



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CÉLULAS T TCR GAMMA-DELTA (TCR $\gamma\delta$),
INTERLEUCINA 17 (IL-17), INTERLEUCINA 10 (IL-10) Y
FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA
(TGF- β) EN TEJIDOS GINGIVALES SANOS Y CON
ENFERMEDAD PERIODONTAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

JORDI OSVALDO SANTIAGO ARELLANO

TUTORA:

Dra. CLAUDIA PATRICIA PEDRAZA ZAMORA

MÉXICO, CD.MX.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Dra. Claudia Patricia Pedraza Zamora por su valiosa tutoría, enseñanza y apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

GRACIAS.

Al Dr. Higinio Arzate por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar este proyecto.

GRACIAS.

A la Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez por su valiosa enseñanza y apoyo tanto en este proyecto como en mi estancia en el laboratorio.

GRACIAS.

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la DEPeI de la Facultad de Odontología, UNAM, por el apoyo y disposición para poder realizar este proyecto.

GRACIAS.

A mis amigas y compañeras del laboratorio (Elianne, Arantza, Karen, Angie y Verónica) por siempre apoyarme y darme ánimos cuando más lo necesitaba, por su amistad incondicional.

GRACIAS.

Al Programa de Apoyos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA205520) por apoyar de manera financiera durante la realización de este trabajo.

Dedicatorias

Para mis padres Esperanza y Alfredo, porque sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, gracias por su amor, apoyo y enseñanzas que me han otorgado desde que nací; gracias por siempre ser mis guías y cuidarme en cada paso y en cada etapa de mi vida.

Para mis hermanos Jesús y Sherlyn, por su amor y apoyo que como hermanos siempre ha estado, han sido parte importante de mí motor para seguir adelante, gracias por tantas aventuras y experiencias que hemos tenido.

Para mis abuelos Cristina, Margarita y Felipe, porque el tiempo que pude pasar con ustedes los recuerdo con cariño y sé que donde sea que estén, me siguen apoyando y cuidando.

Para Samara y Saúl, mis amigos de CCH, por seguir conmigo desde los inicios de quien soy actualmente, los valoro y quiero como no tienen idea, muchas gracias por el apoyo, enseñanzas que vivimos y aprendimos juntos.

Para mis amigos de la carrera, Monste, Linda, Silvia, Fer, Viann e Irving, porque gracias a ustedes y su amistad, mi estancia en la facultad fue más amena y mucho más divertida, gracias por las aventuras, el aprendizaje y las risas que vivimos juntos, tienen un lugar muy especial en mi corazón, los quiero.

Para Elianne, porque un día la vida te puso en mi camino, y gracias a eso pude conocerte, aprender, vivir experiencias y momentos juntos en el laboratorio y fuera de él; en muy poco tiempo me di cuenta que eres una persona muy importante en mi vida; gracias a ti he visto la vida desde una perspectiva diferente, muchas gracias por todo el apoyo y cariño que me has brindado, gracias por enseñarme tantas cosas y gracias por hacerme tan feliz. Te adoro mucho.

Para Arantza, las grandes personas llegan en los momentos más inesperados, y tú eres una de ellas, muchas gracias por llegar a mi vida desde tan lejos, eres una persona muy valiosa para mí, gracias por siempre quererme, apoyarme, escucharme y reírte conmigo, gracias por las aventuras y gracias, porque por ti entendí: "En mi próxima vida, quiero ser yo, y volver a encontrarme contigo".

Para la Dra. Claudia, porque usted me recibió con los brazos abiertos, porque me compartió un poco de su conocimiento, porque siempre me apoyó y porque gracias a usted podré continuar en lo que me gusta hacer.

Y para todas aquellas personas que han aportado un granito o un desierto de arena en mi persona, sin eso, no sería quien soy ahora, muchas gracias.

Índice

Índice abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	4
Introducción	6
Antecedentes	8
Capítulo 1. Enfermedad Periodontal.....	8
Capítulo 2. Respuesta inmune en enfermedad periodontal.....	18
Capítulo 3. Células T gamma-delta ($\gamma\delta$)	22
Capítulo 4. Interleucina 17 (IL-17)	27
Capítulo 5. Interleucina 10 (IL-10)	28
Capítulo 6. Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β).....	29
Capítulo 7. Células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β en enfermedad periodontal.....	31
Planteamiento del problema	33
Justificación	33
Hipótesis	34
Objetivo General	34
Objetivos Específicos	34
Tipo de estudio	35
Variables	35
Universo de estudio	35
Recursos	37
Metodología	39
Resultados	45
Discusión	62
Conclusiones	65
Anexos	67
Referencias Bibliográficas	79

Índice abreviaturas

- ANOVA: Análisis de Varianza.
- AR: Artritis Reumatoide
- CAP: Péptido Asociado a Latencia
- CD: Cluster of Differentiation
- DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño
- DO: Densidad Óptica
- EE: Error Estándar
- EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal
- EM: Esclerosis Múltiple
- EP: Enfermedades Periodontales
- GCF: Fluido gingival crevicular
- ILC3: Células Linfoides Innatas tipo 3
- Ig (A, G, M): Inmunoglobulina
- IL: Interleucina
- INF- γ : Interferón- γ
- KGF: Factor de Crecimiento de Queratinocitos
- MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- NETs: Trampas Extracelulares de Neutrófilos
- NK: Natural Killer
- NLR: NOD Like Receptors
- PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
- PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrones
- TCR: T Cell Receptor
- TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante- β
- Th: Células T helper
- TLR: Toll Like Receptors
- TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral- α
- Treg: Células T reguladoras

Resumen

Las enfermedades periodontales son una patología inflamatoria crónica de causas multifactoriales, caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte del diente (encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar). Durante el desarrollo de estas enfermedades, se pone en marcha una respuesta inmune donde participan células tanto de la inmunidad innata, como adaptativa; así como distintas moléculas, entre ellas citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, moléculas del complemento, etc. Las células T $\gamma\delta$ participan tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa y son una fuente importante de IL-17, IL-10 y TGF- β , moléculas que se ha reportado su significancia en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

El objetivo de este estudio fue analizar el grado de inflamación presente en los tejidos gingivales relacionado a la presencia de células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β en muestras de tejidos de pacientes periodontalmente sanos, con gingivitis y con periodontitis.

Se analizaron 27 biopsias de tejido gingival proveniente de pacientes con salud periodontal, con gingivitis y con periodontitis asociada a biopelícula oral y provenientes de cirugías periodontales o de terceros molares. Las muestras se fijaron en formol al 10%, se procesaron y se incluyeron en parafina. Se realizó tinción H/E para su determinar el grado de infiltrado inflamatorio. También se realizó inmunohistoquímica para la identificación de células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β ; se obtuvieron microfotografías y se analizaron con el software ImageJ para obtener en el nivel de expresión de la densidad óptica. Posteriormente, con los datos obtenidos, se realizó una prueba estadística ANOVA de una vía con corrección de Tukey. Los resultados mostraron una mayor expresión de células T $\gamma\delta$ en los grupos de gingivitis y periodontitis respecto a los tejidos sanos; la expresión de IL-17 e IL-10 fue mayor en gingivitis en comparación con sanos y periodontitis; mientras que inversamente, TGF- β se vio expresada de manera significativa en los tejidos con periodontitis.

Con estos datos, concluimos que la expresión de células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β se localizaban distribuidas tanto en el tejido epitelial como en el tejido conectivo. La expresión células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β fue estadísticamente significativa en los grupos gingivitis y periodontitis con respecto al grupo sano, lo que nos sugiere que tanto las células T $\gamma\delta$ como las moléculas analizadas en este trabajo, funcionan como inmunorreguladores importantes en el tejido gingival durante las diferentes fases clínicas de la enfermedad periodontal.

Abstract

Periodontal disease is a chronic inflammatory pathology with multifactorial etiology, characterized by the destruction of tooth support tissues (gingiva, periodontal ligament, root cementum and alveolar bone). During the development of the disease, an immune response is activated, where cells from both innate and adaptive immunity participate; as well as different molecules including cytokines, chemokines, growth factors, complement molecules, etc. $\gamma\delta$ T cells participate in both innate and adaptive immunity and are an important source of IL-17, IL-10 and TGF- β , which are molecules that have been reported to be significant in the development of periodontal disease.

The objective of this study was to analyze the inflammation degree present in gingival tissues related to the presence of $\gamma\delta$ T cells, IL-17, IL-10 and TGF- β in tissue samples taken from patients with gingivitis, periodontitis, and periodontally healthy.

27 biopsies of gingival tissue were analyzed from patients with periodontal health, gingivitis and periodontitis associated with oral biofilm and from periodontal or third molar surgeries. Samples were fixed in 10% formalin, processed, and embedded in paraffin. H/E staining was performed to determine the degree of inflammatory infiltrate. Immunohistochemistry was also performed for the identification of $\gamma\delta$ T cells, IL-17, IL-10, and TGF- β . Photomicrographs were obtained and analyzed with ImageJ software to obtain the level of expression of optical density. Subsequently, with the data obtained, a one-way ANOVA statistical test with Tukey's correction was performed. The results showed a greater expression of $\gamma\delta$ T cells in both the gingivitis and periodontitis groups compared to healthy tissues; the expression of IL-17 and IL-10 was higher in gingivitis compared to healthy and periodontitis; while conversely, TGF- β was significantly expressed in tissues with periodontitis.

With these data, we concluded that the expression of $\gamma\delta$ T cells, IL-17, IL-10, and TGF- β were located and distributed in both the epithelial and

connective tissue. The expression of $\gamma\delta$ T cells, IL-17, IL-10, and TGF- β . Was statistically significant in the gingivitis and periodontitis groups compared to the healthy group, which suggest that both $\gamma\delta$ T cells and the molecules analyzed in this work function as important immunoregulators in the gingival tissue during the different clinical phases of periodontal disease.

Introducción

La enfermedad periodontal es un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas que destruyen los tejidos de soporte de los dientes y cuyos tejidos afectados son la encía, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, pudiendo provocar la pérdida dental; además en casos severos también puede afectar la salud sistémica al aumentar el riesgo de desarrollar aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes, enfermedad cerebrovascular, entre otras.

Las enfermedades periodontales se consideran una de las afecciones más importantes y frecuentes en la población a nivel mundial. Dichas enfermedades afectan a un 15-20% de los adultos de edad media (35-44 años). Alrededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y los 74 años no tiene dientes naturales y esta afección es una de las principales causas de esta pérdida.

La etiología de esta enfermedad es multifactorial, entre estos factores se encuentran el microbioma bacteriano oral (el cual incluye más de 700 especies diferentes, con aproximadamente 400 especies encontradas en la biopelícula subgingival), una higiene oral deficiente, tabaquismo, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, trastornos inducidos por medicamentos, estrés, obesidad, así como ciertos síndromes congénitos, trastornos hematológicos y alteraciones hormonales. Uno de los factores determinantes en la evolución de la enfermedad periodontal es la propia respuesta inmunológica del hospedero.

La respuesta inmune llevada a cabo es compleja, ya que mecanismos innatos y adaptativos de defensa son activados para mantener la homeostasis del tejido gingival. Dentro de la respuesta inmune innata, encontramos como primera línea de defensa a células dendríticas, neutrófilos y linfocitos T $\gamma\delta$. Los linfocitos o células T $\gamma\delta$ son células innatas conocidas como "células T no convencionales" cuyo TCR (Receptor de Células T) presenta una cadena gamma (γ) y una cadena delta (δ) (a diferencia de las células T "convencionales" que forman parte de la inmunidad adaptativa y presentan una cadena α y una cadena β en su

TCR). Las células T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^+$) representan una población innata en epitelios y mucosas capaces de mediar respuestas innatas y adaptativas gracias a su capacidad de reconocimiento antigénico mediante receptores innatos (TLRs y NLRs [receptores tipo NOD]), además se comportan como células profesionales capaces de presentar antígenos a células T TCR $\alpha\beta$, por la vía dependiente e independiente de moléculas MHC-I y MHC-II, así como moléculas coestimuladoras (CD80, CD86). Por otro lado, también presentan funciones cooperadoras y citotóxicas mediante la producción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, como IL-17; aunque también son responsables de la inmunotolerancia mediante la producción de IL-10 y TGF- β .

Por estas razones, es posible que éstas células estén implicadas estrechamente en la regulación de respuestas inflamatorias de la mucosa oral ante las múltiples especies de flora residente ahí encontradas; por lo que es importante caracterizar su expresión y distribución en tejidos humanos sanos y así poder analizar de manera más profunda si ocurren cambios en su expresión y producción de IL-17 en tejidos con gingivitis y periodontitis.

El objetivo de este estudio es analizar el grado de inflamación presente en los tejidos gingivales relacionado a la presencia de células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β en muestras de tejidos de pacientes periodontalmente sanos, con gingivitis y con periodontitis sin ninguna enfermedad sistémica y cuya inflamación se asocie a la presencia de la biopelícula oral.

Antecedentes

Capítulo 1. Enfermedad Periodontal

Concepto

Las enfermedades periodontales (EP) es un conjunto de patologías inflamatorias crónicas de causas multifactoriales. Se desarrolla a través de una respuesta de transición de simbiosis a disbiosis con cambios en la composición de la biopelícula oral presente en el surco gingival. Principalmente ocasiona la contaminación y la destrucción de los tejidos de soporte del diente, los cuales son: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar.^{1, 2}

Epidemiología

La OMS estima que cerca del 14% de la población adulta padece algún tipo de enfermedad periodontal, esto corresponde a más de mil millones de casos en todo el mundo.³

La información obtenida por el Índice Periodontico Comunitario realizado en 2019 por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) estima que el 59.2% de los pacientes adultos (20 a 99 años) incidentes de los servicios de salud de primer nivel, presentaban algún signo de enfermedad periodontal.⁴

En México se ha reportado una prevalencia de la enfermedad periodontal de hasta 70% de la población adulta mayor (65 años en adelante).⁵

Factores de riesgo

El principal factor de riesgo de las EP es la deficiencia en la higiene oral, aunque también ha sido asociada a factores genéticos (interrelacionados con factores ambientales y demográficos), epigenéticos (tabaquismo, alcoholismo, estrés), edad, condiciones socioeconómicas y sistémicas.

Entre las condiciones sistémicas se encuentran factores modificables, tales como diabetes mellitus tipo 2 no controlada u obesidad y no modificables, como lo son, algunas infecciones específicas, condiciones autoinmunes, neoplasias y trastornos genéticos o del desarrollo,⁷ tales como, síndrome de Down, síndrome de Páilon-Lefèvre, síndrome de Chediak-Higashi, entre otros.^{6,8}

Clasificación actual de la EP

En 2017 la Academia Americana de Periodontología (AAP) y la Federación Europea de Periodontología (EFP) reunieron a 120 expertos con el fin de actualizar y presentar una nueva clasificación basada en la evidencia científica disponible en el campo de la periodontología y la implantología.⁹

1. Salud periodontal.

Se define como el estado libre de enfermedad periodontal inflamatoria, se pueden diferenciar 2 situaciones dentro de la salud periodontal:

- Salud gingival clínica en un periodonto intacto: periodonto estructural y clínicamente sano.
- Salud gingival clínica en presencia de un periodonto reducido: ausencia de sangrados y presencia de un nivel de inserción y óseo reducidos.⁹

2. Gingivitis inducida por biopelícula oral.

- a) **Gingivitis asociada solo con biopelícula oral:** lesiones inflamatorias resultantes de interacciones entre la biopelícula oral y la respuesta inmunológica. Solo abarca la encía sin afectar la inserción periodontal.

Los signos más comunes incluyen: eritemas, inflamación gingival, edemas, sangrados y halitosis. La gingivitis inducida

por biopelícula oral en relación con el tipo de periodonto (intacto o reducido) se puede clasificar en:

- Gingivitis en un periodonto intacto.
- Gingivitis en un periodonto reducido con periodontitis estable.
- Gingivitis en un periodonto reducido sin periodontitis.⁹

b) ***Gingivitis mediada por factores de riesgo locales y sistémicos:*** aunque se sabe que la biopelícula oral es el factor etiológico, las manifestaciones clínicas varían según los factores predisponentes (anatomía dental, posición de los dientes, restauraciones) y modificadores (Enfermedades sistémicas, tabaquismo, medicamentos) que presenta el paciente.⁹

c) ***Agrandamiento gingival influenciado por medicamentos:*** Para ser considerado como un agrandamiento gingival causado por medicamentos, el tamaño debe ser mayor que el que se presenta en una reacción inflamatoria en los tejidos. Algunos de los medicamentos específicos que promueven mayor acumulación de la biopelícula e inflamación gingival más severa son: antiepilépticos (fenitoína, valproato de sodio), bloqueadores de los canales de calcio (nifedipina, verapamilo, diltiazem, amlodipino, felodipina) e inmunorreguladores (ciclosporina).⁹

3. Enfermedades gingivales no inducidas por biopelícula oral.

Con frecuencia con manifestaciones como resultado de condiciones sistémicas o por cambios patológicos limitados en el tejido gingival.

La clasificación de enfermedades gingivales no inducidas por biopelícula es por su etiología:

- a) Trastornos genéticos o del desarrollo.
- b) Infecciones específicas.
- c) Procesos reactivos.

- d) Neoplasias.
- e) Condiciones y lesiones inflamatorias e inmunes.
- f) Lesiones traumáticas.
- g) Pigmentaciones gingivales.⁹

La nueva clasificación divide en 3 a la periodontitis:

1. Enfermedades periodontales necrosantes.

Presentan 3 características clínicas típicas: necrosis en las papilas interproximales, sangrado y dolor.

- a) **Gingivitis necrosante**: proceso inflamatorio agudo de los tejidos gingivales que puede presentar halitosis, pseudomembranas, linfadenopatía regional, fiebre y sialorrea en niños.
- b) **Periodontitis necrosante**: proceso inflamatorio del periodonto con una rápida destrucción ósea.
- c) **Estomatitis necrosante**: Afección inflamatoria del periodonto y la cavidad, en donde la necrosis se extiende más allá de la encía y puede producir exposición ósea a través de la mucosa alveolar, por lo general se presenta en pacientes con un compromiso sistémico severo.⁹

2. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas.

Existen condiciones y enfermedades sistémicas que pueden afectar a los tejidos periodontales ya sea que influyan en el inicio o progresión de la periodontitis; o que afecte a los tejidos periodontal independientemente de la inflamación inducida por la biopelícula.

Algunas de las enfermedades o condiciones sistémicas incluyen:

- Enfermedades o condiciones raras que afectan el curso de la enfermedad periodontal como el síndrome de Papillon-

Lefevre, deficiencia de adhesión de leucocitos o hipofosfatasa.

- Enfermedades o condiciones sistémicas comunes como la diabetes mellitus, obesidad.⁹

3. Periodontitis.

La nueva clasificación categoriza la periodontitis por estadios y grados de progresión, basándose principalmente en la pérdida de inserción y pérdida ósea.

Estadios: Se basan en la severidad, complejidad, extensión y distribución de la enfermedad.

- I. Periodontitis inicial
- II. Periodontitis moderada
- III. Periodontitis severa con potencial de pérdida dental
- IV. Periodontitis avanzada con potencial de pérdida de la dentición.⁹

Severidad: se determina por la pérdida de inserción clínica interdental, pérdida ósea radiográfica y pérdida dentaria.

Complejidad: se determina por los factores locales como la profundidad del sondeo, tipo de pérdida ósea, grado de involucración de furca, defectos en el reborde y la necesidad de rehabilitación compleja debido a disfunciones masticatorias, trauma oclusal, colapso de mordida, cantidad de dientes remanentes.

Extensión y distribución: Se refiere a la cantidad de tejido destruido y dañado, se determina a partir de la cantidad de dientes afectados: Localizada cuando presenta menos de 30% de los dientes involucrados y generalizada cuando la afectación excede el 30% de los dientes.⁹

Grados: Es un indicador de la velocidad o tasa de progresión, teniendo una evidencia directa como lo es una línea de tiempo a través de radiografías y se categoriza en:

- Grado A: progresión lenta.
- Grado B: progresión moderada.
- Grado C: progresión rápida.⁹

Características clínicas del periodonto sano

La salud periodontal se puede definir como la ausencia de inflamación asociada a gingivitis, periodontitis o alguna otra condición periodontal con base en un diagnóstico clínico.⁹

La encía es la mucosa oral, la cual se compone de 3 diferentes tipos: la mucosa masticatoria, la mucosa especializada y la mucosa de revestimiento, la encía es parte de la mucosa masticatoria. Anatómicamente hablando el tejido gingival se divide en: surco gingival, encía marginal libre, encía adherida, línea mucogingival y mucosa alveolar. Principalmente funciona como barrera física contra infecciones, aunque también tiene respuestas hacia estas mismas y tiene un papel activo en la respuesta innata.¹⁰

El color de la encía marginal generalmente se describe como rosa coral, aunque el color varía en diferentes personas con relación a su pigmentación cutánea. El color de la mucosa alveolar es roja, lisa y brillante, con una distinción de color en la línea mucogingival. La textura de la superficie se describe con una similitud a la cascara de naranja, la encía adherida esta punteada, mientras que la encía marginal no lo está. La forma de la encía interdental se rige por el contorno de la superficie interdental y la forma de troneras gingivales.¹⁰

Clínicamente hablando, se considera una salud periodontal cuando se presente menos del 10% de sitios de sangrado, sin pérdida de la inserción, sin pérdida ósea, sin enrojecimiento o inflamación del tejido y una profundidad de sondeo menores o iguales a 3 mm, sin movilidad dental, sin pérdida dental y sin disfunciones masticatorias asociadas al periodonto.^{11,12} Las características radiográficas de un periodonto sano incluyen una lámina dura intacta, sin pérdida ósea en áreas de furca y una distancia promedio de 1 a 3 mm desde la cresta ósea a la unión amelocementaria.¹¹

Características clínicas de las EP

Las formas de enfermedad periodontal son la gingivitis y periodontitis, siendo una afección inflamatoria de causas multifactoriales asociado a la biopelícula como factor etiológico primario, la cual provoca la destrucción de los tejidos de soporte del diente.^{2, 13}

En gingivitis se encuentra clínicamente sitios de sangrados mayores a 10%, inflamación del tejido gingival con un cambio de color a rojo, se pierde la textura de la superficie, se pierde la anatomía de las papilas interdentes, sin pérdida de la inserción y sin pérdida ósea, presencia de cálculo dental, profundidad de sondeo menor o igual a 3 mm y el paciente puede referir alguna molestia, sangrado al cepillado, halitosis y sabor metálico.¹⁴

En periodontitis, existe una pérdida de los tejidos de soporte del diente, inserción mayor 3 mm, presencia de bolsas periodontales en un sondaje mayor a 3 mm, disminución de la cresta ósea (siendo evaluado por medio de radiografías), movilidad dental y sangrado gingival.¹⁴

Características histológicas del tejido periodontal sano

El periodonto es el conjunto de cuatro componentes los cuales proporcionan el soporte necesario para mantener los dientes en función, estos componentes son: encía, ligamento periodontal, hueso y cemento alveolar.¹⁰

La encía se compone de epitelio escamoso estratificado en su porción más externa, seguido por epitelio central y en la porción más profunda se encuentra el tejido conectivo compuesto por fibroblastos, fibras de colágeno y sustancia fundamental.¹⁰

El ligamento periodontal se compone por tejido conectivo altamente celular y por un complejo vascular, siendo las fibras principales el elemento principal y están compuestas por colágeno, se disponen en haces y siguen una trayectoria ondulada en un corte longitudinal.¹⁰

El cemento radicular es un tejido mesenquimatoso avascular calcificado de dos tipos principales: cemento acelular (primario) y celular (secundario), teniendo como contenido inorgánico hidroxipatita. El hueso alveolar es la porción del maxilar y mandíbula en donde se forman y se alojan los dientes y consta de una placa externa de hueso cortical, una pared interior de hueso delgado y compacto y trabéculas esponjosas de dos capas compactadas, el hueso posee dos terceras partes de materia inorgánica y una tercera parte de matriz orgánica compuesta principalmente por colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina, proteína morfogénica ósea, fosfoproteínas y proteoglicanos.¹⁰

Características histológicas de las EP

Page y Schroeder describieron la patogenia de las enfermedades periodontales en cuatro etapas, en las cuales describieron los cambios tanto clínicos como histológicos, siendo estas 4 etapas, lesión inicial, lesión temprana, lesión establecida y lesión avanzada.¹⁵

La lesión inicial se presenta de 2 a 4 días y solamente refleja un aumento en los niveles de los mecanismos que median la actividad de defensa dentro de los tejidos gingivales, se puede presentar migración de algunos neutrófilos hacia el surco gingival y dentro del epitelio de unión; durante esta etapa hay una dilatación e hinchazón del plexo gingival.¹⁵

La lesión temprana aparece dentro de 4 a 7 días siendo la continuación de la lesión inicial, aquí existe una formación y mantenimiento de un infiltrado de células linfoides ocupando del 5 al 15% del tejido conectivo, existen células plasmáticas pero solamente en la periferia lateral y apical del infiltrado. En el epitelio de unión hay un aumento variablemente mayor de neutrófilos transmigratorios e infiltración de linfocitos, en regiones más coronales el epitelio de unión puede presentar características de un microabsceso a causa del infiltrado leucocitario.¹⁵

La lesión establecida aparece de 2 a 3 semanas posteriores a la acumulación de la biopelícula y existe una predominancia de células plasmáticas entre las haces de fibras de colágeno y a lo largo de vasos sanguíneos, sin embargo, no están confinadas al sitio de reacción, estas células producen IgG, IgA e IgM. El surco gingival puede profundizarse y convertirse en una pseudobolsa, hay presencia de moléculas del complemento y de reacciones antígeno-anticuerpo alrededor de los vasos sanguíneos y todavía no existe una pérdida ósea apreciable.¹⁵

La lesión avanzada incluye formación de bolsas periodontales, fibrosis de la encía, ulceración y supuración superficial, destrucción del ligamento periodontal y de hueso alveolar, daño tisular inflamatorio e inmunopatológico; se presenta un denso infiltrado de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos, grupos de células plasmáticas se localizan en lo profundo de tejidos conectivos y alrededor de vasos sanguíneos, hay una conversión de la médula ósea distante de la lesión en tejido conectivo fibroso y tiene periodos de exacerbación en donde se forman abscesos y pus.¹⁵

Microbiología de las EP

La colonización de bacterias en la cavidad oral inicia desde el momento del nacimiento, pero se sabe que posterior a la erupción de los primeros dientes se estabilizan un mayor complejo en la biopelícula oral, las especies que colonizan y dominan la biopelícula incluyen: *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus spp.*, y *Streptococcus oralis*. *S. oralis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*; además de una serie de familias que colonizan desde la etapa neonatal (*Veillonella spp.*, *Neisseria spp.*, *Actinomyces spp.*, y *Staphylococcus spp.*). Se estima que en la biopelícula oral de un adulto existen aproximadamente 700 especies.¹⁰

La biopelícula juega un papel importante en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal, siendo las bacterias Gramnegativas las que se encuentran más comúnmente en las bolsas periodontales, tales como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. Si bien se han encontrado algunas otras especies específicas que pueden tener un papel patógeno en los tejidos periodontales (*Desulfobulbus spp.*, *Filifactor alocis* and *TM7 spp*), la enfermedad periodontal es provocada por un cambio en los niveles de población de las especies en la biopelícula oral.¹⁶

Capítulo 2. Respuesta inmune en las enfermedades periodontales

Respuesta inmune innata en EP

El tejido epitelial juega un gran papel en la respuesta innata, ya que, a pesar de no ser consideradas parte de las células inmunes, al estar en contacto constante con bacterias de la biopelícula, son capaces de expresar una amplia gama de péptidos antimicrobianos, tales como α y β defensinas, catelicidinas, saposinas, entre otras.¹⁷

Dentro de las células innatas se encuentran los neutrófilos, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T $\gamma\delta$ y células NK.¹⁸

Los neutrófilos son las primeras células de la inmunidad innata que llegan al sitio de la infección, y estos utilizan receptores tipo-Toll. Los macrófagos y monocitos también participan reconociendo, fagocitando y matando microorganismos.¹⁷

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en el ser humano, y se caracterizan principalmente por la forma multilobulada de su núcleo (llamadas también células polimorfonucleares [PMNs]).¹⁹

Se encuentran presentes en tejidos gingivales clínicamente sanos, y migran a través de los espacios intercelulares del epitelio de unión en el surco, su función es fagocitar a las bacterias que invaden los tejidos del surco, de esta forma crean una barrera entre la biopelícula subgingival y el tejido gingival; otra forma que tienen de mediar la inmunidad es a través de la formación de trampas extracelulares (NETs) en donde el ADN nuclear condensado y las histonas se extruyen del neutrófilo formando una red en el espacio extracelular, esta red junto con péptidos antimicrobianos facilitan la muerte de microorganismos que se quedan atrapados en las NETs, y además es importante mencionar que estas NETs pueden ser liberadas por neutrófilos viables o no viables; y a este fenómeno se le conoce como NETosis.¹⁰

Los neutrófilos también cumplen con la función de ser células presentadoras de antígeno activando a linfocitos T y B.¹⁷

Otras células que participan en la inmunidad innata son las células T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta+$) o conocidas también como linfocitos no convencionales, los cuales participan en la respuesta innata identificando y eliminando directamente células afectadas, promueven la activación, maduración y el reclutamiento de células dendríticas, células T y B y neutrófilos, activan fagocitos e inducen la formación de granulomas.^{20, 21}

Reconocimiento innato de microorganismos patógenos

El reconocimiento innato está dado por un conjunto sofisticado de receptores proporcionando una detección específica de patógenos; con estos receptores, las células pueden responder directamente a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), y estos patrones moleculares son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en las células inmunes, los cuales se localizan en las membranas de las células en donde median el reconocimiento de patógenos extracelulares, en los endosomas donde detectan patógenos intracelulares; y en el citoplasma.^{17,22}

Los PRRs se clasifican en cuatro familias: Receptores tipo Toll (TLR), Receptores tipo NOD (NLR), Receptores de lectinas tipo C (CLR) y Receptores tipo RIG-1 (RLR).²²

Los TLR pertenecen a las glicoproteínas transmembrana de tipo I y contienen 3 dominios principales, que son, ectodominio, dominio transmembrana de expansión única y dominio TLR citoplasmático. Los TLRs localizados en la superficie celular son TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR6.²³

Los NLR son sensores citoplasmáticos intracelulares que se expresan principalmente en macrófagos, linfocitos y células no inmunitarias como células epiteliales y fibroblastos. Los NLR se subdividen en 4 grupos de

acuerdo a su dominio amino-terminal siendo: NLRA, NLRB, NLRC y NLRP. NOD 1 y 2 del subgrupo NLRC activan vías de señalización que conducen a la producción de citocinas proinflamatorias.²⁴

Los PAMP asociados con la enfermedad periodontal son lipoproteínas bacterianas, lipopolisacáridos, peptidoglicanos, fimbrias, flagelinas, proteínas de choque térmico y ADN; los receptores tipo-Toll es la familia de PRR mejor caracterizada en la detección de múltiples PAMPs, siendo TLR-2 y TLR-4 importantes en la detección de antígenos bacterianos en la enfermedad periodontal.¹⁷

Respuesta inmune adaptativa en EP

Los principales elementos de la respuesta inmunológica adaptativa son los linfocitos T, B y las células plasmáticas.¹⁰

Cuando una lesión es persistente, las células presentadoras de antígeno viajan a los nódulos linfáticos y presentan el antígeno a los linfocitos T, proliferando de forma clonal dependiendo de la respuesta, que puede ser T helper (Th) o T reguladoras (Treg).²⁵

Los linfocitos T helper CD4+ predominan en la lesión periodontal estable y se cree que la alteración en el equilibrio de la población de CD4+ puede conducir a la progresión de una lesión destructiva dominada por linfocitos B. Th1 y Th17 promueven el desarrollo del proceso inflamatorio estimulando la producción de citocinas proinflamatorias y osteoclastogénesis; las células Th1 secretan IFN- γ que activan la inmunidad mediada por macrófagos, NK, células T citotóxicas CD8+ contra microorganismos patógenos. La activación de macrófagos promueve la fagocitosis, mientras que las CD8+ y las NK eliminan a las células infectadas.^{10, 25}

Las células Th2 se asocian a la progresión de la enfermedad. Las células Th17 junto con las Treg balancean la respuesta inmunitaria dado que tienen respuestas antagonistas. ^{17, 25}

Las células Treg pueden inhibir la activación, proliferación de linfocitos T y la producción de anticuerpos de los linfocitos B.²⁵

La respuesta de las células B puede ser tanto protectora, produciendo anticuerpos específicos que sirven para eliminar las infecciones tisulares en conjunto con el sistema del complemento y mejorando la fagocitosis; así como también pueden tener una respuesta destructiva, ya que son fuentes de citocinas proinflamatorias que contribuyen a la destrucción del tejido.¹⁰

Las células B junto con las células plasmáticas se acumulan en el surco o en la bolsa periodontal produciendo inmunoglobulinas contra los antígenos promoviendo la fagocitosis. En los tejidos afectados se encuentran ambos linajes de linfocitos, siendo el tipo B y las células plasmáticas las de mayor proporción en una periodontitis crónica.^{13, 25}

Capítulo 3. Células T gamma-delta ($\gamma\delta$)

Concepto/Definición

Las células T $\gamma\delta$ expresan receptores TCR compuestos por cadenas γ y δ (TCR $\gamma\delta$), estas células presentan alrededor del 0.5 al 5% de todas las células T del cuerpo. En respuesta a la activación, estas células pueden producir varias citocinas y quimiocinas con varias funciones en la inmunidad innata y adaptativa.^{26, 27}

Ontogenia

Las células T $\gamma\delta$ se generan en el timo a partir de células progenitoras comunes con las células T $\alpha\beta$; las células T $\gamma\delta$ se comprometen funcionalmente durante la diferenciación intratímica, el desarrollo y mantenimiento de las células T así como de sus subconjuntos dependen críticamente de IL-7 e IL-15.^{28, 29}

Activación

Las células T $\gamma\delta$ se activan ante signos de estrés tisular, en las que se incluyen células infectadas o transformadas, se pueden activar o no con sus ligandos TCR afines e inducen un estallido de citocinas inflamatorias que inicia la respuesta de células T convencionales. Las células T $\gamma\delta$ presentan una activación TCR-dependiente medida por ciertos metabolitos fosforilados como el precursor de isoprenoides eucariótico IPP o la proteína microbiana HMB-PP, la enterotoxina estafilocócica, la proteína de choque térmico (HSP) 60 en el derivado de proteína purificada (PPD) de micobacterias también activan a las células T $\gamma\delta$. Las células T $\gamma\delta$ reconocen proteínas A y B relacionadas con la cadena de MHC de clase I (MICA y MICB), estas se unen a moléculas NKG2D expresadas en células T $\gamma\delta$ de sangre periférica, lo que lleva a una activación independiente de su TCR. Se han encontrado expresiones de receptores coestimuladores no

TCR que también regulan la activación de las células T $\gamma\delta$, como CD16, NKR, NKG2D. Además de su reconocimiento por TCR y MHC, las células T $\gamma\delta$ presentan patrones de reconocimiento de patógenos (PRRs) de tipo Toll y tipo NOD.^{29, 30, 31, 32, 33}

Funciones

Las células T $\gamma\delta$ pueden desempeñar distintas funciones de acuerdo a la naturaleza y el contexto de la lesión o del tejido afectado, teniendo funciones en la inmunidad tanto innata como en la adaptativa, debido a que su especificidad no está restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), sino que además presenta otras moléculas de reconocimiento innato como TLRs y receptores tipo NOD. Mantienen la integridad de la barrera epitelial promoviendo la supervivencia y homeostasis de las células epiteliales, promueven la activación, maduración y el reclutamiento de células dendríticas, células T y B y neutrófilos, también producen citocinas proinflamatorias como IL-17A, TNF α e INF γ ; son capaces de producir moléculas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β y también han sido reconocidas como células presentadoras de antígeno profesionales, al no depender de la expresión de algún antígeno en particular, las células T $\gamma\delta$ pueden reconocer a la mayoría de los tipos de cáncer a través de varios receptores de células NK (NCRs).^{21, 29, 33}

Células T $\gamma\delta$ en enfermedades inflamatorias

Además del papel que tienen las células T $\gamma\delta$ en la eliminación de patógenos y vigilancia de tejidos en el cáncer; tienen funciones asociadas con la autoinmunidad específica en algunas enfermedades, tales como artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), esclerosis múltiple (EM), espondiloartritis, uveítis, psoriasis. Además, estas células

se han visto implicadas en otras enfermedades inflamatorias de tipo crónico como las enfermedades periodontales.^{31, 34}

Artritis reumatoide (AR)

La AR es un trastorno inflamatorio autoinmune crónico de etiología incompleta, pero se sabe que debido a los defectos de tolerancia periférica, hay una infiltración y activación anormal de diversas células de la inmunidad.³⁵

En estudios, se encontró una alta frecuencia de células T V γ 6V δ 2 de memoria efectora en sangre periférica y líquido sinovial en pacientes con AR, además son capaces de presentar antígenos peptídicos a células T CD4+; expresan HLA-DR y CD86, moléculas involucradas en la presentación de antígenos. También se encontró que las células T V γ 9 producían INF- γ , TNF α e IL-17.

En artritis inducida por colágeno en un estudio de ratones se demostró que las células T $\gamma\delta$ eran la población predominante en la producción de IL-17 en las articulaciones inflamadas.³⁶

Enfermedad inflamatoria intestinal

La EII es un término que se utiliza para agrupar enfermedades autoinmunes gastrointestinales, las dos principales son, la colitis ulcerosa que se caracteriza por una inflamación del colon y la enfermedad de Crohn, la cual puede manifestarse en cualquier sitio del tracto gastrointestinal. Aunque la patogenia no está del todo definida, la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa es la responsable del daño tisular.^{37, 38}

Las células T $\gamma\delta$ desempeñan un papel importante en la inflamación y en las ulceraciones recurrentes en pacientes con EII; algunos estudios describen un papel protector de las células T $\gamma\delta$ y algunos otros estudios mencionan un papel negativo en la fisiopatología de la EII y se cree que su función va a estar dada por el contexto celular y el entorno específico de

citocinas, debido a que poseen un amplio abanico de producción de citocinas, tales como, IL-17, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón γ (IFN- γ), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), IL-10, IL-13, protimosina β 4, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF).^{37, 38}

Esclerosis múltiple (EM)

La EM es un trastorno autoinmune caracterizado por una disfunción neurológica y su patogenia está relacionada con funciones inflamatorias, supresoras y efectoras de distintos subconjuntos de células T.³⁹

Se han encontrado células T $\gamma\delta$ en lesiones del sistema nervioso central en pacientes con EM, y aunque no se sabe con exactitud el papel que tienen estas células en la enfermedad, algunas investigaciones indican que las células T $\gamma\delta$ muestran una dicotomía funcional en la inflamación de los tejidos durante la EM.³⁹

En pacientes con EM las células T $\gamma\delta$ tienen una mayor expresión de CXCR3, el cual es viable para reclutar linfocitos T al sitio de la inflamación; además tienen una citotoxicidad significativa contra oligodendrocitos, teniendo un papel importante como factor desmielinizante en la EM.⁴⁰

Espondiloartritis

La espondiloartritis es un grupo de enfermedades reumáticas en donde hay una inflamación y osificación de la columna vertebral y la articulación sacroilíaca y también artritis periférica como la inflamación y osificación del tejido entésico. Las células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 ubicadas en los tejidos enteseales se han relacionado con la patogénesis de la espondiloartritis, encontrando una mayor cantidad de células en el líquido sinovial que en sangre periférica, sugiriendo una migración hacia las articulaciones con inflamación.³⁴

Uveítis

Es una inflamación de la capa media del ojo y aunque autores describen que la presencia de células T $\gamma\delta$ en enfermedades oculares inflamatorias es muy raro, también se ha descrito la presencia de células T $\gamma\delta$ en la conjuntiva o en el humor acuoso en pacientes que presentaban uveítis. En estudios realizados en ratones a los que se les indujo uveítis se encontró un aumento en la producción de IL-17 por células T $\gamma\delta$ y aunque no median directamente la inflamación ocular, si promovían la patogenia de la enfermedad induciendo la activación de células Th17 uveitogénicas.³⁴

Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a la piel de carácter genético principalmente, pero también tiene un componente autoinmune. En condiciones sanas, rara vez se encuentran células T $\gamma\delta$ en la piel humana.⁴¹

Las células T $\gamma\delta$ son productoras de IL-17A, IL-17F, IL-22 e INF- γ , las cuales son patogénicas en la psoriasis, además expresan CCR6, la cual regula la migración de células T de la dermis a la epidermis, promueve la agregación de neutrófilos y exacerba la inflamación. También tienen propiedades de memoria, contribuyendo a la recurrencia de la enfermedad.⁴¹

Capítulo 4. Interleucina 17 (IL-17)

Concepto/ Definición

La IL-17 es una citocina proinflamatoria, la cual es secretada por una gran variedad de células de la inmunidad, con un peso molecular de 20 a 30 kDa; estructuralmente la familia IL-17 tiene un extremo C conservado con 4 residuos de cisteína, los cuales forman puentes disulfuro intramoleculares. La IL-17 tiene una gran familia que va desde IL-17A a IL-17E y 5 receptores IL-17RA-E distribuidos en una gran variedad de células, en las que se incluyen queratinocitos, células epiteliales, fibroblastos, células mesoteliales y células hematopoyéticas.^{42, 43, 44}

Funciones

La IL-17 desempeña funciones proinflamatorias. La IL-17A e IL-17F reclutan neutrófilos a través de quimiocinas CXCL, activan células T y B y conducen a la activación de péptidos bactericidas (catelicidinas, α y β defensinas), claudinas y mucinas que funcionan para preservar la función de la barrera epitelial. La IL-17E induce citocinas tipo 2 (IL4, IL-5 E IL 13) en células Th2 e ILC2 contra parásitos.^{28, 45, 46}

Células productoras de IL-17

La producción de IL-17 se da en las células T helper (Th17), células T $\gamma\delta$, células linfoides innatas tipo 3 (ILC3), células T Natural Killer (NK), neutrófilos, mastocitos, Células dendríticas (CD), macrófagos y células epiteliales.⁴⁶

Capítulo 5. Interleucina 10 (IL-10)

Concepto/ Definición

La IL-10 es una citocina homodimérica en forma de “V” con un peso molecular de 37 kDa, que posee características antiinflamatorias, la cual actúa en la células presentadoras de antígeno (CD, macrófagos) disminuyendo y regulando la respuesta inflamatoria y reduce la respuesta adaptativa de las células CD4+. La IL-10 humana está compuesta por 178 aminoácidos (aa) en total, teniendo un segmento maduro de 160 aa y una secuencia de señal del 18 aa.^{47, 48}

Funciones

La IL-10 tiene funciones reguladoras entre el balance de células Th1 y Th2, puede inhibir las respuestas tanto del tipo Th1 como del Th2, aunque tiene un efecto predominante en la población Th1; media la actividad inmunosupresora de las células Treg, es capaz de activar monocitos y mejora la función de las células T CD8+, NK y linfocitos B.⁴⁷

Células productoras de IL-10

Primeramente se encontró que las células productoras de IL-10 eran las T helper 2, pero después se demostró que las células T reguladoras (Treg) y CD8+ citotóxicas también las producían; actualmente se sabe que células de ambos linajes producen esta citocina, incluidas macrófagos, monocitos, células T, CD, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y NK. Además se sabe que células tumorales de mieloma múltiple, melanoma y carcinoma escamoso cervical también pueden producir IL-10.^{47, 49}

Capítulo 6. Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)

Concepto/ Definición

El Factor de Crecimiento Transformante Beta es una proteína homodimérica que tiene una estructura que consiste en 2 subunidades que están ligadas por un puente disulfuro y tiene un peso molecular de 25 kDa. Existen 3 isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), las cuales son expresadas en diferentes tejidos; las células linfoides producen principalmente TGF- β 1, teniendo así, un papel importante en la respuesta inmune.^{50, 51}

Las 3 isoformas del factor de crecimiento transformante (TGF- β) pertenecen a una superfamilia compuesta de más de 30 polipéptidos relacionados. Las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, son citocinas pleiotrópicas de 75 kDa conocidos como pro-TGF β . Bioquímicamente, el TGF- β existe en al menos 4 formas diferentes: TGF- β libremente soluble, TGF- β soluble asociado con péptido asociado a latencia (LAP), TGF- β latente asociado con proteína de unión a TGF- β latente (LTBP) y forma latente asociada a la membrana de TGF- β .^{52, 53, 54}

Funciones

El TGF- β modula procesos inflamatorios y también regula mecanismos de respuesta inmunitaria. Además, tiene papeles importantes durante la carcinogénesis en etapas tempranas, provoca apoptosis de células linfoides, células epiteliales normales y tumores pre-malignos y en etapas avanzadas adquiere una capacidad pro-oncogénica y pro-metástasica.^{50, 55}

El TGF- β inhibe la proliferación de células T bloqueando la producción de IL-2, inhibe también moléculas efectoras como IFN- γ y perforinas y promueve la proliferación de células T reguladoras; TGF- β induce un

fenotipo de neutrófilo N2 que reduce la función efectora y aumenta la secreción de citocinas inflamatorias.⁵³

TGF- β también regula la diferenciación, migración y proliferación de células endoteliales, epiteliales y fibroblastos, esto es importante para la angiogénesis y la cicatrización de heridas.⁵²

Células productoras de TGF- β

El TGF- β es producido básicamente por todos los linajes de leucocitos circulantes y residentes en tejidos; estos incluyen células B, células T, neutrófilos, mastocitos, NK, monocitos, células dendríticas y plaquetas.⁵²

Capítulo 7. Células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β en enfermedades periodontales

Las células T $\gamma\delta$ contribuyen en el mantenimiento de la homeostasis inmune gingival, también ayudan en la cicatrización de heridas, son una fuente importante de anfirregulina en periodontitis, poseen acciones reguladoras esenciales para mantener la integridad del tejido al reprimir la inflamación liberando IL-10 y TGF- β ; aunque también producen IL-17, ayudando a mantener una homeostasis tisular y es esencial para determinar si las enfermedades periodontales son destructivas o no.^{20, 56}

IL-17 puede actuar directamente sobre macrófagos y aumenta la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, también recluta neutrófilos en los sitios de inflamación para activar la inflamación mediada por neutrófilos; estimula fibroblastos, células epiteliales y endoteliales para producir IL-6, IL-8 y prostaglandina, dilata y mejora la permeabilidad de vasos sanguíneos provocando enrojecimiento y edema y puede inducir la síntesis de metaloproteinasas de matriz que provocan la degradación del tejido conectivo y participa en la destrucción ósea mediada por osteoclastos; esta citocina también es capaz de inducir la producción de RANKL.^{57, 58}

IL-10 se expresa en tejidos periodontales tanto sanos como en enfermedades periodontales, ayuda a restablecer la salud fisiológica reduciendo la actividad de citocinas inflamatorias y estimula la producción de anticuerpos protectores. IL-10 reduce la respuesta Th1 y aumenta la respuesta de Th2, suprime la presencia excesiva de macrófagos y contrarresta a los neutrófilos. Diversos estudios mencionan la actividad de IL-10 en la prevención de la progresión de la enfermedad periodontal, mientras que en periodontitis severa su expresión es menor y como también interviene en la homeostasis tisular, se puede encontrar una mayor actividad después de realizar un tratamiento periodontal.^{25, 59, 60, 61}

TGF- β disminuye la capacidad de activación de macrófagos, es producido por neutrófilos, células T $\gamma\delta$, y también tiene un papel importante en la estimulación de la angiogénesis, en la formación de tejido de granulación y en la regeneración y remodelación de tejido conectivo.^{25, 29, 62}

Se ha demostrado que IL-10 y TGF- β son moléculas que previenen la destrucción ósea en la enfermedad periodontal inhibiendo la osteoclastogénesis y también inhiben las respuestas inmunitarias de las células Th1, Th2 y Th17; cuando la red de citocinas inflamatorias supera las funciones de IL-10 y TGF- β se activa la osteoclastogénesis mediada por RANKL o por el factor osteoclastogénico, el cual es secretado por células T activadas.⁵⁶

Planteamiento del problema

Las EP constituyen una de las enfermedades inflamatorias más importantes y frecuentes en la población a nivel mundial. La etiología de estas enfermedades es multifactorial, entre estos factores se encuentran de manera importante, la biopelícula oral y la respuesta inmune del hospedero que determinan la evolución de la misma. La etapa inicial de las EP comienzan clínicamente con una gingivitis donde se genera una respuesta inflamatoria moderada y la cual, si no es controlada, puede evolucionar hacia una periodontitis crónica. Bajo esta condición, la biopelícula presenta microorganismos periodontopatógenos con más factores de virulencia que generan mayor inflamación y por lo tanto, ya no son eliminados o controlados por las células de la primera línea de defensa. De esta manera, cuando la homeostasis es alterada y los mecanismos de defensa y regulación inmunológica por parte de las células innatas, tales como los neutrófilos y las células T γ/δ , son insuficientes, el establecimiento y las características de una respuesta linfocitaria son cruciales en determinar el desarrollo y evolución de las EP.

Justificación

La activación y desarrollo del proceso inflamatorio en las EP es clave tanto en la homeostasis tisular así como en el deterioro de las estructuras periodontales, en el cual intervienen células de la respuesta inmune innata y adaptativa. Por esta razón es importante conocer de qué manera la presencia de células T γ/δ contribuyen en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación en los tejidos sanos, en tejidos con gingivitis y con periodontitis; y no solamente respecto al número de éstas células presentes en los tejidos gingivales, sino al patrón de citocinas que secretan, las cuales pueden ser de tipo proinflamatorio (como IL-17) así como antiinflamatorias, tales como IL-10 y TGF- β , las cuales, además de regular la activación de la inflamación, también se han visto implicadas en la reparación tisular y cicatrización.

Por estas razones consideramos relevante analizar la asociación entre estas células, la citocina proinflamatoria IL-17 y las citocinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β respecto al grado de inflamación en los tejidos gingivales orales.

De esta manera, el conocer el desarrollo del proceso inflamatorio, partiendo de la caracterización de las células T $\gamma\delta$ en tejidos sanos e inflamados, nos brindará la posibilidad de generar conocimientos sobre la patogenia de las EP y así en un futuro poder plantear la posibilidad de utilizar estas células o sus productos como blanco terapéutico en pacientes susceptibles a desarrollar EP.

Hipótesis

Las células T $\gamma\delta$ regulan la respuesta inflamatoria durante el desarrollo de las enfermedades periodontales a través de las diferentes citocinas secretadas (IL-17, IL-10 y TGF- β), las cuales son expresadas de manera diferencial en los tejidos sanos que en los tejidos con gingivitis y periodontitis.

Objetivo General

Analizar el grado de inflamación presente en los tejidos gingivales relacionado a la presencia de células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β en muestras de tejidos de pacientes periodontalmente sanos, con gingivitis y con periodontitis sin ninguna enfermedad sistémica y cuya inflamación se asocie a presencia de biopelícula oral.

Objetivos Específicos

- Determinar el número de células T $\gamma\delta$ en tejidos periodontales sanos, con gingivitis y con periodontitis.
- Determinar los niveles de expresión de IL-17 en tejidos periodontales sanos, con gingivitis y con periodontitis.

- Determinar los niveles de expresión de IL-10 en tejidos periodontales sanos, con gingivitis y con periodontitis.
- Determinar los niveles de expresión de TGF- β en tejidos periodontales sanos, con gingivitis y con periodontitis.
- Analizar la distribución microanatómica de las células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β dentro de los tejidos periodontales sanos, con gingivitis y con periodontitis.

Tipo de estudio

Transversal, descriptivo – observacional.

Variables

Independientes:

- Tejido gingival sano
- Tejido con gingivitis.
- Tejido con periodontitis.

Dependientes:

- Grado de infiltrado inflamatorio.
- Presencia de células T $\gamma\delta$.
- Expresión de IL-17.
- Expresión de IL-10
- Expresión de TGF- β

Universo de estudio

Pacientes que asistieron a la Clínica de Periodoncia en la DEPEI de la Facultad de Odontología de la UNAM durante el año 2018 a inicios del 2020 y que fueron sometidos a cirugía periodontal o de terceros molares erupcionados o no erupcionados , así como voluntarios para la toma de biopsia en pacientes con gingivitis moderada.

Tamaño de muestra

La muestra total será de 27 pacientes (N=27) que asistieron a la Clínica de Periodoncia en la DEPEI de la Facultad de Odontología de la UNAM. Se conformarán 3 grupos: Sanos, Gingivitis y Periodontitis (n=10, n=11 y n=6, respectivamente).

Pacientes

Previo a la toma de muestras de pacientes se obtuvo la firma del consentimiento informado por los pacientes. El protocolo ya ha sido sometido y aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la FO de la UNAM (CIE/0110/11/2018) (véase en anexo #2).

Grupos de estudio

Las muestras de estudio se clasificaron y dividieron en tres grupos:

Controles Sanos (CS):

Tejido gingival proveniente de individuos periodontal y sistémicamente sanos; el tejido será tomado de casos de extracciones/cirugías dentales por indicaciones ortodónticas, profilácticas o proveniente de cirugías periodontales con fines estéticos o del margen gingival de molares y premolares superiores o inferiores, o de la zona retromolar.

Tejidos con Gingivitis:

Tejido gingival proveniente de individuos sistémicamente sanos con diagnóstico de gingivitis inducida por biopelícula oral, la cual puede ser leve, moderada o severa, localizada o generalizada. El tejido será tomado del margen gingival de los molares superiores o inferiores.

Tejidos con Periodontitis:

Tejido gingival proveniente de individuos sistémicamente sanos con diagnóstico de periodontitis estadio III o IV, grado A, B o C, localizada o generalizada. El tejido será tomado de casos de extracciones de dientes que presenten un pronóstico desfavorable, es decir; inserción inadecuada para mantener el diente en salud, comodidad y función o del margen gingival de molares y premolares superiores o inferiores, o de la zona retromolar.

Parámetros clínicos para el diagnóstico periodontal

Los parámetros que se tomarán en cuenta para el registro y diagnóstico en cada paciente son:

1. Profundidad de sondaje.
2. Nivel de inserción clínico.
3. Sangrado al sondaje.
4. Movilidad dental.
5. Pérdida ósea radiográfica.
6. Pérdida de dientes por periodontitis.
7. Involucración de furca.
8. Defectos de reborde.

Recursos

Campana de flujo laminar.

Microscopio óptico de luz.

Centrífugas.

Agitadores.

Materiales y reactivos

Tubos eppendorf de 1 ml.

Tubos eppendorf de 15 y 50 ml.

Cubeta.

Cámara húmeda para inmunohistoquímica.

Pipetas pasteur.

Cronómetro.

Formol al 10%.

Alcohol a diferentes concentraciones.

Xilol.

Hematoxilina de Harris.

Eosina.

Agua amoniacal.

Plumón hidrofóbico.

Pipetas de diferentes volúmenes (2 µl, 20 µl, 200 µl y 1000 µl).

Puntas para pipetas.

Portaobjetos tratados con L-Polylisina.

Cubreobjetos.

Resina sintética (Entellan).

Anticuerpos primarios:

- TCR $\gamma\delta$, antibody GeneTex, catálogo: GTX155994.
- Interleucina 17 IL-17 HRP mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-374218.
- Interleucina 10 (IL-10) mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-8438.
- Factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) mouse monoclonal Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-130348.

Anticuerpos secundarios:

- Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch, catálogo: 115-065-003.
- HRP-Estreptavidina GeneTex, catálogo: GTX85912.

Bicarbonato de Litio.

Diaminobencidina (DAB), Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-24982.

Peróxido de hidrógeno, Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-203336.

Metanol.

Albúmina sérica, AMRESCO código: 0332-100G.

Buffer Tris (tris(hidroximetil)aminometano).

Buffer de citratos (pH 6).

Metodología

-Obtención de tejidos gingivales

Las biopsias fueron tomadas por un Periodoncista o estudiante de Periodoncia; primero se realizaron todas las medidas locales de asepsia y antisepsia, posteriormente se anestesió localmente con el anestésico de elección (lidocaína, mepivacaína) en la periferia de la zona donde se tomará la biopsia, nunca intralesional ya que puede distorsionar clínicamente la anatomía de la zona y sus características histológicas, luego se realizó la incisión del tejido, la cual se realizó con bisturí convencional o sacabocados (punch de diámetro variable: 2-4 mm) y se removió el tejido.

-Fijación de las muestras de tejido

Inmediatamente después de la toma de biopsia, el tejido se colocó en un frasco con solución de formol al 10%, marcado con los datos del paciente y se almacenó a temperatura ambiente, el tiempo de fijación recomendado para muestras pequeñas es de un mínimo de 6 horas y un máximo de 48 horas.

-Procesamiento de las muestras

Posterior a la fijación, el tejido se pasó a otro recipiente con agua corriente por 1 hora para quitar el exceso de formol, el tejido se colocó en cassettes

de inclusión de biopsias. Después, el procesamiento de los tejidos se realizó en un procesador automatizado utilizando el programa #1, el cual está determinado para procesar muestras pequeñas y el orden es el siguiente:

- Alcohol 70%: 20 minutos
- Alcohol 80%: 20 minutos
- Alcohol 90%: 20 minutos
- Alcohol 96%: 20 minutos
- Alcohol 99.99%: 20 minutos
- Xilol 50%: 15 minutos
- Xilol 70%: 15 minutos
- Xilol 100%; 15 minutos
- Xilol 100%: 15 minutos
- Parafina 1: 15 minutos
- Parafina 2: 15 minutos
- Parafina 3: 20 minutos

-Inclusión en parafina

Posteriormente los tejidos se incluyeron en parafina utilizando el centro de inclusión de tejidos modelo KD-BM de la marca KEDDE®:

1. Se coloca un poco de parafina líquida en el molde de inclusión.
2. Se posiciona el tejido en la orientación deseada, teniendo en cuenta que la cara inferior del bloque será la superficie de corte.
3. Verter parafina hasta llenar el molde cuidando que la posición del tejido sea la correcta.
4. Colocar el cassette, engrasar la parafina y dejar enfriar el bloque de 10 a 15 segundos a temperatura ambiente para posteriormente colocarlo sobre la placa de enfriamiento modelo KD-BL de la marca KEDDE®

-Corte en micrótopo

Se cortaron secciones de tejido de 4 µm con ayuda del micrótopo modelo KD-3358 de la marca KEDDE® y utilizando el baño de flotación de secciones de parafina Electrothermal™ marca Bibby Scientific™ se montaron las secciones sobre portaobjetos de vidrio tratados con L-polyisina, los cuales fueron procesados mediante tinción de hematoxilina-eosina para su diagnóstico histopatológico y mediante inmunohistoquímica por técnica de peroxidasa para la identificación de células positivas a TCR γδ, IL-17, IL-10 y TGF-β.

-Tinción de hematoxilina/eosina

1. Desparafinado: colocar las laminillas sobre la parrilla a 55-60°C.
2. Introducir las laminillas en Xilol 1 por 10 minutos.
3. Xilol 2: 10 minutos.
4. Xilol/alcohol: 10 minutos.
5. Alcohol 96°: 10 minutos.
6. Alcohol 96°: 10 minutos.
7. Alcohol 80°: 10 minutos.
8. Agua destilada: 5-10 minutos.
9. Hematoxilina: 3 minutos.
10. Lavar con agua corriente hasta aclarar.
11. Agua destilada: 1-2 minutos.
12. Eosina: 30 segundos.
13. Alcohol 80°: 1 minuto.
14. Alcohol 96°: 1 minuto.
15. Alcohol 96°: 5 minutos.
16. Xilol-Alcohol: 10 minutos.
17. Xilol 1: 10 minutos.
18. Montar las laminillas con resina (entellan) sintética base alcohol.

19. Dejar secar 24 horas para poder revisar las laminillas en el microscopio.

-Diagnóstico histopatológico

Las muestras fueron analizadas microscópicamente con ayuda de un Patólogo Bucal, donde, a través del grado de infiltrado inflamatorio y las características propias del tejido, éstas fueron diagnosticadas como sanas o con inflamación.

-Inmunohistoquímica por peroxidasa

1. Desparafinado: colocar las muestras sobre la parrilla a 5°C hasta que la superficie esté brillante. Pasar por Xilol 1 (20 min), Xilol 2 (10 min), Xilol-alcohol (10 min), alcohol 96° (10 min), alcohol 80° (10 min), alcohol 70° (5 min), alcohol 60° (5 min), agua destilada (2 veces por 5 min).
2. Realizar 2 lavados con Tris HCl durante 5 minutos.
3. Bloquear peroxidasa endógena con metanol-peróxido al 3% (1ml peróxido + 9 ml de metanol) durante 10 minutos.
4. Realizar 3 lavados con Tris HCl durante 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
5. Delimitar las muestras con plumón hidrofóbico (PAP).
6. Bloqueo de proteínas inespecíficas con Tris BSA al 1% durante 60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
7. Decantar.
8. Incubación del anticuerpo primario diluido con Tris BSA al 0.1% en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche [TCR $\gamma\delta$ (1:25), IL-17 (1:50), TGF- β (1:50) e IL-10 (1:50)].
9. Realizar 3 lavados con Tris HCl durante 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

10. Incubación del anticuerpo secundario (E-Biotin) (1:200) diluido con Tris BSA al 0.1% durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
11. Realizar 3 lavados con Tris HCl durante 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
12. Incubación del complejo HRP-Estreptavidina (1:100) diluido con Tris BSA al 0.1% durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
13. Realizar 3 lavados con Tris HCl durante 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
14. Revelar con DAB 50X durante TCR $\gamma\delta$ e IL-17 (5 min), TGF- β (2:30 min) e IL-10 (2:30 min).
15. Lavar con agua corriente 2 veces.
16. Contrateñir con Hematoxilina de Harris (base alcohol) durante 1:30 minutos.
17. Lavar con agua corriente hasta aclarar.
18. Pasar las laminillas en agua amoniacal (bicarbonato de litio) durante 1:30 minutos.
19. Lavar con agua destilada.
20. Deshidratar las muestras: OH 60°, OH 70°, OH 80°, OH 96°, xilol-alcohol, xilol 2 y xilol 1 durante 5 minutos cada uno.
21. Montar con resina (entellan) sintética base alcohol y dejar secar durante 24 horas.

-Toma de microfotografías y análisis de datos

Se obtuvieron las microfotografías con ayuda de un microscopio Axioskop 2, adaptado con la cámara AccioCam Rc5 y el software ZEN de la marca Carl Zeiss a un aumento de 20X de cada una de las muestras tratadas por inmunohistoquímica por peroxidasa, utilizando en todas la misma intensidad de luz, 4 en un rango de 1 a 10; un tiempo de exposición de 6.75;

un histograma configurado a Black (1134), Gamma (0.40) y White (4761) y una resolución de pixeles de 2584x1936.

Por cada anticuerpo utilizado, se seleccionaron 10 campos de manera aleatoria para la toma de las microfotografías. Posteriormente se dividieron en 3 grupos de estudio y a su vez en cada anticuerpo (TCR $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β). Cada carpeta dividida por grupo y anticuerpo. En cada una de las microfotografías, se analizó la densidad óptica (DO) arrojada a partir del color café de la diaminobencidina (DAB) de manera digital, a través del software Fiji (ImageJ). Es importante mencionar que los datos numéricos que se obtuvieron en dicho programa, corresponden a la intensidad de pixeles expresadas en densidades ópticas (DO), basándose en los distintos grados de intensidad del color café (DAB).

En el software, se convirtió la imagen a 8 bits, lo cual corresponde a tener 264 tonos de gris, se configuró el color del fondo a blanco con la finalidad de no tener falsos positivos, posteriormente se delimitó la intensidad del color a través de un histograma en las zonas positivas, descartando así zonas inespecíficas presentes en las microfotografías, para así obtener un resultado de porcentaje de área, por último, se programó un macro a través del mismo software para automatizar el análisis de todas las microfotografías.

-Análisis estadístico

A partir de los valores numéricos obtenidos en el programa Image J, se realizaron tablas de frecuencia en el software Microsoft Office Excel con la finalidad de observar la distribución de los datos.

Para su posterior análisis, se utilizó el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego CA, EUA) empleando medidas de tendencia central, para así obtener la Media (promedio), Error Estándar (EE) y Rango de los 3 grupos de estudio (sanos, gingivitis y periodontitis).

Posteriormente, se realizaron las siguientes pruebas estadísticas con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre estos grupos. Estas pruebas fueron: Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, test Brown-Forsythe y test de Barlett. Un valor “p” menor a 0.05 ($p \leq 0.05$) se consideró estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y nos confirmó que existen diferencias entre estos 3 grupos.

Finalmente, para determinar específicamente cuáles eran los grupos que mostraban estas diferencias, se realizó una prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Un valor “p” menor a 0.05 ($p \leq 0.05$) se consideró estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Toda la metodología empleada se realizó en el laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, perteneciente a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

Resultados

Obtención de biopsias.

El número total de muestras (N) fue de 27, las cuales fueron clasificadas en tejido gingival sano, con gingivitis y periodontitis.

Tabla 1. Clasificación de biopsias	
Grupo	Número de biopsias (n)
Sanos	10
Gingivitis	11
Periodontitis	6

Tabla 1. Clasificación de biopsias de tejido gingival, divididas en los grupos de estudio.

Descripción Histológica

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Tejido gingival sano

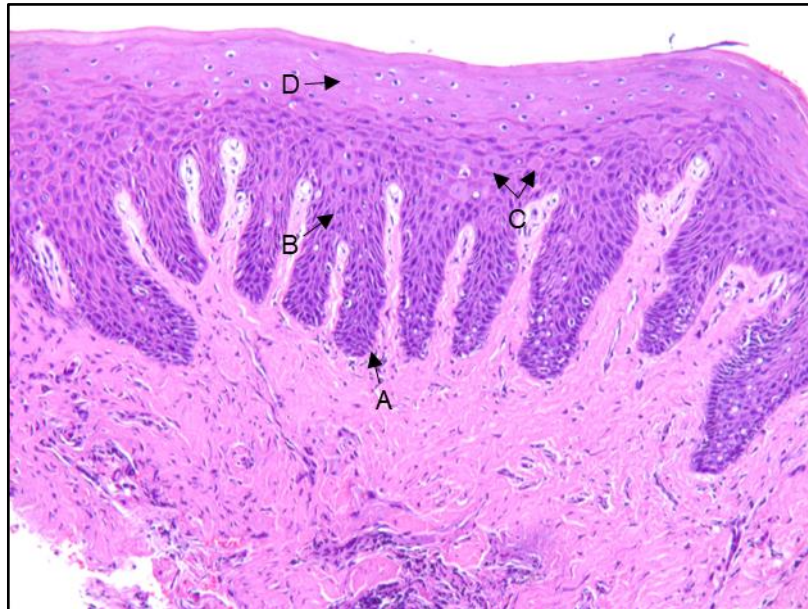


Figura 1. Tejido gingival sano. Microfotografía tomada a 10X de una muestra de mucosa oral sana procesada con tinción de hematoxilina y eosina (H/E), en donde se observa en la porción superior un epitelio plano escamoso estratificado compuesto por los estratos: Basal (A), espinoso (B), granuloso (C) y córneo (D), así como las crestas epiteliales; por debajo del epitelio se encuentra la membrana basal que une al epitelio con el tejido conectivo, este tejido se conforma de fibroblastos y matriz extracelular de colágena (MEC).⁶³

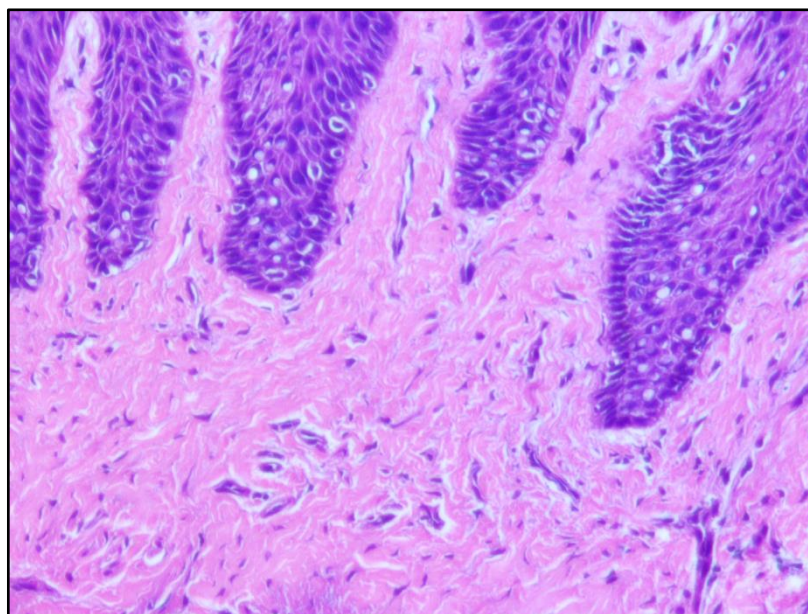


Figura 2. Tejido gingival sano. Microfotografía tomada a 20X de una muestra de mucosa oral sana con tinción de H/E en donde se observa el tejido conectivo ubicado por debajo del epitelio, este tejido se conforma de fibroblastos, macrófagos, leucocitos, células plasmáticas y células cebadas, matriz

extracelular compuesta por colágena y sustancia fundamental, así como de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas.⁶³

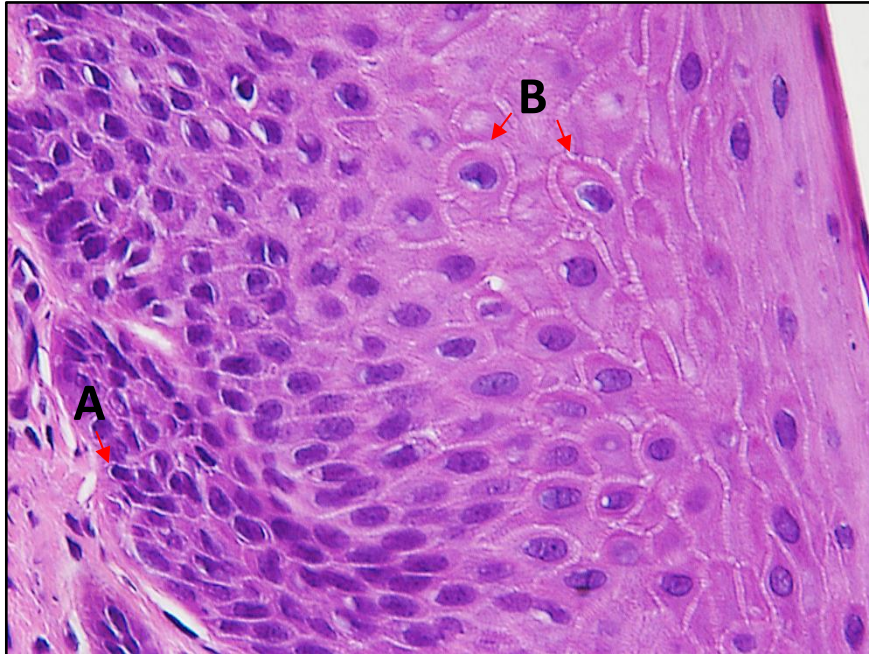


Figura 3. Tejido gingival sano. Microfotografía tomada a 40X de una muestra de mucosa oral sana procesada con tinción H/E. El epitelio se constituye en un 90% por queratinocitos, un 9% de células permanentes (melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans) y en 1% de células transitorias (granulocitos, linfocitos y monocitos). Los queratinocitos se conectan a la lámina basal a través de hemidesmosomas (A) y entre ellos establecen uniones denominadas desmosomas (B).⁶³

Tejido gingival inflamado

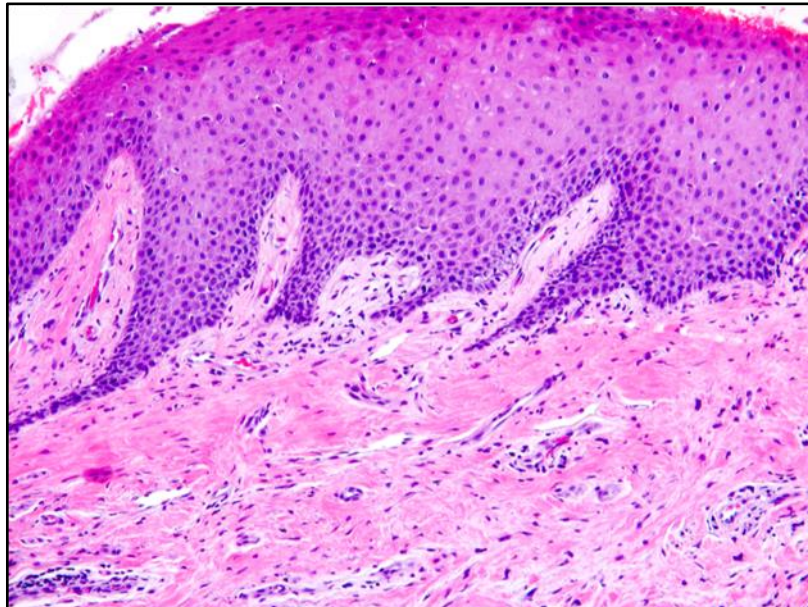


Figura 4. Tejido gingival inflamado con diagnóstico clínico de gingivitis. Microfotografía tomada a 10X de una muestra de mucosa oral inflamada procesada con tinción H/E en donde se observa epitelio escamoso estratificado, por debajo de este, en el tejido conectivo se observa un mayor número de vasos sanguíneos, así como presencia de infiltrado inflamatorio en comparación con el tejido gingival sano.

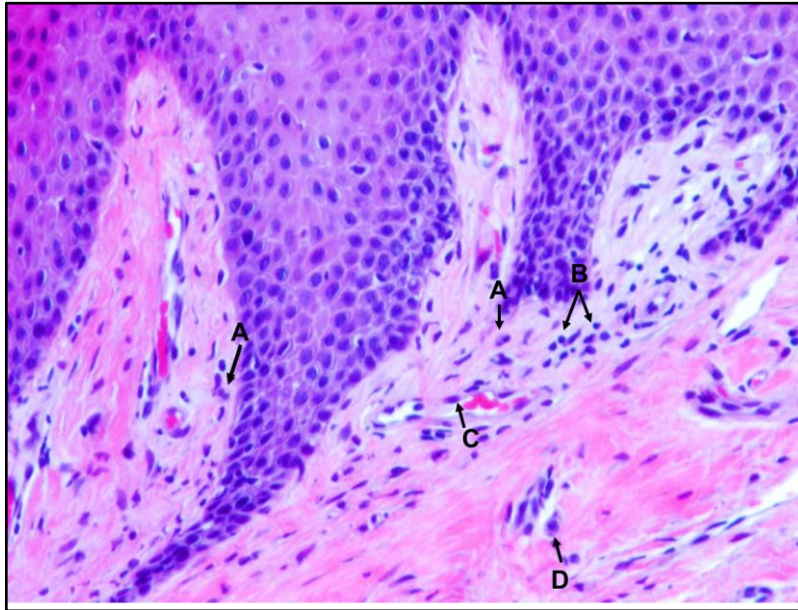


Figura 5. Tejido gingival inflamado con diagnóstico clínico de gingivitis. Microfotografía tomada a 20X de una muestra de mucosa oral inflamada procesada con tinción H/E en donde se observa infiltrado inflamatorio compuesto por células PMN (A), linfocitos T (B), macrófagos (C) y algunas células plasmáticas (E).

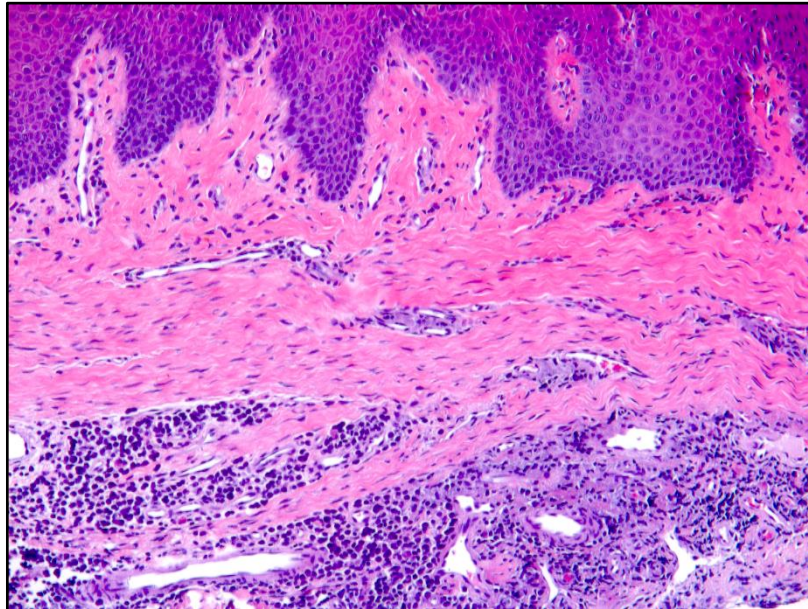


Figura 6. Tejido gingival inflamado con diagnóstico clínico de periodontitis. Microfotografía tomada a 10X de una muestra de mucosa oral inflamada procesada con tinción H/E en donde se observa un grado mayor de infiltrado inflamatorio comparándolo con el tejido gingival con diagnóstico de gingivitis.

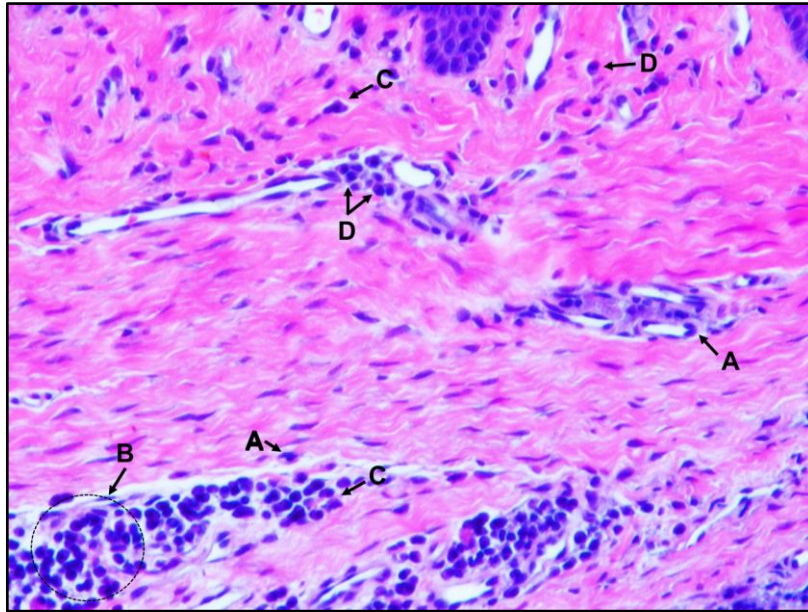


Figura 7. Mucosa inflamada con diagnóstico clínico de periodontitis. Microfotografía tomada a 40X de una muestra de mucosa oral inflamada procesada con tinción H/E en donde se observa infiltrado inflamatorio compuesto principalmente de linfocitos T (B), células plasmáticas (D), así como algunos macrófagos (C) y PMN (A).

Inmunohistoquímica por peroxidasa

Tejido gingival sano

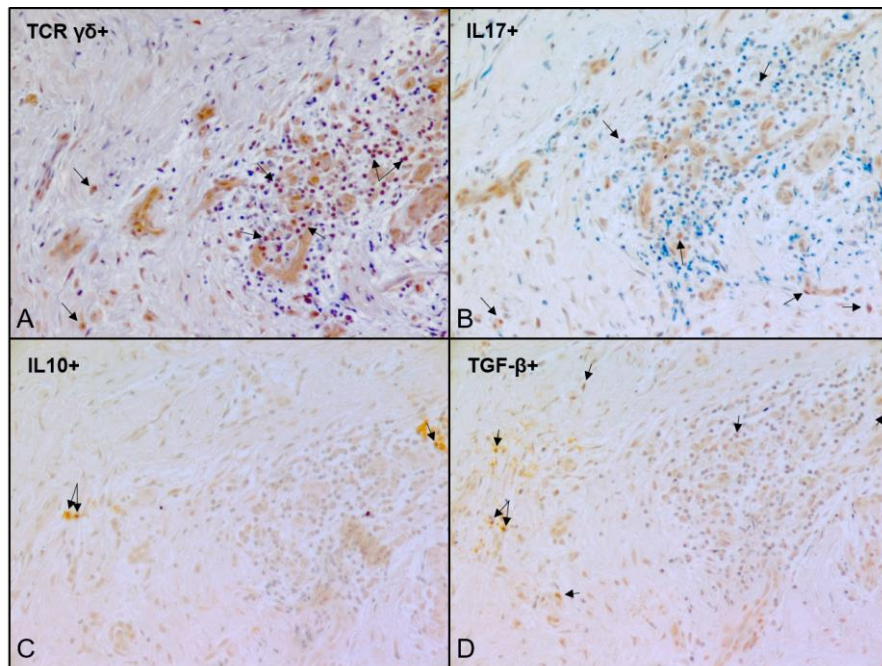


Figura 8. Tejido gingival sano tratado por inmunohistoquímica por peroxidasa. En la imagen A se observa positividad a TCR $\gamma\delta$, las flechas señalan las células positivas y la marca se encuentra más presente en la membrana de las mismas. En la imagen B se muestra positividad a IL-17, en la C a IL-10 y en la D a TGF- β ; en las 3 imágenes la positividad está presente tanto en las células como a la periferia de estas.

Tejido gingival con gingivitis

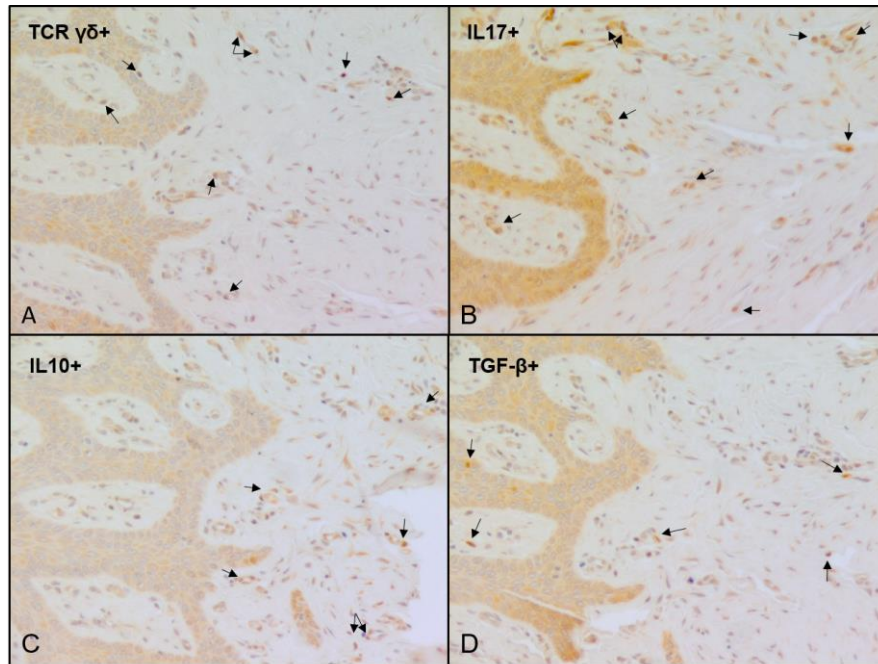


Figura 9. Tejido gingival con gingivitis tratado por inmunohistoquímica por peroxidasa. En la imagen A se observa positividad a TCR $\gamma\delta$, las flechas señalan las células positivas y la marca se encuentra más presente en la membrana de las mismas. En la imagen B se muestra positividad a IL-17, en la C a IL-10 y en la D a TGF- β ; en las 3 imágenes la positividad está presente tanto en las células como a la periferia de estas; la positividad a IL-17, IL-10 y TGF- β se observa con mayor presencia comparándolo con el tejido gingival sano.

Tejido gingival con periodontitis

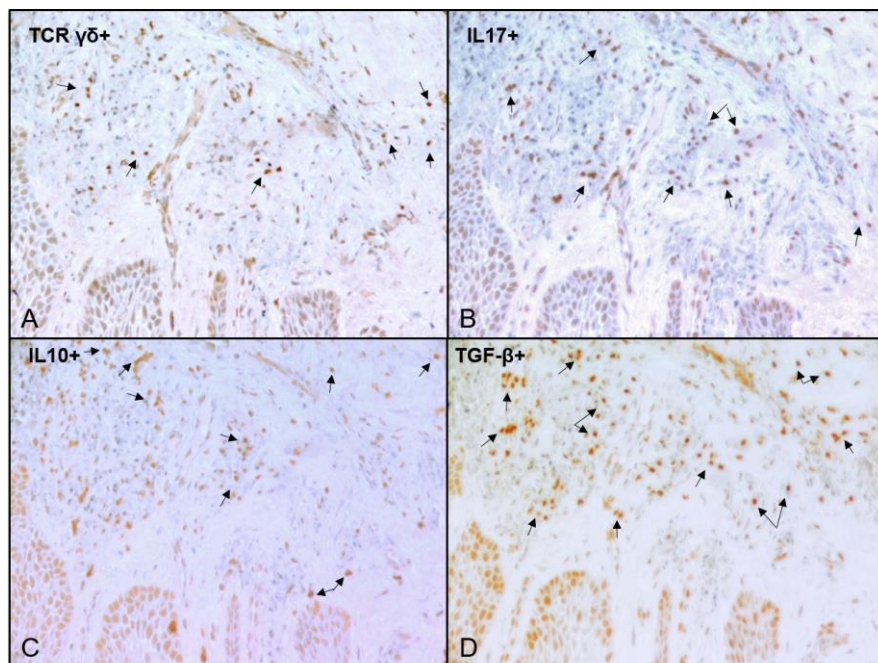


Figura 10. Tejido gingival con periodontitis tratado por inmunohistoquímica por peroxidasa. En la imagen A se observa positividad a TCR $\gamma\delta$, las flechas señalan las células positivas y la marca se encuentra más presente en la membrana de las mismas. En la imagen B se muestra positividad a IL-17, en la C a IL-10 y en la D a TGF- β ; en las 3 imágenes la positividad está presente tanto en las células como a la periferia de estas; la positividad a todos los anticuerpos, se observa con mayor presencia comparándolo con el tejido gingival sano.

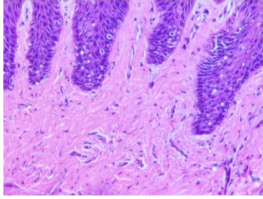
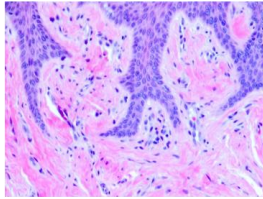
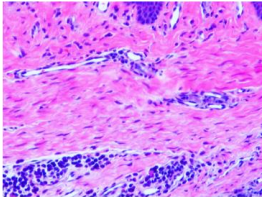
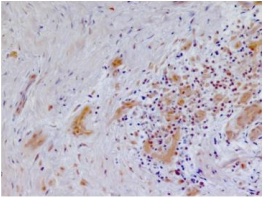
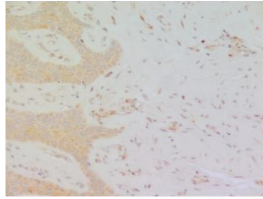
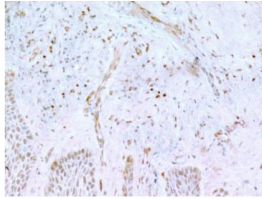
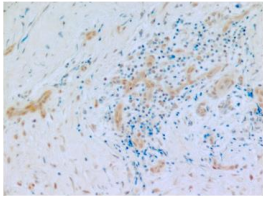
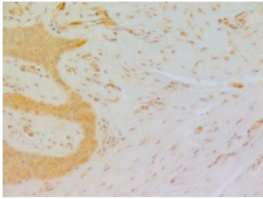
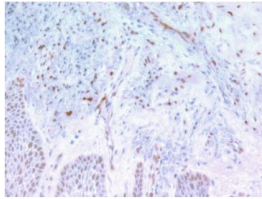
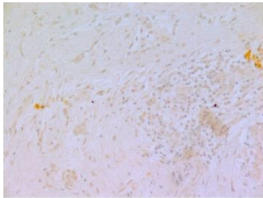
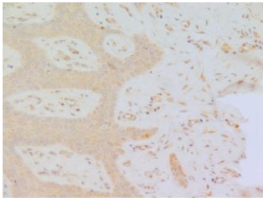
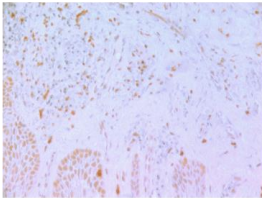
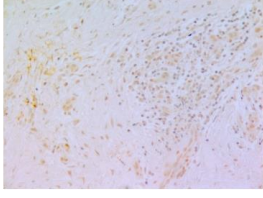
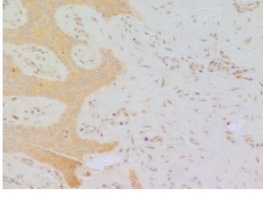
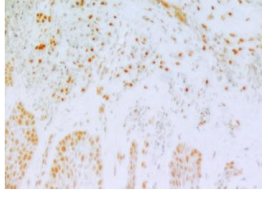
Tabla 2. Diagnóstico histológico e inmunohistoquímico			
	Sanos	Gingivitis	Periodontitis
HyE			
Células T $\gamma\delta$ +			
Células IL-17+			
Células IL-10+			
Células TGF- β +			

Tabla 2. Microfotografías tomadas a 20X, en las que se puede observar el análisis histológico y el análisis inmunohistoquímico de los grupos de estudio. En el grupo Sanos, la tinción H/E muestra un tejido con la arquitectura normal, tanto del tejido epitelial, como del tejido conectivo, además, en los tejidos con IHQ se muestra la positividad de células T $\gamma\delta$ +, IL-17+, IL-10+ y TGF- β . En el grupo Gingivitis, en la tinción H/E se observa un infiltrado inflamatorio leve, con la arquitectura del tejido todavía en condiciones normales, además se observa la positividad en los tejidos con IHQ de células T $\gamma\delta$ +, IL-17+, IL-10+ y TGF- β . Por último, en el grupo Periodontitis, en la tinción H/E se observa un infiltrado inflamatorio más grave, además de un cambio en la arquitectura del tejido y se observa positividad en los tejidos con IHQ de células T $\gamma\delta$ +, IL-17+, IL-10+ y TGF- β .

Análisis de imágenes y datos

Los resultados se obtuvieron mediante el análisis del 100% de píxeles (correspondiente a 542.819444) presentes en las microfotografías, y los resultados se expresaron en promedio y porcentaje del área afectada en relación a la tinción café de DAB.

Tablas de frecuencia

Las tablas o distribución de frecuencia nos permiten ordenar los datos obtenidos distribuyéndolos de acuerdo a su frecuencia de aparición y pueden ser empleadas para variables cuantitativas o cualitativas ordenables.

Las tablas de frecuencia se conforman de 5 columnas. La primera columna corresponde al número de intervalos a considerar; la segunda columna corresponde a los intervalos de clase, aquí se obtienen los intervalos de diferentes valores y se ordenan por rangos de menor a mayor; la tercera columna corresponde a la marca de clase, el cual es el valor intermedio de los intervalos de clase; la cuarta columna es la frecuencia absoluta que es el número de valores que caen en cada intervalo; y por último, la quinta columna corresponde a la frecuencia relativa, la cual es el resultado de la frecuencia absoluta entre el número total de valores.

En este proyecto se utilizaron tablas de frecuencia con la finalidad de descartar los datos que estuvieran fuera de rango y trabajar con datos dentro de una distribución normal. Para obtener dichas tablas de frecuencia, se utilizaron los resultados obtenidos en el análisis de las imágenes, los cuáles arrojaban porcentaje de área de expresión en píxeles de células TCR $\gamma\delta^+$, IL-17+, IL-10+ y TGF- β^+ en tejidos gingivales sanos, con gingivitis y periodontitis. Las tablas de frecuencia se muestran a continuación:

Tabla 2. Tabla de frecuencia de células T $\gamma\delta$ + en tejidos gingivales sanos

Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0090	1.2606	0.6348	81	0.81
2	1.3606	2.6122	1.9864	6	0.06
3	2.7122	3.9637	3.3380	6	0.06
4	4.0637	5.3153	4.6895	3	0.03
5	5.4153	6.6669	6.0411	2	0.02
6	6.7669	8.0184	7.3927	0	0.00
7	8.1184	9.3700	8.7442	1	0.01
8	9.4700	10.7216	10.0958	0	0.00
9	10.8216	12.0731	11.4474	0	0.00
10	12.1731	13.4247	12.7989	1	0.01

Tabla 3. Tabla de frecuencia de células T $\gamma\delta$ + en tejidos gingivales con gingivitis

Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0013	2.7018	1.3515	98	0.89
2	2.8018	5.5023	4.1520	6	0.05
3	5.6023	8.3028	6.9525	3	0.03
4	8.4028	11.1032	9.7530	0	0.00
5	11.2032	13.9037	12.5535	0	0.00
6	14.0037	16.7042	15.3540	1	0.01
7	16.8042	19.5047	18.1545	0	0.00
8	19.6047	22.3052	20.9550	1	0.01
9	22.4052	25.1057	23.7555	0	0.00
10	25.2057	27.9062	26.5559	1	0.01

Tabla 4. Tabla de frecuencia de células T $\gamma\delta$ + en tejidos gingivales con periodontitis

Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0012	1.0394	0.5203	32	0.53
2	1.1394	2.1776	1.6585	11	0.18
3	2.2776	3.3159	2.7968	5	0.08
4	3.4159	4.4541	3.9350	9	0.15
5	4.5541	5.5923	5.0732	0	0.00

6	5.6923	6.7306	6.2114	1	0.02
7	6.8306	7.8688	7.3497	0	0.00
8	7.9688	9.0070	8.4879	0	0.00
9	9.1070	10.1452	9.6261	0	0.00
10	10.2452	11.2835	10.7643	2	0.03

Tablas 2,3 y 4. Tablas de frecuencia en donde se muestra la distribución de los datos obtenidos mediante el análisis de porcentaje de área para las células T $\gamma\delta^+$ para los grupos sanos (tabla 2), gingivitis (tabla 3) y periodontitis (tabla 4).

Tabla 5. Tabla de frecuencia de células IL-17+ en tejidos gingivales sanos

Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0166	1.2121	0.6144	48	0.48
2	1.3121	2.5076	1.9099	8	0.08
3	2.6076	3.8031	3.2054	2	0.02
4	3.9031	5.0986	4.5009	7	0.07
5	5.1986	6.3941	5.7964	4	0.04
6	6.4941	7.6896	7.0919	6	0.06
7	7.7896	8.9851	8.3874	5	0.05
8	9.0851	10.2806	9.6829	12	0.12
9	10.3806	11.5761	10.9784	6	0.06
10	11.6761	12.8716	12.2738	2	0.02

Tabla 6. Tabla de frecuencia de células IL-17+ en tejidos gingivales con gingivitis

Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0001	1.9524	0.9763	28	0.25
2	2.0524	4.0048	3.0286	35	0.32
3	4.1048	6.0572	5.0810	15	0.14
4	6.1572	8.1096	7.1334	6	0.05
5	8.2096	10.1620	9.1858	8	0.07
6	10.2620	12.2144	11.2382	9	0.08
7	12.3144	14.2667	13.2906	3	0.03
8	14.3667	16.3191	15.3429	3	0.03
9	16.4191	18.3715	17.3953	2	0.02
10	18.4715	20.4239	19.4477	1	0.01

Tabla 7. Tabla de frecuencia de células IL-17+ en tejidos gingivales con periodontitis					
Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0072	1.4910	0.7491	26	0.43
2	1.5910	3.0749	2.3330	12	0.20
3	3.1749	4.6588	3.9168	8	0.13
4	4.7588	6.2427	5.5007	3	0.05
5	6.3427	7.8265	7.0846	2	0.03
6	7.9265	9.4104	8.6685	0	0.00
7	9.5104	10.9943	10.2523	4	0.07
8	11.0943	12.5781	11.8362	1	0.02
9	12.6781	14.1620	13.4201	2	0.03
10	14.2620	15.7459	15.0039	2	0.03

Tablas 5, 6 y 7. Tablas de frecuencia en donde se muestra la distribución de los datos obtenidos mediante el análisis de porcentaje de área para las células IL-17+ para los grupos sanos (tabla 5), gingivitis (tabla 6) y periodontitis (tabla 7).

Tabla 8. Tabla de frecuencia de células IL-10+ en tejidos gingivales sanos					
Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0000	0.8980	0.4490	78	0.78
2	0.9980	1.8959	1.4469	17	0.17
3	1.9959	2.8939	2.4449	3	0.03
4	2.9939	3.8918	3.4428	0	0.00
5	3.9918	4.8898	4.4408	0	0.00
6	4.9898	5.8877	5.4387	1	0.01
7	5.9877	6.8857	6.4367	0	0.00
8	6.9857	7.8836	7.4346	0	0.00
9	7.9836	8.8816	8.4326	1	0.01
10	8.9816	9.8795	9.4306	0	0.00

Tabla 9. Tabla de frecuencia de células IL-10+ en tejidos gingivales con gingivitis					
Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0000	1.8122	0.9061	85	0.77

2	1.9122	3.7244	2.8183	5	0.05
3	3.8244	5.6366	4.7305	3	0.03
4	5.7366	7.5488	6.6427	2	0.02
5	7.6488	9.4610	8.5549	12	0.11
6	9.5610	11.3732	10.4671	1	0.01
7	11.4732	13.2854	12.3793	1	0.01
8	13.3854	15.1976	14.2915	0	0.00
9	15.2976	17.1098	16.2037	0	0.00
10	17.2098	19.0220	18.1159	1	0.01

Tabla 10. Tabla de frecuencia de células IL-10+ en tejidos gingivales con periodontitis

Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0000	0.5392	0.2696	42	0.70
2	0.6392	1.1785	0.9089	4	0.07
3	1.2785	1.8177	1.5481	5	0.08
4	1.9177	2.4570	2.1873	3	0.05
5	2.5570	3.0962	2.8266	2	0.03
6	3.1962	3.7354	3.4658	1	0.02
7	3.8354	4.3747	4.1051	1	0.02
8	4.4747	5.0139	4.7443	1	0.02
9	5.1139	5.6532	5.3835	1	0.02
10	5.7532	6.2924	6.0228	0	0.00

Tablas 8, 9 y 10. Tablas de frecuencia en donde se muestra la distribución de los datos obtenidos mediante el análisis de porcentaje de área para las células IL-10+ para los grupos sanos (tabla 8), gingivitis (tabla 9) y periodontitis (tabla 10).

Tabla 11. Tabla de frecuencia de células TGF-β+ en tejidos gingivales sanos

Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0022	1.7277	0.8650	63	0.63
2	1.8277	3.5532	2.6905	7	0.07
3	3.6532	5.3787	4.5160	4	0.04
4	5.4787	7.2042	6.3415	8	0.08
5	7.3042	9.0297	8.1670	5	0.05
6	9.1297	10.8552	9.9925	5	0.05
7	10.9552	12.6807	11.8180	3	0.03
8	12.7807	14.5062	13.6435	3	0.03
9	14.6062	16.3317	15.4690	1	0.01
10	16.4317	18.1572	17.2945	1	0.01

Tabla 12. Tabla de frecuencia de células TGF- β + en tejidos gingivales con gingivitis					
Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0002	1.2346	1.9017473	49	0.45
2	1.3346	2.5689	1.9517473	14	0.13
3	2.6689	3.9033	3.2860855	10	0.09
4	4.0033	5.2376	4.6204237	7	0.06
5	5.3376	6.5719	5.9547619	11	0.10
6	6.6719	7.9063	7.2891001	4	0.04
7	8.0063	9.2406	8.6234383	5	0.05
8	9.3406	10.5749	9.9577765	6	0.05
9	10.6749	11.9093	11.2921147	1	0.01
10	12.0093	13.2436	12.6264529	3	0.03

Tabla 13. Tabla de frecuencia de células TGF- β + en tejidos gingivales con periodontitis					
Intervalos	Intervalos de clase		Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	0.0011	1.4775	0.7393	21	0.350
2	1.5775	3.0539	2.3157	6	0.100
3	3.1539	4.6303	3.8921	7	0.117
4	4.7303	6.2067	5.4685	6	0.100
5	6.3067	7.7830	7.0448	6	0.100
6	7.8830	9.3594	8.6212	4	0.067
7	9.4594	10.9358	10.1976	2	0.033
8	11.0358	12.5122	11.7740	3	0.050
9	12.6122	14.0886	13.3504	2	0.033
10	14.1886	15.6650	14.9268	3	0.050

Tablas 11, 12 y 13. Tablas de frecuencia en donde se muestra la distribución de los datos obtenidos mediante el análisis de porcentaje de área para las células TGF- β + para los grupos sanos (tabla 11), gingivitis (tabla 12) y periodontitis (tabla 13).

Análisis bioestadístico

Análisis de varianza (ANOVA).

El análisis de varianza es un procedimiento en donde se toma la variabilidad total en una serie de datos y la divide en dos o más fuentes de variación, este procedimiento estadístico evalúa la hipótesis nula de que no existe una diferencia entre dos o más grupos. Este análisis se basa en comparar la variabilidad de los tratamientos y el error, para hacerlo, se utiliza una prueba *F*. Los resultados obtenidos de un análisis de varianza se resumen en una tabla de ANOVA.^{64, 65}

Un ANOVA de dos vías o de dos factores determina como una respuesta es afectada por dos factores.⁶⁶

Test de Bartlett.

Se utiliza para probar si *k* muestras tienen varianzas iguales; si existe una igualdad de varianzas entre los grupos, frente a la alternativa de que las varianzas sean desiguales para al menos dos grupos, se le denomina homogeneidad de varianzas. El test de Bartlett es sensible a las desviaciones de la normalidad.⁶⁷

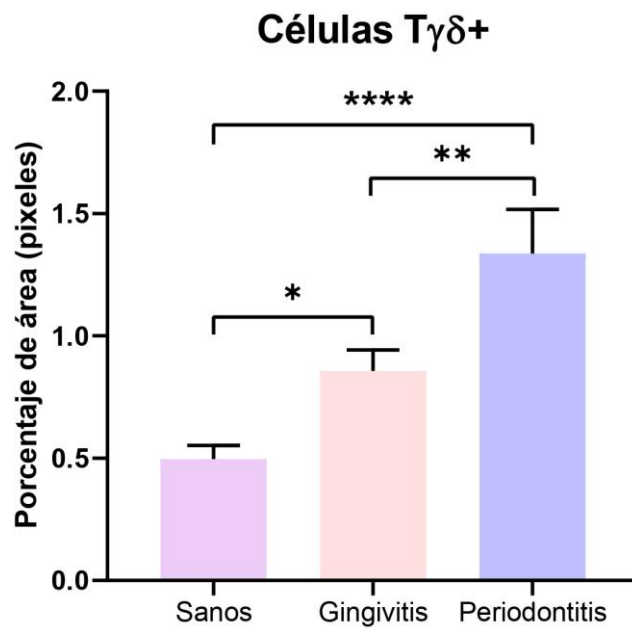
Test de Brown-Forsythe.

Es una prueba estadística, la cual tiene las hipótesis de que las varianzas entre los grupos son iguales y las varianzas entre los grupos no son iguales, si el valor *p* es menor que algún nivel de significancia, entonces se rechaza la hipótesis nula y se concluye que las varianzas no son iguales entre los grupos.⁶⁸

Test de Tukey.

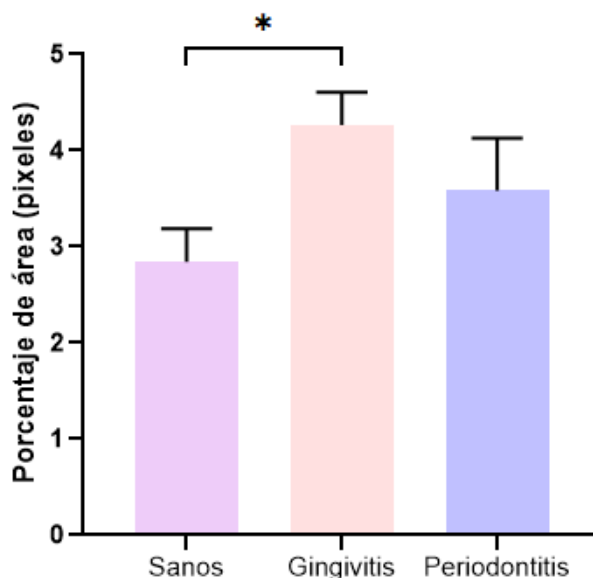
En un análisis de comparación múltiple se comparan múltiples grupos sobre una sola variable resultante. La prueba de Tukey solo se utiliza como una prueba de seguimiento en un ANOVA, esta prueba compara cada media con todas las demás y tiene en cuenta la dispersión de todos los grupos; el test de Tukey puede calcular un intervalo de confianza para la diferencia de las medias y los resultados arrojados son un conjunto de decisiones, que pueden ser “estadísticamente significativo” o “no estadísticamente significativo”.^{65, 69}

Las tablas de resultados del análisis de varianza ANOVA se muestran en el anexo #3.



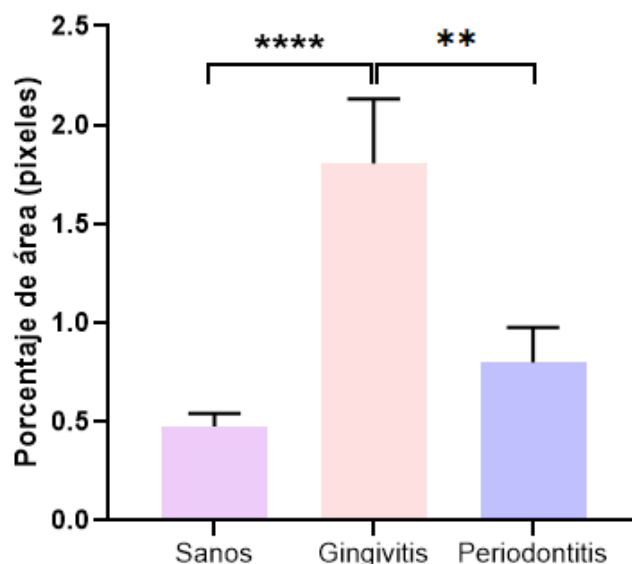
Gráfica 1. El grupo de sanos mostró expresión de 0.49%, mientras que el grupo de gingivitis mostró 0.85% y por último el grupo de periodontitis mostró expresión de 1.33%. Los datos son presentados como la Media o promedio \pm Error estándar de la media (EEM) de los datos correspondientes a cada grupo de estudio. Valores P de ≤ 0.05 fueron considerados significativos (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ y * $P \leq 0.05$).

Células IL-17+

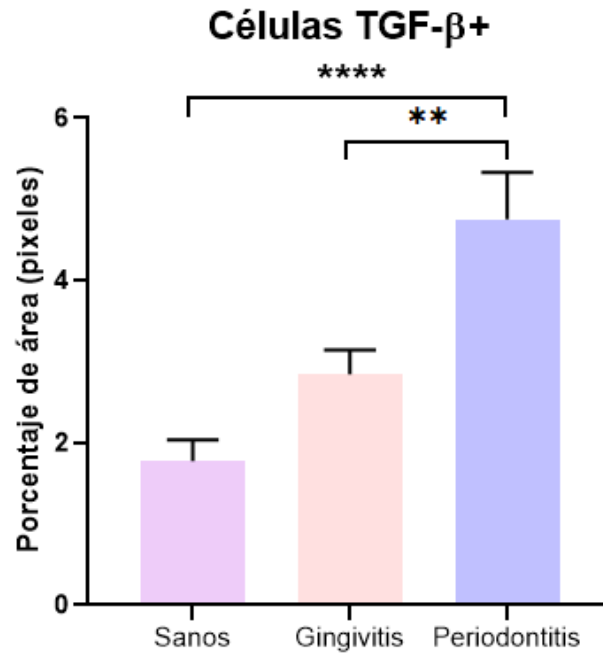


Gráfica 2. El grupo de sanos mostró expresión de 2.84%, mientras que el grupo de gingivitis mostró 4.26% y por último el grupo de periodontitis mostró expresión de 3.58%. Los datos son presentados como la Media o promedio \pm Error estándar de la media (EEM) de los datos correspondientes a cada grupo de estudio. Valores P de ≤ 0.05 fueron considerados significativos (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ y * $P \leq 0.05$).

Células IL-10+



Gráfica 3. El grupo de sanos mostró expresión de 0.47%, mientras que el grupo de gingivitis mostró 1.8% y por último el grupo de periodontitis mostró expresión de 0.8%. Los datos son presentados como la Media o promedio \pm Error estándar de la media (EEM) de los datos correspondientes a cada grupo de estudio. Valores P de ≤ 0.05 fueron considerados significativos (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ y * $P \leq 0.05$).



Gráfica 4. El grupo de sanos mostró expresión de 1.77%, mientras que el grupo de gingivitis mostró 2.84% y por último el grupo de periodontitis mostró expresión de 4.75%. Los datos son presentados como la Media o promedio \pm Error estándar de la media (EEM) de los datos correspondientes a cada grupo de estudio. Valores P de ≤ 0.05 fueron considerados significativos (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ y * $P \leq 0.05$).

Discusión

Las EP son un conjunto de patologías inflamatorias de tipo crónico, causada por una transición de simbiosis a disbiosis y en donde hay un cambio en la composición de la biopelícula oral. La OMS estima que el 14% de la población adulta padece algún tipo de EP y en México se estima que alrededor del 60% de la población adulta presentaba algún signo de EP, lo cual se ha convertido en una problemática de salud pública importante.^{1, 3,}

4

Las células T $\gamma\delta$ son un tipo de linfocito, las cuales expresan un TCR compuesto por una cadena γ y una cadena δ ; representan del 0.5 al 5% de todos los linfocitos T del cuerpo; al activarse, las células T $\gamma\delta$ pueden expresar distintas citocinas y quimiocinas, lo cual le confiere funciones tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Estas células participan en el mantenimiento de la homeostasis gingival, poseen acciones reguladoras esenciales para mantener la integridad del tejido reprimiendo el proceso inflamatorio liberando IL-10 y TGF- β ; aunque también producen IL-17, una citocina proinflamatoria, ayudando a mantener una homeostasis tisular y es esencial para determinar si la enfermedad periodontal es destructiva o no.

20, 26, 27, 56

Los resultados del estudio realizado por Gemmell *et al.* demostraron un incremento en la proporción de células T $\gamma\delta$ en comparación con células T $\alpha\beta$ cuando existe mayor grado de infiltrado inflamatorio en tejidos con EP, además, en el estudio de Kawahara *et al.* observaron que en sitios donde no había infiltrado inflamatorio rara vez se encontraban células T $\gamma\delta$. Estos datos coinciden con los obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo, donde observamos un mayor número de células T $\gamma\delta$ en tejidos gingivales clínicamente sanos pero histológicamente, con un infiltrado inflamatorio de moderado a severo. Estos resultados son coincidentes con los encontrados en este estudio, en el cual pudimos demostrar que ocurre aumento en la

cantidad de células T $\gamma\delta$ presentes en tejidos con gingivitis y periodontitis, en comparación con los tejidos gingivales sanos.^{71, 72, 73}

Con respecto a las citocinas analizadas en este trabajo; en el año 2020, Lu Sun y colaboradores, evaluaron la correlación entre IL-17 e IL-10 en muestras de GCF, demostraron que los sujetos con altos niveles de IL-17 y niveles bajos de IL-10 presentaron una enfermedad clínica significativamente más grave que los sujetos que presentaban niveles bajos o altos de ambas citocinas o que sujetos con niveles de IL-10 altos y niveles de IL-17 bajos; lo cual sugiere que IL-10 puede actuar como regulador negativo de IL-17 para reducir la expresión clínica de la EP.⁷³

Además de esto, también evaluaron los niveles de IL-17 e IL-10 en biopsias de tejido gingival a través de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, y determinaron que los niveles de estas citocinas fueron significativamente mayores en tejidos gingivales con EP, en comparación con biopsias de tejidos sanos. Estos datos coincidieron con los resultados de nuestra investigación, donde pudimos demostrar que los niveles de expresión de IL-17 e IL-10 incrementaban de manera significativa con relación al grado de infiltrado inflamatorio. Sin embargo, es importante hacer énfasis que, aunque el incremento en la expresión de estas citocinas fue gradual conforme el cuadro clínico empeoraba, el grupo de gingivitis fue el que mostró los niveles más elevados de IL-17 e IL-10 con respecto al grupo sano.

Lo cual nos sugiere que la presencia de ambas citocinas trabajan en conjunto; por un lado, para reclutar células inmunes al sitio de inflamación, a través de IL-17. Mientras que el incremento similar de IL-10 en ese mismo grupo de estudio (gingivitis), podría estar contrarrestando en cierta medida los efectos proinflamatorios de IL-17; regulando posiblemente, la inflamación a nivel tisular previo a la pérdida de tejidos periodontales que se presenta en la periodontitis; y así, esto puede corresponder a un mecanismo de regulación inmune del tejido gingival humano.⁷³

Para concluir con TGF- β , un estudio realizado por Khalaf *et al.* determinaron que la acumulación de TGF- β permaneció aumentada tanto en saliva como en GCF en pacientes con EP comparándolo con pacientes controles sanos. Del mismo modo, Li X *et al.* en su estudio demostraron una diferencia importante en los niveles de TGF- β comparando su grupo experimental contra su grupo control tanto en inmunohistoquímica como en RT-PCR. Así entonces, nuestros resultados en este estudio también demostraron un incremento en los niveles de expresión de TGF- β en los grupos de gingivitis y periodontitis con respecto con el grupo control sano.

74, 75

Por lo tanto, todos estos datos nos sugieren que las células T $\gamma\delta$ son elementos celulares innatos muy importantes en la primera línea de defensa de la mucosa oral y son capaces de secretar diferentes citocinas como IL-17, IL-10 y TGF-b. Sin embargo, aun cuando el número de células T $\gamma\delta$ pueda verse incrementado en grupos de gingivitis y periodontitis, la expresión de las citocinas analizadas en este estudio, mostraron diferentes niveles de expresión, especialmente en el grupo de gingivitis; lo que nos hace pensar que la regulación inmune por parte de las células innatas, como las T $\gamma\delta$ se encuentra controlada aún en esa fase clínica, mientras que al evolucionar a periodontitis, la regulación inmune es deficiente y podría ser una de las causas asociadas a la pérdida de los tejidos periodontales.

Conclusiones

Las células $T\gamma\delta^+$ y las moléculas IL-17, IL-10 y TGF- β se encontraban distribuidas en el epitelio, tejido conectivo y cercanas a vasos sanguíneos en los tejidos gingivales con diferentes niveles de expresión.

La expresión de células $T\gamma\delta^+$ mostró un incremento estadísticamente significativo en el grupo de gingivitis y periodontitis, comparándolos con el grupo control; siendo mayor en periodontitis.

IL-17 fue observada en todas las biopsias, siendo el grupo con gingivitis y periodontitis los que mostraron un mayor incremento, el cual fue gradual respecto al cuadro clínico y estadísticamente significativo en comparación con el grupo control sano.

IL-10 se observó presente en todos los tejidos gingivales; sin embargo, el porcentaje de expresión de IL-10 fue mayor y estadísticamente significativo en el grupo con gingivitis en comparación con el grupo control sano. En el caso de los tejidos con periodontitis, se observó un incremento mayor de IL-10 que en el grupo control, pero menor que en el grupo con gingivitis, por lo que la expresión de esta citocina no mostró diferencias estadísticamente significativas entre periodontitis y el grupo sano.

El porcentaje de expresión de TGF- β fue estadísticamente significativo en todos los grupos, mostrando un incremento en gingivitis y aún mayor, en periodontitis comparándolos con el grupo control.

De manera resumida, el porcentaje de expresión de células $T\gamma\delta^+$ y de TGF- β , mostró un aumento gradual y significativo en los tejidos con gingivitis y periodontitis, en comparación con el grupo sano, con el mayor incremento observado en el grupo de periodontitis. En el caso de IL-17 e IL-10, el grupo de gingivitis mostró los mayores niveles de expresión en comparación con el grupo control, e incluso con periodontitis. Finalmente, la expresión de

TGF- β fue en aumento del grupo control sano al grupo de gingivitis, así como también se observó un incremento en el grupo de gingivitis con respecto al de periodontitis.

Los diferentes cuadros clínicos de las EP mostraron diferentes niveles de expresión tanto de células T $\gamma\delta$, IL-17, IL-10 y TGF- β . Estos niveles se ven modificados conforme avanza el desarrollo de la enfermedad periodontal, lo que sugiere que tanto las células T $\gamma\delta$ como las moléculas que expresan, actúan como inmunorreguladores en el tejido gingival durante las diferentes fases de la enfermedad periodontal.

Anexos

Anexo #1: Preparación de reactivos.

Buffer Tris HCl 0.5M pH 7.6.

-Tris (Trizma hydrochloride)	6.1 g
-H ₂ O Destilada	500 ml
-Agregar HCl .1N	.375 ml

Aforar a 1000 ml y llevar pH a 7.6.

Solución bloqueadora de ASB (Albúmina sérica bovina) al 1%.

-Buffer Tris HCl 0.5M	10 ml
-ASB	0.1 g
-Tritón X 0.01%	1µL

Mezclar bien con la punta donde se tomó el tritón.

Solución diluyente para anticuerpos ASB 0.1%.

- Tomar 1 ml de la solución bloqueadora ASB 1%.
- Agregar 9 ml de buffer Tris HCl 0.5M.
- Tritón X 0.01% 1µL.

Mezclar bien con la punta donde se tomó el tritón.

Anexo #2: Carta de aceptación del Comité de Investigación y Ética y consentimientos informados



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

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 γδ, 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





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

Donación de tejido para uso en investigación.

Se le invita a donar una porción pequeña de su encía (toma de biopsia) para ser utilizado en futuras investigaciones en odontología.

Antes de decidir sobre su participación, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto para ayudarlo a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya leído esta carta de consentimiento y si usted desea donar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

Justificación

La donación de un pequeño fragmento de su encía, ya sea tomada antes de su tratamiento periodontal (biopsia) o bien, durante la cirugía de muelas del juicio o premolares (en casos de que su ortodoncista lo haya requerido) no afecta ni pone en riesgo su salud, ni interfiere en el diagnóstico o tratamiento que se le vaya a realizar. En el caso de que su encía haya derivado de una cirugía, cuando no se requiere para diagnóstico, la encía se desecha e incinera de la siguiente manera: al finalizar la cirugía se colocará en una bolsa amarilla la cual será recolectada y llevada a incinerar por la empresa Bio- Tratamientos México, S. A de C. V. (BIOTRAMEX). En el caso de que Usted permita la toma de biopsia antes de comenzar su tratamiento, esto no afectará en lo absoluto su tratamiento ya que sería una muestra muy pequeña que será tomada bajo anestesia de esa pequeña zona, por lo que no referirá mayor complicación posterior. Su donación, para la investigación, es muy importante ya que de estos tejidos se pueden obtener cultivos celulares, pruebas genéticas, inmunológicas etc., que ayudarán al avance de la medicina; lo que llevará a la obtención de nuevos conocimientos y posibles terapias para tratar enfermedades que afectan de manera frecuente al ser humano.

Objetivo

El objetivo de solicitar la donación de tejido de biopsias es: obtener muestras de tejido de encía para investigar dentro de un laboratorio; se analizarán diferentes las células que conforman su encía y se les realizarán diferentes pruebas para analizar la función que llevan a cabo, así como su relación con el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Beneficios

La información obtenida de la investigación que se realiza sobre estos tejidos se utiliza para mejorar el diagnóstico de enfermedades, generar conocimientos científicos y diseñar nuevas terapias para enfermedades que afectan al ser humano.

1/6

Procedimientos

El procedimiento que le explicó su Cirujano Dentista no se verá afectado de ningún modo. Se recolectarán datos generales (edad, género, ocupación, etc), antecedentes patológicos y no patológicos, hábitos en su vida diaria, localización y características de su encía, el procedimiento quirúrgico y el diagnóstico. El tejido resultante será colocado en soluciones fijadoras ó en medio de cultivo especial para su procesamiento posterior.

Aclaraciones

La decisión de donar o no el tejido, es completamente voluntaria.

- No habrá ninguna consecuencia desfavorable en caso de no aceptar.
- No tendrá que hacer gasto alguno derivado de la donación.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores, por lo cual su nombre será reemplazado por un número de folio.
- **La participación en este proyecto no implica la provisión de servicio dental gratuito o ningún tipo de apoyo económico para el tratamiento dental.**
- La participación en este proyecto no brinda ninguna remuneración 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**

2/6



"ANÁLISIS DEL PAPEL DE CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA (CÉLULAS T γδ, NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS TH17) Y SUS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN EL DESARROLLO DE LA 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 ó bien, acepto la toma de biopsia 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 la normatividad correspondiente 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 investigador



"ANÁLISIS DEL PAPEL DE CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA (CÉLULAS T γ δ , NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS TH17) Y SUS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN EL DESARROLLO DE LA 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 ó bien, acepto la toma de biopsia 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 la normatividad correspondiente 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



"ANÁLISIS DEL PAPEL DE CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA (CÉLULAS T γδ, NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS TH17) Y SUS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL"

Solicitud de Revocación del Consentimiento Informado

Yo, _____ por este conducto deseo informar mi decisión de revocar mi autorización para la donación de tejido proveniente de mi cirugía ó toma de biopsia 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



"ANÁLISIS DEL PAPEL DE CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA (CÉLULAS T $\gamma\delta$, NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS TH17) Y SUS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL"

Solicitud de Revocación del Consentimiento Informado

Yo,

_____ por este conducto deseo informar mi decisión de revocar mi autorización para la donación de tejido proveniente de mi cirugía ó toma de biopsia 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

Anexo #3: Tablas de Resultados ANOVA

Células Tγδ+					
Table Analyzed	Células Tγδ+				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	14.35				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0.1049				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	17.00 (2, 245)				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	62.03				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	24.36	2	12.18	F (2, 245) = 14.35	P<0.0001
Residual (within columns)	208	245	0.8488		
Total	232.3	247			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	248				

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0.05							
Tukey's multiple comparisons test								
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Gingivitis TCRyd vs. Sanos TCRyd	0.3596	0.04399 to 0.6753	Yes	*	0.021	B-A		
Periodontitis TCRyd vs. Sanos TCRyd	0.8404	0.4702 to 1.211	Yes	****	<0.0001	C-A		
Periodontitis TCRyd vs. Gingivitis TCRyd	0.4807	0.1227 to 0.8388	Yes	**	0.0049	C-B		
Test details								
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Gingivitis TCRyd vs. Sanos TCRyd	0.856	0.4964	0.3596	0.1339	104	87	3.8	245
Periodontitis TCRyd vs. Sanos TCRyd	1.337	0.4964	0.8404	0.157	57	87	7.57	245
Periodontitis TCRyd vs. Gingivitis TCRyd	1.337	0.856	0.4807	0.1518	57	104	4.478	245

Células IL-17+					
Table Analyzed	Células IL-17+				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	3.735				
P value	0.0253				
P value summary	*				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0.03031				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0.4374 (2, 239)				
P value	0.6463				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	5.127				
P value	0.077				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	92.85	2	46.43	F (2, 239) = 3.	P=0.0253
Residual (within columns)	2971	239	12.43		
Total	3064	241			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	242				

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0.05							
Tukey's multiple comparisons test								
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Gingivitis IL-17 vs. Sanos IL-17	1.422	0.1950 to 2.649	Yes	*	0.0184	B-A		
Periodontitis IL-17 vs. Sanos IL-17	0.7402	-0.6661 to 2.146	No	ns	0.43	C-A		
Periodontitis IL-17 vs. Gingivitis IL-17	-0.6819	-2.065 to 0.7009	No	ns	0.4765	C-B		
Test details								
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Gingivitis IL-17 vs. Sanos IL-17	4.265	2.843	1.422	0.5203	96	88	3.865	239
Periodontitis IL-17 vs. Sanos IL-17	3.583	2.843	0.7402	0.5963	58	88	1.756	239
Periodontitis IL-17 vs. Gingivitis IL-17	3.583	4.265	-0.6819	0.5863	58	96	1.645	239

Células IL-10+					
Table Analyzed	Células IL-10+				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	9.766				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0.08897				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	10.48 (2, 200)				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	152.4				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	70.62	2	35.31	F (2, 200) = 9.766	P<0.0001
Residual (within columns)	723.1	200	3.616		
Total	793.7	202			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	203				

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0.05							
Tukey's multiple comparisons test								
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Gingivitis IL-10 vs. Sanos IL-10	1.331	0.5921 to 2.069	Yes	****	<0.0001			
Periodontitis IL-10 vs. Sanos IL-10	0.3242	-0.4799 to 1.128	No	ns	0.608			
Periodontitis IL-10 vs. Gingivitis IL-10	-1.006	-1.801 to -0.2114	Yes	**	0.0088			
Test details								
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Gingivitis IL-10 vs. Sanos IL-10	1.806	0.4759	1.331	0.3127	76	72	6.017	200
Periodontitis IL-10 vs. Sanos IL-10	0.8001	0.4759	0.3242	0.3405	55	72	1.347	200
Periodontitis IL-10 vs. Gingivitis IL-10	0.8001	1.806	-1.006	0.3366	55	76	4.228	200

Células TGF-β+					
Table Analyzed	Células TGF-β+				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	14.71				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R square	0.1053				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	12.47 (2, 250)				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	26.01				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	317.5	2	158.7	F (2, 250) = 14.71	P<0.0001
Residual (within columns)	2697	250	10.79		
Total	3015	252			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	253				

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0.05							
Tukey's multiple comparisons test								
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Gingivitis TGF-b vs. Sanos TGF-b	1.069	-0.05109 to 2.190	No	ns	0.065			
Periodontitis TGF-b vs. Sanos TGF-b	2.984	1.684 to 4.283	Yes	****	<0.0001			
Periodontitis TGF-b vs. Gingivitis TGF-b	1.914	0.6632 to 3.166	Yes	**	0.0011			
Test details								
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Gingivitis TGF-b vs. Sanos TGF-b	2.842	1.772	1.069	0.4752	106	87	3.182	250
Periodontitis TGF-b vs. Sanos TGF-b	4.756	1.772	2.984	0.5512	60	87	7.655	250
Periodontitis TGF-b vs. Gingivitis TGF-b	4.756	2.842	1.914	0.5307	60	106	5.102	250

Referencias Bibliográficas

1. Sojod B, Périer J-M, Zalberg A, Bouzegza S, Halabi BE, Anagnostou F. Enfermedad periodontal y salud general. EMC - Tratado de Medicina [Internet]. 2022 Mar [citado 2022 Agosto 19]; 26(1):1–8. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(22\)46043-0](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(22)46043-0)
2. Pardo F, Hernández J. Enfermedad periodontal: enfoques epidemiológicos para su análisis como problema de salud pública. Rev. Salud pública [Internet]. 2018 [citado 2022 Agosto 15]; 20(2): 258-264. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/rsap.v20n2.64654>
3. World Health Organization. Salud bucodental [Internet]. Who.int. WHO; 2022 [citado 2022 Agosto 19]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health#:~:text=Gingivitis%20y%20periodontitis,y%2C%20a%20veces%2C%20halitosis>.
4. Secretaría de Salud. Informes SIVEPAB 2019 [Internet]. gob.mx. 2019 [citado 2022 Agosto 19]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-sivepab-2019>
5. Boletín UNAM DGCS. En México, la enfermedad periodontal tiene una prevalencia de 70 por ciento [Internet]. Unam.mx. 2016 [citado 2022 Agosto 19]. Disponible en: https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_476.html
6. Sánchez R, Sánchez R. J., Sigcho, Expósito A. Factores de Riesgo de enfermedad periodontal. Correo Científico Médico. [Internet] 2021 [citado el 2022 Agosto 21] 25(1).
7. Moreno L, Amaya S, Cruz E. Factores de riesgo modificables e inmodificables de la periodontitis: Revisión Narrativa. Pontificia Universidad Javeriana [Internet] 2018 [citado el 2022 Agosto 21] 37(79) Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-995626>
8. Wu J, Keung W, Sun Weibin. Periodontal disease associated with genetic disorders. Periodontology- Fundamentals and Clinical Features. [Internet] 2021 [Citado 2022 Agosto 24]
9. Vargas A, Yañez B. Clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y periimplantares 2018. Primera parte. Rev Odontológica Mexicana [Internet] 2021 Ene-Mar [citado 2022 Agosto 19]; 25(1): 10-26. Disponible en: <http://revistas.unam.mx/index.php/rom/article/view/82268/72140>
10. Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Newman and Carranza's Clinical Periodontology. Chapter 3: Anatomy, Structure, and Function of the Periodontium 13th ed. Carranza FA, Elangovan S, Freire M, Jepsen S, Klokkevold PR, Newman MG, et al., editors. Los Angeles, California: Elsevier Inc.; 2019.
11. Lang N, Bartold P. Periodontal health. Journal of Clinical Periodontology [Internet]. 2018 Jun [citado 2022 Ago 29]; 45:S9–16. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12936>
12. Klinger A. Periodontal classification revisited: The classification system in the test of time. Compendium of Continuing Education in Dentistry (15488578) [Internet] 2022 Mar [citado 2022 Agosto 29]; 43(3):184–8. Disponible en: PMID: NLM35917589 NLM UID: 9600713
13. Hajishengallis G, Korostoff J. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. Periodontology 2000 [Internet]. 2017 Jul 31 [citado 2022 Agosto 29]; 75(1):116–51. Disponible en: doi: 10.1111/prd.12181
14. Cárdenas P, Guzmán D, Valera E, Cuevas J, Zambrano G, García A. Principales Criterios de Diagnóstico de la Nueva Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales. Int. J. Odontostomat. [Internet]. 2021 Mar [citado

- 2022 Ago 29]; 15(1): 175-180. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2021000100175>
15. Page R., Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976; 33: 235–249.
 16. Patini R, Staderini E, Lajolo C, Lopetuso L, H. Mohammed, L. Rimondini, V. Rocchetti, F. Francheschi, M. Cordaro, P. Gallenzi. Relationship between oral microbiota and periodontal disease: a systematic review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* [Internet] 2018 [citado el 2022 agosto 15] 22: 5775-5788. Disponible en: <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/5775-5788.pdf>
 17. Kumar V, Arvina R, Sivaranjani K, Hema P, Arun V. Role of Immunology in Periodontal Disease: A Brief Review. *Journal of Scientific Dentistry.* [Internet] 2018; [Citado 2022 Agosto 17] 8(2):25-8. Disponible en: <https://jsd.sbvjournals.com/doi/JSD/pdf/10.5005/jsd-8-2-25>
 18. Toche P. Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2012 Jul [citado 2022 Ago 28]; 23(4):446–57. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8)
 19. Eberl M, Davey M. Neutrophils. *British Society for Immunology* [Internet]. Immunology.org. 2021 [citado 2022 Agosto 16]. Disponible en: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/neutrophils>
 20. Ribot J, Lopes N, Silva B. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nature Reviews Immunology* [Internet]. 2020 [citado 2022 Agosto 28]; 21(4):221–32. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00452-4>
 21. Khairallah C, Chu T, Sheridan B. Tissue Adaptations of Memory and Tissue-Resident Gamma Delta T Cells. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018 Nov [citado 2022 Agosto 24]; 9. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02636>
 22. British Society for Immunology. Pattern recognition receptor (PRRs) ligands [Internet]. Immunology.org. 2021 [citado 2022 Agosto 28]. Disponible en: [https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/receptors-and-molecules/receptores-que-reconocen-patrones#:~:text=El%20sistema%20inmunitario%20est%C3%A1%20equipado,que%20reconocen%20patrones%20\(PRRs\)](https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/receptors-and-molecules/receptores-que-reconocen-patrones#:~:text=El%20sistema%20inmunitario%20est%C3%A1%20equipado,que%20reconocen%20patrones%20(PRRs)).
 23. Mokhtari Y, Pourbagheri A, Zafari P, Bagheri N, Ghaffari SH, Bashash D. Toll-like receptors (TLRs): An old family of immune receptors with a new face in cancer pathogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [Internet]. 2020 Dec 18 [citado 2022 Sep 1]; 25(2):639–51. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jcmm.16214>
 24. Dolasia K, Bisht M, Pradhan G, Udgata A, Mukhopadhyay S. TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity. *International Reviews of Immunology.* [Internet] 2018. [Citado 2022 Agosto 28]; 37(1):1-19.
 25. Solís D, Pérez I, García A. Mecanismos inflamatorios en la destrucción periodontal. *Revista Odontológica Mexicana.* [Internet]. 2019. [Citado 2022 Agosto 28]; 23(3): 159-172.
 26. Oliveira B, Rodrigues T, Russo J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cell-derived cytokines (IL-4, IL-17, IFN- γ and IL-10) and their possible implications for atopic dermatitis development. *International Journal of Dermatology* [Internet]. 2022 [citado 2022 Agosto 22]; Disponible en: <https://doi.org/10.1111/ijd.16364>
 27. Rodrigues T, Russo J. Natural Self-Ligand Gamma Delta T Cell Receptors ($\gamma\delta$ TCRs) Insight: The Potential of Induced IgG. *Vaccines* [Internet]. 2020 [citado 2022 Agosto 22]; 8(3):436. Available from: <https://doi.org/10.3390/vaccines8030436>

28. Akitsu A, Iwakura Y. Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T ($\gamma\delta$ 17) cells in inflammatory diseases. *Immunology* [Internet]. 2018 Sep [citado 2022 Agosto 22]; 155(4):418–26.
29. Giri S, Lal G. Differentiation and functional plasticity of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells under homeostatic and disease conditions. *Molecular Immunology* [Internet]. 2021 Ago [citado 2022 Nov 17]; 136:138–49. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.06.006>
30. Pastar I, O'Neill K, Padula L, Head C, Burgess J, Chen V, et al. Staphylococcus epidermidis Boosts Innate Immune Response by Activation of Gamma Delta T Cells and Induction of Perforin-2 in Human Skin. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 Sep 16 [citado 2022 Nov 17]; 11. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.550946>
31. Malik S, Want M, Awasthi A. The Emerging Roles of Gamma–Delta T Cells in Tissue Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2016 Jan 29 [Citado 2022 Agosto 29]; 7. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00014>
32. British Society for Immunology. Gamma Delta ($\gamma\delta$) T Cells [Internet]. Immunology.org. 2021 [citado 2022 Sep 6]. Disponible en: <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/cells/c%C3%A9lulas-t-gamma-delta-%CE%B3%CE%B4>
33. Rezende R, Weiner H. Oral tolerance: an updated review. *Immunology Letters* [Internet]. 2022 May [citado 2022 Agosto 29]; 245:29–37. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2022.03.007>
34. Papotto P, Reinhardt A, Prinz I, Silva B. Innately versatile: $\gamma\delta$ 17 T cells in inflammatory and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* [Internet]. 2018 Feb [citado 2022 Sep 14]; 87:26–37. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.11.006>
35. Luque N, Contreras R, Martínez J, Torres M, Bahraoui S, Wei M, et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Rheumatoid Arthritis Progression by Controlling Memory T Cell Response. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2019 Abril 16 [citado 2022 Sep 12]; 10. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00798>
36. Bank I. The Role of Gamma Delta T Cells in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Cells* [Internet]. 2020 Feb 18 [citado 2022 Sep 12]; 9(2):462. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cells9020462>
37. Suhail A, Rizvi Z, Mujagond P, Ali SA, Gaur P, Singh M, et al. DeSUMOylase SENP7-Mediated Epithelial Signaling Triggers Intestinal Inflammation via Expansion of Gamma-Delta T Cells. *Cell Reports* [Internet]. 2019 Dic [citado 2022 Sep 12]; 29(11):3522-3538.e7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.028>
38. Li J, Glover S. Innate Lymphoid Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* [Internet]. 2018 Ago 29 [citado 2022 Sep 12]; 66(6):415–21. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00005-018-0519-5>
39. Arneth B. Contributions of T cells in multiple sclerosis: what do we currently know? *Journal of Neurology* [Internet]. 2020 Oct 20 [citado 2022 Sep 12]; 268(12):4587–93. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10275-x>
40. Zarobkiewicz M, Kowalska W, Roliński J, Bojarska-Junak A. $\gamma\delta$ T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* [Internet]. 2019 May [citado 2022 Sep 12]; 330:67–73. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.02.009>
41. Qi C, Wang Y, Li P, Zhao J. Gamma Delta T Cells and Their Pathogenic Role in Psoriasis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021 Feb 25 [citado 2022 Sep 12]; 12. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.627139>
42. Yamada A, Wang J, Komaki Y, Komaki F, Micic D, Sakuraba A. Systematic review with meta-analysis: risk of new onset IBD with the use of anti-interleukin-17 agents.

- Alimentary Pharmacology & Therapeutics. [Internet] 2019. [Citado 2022 Agosto 22]; 50(4) 373-385.
43. Ge Y, Huang M, Yao Y. Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2020 Jul [citado 2022 Agosto 24]; 11:1558. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01558>
 44. Liu S. Structural Insights into the Interleukin-17 Family Cytokines and Their Receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2019 [citado 2022 Agosto 22]; 97–117.
 45. Ruiz de Morales G, Puig L, Daudén E, Cañete JD, Pablos JL, Martín AO, et al. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmunity Reviews* [Internet]. 2020 [citado 2022 Agosto 24]; 19(1):102429. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102429>
 46. Chung S, Ye X, Iwakura Y. Interleukin-17 family members in health and disease. *International Immunology* [Internet]. 2021 Oct 6 [citado 2022 Agosto 22]; 33(12):723–9.
 47. Berti F, Pereira A, Cebinelli G, Trugilo K, Brajão K. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine and Growth Factor Reviews* [Internet]. 2017 Apr 1 [citado 2022 Agosto 16]; 34:1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.03.002>
 48. Arellano G, González A. Determinación de interleucina 10 como herramienta diagnóstica para linfoma primario del sistema nervioso central en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez de la Ciudad de México durante el período de febrero 2012 a febrero 2018 [Internet]. 2018 [citado 2022 Agosto 16]. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2018/julio/0776925/Index.html>
 49. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *The Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2019 Oct 14 [citado 2022 Agosto 16]; 217(1). Disponible en: doi: 10.1084/jem.20190418
 50. Ávila D, Segura D, Ibarra A, González C, Macías M. TGF- β y células cebadas: reguladores del desarrollo del tumor. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* [Internet]. 2020 [citado 2022 Agosto 16]; 23(0). Disponible en: <http://tip.zaragoza.unam.mx/index.php/tip/article/view/200/211>
 51. Gonzalo E, Galindo M. Papel del factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β) en la fisiopatología de la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica* [Internet]. 2014 May [citado 2022 Ago 22]; 10(3):174–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2014.01.009>
 52. Nolte M, Margadant C. Controlling Immunity and Inflammation through Integrin-Dependent Regulation of TGF- β . *Trends in Cell Biology* [Internet]. 2020 Ene [citado el 2022 Agosto 21]; 30(1):49–59. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.002>
 53. Papageorgis P, Stylianopoulos T. Role of TGF β in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (Review). *International Journal of Oncology* [Internet]. 2015 [citado 2022 Agosto 22]; 46(3):933–43. Disponible en: doi: 10.3892/ijo.2015.2816
 54. Metelli A, Salem M, Wallace CH, Wu BX, Li A, Li X, et al. Immunoregulatory functions and the therapeutic implications of GARP-TGF- β in inflammation and cancer. *Journal of Hematology & Oncology* [Internet]. 2018 [citado 2022 Agosto 22]; 11(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0570-z>
 55. Molina G. Efecto de TGF- β , IFN- β , EGF e IL-10 sobre la secreción de CD73 soluble en células de cáncer cérvico-uterino. [Internet]. 2019 [citado 2022 Agosto 16]. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2019/abril/0788326/Index.html>
 56. Balaji S, Cholan PK, Víctor DJ. An emphasis of T-cell subsets as regulators of periodontal health and disease. [Internet] *J Clin Transl Res*. 2021 Sep 20; [Citado

- 2022 Agosto 17] 7(5):648-656. PMID: 34778595; PMCID: PMC8580519. Disponible en: PMID: 34778595
57. Tan J, Dai A, Pan L, Zhang L, Wang Z, Ke T, et al. Inflamm-Aging-Related Cytokines of IL-17 and IFN- γ Accelerate Osteoclastogenesis and Periodontal Destruction. Wong S-W, editor. Journal of Immunology Research [Internet]. 2021 Ago 4 [citado 2022 Sep 13]; 2021:1–12. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/9919024>
 58. Jayakumar V, Sadasivan A, Koshi E, Krishna A, Alim A, Sebastian A. Effect of NonSurgical Periodontal Therapy on Plasma Levels of IL-17 in Chronic Periodontitis Patients with Well Controlled Type-II Diabetes Mellitus—A Clinical Study. Dentistry Journal [Internet]. 2018 Jun 13 [citado 2022 Sep 13]; 6(2):19. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/dj6020019>
 59. Gur A, Guncu G, Akman A, Pinar A, Karabulut E, Nohutcu R. Evaluation of GCF IL-17, IL-10, TWEAK, and sclerostin levels after scaling and root planing and adjunctive use of diode laser application in patients with periodontitis. Journal of Periodontology [Internet]. 2022 Ene 25 [citado 2022 Sep 21]; 93(8):1161–72. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0494>
 60. Al-Hamoudi N, Alsahhaf A, Al Deeb M, Alrabiah M, Vohra F, Abduljabbar T. Effect of scaling and root planing on the expression of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-9, IL-10, and IL-13) in the gingival crevicular fluid of electronic cigarette users and non-smokers with moderate chronic periodontitis. Journal of Periodontal & Implant Science [Internet]. 2020 [citado 2022 Sep 21]; 50(2):74. Disponible en: doi: 10.5051/jpis.2020.50.2.74
 61. Reddahi S, Bouziane A, Rida S, Tligui H, Ennibi O. Salivary Biomarkers in Periodontitis Patients: A Pilot Study. Goncalves L, editor. International Journal of Dentistry [Internet]. 2022 Mar 24 [citado 2022 Sep 21]; 2022:1–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2022/3664516>
 62. Falcón B, Quea S, Quispe M, Nina S, Medina W, Tito N, Pérez D. Cicatrización periodontal en pacientes con diabetes mellitus. Revista Odontológica Basadrina [Internet] 2020 [citado 2022 Sep 21]; 4(2), 51–56. Disponible en: <https://doi.org/10.33326/26644649.2020.4.2.963>
 63. Gómez F, Campos M. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. Parte II Histología y Embriología Bucodental, sección 1 cavidad bucal y anexos. 4ªed. Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana. 2019. [citado 2023 May 10] 91-108.
 64. Celis R, Labrada V. Bioestadística. Cap. 20: Análisis de varianza. 3ªed. Ciudad de México. Editorial Manual moderno. 2014. [citado 2023 Oct 26] 153.
 65. Blair R. Bioestadística. Sección 7.4. Procedimientoa de comparación múltiple. 1ª ed. México. Editorial Pearson Educación. 2008 [citado 2023 Oct 26] 283.
 66. GraphPad Software, LLC. GraphPad Prism 10 Statistics Guide - Two-way ANOVA [Internet]. Graphpad.com. 2015 [citado 2023 Oct 26]. Disponible en: https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/two-way_anova.htm
 67. NIST. Bartlett's Test [Internet]. Nist.gov. 2023 [citado 2023 Oct 26]. Disponible en: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda357.htm>
 68. Zach. Brown–Forsythe Test in R: Step-by-Step Example - Statology [Internet]. Statology. 2020 [citado 2023 Oct 26]. Disponible en: <https://www.statology.org/brown-forsythe-test-in-r/>
 69. GraphPad Software, LLC. GraphPad Prism 10 Statistics Guide - Tukey and Dunnett methods [Internet]. Graphpad.com. 2015 [citado 2023 Oct 26]. Disponible en: https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_the_methods_of_tukey_and_dunne.htm

70. Gemmell E, Seymour GJ. $\gamma\delta$ T lymphocytes in human periodontal disease tissue. *J Periodontol* [Internet]. 1995 [citado 2023 Oct 30]; 66(9):780–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1995.66.9.780>
71. Kawahara K, Fukunaga M, Takata T, Kawamura M, Morishita M, Iwamoto Y. Immunohistochemical study of $\gamma\delta$ T cells in human gingival tissues. *J Periodontol* [Internet]. 1995 [citado 2023 Oct 30]; 66(9):775–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1995.66.9.775>
72. Pedraza C, Alquicira S, Becker I, Arzate H. Gamma delta ($\gamma\delta$) T cells and IL-17 expression in healthy gingival tissues. *Eur. J. Immunol.* 2022. 52(Suppl. 2): 1–140. DOI: 10.1002/eji.202270200
73. Sun L, Girnary M, Wang L, Jiao Y, Zeng E, Mercer K, et al. IL-10 dampens an IL-17–mediated periodontitis-associated inflammatory network. *J Immunol* [Internet]. 2020 [citado 2023 Oct 30]; 204 (8):2177–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1900532>
74. Khalaf H, Lönn J, Bengtsson T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: Possible role for TGF- β 1 as a marker for disease progression. *Cytokine* [Internet]. 2014 [citado 2023 Oct 31]; 67(1):29–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.02.007>
75. Li X, Han X, Yu W, Chen X, Wu Y, Lu L. Correlation between transforming growth factor- β and periapical lesions in patients with chronic apical periodontitis. *J Healthc Eng* [Internet]. 2022 [citado 2023 Oct 31]; 2022:1–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2022/2173434>