hongos y parásitos (36),

pudiendo inducir la producción de péptidos antimicrobianos considerados protectores en la periodontitis (56).

CONCLUSIÓN

- La enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria que afecta mayoritariamente a adultos de mediana edad y cuya respuesta inmune es variable entre individuos sanos, en la cual se encuentran involucrados diferentes tipos celulares y la liberación de diversas citocinas, como lo son las células T $\gamma\delta$ y la IL-17.
- Las células T $\gamma\delta$ presentan funciones de tipo innato y adaptativo, son fuente importante en la producción y liberación de IL-17; citocina cuya principal función es la defensa de las mucosas ante diferentes microorganismos.
- La localización de las células T $\gamma\delta$ en tejidos histológicamente sanos es principalmente en los estratos córneo y espinoso del tejido epitelial; mientras que la expresión de IL-17 en este grupo de tejidos es en los estratos basal y espinoso del epitelio, así como en fibras colágenas del tejido conectivo.
- La inmunolocalización de células T $\gamma\delta$ e IL-17 en tejidos inflamados es en epitelio y tejido conectivo. Hay presencia de ambos marcadores alrededor de los capilares presentes en inflamación.
- El promedio de expresión del grupo de tejidos sanos y tejidos inflamados, mostró que existe diferencia significativa en la inmunoexpresión de células T $\gamma\delta$. Mientras que, en la expresión de IL-17, se encontró que no existe diferencia entre la inmunoexpresión de esta citocina en tejidos histológicamente sanos respecto a los inflamados
- La presencia de células T $\gamma\delta$ se incrementó significativamente en tejidos que muestran inflamación en comparación con los tejidos sanos; mientras que il-17 no mostró cambios significativos, lo que sugiere un papel inmunoregulator por parte de las células T $\gamma\delta$.

ANEXOS

1. CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA

1

Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 20 de mayo de 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CIE/0110/11/2018

ASUNTO: Respuesta del Comité de Investigación y Ética de la
Facultad de Odontología, UNAM.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: *Análisis del papel de células de la respuesta inmune innata (Células T yδ, Neutrófilos y Células Th17) y sus citocinas proinflamatorias en el desarrollo de La Enfermedad Periodontal.*

RESPONSABLE: Dra. Claudia Patricia Pedraza Zamora

Dra. Claudia Patricia Pedraza Zamora:

Este Comité de Investigación y Ética, reunido el día 13 de mayo de 2019 a las 16:30, en la segunda sesión del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología del año 2019, llevada a cabo en la Sala de Juntas de la Subjefatura de Investigación, División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología y estando presentes los siguientes miembros del CIEFO: Mtra. Ana Patricia Vargas Casillas, Dra. Ana María Wintergerst Lavín, Mtra. Raquel Yáñez Ocampo, Dr. Juan Pablo Méndez Blanco, Dr. Eduardo Llamosas Hernández y Dra. Socorro Aída Borges Yáñez.

Una vez que este Comité de Investigación y Ética llevó a cabo la evaluación del protocolo de investigación, formato de consentimiento informado y carta de consentimiento informado determinó que:

HA SIDO APROBADO Y SE OTORGA EL AVAL PARA REALIZARSE.

Ni el investigador principal, ni el corresponsable de la investigación tomaron parte en la decisión del

FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

ATENTAMENTE




Dra. Socorro Aída Borges Yáñez
Presidenta del Comité de Investigación y Ética de la
Facultad de Odontología

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA

2. CONSENTIMIENTO INFORMADO



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE TEJIDO PARA INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA

Proceso para proporcionar el tejido para usarlo en investigación.

Se le invita a proporcionar el tejido que se obtendrá de su cirugía para ser utilizado en siguientes investigaciones en odontología.

Antes de decidir sobre su participación, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes puntos. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con total libertad para preguntar sobre cualquier punto para ayudarlo a aclarar las dudas relacionadas. Una vez que haya leído esta carta de consentimiento y si usted desea proporcionar su tejido, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y con fecha.

Justificación

Al proporcionar el tejido proveniente de su cirugía no afecta ni pone en riesgo su salud, ni interfiere en saber el padecimiento, lesión y/o enfermedad que tiene o tratamiento que se le vaya a realizar. El tejido que se obtiene de las cirugías después de ser procesado y diagnosticado se almacena; pero, cuando no se requiere para saber sobre algún tipo de padecimiento, lesión y/o enfermedad, se desecha y se quema de la siguiente manera: al finalizar la cirugía se colocará en una bolsa amarilla la cual será llevada a quemar por la empresa Bio- Tratamientos México, S. A de C. V. (BIOTRAMEX). El tejido proporcionado, para la investigación, es muy importante ya que de estos tejidos se pueden obtener cultivos de células, pruebas de genes, etc., que ayudaran al avance de la medicina; lo que llevará a la obtención de nuevas formas para tratar enfermedades que afectan de manera frecuente al ser humano.

Objetivo

El objetivo de solicitar que proporcione el tejido es: obtener muestras de tejido de la encía para investigar dentro de un laboratorio; en el cual se analizarán diferentes células que se encuentran en ese tejido y se les realizarán diferentes pruebas para ver sus funciones, y la relación que tiene con la enfermedad periodontal.

Beneficios

La información que se obtenga de la investigación que se realiza sobre estos tejidos se utiliza para mejorar la forma de identificar distintas enfermedades, generar conocimientos científicos y diseñar nuevas maneras para tratar enfermedades que afectan al ser humano.

Procedimientos

El procedimiento que le explicó su Cirujano Dentista no se verá afectado de ningún modo. Solo se pedirá que proporcione datos generales (edad, género, ocupación, etc), enfermedades y/o lesiones que padezca, ubicación y características de la lesión, procedimiento quirúrgico y cual es el nombre de la enfermedad o lesión que padece. El tejido obtenido va a ser colocado en un medio adecuado para después procesar el tejido obtenido.

Aclaraciones

La decisión de proporcionar o no el tejido, es completamente voluntaria (es decir no es obligatoria o a fuerzas).

- No habrá ninguna consecuencia en caso de no proporcionar el tejido.
- No tendrá que hacer gasto alguno en caso de proporcionar el tejido.
- La información personal obtenida en este estudio, utilizada para identificar a cada paciente, será mantenida oculta por el grupo de investigadores, por lo cual su nombre será sustituido por un número de folio.
- **La participación en este proyecto no implica la obtención de servicio dental gratis o ningún tipo de ayuda económica para el tratamiento dental.**
- La participación en este proyecto no brinda ninguna ayuda económica.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de **Consentimiento Informado** anexa a este documento.

En caso de tener cualquier duda relacionada con el procedimiento de este estudio, usted puede comunicarse con la **Dra. Claudia Patricia Pedraza Zamora al teléfono: 55 55030933**

- **POR FAVOR CONSERVE ESTA HOJA**



"INMUNOEXPRESIÓN DE NÚTRÓFILOS, INTERLEUCINA 17 (IL-17 A/F) Y ELASTASA (NE) EN TEJIDOS PERIODONTALES SANOS Y CON ENFERMEDAD PERIODONTAL"

Consentimiento Informado

Yo, _____
he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en proporcionar el tejido obtenido de mi cirugía para investigaciones en odontología.

Recibí una copia firmada y con fecha de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del paciente participante (padre ó tutor responsable del menor de edad) (en caso que aplique) **Fecha**
Domicilio:

Teléfono: _____

Nombre y Firma del Testigo 1 **Fecha** 2/6
Relación con el participante:

Teléfono _____
Domicilio:

Nombre y Firma del Testigo 2 **Fecha**
Relación con el participante: _____

Teléfono _____
Domicilio:

Esta parte debe ser completada por el Investigador:
He explicado al Sr(a). _____ la razón y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.



"INMUNOEXPRESIÓN DE NEUTRÓFILOS, INTERLEUCINA 17 (IL-17 A/F) Y ELASTASA (NE) EN TEJIDOS PERIODONTALES SANOS Y CON ENFERMEDAD PERIODONTAL"

Consentimiento Informado

Yo, _____
he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en donar el tejido proveniente de mi cirugía para investigaciones en odontología.

Recibí una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del paciente participante (padre ó tutor responsable del menor de edad) (en caso que aplique) **Fecha**
Domicilio:

Teléfono: _____

Nombre y Firma del Testigo 1 **Fecha**
Relación con el participante: _____
Teléfono _____
Domicilio:

Nombre y Firma del Testigo 2 **Fecha**
Relación con el participante: _____
Teléfono _____
Domicilio:

Esta parte debe ser completada por el Investigador:

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco las reglas que correspondientes para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador **Fecha**
Hoja para el donador



"INMUNOEXPRESIÓN DE NEUTRÓFILOS, INTERLEUCINA 17 (IL-17 A/F) Y ELASTASA (NE) EN TEJIDOS PERIODONTALES SANOS Y CON ENFERMEDAD PERIODONTAL"

Solicitud de Anulación del Consentimiento Informado

Yo, _____
por este medio deseo informar mi decisión de anular mi autorización para proporcionar el tejido obtenido de mi cirugía para investigación en odontología.

Recibí una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del paciente participante (padre ó tutor responsable del menor de edad) (en caso que aplique) **Fecha**
Domicilio:

Teléfono: _____

Nombre y Firma del Testigo 1 **Fecha**
Relación con el participante: _____
Teléfono _____
Domicilio:

Nombre y Firma del Testigo 2 **Fecha**
Relación con el participante: _____
Teléfono _____
Domicilio:

Firma del investigador **Fecha**

Hoja para el investigador



"INMUNOEXPRESIÓN DE NEUTRÓFILOS, INTERLEUCINA 17 (IL-17 A/F) Y ELASTASA (NE) EN TEJIDOS PERIODONTALES SANOS Y CON ENFERMEDAD PERIODONTAL"

Solicitud de Anulación del Consentimiento Informado

Yo, _____
por este medio deseo informar mi decisión de anular mi autorización para proporcionar el tejido obtenido de mi cirugía para investigación en odontología.

Recibí una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del paciente participante (padre ó tutor responsable del menor de edad) (en caso que aplique) **Fecha**
Domicilio:

Teléfono: _____

Nombre y Firma del Testigo 1 **Fecha**
Relación con el participante: _____
Teléfono _____
Domicilio:

Nombre y Firma del Testigo 2 **Fecha**
Relación con el participante: _____
Teléfono _____
Domicilio:

Firma del investigador **Fecha**

Hoja para el donador

3. Resultados análisis digital de imágenes

Resultados obtenidos del análisis digital de fotomicrografías realizado con el software *Fiji* (Image J), en donde el área significa el número de píxeles marcados como positivos para la expresión de células T $\gamma\delta$ y de IL-17 en tejidos sanos e inflamados respectivamente. Así como el promedio de color expresado en cada imagen.

| Resultados obtenidos del análisis digital de fotomicrografías de tejidos sanos | | | | |
|--|-------------------------------|--|------------|-------------------------|
| Número de muestra | Área células T $\gamma\delta$ | Promedio de color células T $\gamma\delta$ | Área IL-17 | Promedio de color IL-17 |
| Muestra 1 | 470496 | 218.569 | 339280 | 220.811 |
| | 1065613 | 217.032 | 149146 | 218.608 |
| | 3464407 | 205.931 | 110787 | 220.89 |
| | 1349055 | 214.249 | 234203 | 219.708 |
| | 683960 | 218.638 | 1070967 | 221.121 |
| | 908954 | 218.957 | 236469 | 221.32 |
| | 2488792 | 207.252 | 287513 | 220.362 |
| | 2256010 | 216.244 | 709403 | 221.252 |
| Muestra 2 | 1557342 | 205.858 | 480453 | 210.256 |
| | 1328534 | 212.446 | 604640 | 208.98 |
| | 1453310 | 211.91 | 759152 | 211.132 |
| | 1317083 | 210.245 | 769879 | 210.31 |
| | 1724381 | 204.304 | 309930 | 214.163 |
| | 2110488 | 211.726 | 224819 | 213.673 |
| | 1902505 | 216.283 | 517757 | 211.687 |
| | 3653653 | 207.439 | 700818 | 211.54 |
| Muestra 3 | 165267 | 215.918 | 230746 | 219.7 |
| | 391616 | 218.425 | 159745 | 217.052 |
| | 356116 | 219.47 | 557363 | 215.812 |
| | 497492 | 219.395 | 318343 | 216.102 |
| | 773345 | 216.537 | 267023 | 214.751 |
| | 689325 | 218.111 | 454998 | 220.109 |

| | | | | |
|-----------|-----------|---------|---------|---------|
| | 846951 | 213.85 | 580242 | 217.39 |
| | 512801 | 218.563 | 175858 | 219.188 |
| Muestra 4 | 1889227 | 213.003 | 107226 | 219.667 |
| | 1348432 | 216.932 | 141027 | 221.393 |
| | 2672317 | 206.784 | 150644 | 216.859 |
| | 1307095 | 211.422 | 368187 | 222.403 |
| | 1968457 | 216.076 | 119472 | 215.385 |
| | 2726167 | 211.606 | 428477 | 212.589 |
| | 1492685 | 218.53 | 449789 | 222.074 |
| | 1867254 | 212.506 | 272363 | 218.026 |
| | Muestra 5 | 1076346 | 212.393 | 787018 |
| 2987631 | | 206.419 | 933223 | 217.464 |
| 673794 | | 212.336 | 2233144 | 212.427 |
| 1655527 | | 211.554 | 702263 | 213.653 |
| 2225405 | | 203.231 | 1552804 | 206.745 |
| 2736910 | | 213.101 | 1309896 | 218.024 |
| 2618287 | | 209.821 | 1061637 | 216.503 |
| 1466436 | | 220.153 | 26767 | 219.478 |
| Muestra 6 | 382701 | 218.274 | 231690 | 216.861 |
| | 3248203 | 216.049 | 88189 | 215.684 |
| | 1596310 | 217.327 | 76218 | 216.611 |
| | 732550 | 217.068 | 83817 | 208.389 |
| | 400342 | 221.506 | 26517 | 220.265 |
| | 931563 | 219.537 | 45325 | 221.28 |
| | 488781 | 216.721 | 44963 | 219.189 |
| | 3202243 | 205.319 | 2780872 | 220.321 |

**Resultados obtenidos del análisis digital de fotomicrografías
de tejidos inflamados**

| Número de muestra | Área células T $\gamma\delta$ | Promedio de color células T $\gamma\delta$ | Área IL-17 | Promedio de color IL-17 |
|--------------------------|---|--|-------------------|--------------------------------|
| Muestra 1 | 2382168 | 207.181 | 526527 | 214.955 |

| | | | | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|
| | 2837446 | 218.082 | 1191109 | 217.93 |
| | 3941314 | 209.608 | 220233 | 216.757 |
| | 2625200 | 218.798 | 613962 | 219.948 |
| | 2861560 | 217.852 | 626675 | 219.719 |
| | 3477775 | 216.787 | 498279 | 221.316 |
| | 3380026 | 216.692 | 499702 | 220.225 |
| | 748727 | 216.352 | 459669 | 221.678 |
| Muestra 2 | 4055226 | 206.272 | 3304982 | 220.665 |
| | 4391708 | 198.974 | 1232759 | 220.794 |
| | 4898235 | 198.483 | 2427172 | 220.919 |
| | 4879965 | 201.576 | 1998993 | 218.816 |
| | 4913415 | 202.687 | 574225 | 222.056 |
| | 4819318 | 198.689 | 2967987 | 217.023 |
| | 4075813 | 210.168 | 2967987 | 217.023 |
| | 2458967 | 219.32 | 646066 | 222.677 |
| Muestra 3 | 3860970 | 197.955 | 3360765 | 201.599 |
| | 2903689 | 216.046 | 725140 | 217.082 |
| | 3158414 | 211.012 | 610849 | 217.836 |
| | 4818501 | 196.955 | 1474130 | 214.209 |
| | 3995243 | 205.91 | 862646 | 213.047 |
| | 3749494 | 214.468 | 375768 | 217.263 |
| | 3906067 | 214.515 | 345906 | 220.043 |
| | 4013120 | 206.979 | 267955 | 217.956 |
| Muestra 4 | 4489691 | 201.605 | 2169915 | 201.443 |
| | 3881169 | 209.622 | 2068156 | 211.184 |
| | 3790864 | 205.487 | 3162534 | 202.159 |
| | 4185428 | 197.531 | 1879539 | 200.668 |
| | 4156988 | 195.571 | 2546327 | 209.709 |
| | 3754931 | 205.087 | 3051449 | 207.967 |
| | 3936113 | 204.007 | 2056997 | 211.147 |
| | 3937611 | 210.026 | 3383818 | 200.891 |
| Muestra 5 | 3775023 | 208.776 | 1035028 | 219.592 |
| | 4576247 | 206.212 | 450629 | 220.317 |
| | 4782062 | 198.183 | 137611 | 222.601 |
| | 4490751 | 201.941 | 841167 | 222.868 |
| | 4609104 | 202.848 | 557310 | 219.762 |

| | | | | |
|------------|---------|---------|---------|---------|
| | 4564478 | 206.094 | 906100 | 222.522 |
| | 3937019 | 210.901 | 442379 | 221.437 |
| | 3520298 | 209.329 | 501395 | 220.029 |
| Muestra 6 | 2725607 | 211.435 | 366943 | 212.507 |
| | 1826370 | 214.009 | 87267 | 220.734 |
| | 2473505 | 215.187 | 291444 | 217.424 |
| | 4359977 | 213.573 | 224008 | 219.556 |
| | 1389738 | 214.965 | 115747 | 216.457 |
| | 2731192 | 213.703 | 22928 | 220.467 |
| | 3959989 | 208.901 | 460854 | 207.638 |
| | 2985723 | 212.035 | 146232 | 222.805 |
| Muestra 7 | 2624316 | 205.383 | 405539 | 223.051 |
| | 4857076 | 200.884 | 1009149 | 223.085 |
| | 4935624 | 197.997 | 924109 | 222.506 |
| | 4775628 | 202.362 | 802776 | 220.895 |
| | 4535158 | 206.482 | 1016000 | 221.78 |
| | 3272766 | 213.516 | 702327 | 221.524 |
| | 4803617 | 207.277 | 454365 | 219.915 |
| | 4886100 | 204.554 | 301558 | 218.659 |
| Muestra 8 | 1990038 | 208.283 | 1804792 | 210.011 |
| | 3208426 | 195.803 | 328403 | 218.548 |
| | 2902853 | 210.049 | 466141 | 209.397 |
| | 2905891 | 206.36 | 346932 | 220.259 |
| | 1832262 | 209.782 | 1284771 | 210.192 |
| | 4237036 | 202.049 | 752475 | 211.594 |
| | 4222513 | 205.188 | 1329054 | 212.089 |
| | 3989401 | 202.127 | 324901 | 217.765 |
| Muestra 9 | 4152198 | 207.205 | 522070 | 217.825 |
| | 4855500 | 195.391 | 3849214 | 213.603 |
| | 4303224 | 204.594 | 1666565 | 219.429 |
| | 4884957 | 196.808 | 1374318 | 218.913 |
| | 4797972 | 199.798 | 536570 | 220.858 |
| | 4670525 | 202.723 | 1945593 | 217.687 |
| | 4779610 | 200.468 | 787552 | 217.888 |
| | 4633860 | 203.004 | 1671900 | 220.329 |
| Muestra 10 | 3075926 | 214.86 | 336867 | 220.713 |
| | 4881614 | 205.565 | 399852 | 216.462 |
| | 3403965 | 215.822 | 619430 | 212.386 |
| | 4793799 | 204.72 | 858207 | 211.419 |

| | | | | |
|------------|---------|---------|---------|---------|
| | 4802054 | 205.078 | 462825 | 216.07 |
| | 3576407 | 212.282 | 639030 | 207.892 |
| | 2290047 | 215.798 | 70478 | 222.202 |
| | 2391204 | 218.601 | 228983 | 219.678 |
| Muestra 11 | 2057337 | 218.829 | 3303988 | 218.423 |
| | 2266222 | 217.366 | 3837641 | 213.662 |
| | 1916279 | 210.576 | 2999486 | 217.015 |
| | 3084241 | 213.965 | 3339212 | 217.033 |
| | 3815331 | 212.609 | 3045455 | 216.223 |
| | 1825189 | 216.218 | 3711052 | 216.898 |
| | 2126491 | 209.838 | 3328212 | 217.729 |
| | 1413803 | 217.323 | 2454666 | 219.165 |
| Muestra 12 | 3643602 | 213.225 | 316247 | 223.297 |
| | 3897382 | 211.423 | 280018 | 223.397 |
| | 3497960 | 210.901 | 91319 | 223.167 |
| | 3098129 | 216.076 | 122051 | 221.921 |
| | 3740499 | 211.806 | 99817 | 222.999 |
| | 3780485 | 213.244 | 391175 | 220.067 |
| | 4149084 | 211.666 | 525580 | 219.6 |
| | 4033379 | 212.917 | 508318 | 223.132 |
| Muestra 13 | 4794807 | 201.708 | 1175519 | 218.227 |
| | 4425042 | 207.237 | 656675 | 215.01 |
| | 3875498 | 207.889 | 647668 | 216.216 |
| | 4905830 | 203.73 | 1447319 | 211.64 |
| | 4914607 | 203.738 | 678951 | 215.732 |
| | 4848294 | 199.863 | 1398359 | 218.255 |
| | 4774992 | 203.01 | 1464541 | 218.543 |
| | 4459132 | 205.998 | 446771 | 217.06 |
| Muestra 14 | 3815397 | 213.989 | 2678140 | 211.337 |
| | 2787181 | 213.874 | 2514606 | 213.136 |
| | 3644926 | 212.329 | 630457 | 215.656 |
| | 3292196 | 216.671 | 2112044 | 217.2 |
| | 3396905 | 213.141 | 1645934 | 217.498 |
| | 3169964 | 213.668 | 1670314 | 214.957 |
| | 3104137 | 218.331 | 2394224 | 215.569 |
| | 3513707 | 213.308 | 1944238 | 216.656 |

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Needleman I., Garcia R., Gkrantias N., Kirkwood KL., Kocher T., Di-Iorio A., Et al. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. JPER. 2017; (2017): 17-0062.
2. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. Australian Dental Journal. 2009; (54): 11–26.
3. Cortés-Vieyra R, Rosales C, Uribe-Querol E. Neutrophil Functions in Periodontal Homeostasis. Journal of Immunology Research. 2016; (2016): 1-9.
4. Billings M., Holtfreter B., Papapanou NP., Lopez-Mitnik G., Kocher T., Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. J Periodontol. 2018; 89 (Suppl 1): S140–S158.
5. Organización Mundial de la Salud. Epidemiología. OMS. [Consultado noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/topics/epidemiology/es/>
6. AlJehani YA. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. International Journal of Dentistry. 2014; (2014): 1-9.
7. Preshaw P. M., Alba A. L., Herrera D., Jepsen S., Konstantinidis A., Makrilakis K., Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. Diabetologia. 2012; 55(1), 21-31.
8. Zee KY. Smoking and periodontal disease. Australian Dental Journal. 2009; 54:(1 Suppl): S44–S50.
9. Melandri D., Zlatareva I., Chaleil RAG., Dart RJ., Chancellor A., Nussbaumer O., Et al. The $\gamma\delta$ TCR combines innate immunity with adaptive immunity by utilizing spatially distinct regions for agonist selection and antigen responsiveness. Nature Immunology. 2018; 19: (12): 1352-1365.
10. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000. 2005; (38): 135-187.
11. Kinane DF., Stathopoulou P. Periodontal diseases. Nature Reviews Disease Primers. 2017; 3: (1): 1-14.

12. Billings M., Holtfreter B., Papapanou NP., Lopez-Mitnik G., Kocher T., Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Periodontol.* 2018; 89 (Suppl 1): S140–S158.
13. Organización Mundial de la Salud. Epidemiología. OMS. [Consultado enero 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/topics/epidemiology/es/>.
14. García-Conde GG., Espinosa de Santillana IA, Martínez-Arroniz F., Huerta-Herrera N, Islas-Márquez AJ., Medina-Solís CE. Necesidades de tratamiento periodontal en adultos de la región rural Mixteca del Estado de Puebla, México. 2010; *Rev. salud pública.* 12 (4): 647-657.
15. Borges-Yañez SA., Irigoyen-Camacho ME., Maupomé G. Risk factors and prevalence of periodontitis in community-dwelling elders in Mexico. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 184–194.
16. García-Pérez A., Borges-Yañez SA., Jiménez-Corona A., Jiménez-Corona ME., Ponce de León S. Self-report of gingival problems and periodontitis in indigenous and non-indigenous populations in Chiapas, Mexico. *International Dental Journal.* 2016; 66: 105–112.
17. Secretaría de Salud. Gingivitis y enfermedades periodontales. *Vigilancia Epidemiológica.* 2010; 10 (27): 1-3.
18. Bascones-Martínez A., Figuero-Ruiz E. Periodontal diseases as bacterial infection. *Av Periodon Implantol.* 2005; 17, 3: 111-118.
19. Fajardo-Puig ME., Rodríguez-Reyes O., Rodríguez-Bacallao A. Las hormonas sexuales femeninas y su relación con la enfermedad periodontal. *MEDISAN.* 2017; 21(1): 108.
20. Uwitonze AM., Uwambaye P., Isyagi M., Mumena CH., Hudder A., Haq A., Et al. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes: Is there a role for vitamin D?. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2018; 180: 65-72.
21. Lang NP., Bartold PM., Periodontal health. *J Periodontol.* 2018; 89(Suppl 1): 9-16.
22. Lindhe J. Lang N., Karring T. *Periodontología clínica e implantología odontológica.* 5ta Ed. Editorial Médica Panamericana. 2009.

23. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2001; 25: 8–20.
24. Popova C., Dosseva-Panova V., Panov VE. Clinical and microbiological data in patients with chronic periodontitis. *J of IMAB*. 2013. 19 (4): 313-316.
25. Chapple ILC., Mealey BL., Van Dyke TE., Bartold PM., Dommisch H., 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 *J Clin Periodontol*. 2018; 45(Suppl 20): S68–S77.
26. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018; 45:45(Suppl 20); S1-S8.
27. Tonetti MS, Greenwell H, Fornman KS., Staging and grading of periodontitis; Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018.
28. Renatus A., Trentzsch L., Schönfelder A., Schwarzenberger F., Jentsch H., Evaluation on an Electronic Periodontal Probe Versus a Manual Probe. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016 Nov, Vol-10(11): ZH03-ZH07.
29. Al-Shayeb KNA., Turner W., Gillam, DG. Periodontal probing: a review. *Primary dental journal*. 2014; 3 (3): 25-29.
30. Botero JE., Bedoya E. Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* 2010; 3 (2); 94-99.
31. Faria R., Belén A., Bascones A. Nuevos métodos de diagnóstico en Periodoncia. *Métodos bioquímicos. Periodon Implantol*. 2001; 13, 1: 29-37.
32. Socransky SS, Smith C, Martin L, et al. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994;17(4):788-792.
33. Page R., Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976: 33: 235–249.

34. Lang NP., Lindhe J., Berglundh T., Giannobile WV., Sanz M. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 6ta Ed. Wiley. 2015.
35. Offenbacher S., Heasman PA., Collins JG. Modulation of Host PGE2 Secretion as a Determinant of Periodontal Disease Expression. J Periodontol. 1993; 64: 432-444.
36. Sutton CE. Mielke LA, Mills KHG. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. Eur. J. Immunol. 2012; (42): 2221–2231.
37. Abbas AK., Lichtman AH., Pillai S. Inmunología celular y molecular. 8va Ed. Elsevier. 2015.
38. Kadivar M, Petersson J, Svensson L. CD8 $\alpha\beta$ + $\gamma\delta$ T Cells: A Novel T Cell Subset with a Potential Role in Inflammatory Bowel Disease. The Journal of Immunology. 2016. (197): 4584-4592.
39. Hayday AC. $\gamma\delta$ T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response. Cell Press. 2009; (31): 184-196.
40. Lafont V, et al. Plasticity of $\gamma\delta$ T cells: impact on the anti-tumor response. Frontiers in Immunology. 2014; (5): 1-13.
41. Talukdar A., Rai R., Sharma KA., Rao DN., Sharma, A. Peripheral Gamma Delta T cells secrete inflammatory cytokines in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. Cytokine. 2018; 102: 117-122.
42. Rajoriya N., Fergusson JR., Leithed JA., Klenerman P. Gamma delta T-lymphocytes in hepatitis C and chronic liver disease. Frontiers in immunology. 2014; 5(400): 1-9.
43. Pérez-Payarols J, Benique MR, Matamoros-Florí N, Román-Piñana JM. Incremento de linfocitos T gamma-delta en sangre periférica de pacientes afectados de fibrosis quística. An Esp Pediatr. 1996; (44): 239-241.
44. Zhao Y, Niu C, Cui J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development?. J Transl Med. 2018; (2018): 16:30.
45. Moutsopoulos NM, Konkei JE. Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal Barrier, Trends in Immunology, 2018; (39): 277-287.

46. Wilharm A., Tabibb T., Nassarb M., Reinhardt A., Mizraji G., et al. Mutual interplay between IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and microbiota orchestrates oral mucosal homeostasis. *PNAS*, 2019; 116(7): 3-10.
47. Gemmell E., Seymour GJ. $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Human Periodontal Disease Tissue. *J Periodontol*. 1995; 66(9): 780-785.
48. Cañete JD, Introducción a la interleucina-17. *Reumatol Clin Supl*. 2018; 14(1): 2-7.
49. Flores-García Y, Talamás-Rohana P. Interleucina 17, funciones biológicas y su receptor. *REB 31*. 2012; (1):3-9.
50. Liu S., Song X., Chrnyk BA., Shanker S., Hoth LR., Marr ES., et al. Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nature Communications*. 2012. (4): 1-9.
51. Bermejo DA., Jackson SW., Gorosito-Serran M., Acosta-Rodríguez EV., Amezcua-Vesely MC., Sather BD., et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates an ROR- γ t-AHR-independent program leading to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol*. 2013; 14 (5): 514–522.
52. Schulz SM., Köhler G., Holscher C., Iwakura Y., Alber G. IL-17A is produced by Th17, gd T cells and other CD42 lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *International Immunology*. 2008; 20 (9): 1129–1138.
53. Weaver CT., Hatton RD., Mangan PR., Harrington LE. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annu. Rev. Immunol*. 2007. 25: 821–
54. Herrera-Mora MC., Guerrero-Velázquez C., Martínez-Rodríguez V. Participación de la IL-17 en la periodontitis crónica y agresiva. *Rev Mex Periodontol* 2013; IV (2): 73-77.
55. Valentini-Zacarias JM., Sippert EÂ., Tsuneto PY., Laguila-Visentainer JE., Oliveira e Silva C., Sell AM. The Influence of Interleukin 17A and IL17F Polymorphisms on Chronic Periodontitis Disease in Brazilian Patients. *Hindawi*. 2015; 2015: 1-8.
56. Zenobia C., Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol* 2000. 2015; 69(1): 142–159.

57. Paull A, Trier JS, Dalton MD, Camp RC, Loeb P, et al. The Histologic Spectrum of Barrett's Esophagus. *New England Journal of Medicine*. 1976; 295(9): 476–480.
58. Gupta RB., Harpaz N., Itzkowitz S., Hossain S., Matula S., et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*. 2007; 133(4): 1099-105.
59. Cross SS, Grading and scoring in histopathology. *Histopathology*. 1998; 33: 99-106.
60. Carrasco-Avino G., *Histología en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.*, REV. MED. CLIN. CONDES. 2019; 30(4): 283-298.
61. Glatz SA. *Bioestadística*. Editorial Mc Graw Hill. Sexta Edición. 2002. México. 73-99.
62. Ptaschinski C., Lukacs NW. Chapter 2 Acute and Chronic Inflammation Induces Disease Pathogenesis. *Molecular Pathology*. Elsevier. Second Edition. 2018. United States. 25-38.
63. Stern, I. R. Membrana mucosa oral. In: Bhaskar, S. N. *Histologia e embriologia oral de Orban*. 10ª ed. São Paulo, Artes Médicas, 1989. pp275-351.
64. Gordón-Núñez MA., Silva Júnior FL., Lucena HF., Galvão HC., De Douza LB., Pereira Pinto L. Análisis clínico e histomorfológico de la mucosa oral normal, hiperplasia fibroepitelial inflamatoria oral y displasia epitelial oral. *Int. J. Morphol*. 2008; 26(2):345-352.
65. Lang NP, Joss A, Tonetti MS. Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. *Periodontol 2000*.1996;12:44–48.
66. Greenstein G. The role of bleeding upon probing in the diagnosis of periodontal disease. A literature review. *J Periodontol*.1984;55:684–688.
67. Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol*. 2010;11(8): 666–673.

REFERENCIAS DE IMÁGENES

68. Gómez-Recober S. *Epidemiología y tratamiento de la enfermedad crónica en la población de Fuengirola entre el periodo de 2008-2013, ambos inclusive [Tesis doctoral]*. Málaga: 2016.

69. https://www.google.com.mx/search?q=periodonto&newwindow=1&sxsrf=ALeKk0310t1C1hfhzE9NUIhNImc0Cp3SA:1620512156276&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwij87abjrvwAhUFaq0KHdK4D6cQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=625#imgrc=H4tRUsZ-xqIPDM