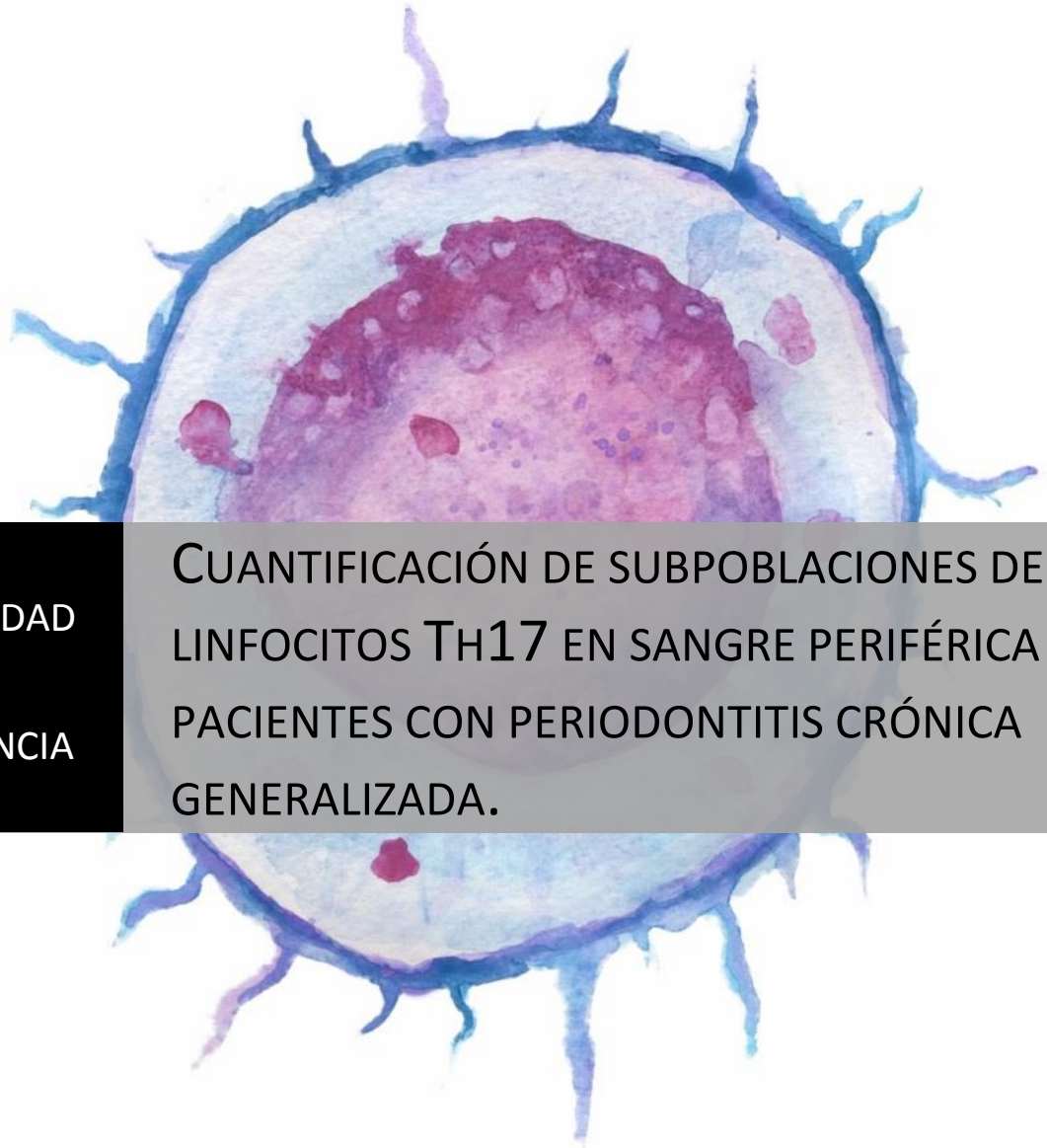


Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Odontología



ESPECIALIDAD
EN
PERIODONCIA

CUANTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE
LINFOCITOS Th17 EN SANGRE PERIFÉRICA DE
PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA
GENERALIZADA.

Hernán Santiago Garzón V. | Directora: Dra. Lina Suárez.
Co-directora: Dra. Nelly Roa.

**CUANTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS TH17 EN SANGRE PERIFÉRICA DE
PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA GENERALIZADA.**

Hernán Santiago Garzón Vergara

Trabajo final para optar al título de:

Especialista en Periodoncia.

Directora:

Dra. Lina Janeth Suárez Londoño

Esp. Periodoncia. Pontificia Universidad Javeriana.

Magíster en Biología. Pontificia Universidad Javeriana.

Co-directora:

Dra. Nelly Roa.

Odontóloga. Pontificia Universidad Javeriana.

PhD Inmunología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Odontología

Especialidad en Periodoncia

Bogotá, Colombia

2015

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres por todo lo que me brindan incondicionalmente y a quienes debo todo.

Gracias a la Dra. Lina por darme la oportunidad de iniciar este viaje que está pronto a terminar, pero donde aprendí de su mano que fue la mejor decisión que pude tomar. Gracias por su apoyo, paciencia y empeño por ser excelentes.

Gracias a la Dra. Nelly por ese ejemplo de pasión por lo que se hace, por enseñarme con paciencia que todo sale bien si se hace con dedicación.

A mis profesores y pacientes por enseñarme día a día lecciones que no se aprenden en ningún otro lugar.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
1. Introducción.	5
2. Pregunta de investigación.	6
3. Justificación.	6
4. Objetivo general y objetivos específicos.	7
5. Marco teórico	8
6. Diseño metodológico.	14
7. Resultados.	20
8. Conclusiones y recomendaciones.	32.
9. Bibliografía.	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de sub-poblaciones de linfocitos Th17.	11
Tabla 2: Etapas a desarrollar en la investigación.	15
Tabla 3: Variables a considerar en el estudio.	18
Tabla 4. Porcentaje de linfocitos productores de IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21 de acuerdo con los diferentes protocolos de estimulación.	24
Tabla 5. Protocolo sugerido para la estimulación de PBMCs con PMA/ionomicina.	25
Tabla 6: Pacientes excluidos posterior a la elaboración de la historia clínica.	28
Tabla 7: Pacientes excluidos posterior a los resultados de los exámenes de laboratorio.	29
Tabla 8: Pacientes con dx gingivitis o periodonto sano.	30
Tabla 9: Pacientes con dx periodontitis crónica severa generalizada.	31

LISTA DE GRÁFICAS

Figura 1: Adquisición de 100.000 eventos de la región de la población linfoide.	20
Figura 2: Distribución de cultivo celular en pozos utilizado.	21
Figura 3. Porcentaje de Linfocitos productores de citocinas IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21. Se presenta las figuras en dot plot de las PBMCs.	23

LISTA DE ANEXOS

ANEXO #1: Escalas para exámenes de laboratorio.	40
ANEXO #2: Historia Clínica.	43
ANEXO #3: Consentimiento informado.	49
ANEXO #4: Protocolo toma individual de muestra de sangre venosa.	51
ANEXO #5. Insertos anticuerpos anti-citocinas intracelulares.	52

1. INTRODUCCIÓN

Ante la falta de entendimiento de los mecanismos inmunopatogénicos en enfermedad periodontal y el descubrimiento de poblaciones de linfocitos T cuya naturaleza pro-inflamatoria respondería a los interrogantes existentes, se plantean hoy en día nuevas hipótesis acerca del papel de este tipo celular en la patogénesis de la periodontitis. Una de estas poblaciones, los linfocitos Th17 descritos inicialmente en enfermedades sistémicas inflamatorias y autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico (1) y artritis reumatoide (2), marcan la pauta para una nueva concepción de la inmunopatogénesis periodontal (3), superando el entendimiento desde el clásico y a su vez controvertido paradigma Th1/Th2 (4,5).

La IL-17 en humanos se identificó en 1995 (6), pero sólo hasta inicios del siglo XXI recobra importancia por su relación directa con enfermedades sistémicas inflamatorias. Esta citoquina no pudo ser relacionada con alguna de las poblaciones de linfocitos CD4+ identificadas hasta ese momento, describiéndose por tal motivo una nueva población, los Th17 (7,8). Los Th17 se distinguen por el marcador de superficie CD161+ (9) y están encargados principalmente de la defensa contra bacterias extracelulares.

Los perfiles de citoquinas presentes en el medio, promueven o regulan la respuesta inmune de acuerdo con la necesidad. Según las citoquinas presentes, los linfocitos pueden diferenciarse en sub-poblaciones, capacidad denominada “plasticidad” (10,11). Esto ha llevado a la reciente descripción de diferentes sub-poblaciones de Th17: Th17 “patológicos” o efectores (Teff17), Th17 reguladores (Treg17) (12) y Th17/Th1 (13). Las diferentes funciones identificadas en cada subpoblación resultan ser antagónicas entre sí lo que puede llevar a un entendimiento completamente diferente de su función en las diferentes patologías, pues hasta el momento se adjudica un papel netamente inflamatorio y mediador de daño tisular (14).

La posible relación entre Th17 y enfermedad periodontal ha sido descrita por diversos autores (15,16,17). Dado su aumento en número en tejidos periodontales inflamados se intuye un papel patológico (18); sin embargo, ante la descripción de las diferentes subpoblaciones, estas células podrían actuar como efectoras o reguladoras de daño tisular.

La clara naturaleza pro-inflamatoria de la enfermedad periodontal se ha relacionado con la presencia de enfermedades con igual carácter, como artritis reumatoide (19), diabetes (20), y enfermedades cardiovasculares (21). A pesar de compartir mecanismos fisiopatológicos, aún no se conoce cómo una infección oral puede contribuir a este tipo de procesos sistémicos (22). En este contexto, la generación de una inflamación sistémica de baja magnitud (“low grade inflammation”) (23,24,25) a partir de una infección periodontal, se presenta como una de las posibles vías de relación. Con la descripción de las diferentes subpoblaciones de Th17 se abre la posibilidad para esclarecer su papel no solo en la fisiopatogénesis del proceso inflamatorio local si no a nivel de una posible repercusión sistémica.

No se han descrito las subpoblaciones de linfocitos Th17 relacionados con periodontitis crónica, ni la repercusión que a nivel sistémico pueden tener las enfermedades crónicas de la cavidad oral como la periodontitis a nivel de dichas sub-poblaciones. Por tal motivo, la identificación y

cuantificación de las diferentes subpoblaciones de Th17 en sangre periférica, cuyo presunto origen sea periodontal, permitirá acercarnos a la función que podría tener la periodontitis en el proceso fisiopatológico en posible relación con enfermedades inflamatorias sistémicas que se han descrito como asociadas a infecciones en cavidad oral.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la cantidad de linfocitos Th17 patológicos, reguladores y Th17/Th1 presentes en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos con periodontitis crónica generalizada, respecto a pacientes con periodonto sano o con gingivitis asociada a placa bacteriana?

3. JUSTIFICACIÓN

Revelar la inmunopatogénesis de la enfermedad periodontal ha sido un proceso investigativo complejo de casi sesenta años (26), y actualmente sigue siendo controversial pues aún no existe explicación irrefutable. Durante todos estos años la evidencia ha mostrado posibles funciones protectoras y/o destructoras de los componentes celulares y humorales de la inmunidad innata y adquirida en el curso de la periodontitis crónica (27,28,29,30).

La descripción de la población de linfocitos Th17 en la comprensión de la inmunopatogénesis de la enfermedad periodontal rompe paradigmas anteriores que resultaron ser insuficientes para entender la complejidad de la misma (31). Si bien se había adjudicado un papel netamente pro-inflamatorio y “destructor” a los linfocitos Th17 hasta hace unos años, la reciente distinción entre diferentes sub-poblaciones con funciones antagónicas (Th17 “patológicos” o efectores (Teff17), Th17 reguladores (Treg17) y Th17/Th1 (Th1 no clásicos), resulta tener un interés especial pues implicaría un entendimiento diferente de su función.

En un trabajo de investigación previo desarrollado en el posgrado de periodoncia de la Universidad Nacional de Colombia en el cual se cuantificó la cantidad de linfocitos Th17 total (IL-23R(+), CD161+) en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos con diagnósticos de: gingivitis inducida por placa bacteriana y periodontitis crónica, se determinó que la cantidad de éstos es mayor en pacientes con enfermedad periodontal (0.75%) respecto a pacientes con inflamación gingival (0.29%), diferencia estadísticamente significativa (32).

Hoy en día es ampliamente aceptado que las infecciones periodontales pueden asociarse a otras enfermedades inflamatorias sistémicas con características inmunopatológicas similares, sin que los mecanismos de estas asociaciones sean claros. La infección periodontal puede convertirse en un reservorio bacteriano cuyo desenlace es una inflamación crónica. Se ha relacionado con un proceso denominado “low grade inflammation” o una inflamación de baja magnitud sistémica.

Si bien esta relación no ha sido descrita de forma concluyente, se precisa como una de las vías por las cuales la enfermedad periodontal puede vincularse a la generación de inflamación sistémica. Es allí donde la presente investigación cobra importancia, convirtiéndose en un desarrollo innovador para el acercamiento al papel de los linfocitos Th17 como reguladores o destructores en esta infección particular; y por otro lado, a esclarecer un poco más cómo la enfermedad periodontal efectivamente puede ser tenida en cuenta como un foco infeccioso oral capaz de generar una inflamación sistémica de baja magnitud, recobrando la importancia de la infección periodontal en el ámbito médico.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar el número de linfocitos Th17 patológicos, reguladores y Th17/Th1 en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos con: periodontitis crónica generalizada, respecto a pacientes con periodonto sano o gingivitis asociada a placa bacteriana.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Estandarización de un protocolo para la cuantificación de sub-poblaciones linfoides Th17 a través de la marcación intracelular de citocinas específicas para cada sub-perfil.
- 4.2.2 Cuantificar linfocitos Th17 (CD4+, CD161+) patológicos mediante marcación intracelular de IL-17A, IL-17F.
- 4.2.3 Cuantificar linfocitos Th17 (CD4+, CD161+) reguladores mediante marcación intracelular de IL-10.
- 4.2.4 Cuantificar linfocitos Th17 (CD4+, CD161+) Th17/Th1 marcación intracelular de IFN- γ .

5. MARCO TEÓRICO.

Actualmente es claro que el entendimiento de diferentes patologías inflamatorias crónicas resulta en una interpretación de éstas desde una perspectiva diferente: esto implica que el centro de atención no es el proceso inflamatorio en sí mismo, sino cómo es la presunta falta de regulación inmunológica el origen del daño tisular. De acuerdo con esto, los procesos inflamatorios crónicos locales son considerados como contribuyentes en procesos de inflamación sistémica de baja magnitud. De ahí que, la relación entre enfermedad periodontal y esta inflamación sistémica esté siendo actualmente estudiada como un tópico de importancia mundial (33).

La periodontitis crónica inicia con la presencia de agentes infecciosos asociados al biofilm dental producto del acúmulo de placa bacteriana, cuya patogénesis y progresión es mediada siempre por el sistema inmune. Es una enfermedad infecciosa inflamatoria crónica, caracterizada por el infiltrado de linfocitos y monocitos, destrucción del tejido conectivo, y reabsorción ósea. Molecularmente está mediada por el aumento de mediadores pro-inflamatorios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE2) y metaloproteinasas que llevan al daño en la matriz extracelular y pérdida ósea. Esto llevaría a pensar que la destrucción del tejido no es causada en sí misma por los agentes infecciosos, sino por aquella respuesta inmunológica sostenida, que en algún punto “pierde” su propia regulación al no retirarse el factor etiológico (34).

La enfermedad periodontal cuyo origen se ha descrito como multifactorial, involucra uno genético inmodificable descrito como pacientes con un “fenotipo hiper-inflamatorio”, caracterizado por una respuesta exacerbada de mediadores inflamatorios en este caso por un origen infeccioso (35). La ulceración epitelial y conectiva en la bolsa periodontal ha sido descrita como una vía de entrada para bacterias orales (generalmente gram-negativas y anaerobias) y de sus lipopolisacáridos o endotoxinas al torrente circulatorio, describiéndose incluso la posibilidad de colonización en zonas distantes a la infección local (36). Este aumento en los niveles de endotoxinas en el torrente circulatorio cursando con un cuadro subclínico, conocido como “endotoxemia metabólica”, se ha referido como el posible factor desencadenante de enfermedades crónicas como diabetes mellitus tipo II, aterosclerosis, Parkinson e incluso cáncer (37).

Una infección crónica que lleve a niveles bajos de endotoxinas en el torrente sanguíneo se enuncia como una de las posibles causas de una inflamación sistémica de baja magnitud o “low grade inflammation”, acompañada de otras causas como el sobrepeso y el envejecimiento. Esto hace que persista un estado pro-inflamatorio sin resolución, que conlleve al desarrollo de enfermedades crónicas en pacientes genéticamente susceptibles (38).

En el contexto de la relación entre enfermedad periodontal y enfermedad sistémica, se ha entendido a la periodontitis como una infección crónica local que puede llegar a otro sitio del organismo. Puede denominarse como una “metástasis” de la infección (bacteremia e infecciones en otros sitios del cuerpo causados por bacterias orales), inflamación y todo lo que conlleva a la activación de los componentes celulares y humorales del sistema inmune que llevan a tener consecuencias a nivel sistémico. Sin embargo, esta relación ha sido el resultado de factores de

riesgo comunes y no una relación causal; de ahí se puede entender que la relación entre enfermedad periodontal y enfermedad sistémica no es lineal, pero sí muy compleja (39).

Han sido tres las vías por las cuales se ha relacionado la enfermedad periodontal con una afección sistémica: **infección o bacteremia, respuesta inflamatoria y respuesta inmune** (36,40). La **infección** no se limita a la cavidad oral, la bacteremia resultante se da por manipulación de los tejidos ulcerados por actos como el cepillado dental, uso de seda dental, masticar goma de mascar o incluso con la masticación (41) puede llevar a la migración de bacterias y sus productos al torrente sanguíneo. Las bacterias orales provenientes de la infección periodontal pueden sobrevivir en la circulación y pueden adherirse a superficies protésicas o tejidos con alteraciones como microangiopatías o placas ateroscleróticas (42).

La **respuesta inflamatoria** generada por todo este proceso infeccioso, se ha reportado no se limita únicamente a nivel local, también a nivel sistémico. Los microorganismos que logran acceso al torrente sanguíneo a través del tejido conectivo ulcerado son usualmente eliminados por el sistema retículo endotelial en minutos (bacteremia transitoria), sin manifestación clínica. Sin embargo, es posible que algunas bacterias persistan en sitios distantes y esto conlleva a la diseminación de factores de virulencia que actuarían como antígenos solubles (36).

Entonces, los antígenos bacterianos que puedan persistir sistémicamente favorecen esta llamada inflamación sistémica. Los leucocitos, las células endoteliales y los hepatocitos responden a estas bacterias/factores de virulencia con la secreción de mediadores inflamatorios (citoquinas, quimioquinas, proteína C reactiva). Con esta exposición continua los antígenos solubles reaccionan con anticuerpos específicos circulantes para formar inmuno-complejos que amplificarían esta inflamación. Es clara la activación presente de los componentes celulares y humorales del sistema inmune innato de forma constante por ser un reto bacteriano crónico (43).

En principio, debería existir una **regulación** natural inicial de esta respuesta inmune. Esta inflamación periodontal inicia como respuesta protectora frente al biofilm. En individuos susceptibles la inflamación periodontal falla en este papel, y se convierte en una inflamación **crónica** por no ser retirado el estímulo bacteriano. Debido a lo anterior resulta en una destrucción del tejido mediada aparentemente por los propios componentes del sistema inmune. Las **lipoxinas** (productos de los eicosanoides) son receptores agonistas que estimulan la resolución de la inflamación y promueven la restitución de la homeostasis. Son derivados de los ácidos grasos endógenos. Los ácidos grasos consumidos en la dieta, de la familia de omega-3 son metabolizados por vías similares y los productos llamados **resolvinas** tienen una actividad biológica similar a las lipoxinas (44).

En el **sistema inmune adaptativo** el componente humoral está dado por la producción de anticuerpos por parte de los Linfocitos B. La producción de estos anticuerpos tendrá diversas finalidades: primero, el reconocimiento del antígeno; segundo, su neutralización (mediante unos mecanismos efectores); y tercero, se encargan de marcar la superficie celular del microorganismo para que se convierta en célula target o diana, cuyo resultado será una respuesta fagocítica para la eliminación del mismo. Para lograrlo, dentro de los mecanismos efectores encontraremos la activación de ciertas células, promover la fagocitosis, y estimular la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias además de algunos mediadores de la inflamación. De esta forma, tras la interacción de los Linfocitos B con el antígeno se generará una proliferación y diferenciación a células

plasmáticas que producirán estos anticuerpos específicos, proceso denominado expansión clonal. Este tipo de inmunidad se ha relacionado para la defensa contra bacterias extracelulares (45).

Teniendo en cuenta la activación celular en el sistema inmune adaptativo cuyo protagonista será el linfocito T, es necesario tener presente que durante los noventa la aplicación del **paradigma Th1/Th2** para la explicación de diferentes patologías inflamatorias, se adjudicaba un papel antagónico para cada uno. En enfermedad periodontal inicialmente se adjudicaba un papel destructor a Th2 por el aumento en el infiltrado de linfocitos B en lesiones avanzadas (46), sin embargo publicaciones posteriores controvierten estos hallazgos adjudicándole un papel destructor a Th1 por la activación persistente de macrófagos (47). El panorama era confuso y este paradigma empieza a reevaluarse a la luz de nuevos descubrimientos, como el de la IL-17 que ante la dificultad para su clasificación dentro de uno de los perfiles anteriores, se menciona uno nuevo: el perfil Th17 (48).

▣ Población de linfocitos Th17.

La descripción de la población de linfocitos Th17 se remite a la identificación de IL-17 en 1995, como una citoquina fundamental en procesos pro-inflamatorios (49). Sin embargo, no sería sino hasta el 2005 cuando recobra importancia, al relacionarse con enfermedades de tipo inflamatorio y autoinmune como lupus eritematoso sistémico (50) y artritis reumatoide (51).

Su naturaleza la convertía en una citoquina diferente respecto a su función particular, no encajaba dentro del paradigma Th1/Th2, y surge entonces la necesidad de clasificar una nueva población de linfocitos T CD4+: población Th17 productora de IL-17 (52). Años después se descubre que la producción de IL-17 no es restringida únicamente a esta población de linfocitos T, sino que también pueden producirla neutrófilos, NK, mastocitos y células epiteliales (53,54).

La familia de citoquinas derivadas de la IL-17 se constituye de seis miembros que varían en su homología: IL-17 (también llamada IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también llamada IL-25) y la IL-17F. Estos subconjuntos fueron descubiertos en un periodo muy corto, entre el 2000 y 2002 siendo llamados secuencialmente de acuerdo con el orden en que fueron descritos. Estas moléculas tienen un peso molecular de entre 20 kd a 200 kd y aunque tienen funciones biológicas similares tienen diferencias sutiles (55).

Para el desarrollo de este perfil, se requiere la presencia en el medio de las siguientes citoquinas: TGF- β , IL-6, IL-1 β y la IL-23. Además este tipo de células necesitan los siguientes factores de transcripción: ROR γ , ROR α , IRF-4 y AhR para su desarrollo y posterior producción de citoquinas.

Tanto la IL-17A como la IL-17F activan células de la inmunidad innata como los neutrófilos y células de los tejidos circundantes no pertenecientes al sistema inmune, como fibroblastos y células epiteliales mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B. La IL-17 estimula a las células epiteliales, endoteliales y fibroblastos para la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6, IL-8, GM-CSF, CXCL1, CCL20 y prostaglandina E2. La secreción de CXCL1 y de CCL20 resulta en el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos al sitio de inflamación favoreciendo la migración celular en procesos crónicos, cuya falta de regulación favorece el daño al tejido. La falta de regulación de una respuesta inmune IL-23/IL-17 es un factor importante para el desarrollo de enfermedades autoinmunes (56).

▣ Subpoblaciones de linfocitos Th17.

El tipo de citoquinas con los que cuente el medio es fundamental para la diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos. De ahí que, la existencia de diferentes subpoblaciones permite entender la multiplicidad inherente a su función. En el siguiente cuadro se resumen sus características principales (11):

Tabla #1: Descripción de sub-poblaciones de linfocitos Th17.

	Th 17 patológico (Teff17)	Th17 regulador (Treg17)	Th17/Th1
Activado por:	TGF-β3, IL-6, IL-23	TGF-β1 e IL-6	IL-12
Produce:	IL-17A, IL-17F, GM-CSF, IL-22	IL-17A, IL-17F, IL-10.	IFN-γ
Activa a:	Macrófagos, células endoteliales, células epiteliales.	Inactiva a: Macrófagos, células dendríticas: inhibición de la expresión de IL-12, co-estimuladores y clase II de MHC.	Macrófagos, Linfocitos Th1 (diferenciación)
Regulado por:	IL-2, IL-27.	IL-1β, IL-23	IL-4, IL-5, IL-13
Características:	Pro-inflamatorio. CD4+ CD161+ IL-23R ^{high} CD26+	Regulador. CD4+ CD161+ IL-23R ^{low}	Pro-inflamatorio. CD4+ CD161+
Enfermedades relacionadas	Lupus eritematoso sistémico (57), encefalomielitis experimental autoinmune (58), artritis reumatoide (59).	No se ha reportado.	Enfermedad de Crohn (60), síndrome coronario agudo (61,62), acné (63).

▣ Plasticidad del perfil Th17

Dependiendo de del antígeno, el estímulo, las citoquinas, señales co-estimuladoras, y de otros factores adicionales, las células T CD4+ pueden diferenciarse en diferentes subpoblaciones con funciones especializadas. De forma clásica, se distinguían los perfiles: Th1 (productor de IFN-γ e inducido en presencia de IL-12) y el Th2 (inductor de una respuesta humoral y promovido por la IL-4). Sin embargo, últimamente han sido descritas otras subpoblaciones de estas células T. Si bien durante muchos años se trataba de explicar la patogénesis de enfermedades infecciosas bajo

el paradigma Th1/Th2, el surgimiento de otros perfiles surge como una posible explicación ante un modelo limitado y escaso para encasillar a todas las enfermedades de este tipo. Uno de estos es el perfil Th17, cuya característica de “plasticidad” le confiere características propias, permitiéndole bajo ciertas circunstancias el cambio de un fenotipo y de función. Recientemente se ha descrito que debido a esta función la existencia de sub-poblaciones es posible, y donde es probable que no todos los Th17 sean patológicos.

▣ Th17 y enfermedad periodontal

Las células del ligamento periodontal actualmente se consideran como facilitadoras del reclutamiento leucocitario, influenciadas en su función inmuno-reguladora por la liberación de IL-17. Los fibroblastos de tejidos sanos y con periodontitis muestran un fenotipo totalmente diferente con alteraciones en la función celular, pues en sitios de inflamación tienen una interacción importante con las células del sistema inmune mediante la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (64). La IL-17 puede activar tanto los fibroblastos como las células endoteliales para aumentar la secreción de IL-6 en presencia de TNF- α . La IL-6 y RANTES son factores reconocidos para la progresión de gingivitis a periodontitis. RANTES es producida por los fibroblastos gingivales luego de un reto con IL-1 β y TNF- α , induciendo el reclutamiento de monocitos en el tejido; además es un factor de quimio-atracción de células del perfil Th1 (65).

Las citoquinas para la diferenciación celular hacia un perfil Th17 están presentes en el medio ambiente periodontal, como: TNF- α , IL-1 β y la IL-6, producidas por gran cantidad de tipos celulares (entre estos el macrófago (66)), y su expansión clonal es posible específicamente gracias a la IL-23. En un estado inicial de inflamación, los fibroblastos gingivales regulan la IL-23; además la activación de células dendríticas también estimula la producción de prostaglandina E2, facilitando la liberación de IL-23, promoviendo la expansión de Th17 (67). En muestras de tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica moderada, es elevada la concentración de IL-23, IL-17 y de IFN- γ (68).

Se encuentra una mayor expresión de IL-17A en tejidos periodontales humanos con enfermedad periodontal respecto a los tejidos con gingivitis, porque esta citoquina es producida por células T de memoria CD4+CD45RO+ sólo cuando están activadas; sin embargo, no se ha reportado diferencia significativa entre la expresión de IL-17F en tejidos con periodontitis crónica o gingivitis (69). La cantidad de IL-17 es significativamente mayor en fluido crevicular de pacientes con periodontitis crónica (45.9%) comparados con pacientes sanos (35.6%) (70). Toda esta estimulación inmunológica es mediada por las bacterias periodontopatógenas, como la *P.gingivalis* capaz de iniciar por sí misma la activación de Th17 (71,72).

Se presume que hay una mayor severidad de la enfermedad periodontal en el fondo de la bolsa, puesto que la concentración de infiltrado inflamatorio y de IL-17 es mayor. Se ha reportado la presencia de macrófagos (CD68+) y las células B (CD20+) tanto en el fondo de la bolsa como en una región más coronal del surco gingival; a diferencia de células dendríticas cuya concentración es significativamente menor. Además la producción de IL-23 es mayor por parte de los macrófagos que de las células B. De acuerdo con estos datos, se puede decir que son los

macrófagos como células presentadoras de antígeno se convierten en mediadoras importantes del infiltrado de Th17 en periodontitis crónica (73).

Zhao y colaboradores (2011) realizaron la medición de la concentración de Th17, Th1/Th2 y sus factores de transcripción antes y después de una terapia básica periodontal no quirúrgica. Los resultados demostraron que las citoquinas relacionadas con el perfil Th17 disminuyen después del tratamiento, las Th1 disminuyeron también pero en una cantidad menor; sin embargo, el nivel de IL-4 aumentó de manera significativa. Asimismo, la expresión de factores de transcripción: RORC (Th17), T-bet (Th1) y GATA-3 (Th2) también disminuyeron en células T CD4+ de sangre periférica (74).

Enfermedad periodontal y relación con enfermedad sistémica.

ALTERACIONES CARDIOVASCULARES

Este quizá ha sido uno de los tópicos con el mayor grado de investigación, pues ha tenido un desarrollo importante desde hace aproximadamente 20 años atrás. Desde los años 90's ha existido un aumento considerable en las publicaciones donde se ha tenido en cuenta esta relación, sin embargo los resultados son contradictorios. Si bien se han descrito diversos mecanismos por los cuales esta infección oral puede eventualmente generar efectos adversos cardiovasculares, la controversia persiste. Sin embargo, este tópico recobra gran importancia por la alta incidencia de estas dos enfermedades en el mundo, y el impacto que puede tener para re-interpretar la identificación de factores de riesgo y terapéuticos, que en este caso deben incluir un periodoncista dentro del grupo interdisciplinar para el manejo de este tipo de pacientes (75)

Las dos enfermedades tienen en común generarse por una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales y personales. Los factores de riesgo asociados incluyen todos aquellos que no pueden ser cambiados, como la etnia, edad, historia familiar; y por otro lado aquellos modificables o controlables: hipertensión, dislipidemia, hábito de fumar, exceso de peso y diabetes mellitus (76).

Se han descrito diversas vías fisiopatológicas para establecer una relación entre las mismas, enunciándose mecanismos directos e indirectos. Uno de los mecanismos indirectos ha sido la posible **inflamación sistémica** causada por la infección periodontal, donde diferentes mediadores inflamatorios como el TNF- α , IL-1, IL-6, MMPs y fibrinógeno; a su vez la activación de diferentes células, moléculas de adhesión, TLRs, y la vía de NK- $\kappa\beta$, hacen que esta interacción entre el endotelio, monocitos y plaquetas sea pro-aterogénico, contribuyendo indirectamente a la aterogénesis o a diferentes desenlaces adversos cardiovasculares relacionados con la ruptura de la placa ateromatosa (77).

Dentro de los mecanismos indirectos relacionados encontramos el **mimetismo molecular**: es un proceso mediante el cual se da una activación de células auto-reactivas T y B contra péptidos propios por una reacción cruzada entre los mismos y secuencias similares en organismos patógenos como bacterias periodontales que han logrado migrar y sobrevivir en el torrente sanguíneo. Se han detectado este tipo de reacciones en enfermedad periodontal contra lipopolisacáridos bacterianos y proteínas de choque térmico humanas, específicamente la hsp60

para el caso de periodontitis. Este mecanismo se ha reportado en enfermedades autoinmunes con modelos animales como la encefalomiелitis alérgica, la miocarditis experimental y la uveitis-queratinitis experimental autoinmune (78).

Las proteínas de choque térmico (heat shock protein –hsp60) pertenecen a una familia de proteínas conservadas durante el proceso evolutivo que tienen homología entre las células procariotas y eucariotas confiriéndoles una fuerte inmunogenicidad. Las proteínas de choque térmico son moléculas de señalización intercelular ubicadas extracelularmente y pueden mediar e influenciar un amplio rango de respuestas inflamatorias. La hsp60 humana y bacteriana, activa a las células endoteliales vasculares humanas para la expresión de E-selectina, molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular -1 (VCAM-1). Éstas activan a las células vasculares endoteliales, células de músculo liso y monocitos/macrófagos para la producción de IL-6 y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).

Las bacterias del grupo rojo tienen proteínas de choque térmico homologas a GroEl de *Escherichia coli*. La hsp60 humana puede ser un antígeno target para una respuesta autoinmune en periodontitis, debido al mimetismo molecular con su homólogo GroEl bacteriano en patologías como aterosclerosis y enfermedad vascular. Ha sido un mecanismo bacteriano referenciado como forma de evadir la respuesta inmune del hospedero evitando ser eliminada (79).

El mecanismo directo relacionado es la posibilidad de **circulación de bacterias periodontopatógenas y su colonización en sitios distantes a cavidad oral**. En este sentido, el surco gingival o bolsa periodontal se convierte en la vía por la cual las bacterias pueden llegar al torrente sanguíneo, junto con las células del sistema inmune. Si bien se han reportado la posibilidad de generar bacteremias transitorias con el cepillado e incluso la masticación; estas bacterias pueden circular en sangre y depositarse en la placa ateromatosa siendo identificadas bacterias del grupo rojo (80).

6. DISEÑO METODOLÓGICO

A continuación se menciona el diseño metodológico del proyecto en su totalidad que comprende diferentes pasos a ser desarrollados de forma paulatina, debido a la extensión y complejidad del mismo.

Tipo de estudio: Transversal, cuantitativo, analítico.

Población: Pacientes sistémicamente sanos con diagnóstico periodontal de: periodonto sano, gingivitis asociada a placa bacteriana generalizada, periodontitis crónica severa generalizada, de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Colombia.

Muestra:

GRUPO 1: 10 pacientes sistémicamente sanos con diagnóstico de periodontitis crónica moderada o severa generalizada.

GRUPO 2: 10 pacientes sistémicamente sanos con diagnóstico de periodonto sano o gingivitis inducida por placa bacteriana generalizada.

Criterios de inclusión:

- ✘ Sistémicamente sanos determinados inicialmente de forma presuntiva mediante diligenciamiento de historia clínica.
- ✘ Mayores de 18 años.
- ✘ No ingesta de fármacos de forma crónica.
- ✘ No hayan recibido terapia antibiótica o anti-inflamatoria en los últimos 6 meses.
- ✘ No en estado de embarazo o lactancia.
- ✘ No fumadores
- ✘ Mínimo 20 dientes presentes en boca.
- ✘ No requieran profilaxis antibiótica para el examen.
- ✘ Diagnóstico periodontal que encaje dentro de los ya mencionados para grupo 1 o grupo 2.

Criterios de exclusión:

- ✘ Factor reumatoideo positivo.
- ✘ Resultados fuera de los rangos considerados como normales en las pruebas de laboratorio: cuadro hemático, perfil lipídico y hemoglobina glicosilada. (Ver anexo #1).

Materiales:

- ✘ Instrumental básico: espejo de boca, pinza algodонера, explorador dental, sonda periodontal (Hu-Friedy, Carolina del Norte).
- ✘ Kit de toma de muestra sanguínea por venopunción: aguja, tubo de recolección y transporte, anticoagulante.
 Marca: BD VACUTAINER Blood collection Set: Blood collection needle, Plus plastic K2 EDTA Tubes, EDTA (Ácido erlendiaminotetraacético).
 Fabricante: Beckton Dickinson.
 Ciudad: Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos.

Tabla #2: Etapas a desarrollar en la investigación.

ETAPA DEL ESTUDIO	PROCEDIMIENTO	INFORMACIÓN/ MUESTRA RECOLECTADA	PROCESAMIENTO/ANÁLISIS
1. Estandarización de la técnica.	Estandarización de la técnica de laboratorio para la adecuada cuantificación de las células de los sub-perfiles de Th17 presentes en sangre periférica.	-Estandarización del protocolo a ser aplicado para la consecución de los objetivos del proyecto.	-Análisis de los resultados obtenidos para la consecución de una técnica de cuantificación de subpoblaciones linfocitos Th17: depurada, veraz y reproducible.
2. Consecución y examen a pacientes. 2.1.Examen inicial: Se consignará la	Diligenciamiento de Historia clínica (Ver anexo # 2) por paciente.	-Alerta médica. -Datos personales. -Motivo de consulta. -Antecedentes médicos personales.	-Diagnóstico sistémico presuntivo.

información de forma manual en la historia clínica individual desarrollada para tal fin.		-Examen periodontal: consiste en el sondaje periodontal en seis superficies por diente, se registran los datos en periodontograma de la historia clínica.	-Diagnóstico periodontal (81)
3. Selección de pacientes.	De acuerdo con los resultados obtenidos en la fase inicial, se aplicarán los criterios de inclusión para escoger el grupo de pacientes que continúan en el estudio.	Pacientes que continúan en el estudio. Firma de consentimiento informado y se entrega cartilla informativa (Ver anexo #3). Material aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia, en el acta 20-14.	No requiere procesamiento.
3.1 Exámenes de laboratorio iniciales.	Venopunción tradicional (ver anexo # 4)	Muestra de 4 ml de sangre periférica.	Muestra # 1: Enviada a laboratorio para análisis de: - Cuadro hemático. -Perfil lipídico. -Factor Reumatoideo. --Hemoglobina glicosilada.
	De acuerdo con los resultados de estos exámenes, se aplicarán los criterios de exclusión y aquellos pacientes que obtengan resultados fuera del parámetro de normalidad establecido (ver anexo # 1), no continuarán en el estudio. Sólo aquellos que tengan estos resultados dentro del parámetro de normalidad continuarán.		
4. Obtención de muestra # 2 de sangre periférica.	Una vez seleccionados los pacientes que continúan: Venopunción tradicional (ver anexo # 4)	Muestra de 20 ml de sangre periférica.	Muestra # 2: Estimulación celular e inducción de citocinas <i>Ex vivo</i>.

<p>5. Obtención de resultados</p>	<p>Determinación de promedios de subpoblaciones de TH17 en cada uno de los grupos.</p>	<p>Resultados obtenidos Grupo 1 y Grupo 2: Número total de linfocitos Th17 (CD4+, CD161+). Porcentaje de Th17 patológicos. Porcentaje de Th17 reguladores. Porcentaje de Th17/Th1</p>	<p>Información obtenida Citómetro de Flujo FACs CANTO II. Los datos obtenidos por el Citómetro, serán analizados por el programa Flow jo 8,7.</p>												
<p>7. Análisis e interpretación de resultados.</p>	<p>Análisis estadístico. Comparación de los porcentajes obtenidos entre Grupo 1 y Grupo 2.</p>	<p>Análisis estadístico comparativo de los resultados.</p>	<p>ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Se utilizará un análisis ANOVA de 3 factores:</p> <table border="1" data-bbox="1008 915 1479 1211"> <thead> <tr> <th data-bbox="1008 915 1127 1016">Grupo</th> <th data-bbox="1127 915 1240 1016">%Teff17</th> <th data-bbox="1240 915 1359 1016">%Treg17</th> <th data-bbox="1359 915 1479 1016">%Th17/Th1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="1008 1016 1127 1117">Grupo 1</td> <td data-bbox="1127 1016 1240 1117"></td> <td data-bbox="1240 1016 1359 1117"></td> <td data-bbox="1359 1016 1479 1117"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="1008 1117 1127 1211">Grupo 2</td> <td data-bbox="1127 1117 1240 1211"></td> <td data-bbox="1240 1117 1359 1211"></td> <td data-bbox="1359 1117 1479 1211"></td> </tr> </tbody> </table>	Grupo	%Teff17	%Treg17	%Th17/Th1	Grupo 1				Grupo 2			
Grupo	%Teff17	%Treg17	%Th17/Th1												
Grupo 1															
Grupo 2															

Tabla # 3 Variables a considerar en el estudio.

Variable	Unidad de Medida	Tipo de variable.	Identificación en la base de datos.	Definición para el estudio.	Valores límites.	Código.	Ejemplo de interpretación.
Sexo	No aplica.	Cualitativa, nominal-	sexo	Sexo biológico referido por el paciente.	No aplica.	0: Femenino. 1: Masculino.	El 45% de los pacientes fueron de sexo masculino.
Edad	Años.	Cuantitativa, discreta.	edadpac	Edad en años verificada en documento de identidad.	18 años – 80 años.		La edad promedio de los individuos del estudio fue 40 años.
Diagnóstico periodontal	No aplica.	Cualitativa.	dxperio	Diagnóstico periodontal de acuerdo con hallazgos de sondaje periodontal.	No aplica.	1: Periodonto sano o gingivitis asociada a placa bacteriana generalizada. 2: periodontitis crónica moderada o severa generalizada.	En el grupo 2 el 80% de los pacientes tenía diagnóstico de periodontitis crónica severa generalizada.
Sistémicamente sano.	No aplica.	Cualitativa	dxsist	Sistémicamente sano a descartar con historia clínica y resultados de exámenes de laboratorio	No aplica.	0: Sistémicamente sano. 1: Sistémicamente comprometido.	En el estudio inicialmente se incluyeron 20 pacientes en la primera fase. En la segunda fase de acuerdo con los resultados de los exámenes de laboratorio, se excluyeron 2 por tener resultados fuera del rango de normalidad.

				dentro de rangos de normalidad.			
Número de linfocitos Th17 total (CD4+, CD161+).		Cuantitativa.	t17total	Número de linfocitos Th17 totales obtenidos de la muestra sanguínea.	No aplica.		En el grupo 1 el total de Th17 fue: y en el grupo 2 fue:
Porcentaje de Linfocitos Th17 patológicos.	Porcentaje.	Cuantitativa.	t17patol	Porcentaje de linfocitos Th17 patológicos.	No aplica.		En el grupo 2 el porcentaje de linfocitos Th17 patológicos fue de 25%.
Porcentaje de Linfocitos Th17 reguladores.	Porcentaje.	Cuantitativa.	t17regul	Porcentaje de linfocitos Th17 reguladores.	No aplica.		En el grupo 2 el porcentaje de linfocitos Th17 reguladores fue de 55%.
Porcentaje de Linfocitos Th17/Th1	Porcentaje.	Cuantitativa.	t17th1	Porcentaje de linfocitos Th17 reguladores.	No aplica.		En el grupo 2 el porcentaje de linfocitos Th17 /Th1 fue de 20%.

7. Desarrollo de la investigación.

1. Estandarización de la técnica.

Protocolo inicial propuesto para la estimulación y obtención de perfiles Th17 en enfermedad periodontal

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas a partir de sangre anticoagulada con heparina (BD Bioscience) por venopunción. La sangre diluída con PBS 1:1, fue separada por Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences) (1:2) y se centrifugó a 1750 RPM durante 30 minutos a 22°C. Obtenidas las PBMCs, se resuspendieron en 5ml de RPMI suplementado con 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicilina, 100µg/ml estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB). Se lavaron las células 2 veces a 2000 RPM por 5 minutos a 4°C. El número de células fue obtenido, después del conteo en cámara de Neubauer.

Se sembraron 1×10^6 células por pozo, con diferentes concentraciones de PMA/ionomicina (Estímulo 1 (PMA: 20 µl – Ionomicina: 1 µl), Estímulo 2 (PMA: 500 µl – Ionomicina: 0.5 µl), Estímulo 3 (PMA: 50 µl – Ionomicina: 0.5 µl)) en presencia de Brefeldina A, por 6 horas a 37°C en 5% de CO₂. Se retiraron las células en cultivo para realizar la tinción intracelular, y se dispensaron en tubos de citometría para cada citocina de estudio. Se lavaron dos veces con buffer de teñido (PBS pH 7.6 + 1% SFB + 0.09% de azida de sodio), a 2.000 rpm por 5 minutos a 4°C y se adicionó a cada uno, 250 µl del buffer Cytofix/Cytoperm, por 20 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células 2 veces con el buffer Perm/Wash 250 µl, y se adicionaron los anticuerpos anti-citoquinas intracelulares, con la cantidad indicada por el fabricante IL-17A (5 µl), IL-17F (5 µl), IL-10 (5 µl), IL-21 (5 µl) e IFN-γ (10 µl de una dilución 1:40). Se incubaron por 30 minutos a 4°C en la oscuridad.

Finalmente las células fueron lavadas 2 veces con el buffer Perm/Wash y fijadas con paraformaldehído al 2%. Se adquirieron 100.000 eventos de la región de la población de linfocitos (Figura 1), en el Citómetro de Flujo FACs CANTO II. Los datos obtenidos, fueron analizados por el programa Flow jo 8,7.

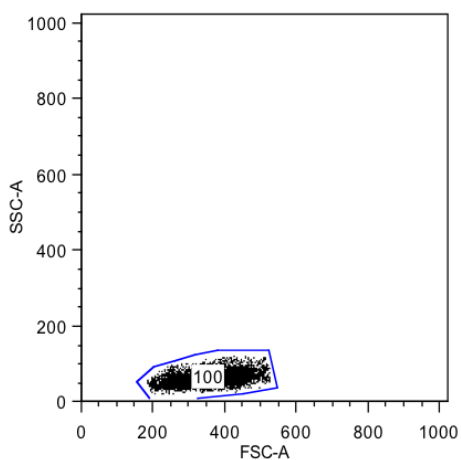


Figura 1: Adquisición de 100.000 eventos de la región de la población linfoide.

A. Obtención de células mononucleares de sangre periférica:

Se validó y optimizó el protocolo de obtención de células mononucleares de sangre periférica por Ficoll Hypaque; por un tubo de 5 ml de sangre heparinizada, se purificaron 3×10^6 cels.

No se ha reportado una técnica unificada que permita, con la obtención de una única muestra de sangre periférica la identificación de las tres subpoblaciones de linfocitos Th17 en un mismo paciente; la literatura es variable respecto a dichos protocolos de estimulación. Frente a esta limitante, se hace necesario de forma preliminar desarrollar una técnica estandarizada para la identificación adecuada de cada subpoblación, que permita veracidad en el proceso de identificación y con la cual, futuros investigadores puedan reproducirla.

B. Estimulación antigénica *in vitro*.

Lo primero que se realizó, fue observar el número de células adecuado por pozo. Se escogieron placas de 24 pozos, en donde se sembraron diferentes número de células: 500.000, 1×10^6 y 2×10^6 de células en 1 ml de RPMI 10% SFB, y después de 24 horas en cultivo, por medio de un microscopio invertido, se observó viabilidad. Una población celular dispersa, no coagregada o superpuesta, **se obtuvo con 1×10^6 células por pozo.**

Para observar citocinas intracelulares en Linfocitos T *in vitro*, se estandarizó inicialmente, el control positivo, se probaron 3 concentraciones diferentes de PMA/ionomicina, de acuerdo con diferentes reportes de la literatura: Estímulo 1: PMA 20 μ l, Ionomicina: 1 μ l, RPMI: 873 μ l., Estímulo 2: PMA 500 μ l, Ionomicina: 0.5 μ l, RPMI: 500 μ l, estímulo 3: PMA 50 μ l, Ionomicina: 0.5 μ l, RPMI: 950 μ l.

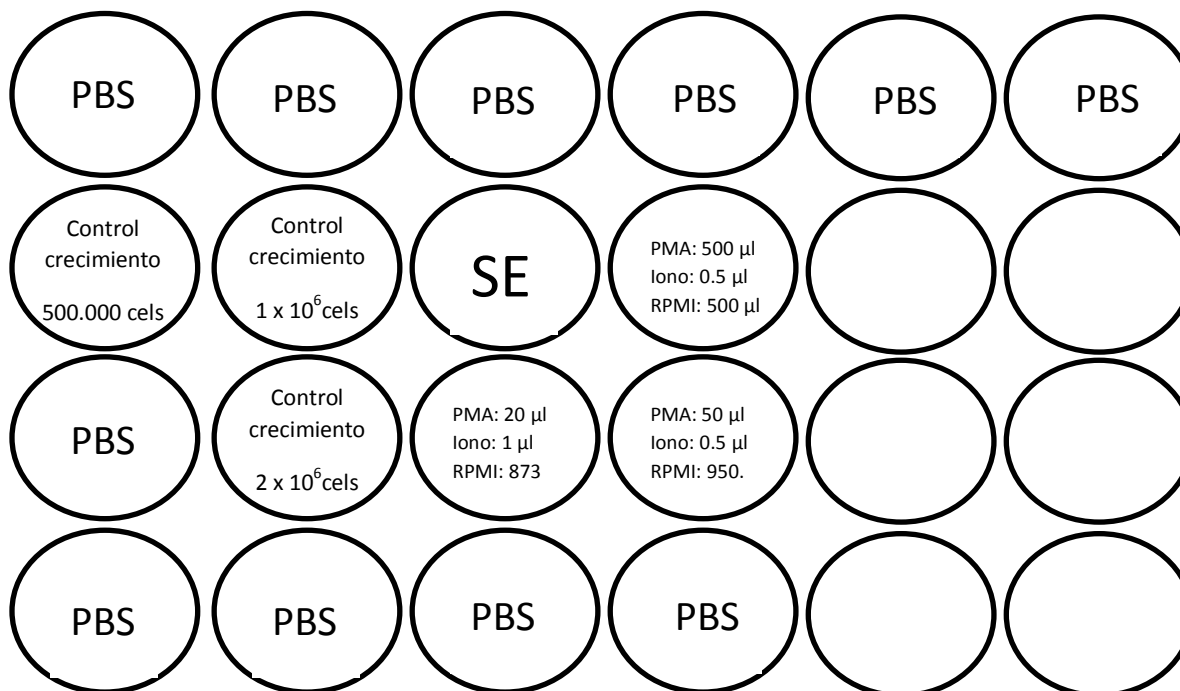


Figura 2: Distribución de cultivo celular en pozos utilizado.

La PMA (Phorbol 12 myristate 13-acetate es un activador de la protein kinasa C y por lo tanto de la vía NF- κ β , se activa en concentraciones nanomolares (82); por otro lado la ionomicina es un ionóforo producido por la bacteria *Strptomyces conglobatus*, es usado en investigación para elevar los niveles de calcio (Ca^{2+}) a nivel intracelular y para entender el transporte de calcio en las membranas celulares. Por lo tanto, su uso conjunto permitirá, observar poblaciones celulares activadas con la consecuente producción de citocinas.

Como el objetivo de este trabajo es observar perfiles de LTH17 a partir de la producción de citocinas, junto al estímulo PMA/ionomicina, se adicionó la Brefeldina A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), que es un metabolito fúngico que genera una interferencia en el transporte anterógrado desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi. Este bloqueo del Golgi permitirá prevenir la secreción de la citocina en cultivo. Las células en las condiciones descritas, estuvieron durante 6 horas a 37°C en 5% de CO_2 .

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a la tinción de citocinas intracelulares, por medio de anticuerpos monoclonales específicos para cada citocina, con diferentes fluorocromos: α - IFN- γ PE-Cy7, α -IL-10 BV421, α -IL-17A BV510, α -IL-17F V450, α -IL-21 BV421; siguiendo el protocolo del kit Golgi Plug (Cytotfix/Cytoperm) descrito anteriormente.

A continuación se presenta el porcentaje de linfocitos productores de las citocinas IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21 por citometría de flujo (Figura 3):

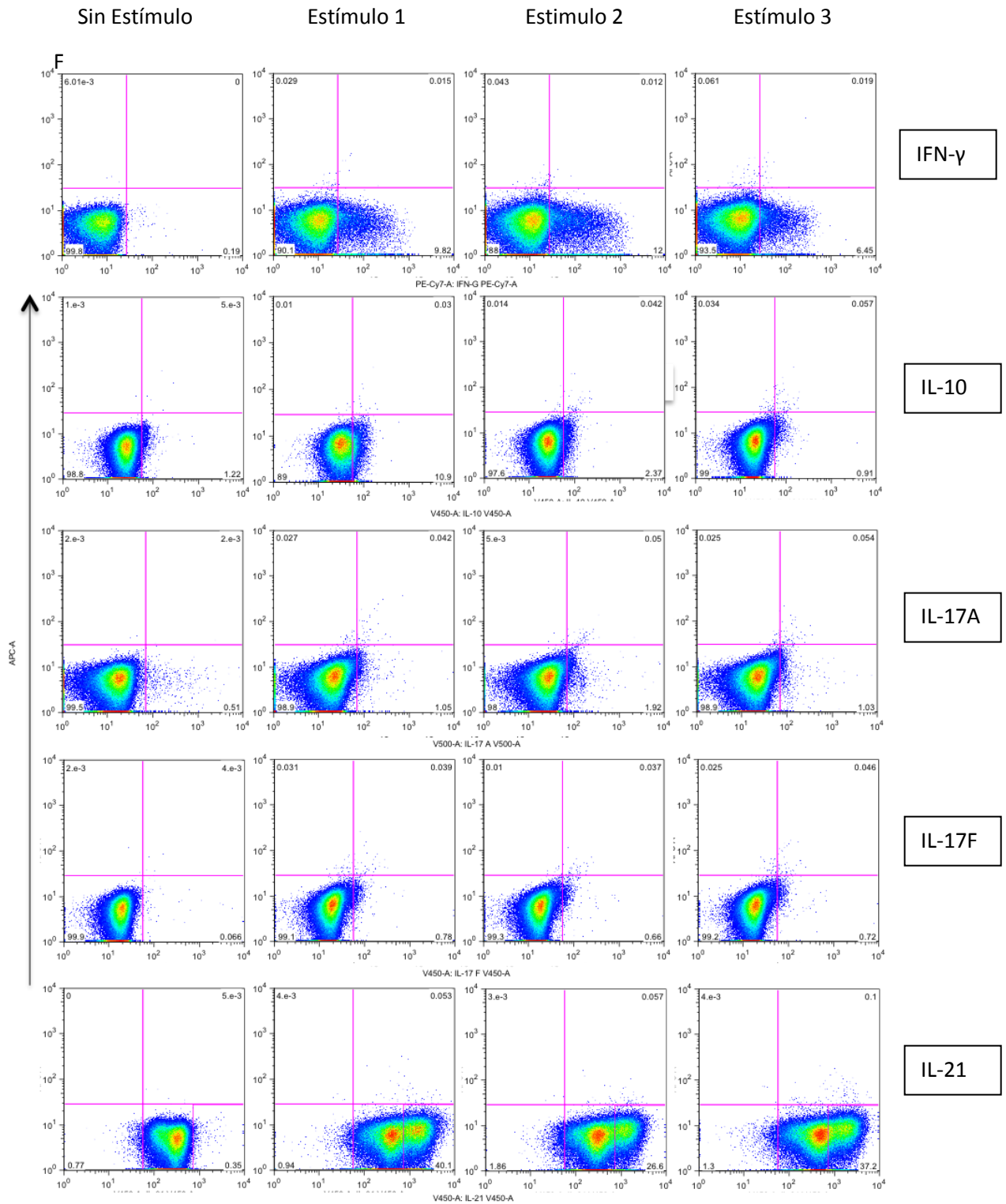


Figura 3. Porcentaje de Linfocitos productores de citocinas IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21. Se presenta las figuras en dot plot de las PBMCs estimuladas con diferentes concentraciones de PMA/ionomicina: Estímulo 1 (PMA 20 μ l, Ionomicina: 1 μ l, RPMI: 873 μ l), Estímulo 2 (PMA 500 μ l, Ionomicina: 0.5 μ l, RPMI: 500 μ l), Estímulo 3 (PMA 50 μ l, Ionomicina: 0.5 μ l, RPMI: 950 μ l.). Los números representan el porcentaje de linfocitos productores de citocinas.

Los resultados de la citometría pueden ser analizados de forma individual para la paciente en cuestión o de forma general para la estandarización de la técnica.

La paciente con quien se realizó la estandarización de la técnica tiene como diagnóstico sistémico artritis reumatoide seleccionada como control positivo inicial. Estos hallazgos relacionados con su compromiso sistémico van en concordancia con lo planteado en la literatura, en donde los niveles de IL-21 a nivel sistémico se encuentran claramente aumentados en un paciente con una patología de carácter autoinmune respecto a un paciente sano, pues esta citocina aumenta notablemente la activación de linfocitos B y perpetúa el proceso inflamatorio, aun cuando el paciente se encuentre con medicación anti-TNF. Sin embargo, se esperaba una mayor producción de IL-17A e IL-17F (83).

Los resultados muestran una producción positiva evidente de IFN- γ posterior a la estimulación y una producción basal de IL-21 aumentada posterior a la estimulación. Debido a lo anterior, se realizó la interpretación de los resultados de la Región 2 del dot plot al evidenciar dos poblaciones celulares productoras de la IL-21 luego de la estimulación.

De forma general, los hallazgos presentados dan cuenta de la efectividad de este método para la detección de citocinas intracelulares por el citómetro de flujo previa activación celular y bajo una reacción antígeno-anticuerpo con la citocina de interés, hallazgo que concuerda con publicaciones recientes donde el protocolo de detección ha sido mejorado con el paso del tiempo. Sin embargo, es necesario aclarar que depende del tipo de citocina que se desee visualizar así mismo será la concentración de los diferentes medios para activación y anticuerpos para su detección (84, 85).

En este caso particular la necesidad de identificación en una misma muestra de cinco citocinas diferentes termina siendo exigente pues es necesario contar con fluorocromos diferentes para cada tipo de citocina. De no ser así, se incurre en la necesidad de correr un tubo diferente por el citómetro para evitar el solapamiento.

En la siguiente tabla se resumen los porcentajes de linfocitos productores de cada una de las citocinas de interés en cada uno de los diferentes protocolos de estimulación. Los hallazgos presentados se corroboran con los encontrados en la literatura (columna de la derecha). Bajo esta condición se hace necesario definir un protocolo de estimulación diferente para cada citocina a tratar.

Tabla 4. Porcentaje de linfocitos productores de IFN- γ , IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21 de acuerdo con los diferentes protocolos de estimulación.

Citocina	% Sin Estímulo	% Estimulo 1	%Estímulo 2	%Estímulo 3	% literatura
IFN- γ	0.19	9.63	11.81	6.26	15% (86)
IL-10	1.22	9.68	1.15	0	< 1 %
IL-17A	0.51	0.54	1.41	0.52	0 – 2.1 % +/- 0.6% (87)
IL-17F	0.066	0,714	0.594	0.654	0.46 +/- 0.41% (88)
IL-21 R2.	0.35	39.75	26.25	36.85	24% (89)

Dentro de la tabla se señalan (con color verde) aquellos valores cercanos a los reportados en la literatura para la visualización de la citocina de interés posterior a los diferentes protocolos de estimulación con PMA/ionomicina. Resumiendo, se sugiere un protocolo de estimulación de la siguiente forma:

Citocina	Concentración PMA/ionomicina
IFN-γ	PMA 500 μ l, Ionomicina: 0.5 μ l, RPMI: 500 μ l. Tiempo: 4 a 6 horas.
IL-10	Requiere re-formularse pues sólo con el estímulo 1 (PMA 20 μ l, Ionomicina: 1 μ l, RPMI: 873 μ l) logró evidenciarse un 9.68%, sin embargo la separación celular en el dot plot no es evidente. En la literatura se sugiere realizar una estimulación con LPS (100 ng/ml) durante 18 a 24 horas (90).
IL-17A	PMA 50 μ l, Ionomicina: 1 μ l, RPMI: 950 μ l. Tiempo: 4 a 6 horas.
IL-17F	PMA 50 μ l, Ionomicina: 1 μ l, RPMI: 950 μ l. Tiempo: 4 a 6 horas.
IL-21 R2.	PMA 20 μ l, Ionomicina: 1 μ l, RPMI: 873 μ l. Tiempo 4 a 6 horas.

Tabla 5. Protocolo sugerido para la estimulación de PBMCs con PMA/ionomicina.

En la literatura, es posible evidenciar diferentes protocolos de estimulación previa al uso de PMA/Ionomicina mediante el uso de proteínas recombinantes que favorezcan la inducción hacia cada uno de los perfiles aprovechando esa capacidad de “plasticidad” de las células Th17. A continuación se mencionan las concentraciones utilizadas según cada autor:

PERFIL: TH17 efector.

CITOQUINA	CONCENTRACIÓN
IL-23	20 ng/ml.
IL-6	50 ng/ml
TGF- β 3	3 ng/ml

Tomado de: Longhi MS, Moss A, Bai A, Wu Y, Huang H, et al. **Characterization of human CD39+ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease.** Plos One. 2014; 9 (2): e87956.

PERFIL: Th17 regulador.

CITOQUINA	CONCENTRACIÓN
IL-6	20 ng/ml
TGF- β 1	0.5 ng/ml

Tomado de: Ghoreschi K, Laurence A, Yang X, Tato C, McGeachy M, et al. **Generation of pathogenic Th17 cells in the absence of TGF- β signaling.** Nature. 2010; 467: 967-972.

PERFIL: Th17/Th1.

CITOQUINA	CONCENTRACIÓN
IL-23	20 ng/ml
IL-12	10 ng/ml

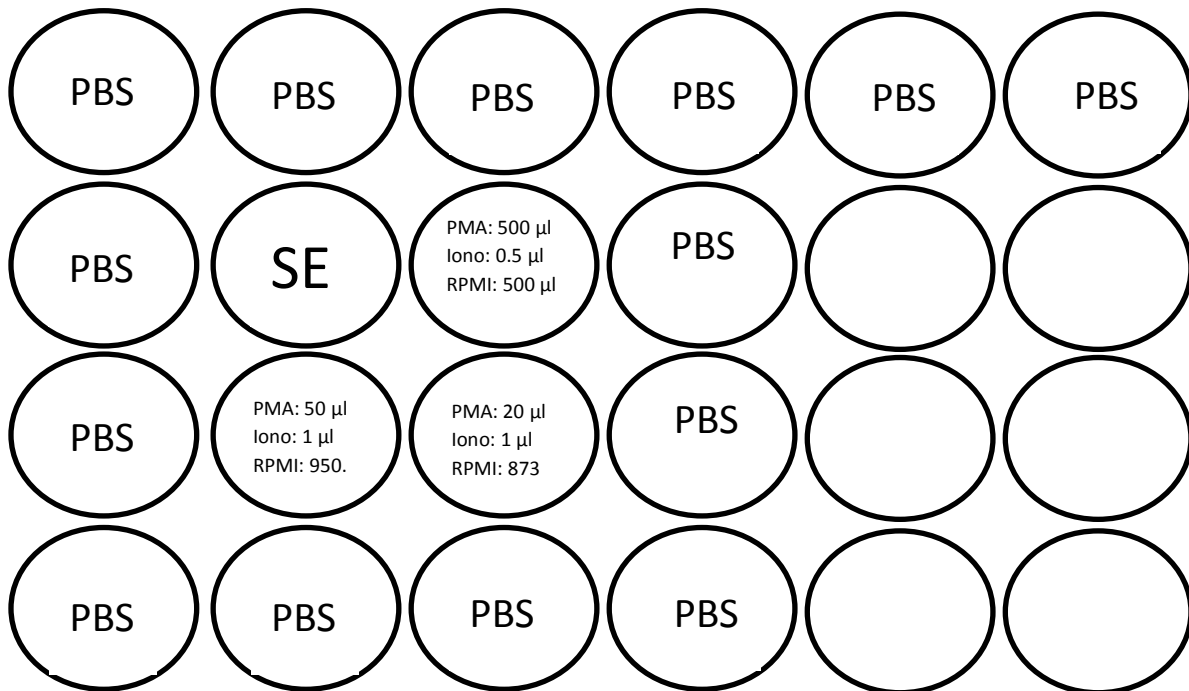
Tomado de: Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, et al. **Phenotypic and functional features of human Th17 cells.** JEM. 2007; 204 (8): 1849-1861.

Sin embargo, se considera que el uso de estas proteínas previo al uso de PMA/ionomicina puede influir en una inducción de las células presentes en la muestra hacia cada uno de los perfiles, arrojando resultados de porcentajes de citocinas intracelulares elevados respecto a los encontrados en la presente estandarización de la técnica. Esto obedece a que los objetivos iniciales de los autores se ratifican como diferentes al del presente proyecto, pues es evidente que la estimulación lograda con PMA/ionomicina resultaría suficiente para la detección de citocinas intracelulares. Si bien el uso de las proteínas recombinantes puede aumentar de forma significativa la producción de las citocinas de interés, es probable que este estímulo lleve a una diferenciación celular, lo cual puede en algún momento alterar los resultados.

Bajo esta perspectiva, a continuación se plasma el protocolo definitivo a ser utilizado:

Protocolo de estimulación y obtención de perfiles Th17 en enfermedad periodontal.

1. Obtenga una muestra sanguínea (20 ml) por venopunción convencional en tubos estériles con heparina (BD Bioscience).
2. Con mucho cuidado, destape el tubo y deposite la sangre en un frasco con tapa rosca estéril con suave pipeteo. Antes de esto, agite suavemente el tubo de abajo hacia arriba.
3. Diluya la sangre con PBS en proporción 1:1.
4. Separe los componentes sanguíneos utilizando Ficoll-Paque en una proporción 1:2 (3 ml de sangre por 6 de Ficoll).
5. Centrifugue a 1750 RPM durante 30 minutos a 22 °C.
6. Obtenga las células mononucleares y resuspendalas en 5 ml de medio RPMI suplementado con 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicilina, 100µg/ml estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB).
7. Lave las células 2 veces y centrifugue a 2000 RPM por 5 minutos a 4°C.
8. Cuente las células en cámara de Neubauer y obtenga un mínimo de 5×10^6 células.
9. Tome una placa de 24 pozos y siembre 1×10^6 células por pozo, siembre 4 pozos por paciente, uno sin anticuerpo (SE) y 3 con anticuerpos monoclonales: anti-CD3 y CD28 (1 µg/ml) (BD Pharmingen Corp, USA). Recuerde presensibilizar la placa con el anti-CD3. y aplique la cantidad referida de PMA/Ionomicina de la siguiente forma:



10. Pozo C2: estímulo sugerido para: IFN- γ . Pozo B3: estímulo sugerido para IL-17A e IL17F, IL-10. Pozo C3: estímulo sugerido para IL-21
11. Aplique 10 μ l de Brefeldina A en todos los pozos e incube durante 6 horas a 37 °C en 5% de CO₂.
12. Pasado el tiempo de incubación, obtenga las células del cultivo y proceda a realizar la tinción extra e intracelular. Dispense en tubos de citometría para cada citocina de estudio.
13. Resuspenda las células con buffer de teñido (PBS pH 7.6 + 1% SFB + 0.09% de azida de sodio)
14. Centrifugue a 2000 RPM por 5 minutos a 4°C.
15. Adicione 250 μ l del Buffer Cytofix/Cytoperm, por 20 minutos a 4°C en oscuridad.
16. Lave las células 2 veces en buffer Perm /Wash 250 μ l.
17. Adicione los anticuerpos :

Tubo 1: PerCP-Anti-CD3/FITC-Anti-CD4/APC-Anti-CD161/Alexa Flúor 700-Anti-IL-17A/Alexa Fluor 647-Anti-IL-17F.

Tubo 2: PerCP-Anti-CD3/FITC-Anti-CD4/APC-Anti-CD161/PE-CF594-Anti-IL-10.

Tubo 3: PerCP-Anti-CD3/FITC-Anti-CD4/APC-Anti-CD161/Alexa Flúor 647-Anti-IFN- γ

Tubo 4: PerCP-Anti-CD3/FITC-Anti-CD4/APC-Anti-CD161/Alexa Flúor 647-Anti-IL-21.

18. Incube por 30 minutos a 4°C en la oscuridad.
19. Lave 2 veces con el buffer Perm/Wash.
20. Agregue paraformaldehído al 2%.
21. Lleve las muestras a lectura en el citómetro. Ajuste los fluorocromos según fabricante de los anticuerpos anti-citoquinas.
22. Se sugiere utilice: Citómetro de Flujo FACs CANTO II.

23. Analice los datos obtenidos en el programa Flow jo 8,7.

2. Consecución y examen inicial a pacientes.

2.1. Examen inicial:

2.1.1. Elaboración de historia clínica:

Los pacientes asistentes a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia, quienes recibieron una valoración por odontología general en el área de atención al usuario, fueron remitidos a las clínicas de posgrado de periodoncia de la Universidad Nacional de Colombia cuando se evidenciaba compromiso periodontal de cualquier severidad.

Se realizó una valoración de 37 pacientes (21 mujeres y 16 hombres), con un promedio de edad de 37 años, remitidos de la oficina de atención al usuario de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia.

Se realizó un interrogatorio y examen físico extra e intraoral, diligenciamiento de historia clínica. Se excluyeron los siguientes pacientes por la condición referida en la tabla:

Tabla 6: Pacientes excluidos posterior a la elaboración de la historia clínica.

Paciente		Motivo exclusión
Sexo	Edad	
Femenino	40 años.	Toma de medicamentos: Litio. 400 mg/día. Dx: Trastorno bipolar.
Masculino	32 años.	Fumador pesado.
Masculino	50 años.	Pre-Obesidad. IMC: 27.6. Se excluye del estudio pues en la literatura se reporta relación entre obesidad y procesos de inflamación sistémica de baja magnitud por esta condición (91).
Femenino	45 años.	Tensión arterial: 180/110 (Referencia: 120/80)
Masculino	55 años.	Tensión arterial: 140/90 Tratado con Enalapril 10 mg/día
Masculino	35 años.	Tratamiento antimicótico: Funide 250 mg, 1 diaria por 28 días.
Femenino	39 años.	Tratamiento antibiótico. Exodoncia hace 3 días realizada en otra institución. Amoxicilina 500 mg, 1 cada 8 horas por 7 días.
Masculino	43 años.	Dx: Gastritis crónica. Medicado con Omeprazol 20mg.
Masculino	57 años.	Durante las primeras dos citas de elaboración de historia clínica el paciente asistió al médico en la EPS donde fue diagnosticado con Cáncer de Próstata.
Femenino	30 años	Diagnóstico periodontal: Periodontitis crónica moderada localizada.
Femenino	28 años	Periodontitis crónica severa localizada.

Masculino	26 años	Agrandamiento gingival generalizado.
-----------	---------	--------------------------------------

Posterior al examen inicial e historia clínica se excluyeron un total de 9 pacientes por compromiso sistémico o toma de medicamentos y 3 pacientes por tener un diagnóstico periodontal diferente al requerido.

Sin embargo, todos recibieron el tratamiento periodontal pertinente en las clínicas de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia.

Un total de 25 pacientes continuaron a la siguiente fase del estudio porque cumplieron con todos los criterios de inclusión.

2.2 Exámenes de laboratorio iniciales

De acuerdo con el protocolo, se realizó la toma de muestra de sangre periférica por venopunción convencional (anexo #4) a los pacientes que continuaron en el estudio. Previo a esto, los pacientes fueron informados verbalmente, se entregó cartilla informativa y firmaron consentimiento informado (anexo #3). Todos los pacientes estuvieron de acuerdo de forma verbal y escrita con la participación en el proyecto, se aclaró que si por alguna razón decidían no continuar en el estudio se podían retirar en el momento deseado sin consecuencias negativas en su atención.

La muestra de sangre fue tomada en las instalaciones de la clínica de periodoncia de la Universidad Nacional de Colombia. Los pacientes debían asistir con 12 horas de ayuno previo a la toma. La auxiliar del laboratorio COLCAN fue quien realizó la toma de la muestra.

Los resultados de cada examen fueron consultados vía web por el investigador, quien posterior a un análisis de los mismos, aplica los criterios de exclusión:

Tabla 7: Pacientes excluidos posterior a los resultados de los exámenes de laboratorio.

Paciente		Motivo exclusión
Sexo	Edad	
Masculino	27 años	Factor reumatoideo positivo.
Femenino	47 años	HDL= 108 mg/dl (Referencia: 40 a 70)
Femenino	52 años	Colesterol total= 265 (Referencia: < 200)
Masculino	56 años	Colesterol total= 228 (Referencia: < 200)
Femenino	28 años	Triglicéridos = 286 (Referencia: < 150)

Los resultados se obtuvieron impresos para entregarlo a cada uno de los pacientes, además se anexó copia en la historia clínica.

Se excluyeron posterior a conocer los resultados de los exámenes de laboratorio un total de 5 pacientes por resultados fuera de rango de normalidad, los pacientes fueron informados de sus resultados para tomar una acción pertinente.

A los pacientes excluidos en esta fase se les explicaron los motivos de su no inclusión dentro del proyecto. De igual forma que los pacientes excluidos en la primera fase, los anteriormente mencionados recibieron tratamiento periodontal en las clínicas de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia.

Luego de esta selección rigurosa y exhaustiva de los pacientes a ser incluidos dentro del estudio, la muestra final para el desarrollo del proyecto consistió en un total de 20 pacientes, distribuidos en dos grupos de 10 personas cada uno:

🚩 Grupo 1: Pacientes con diagnóstico: periodonto sano o gingivitis asociada a placa bacteriana.

🚩 Grupo 2: Pacientes con diagnóstico: Periodontitis crónica severa generalizada.

El grupo total se compone de 13 mujeres y 7 hombres, con un promedio de edad de 34 años. Posterior a todo lo realizado, se consideró no tienen compromiso sistémico actual y pueden continuar en la siguiente fase del proyecto.

En la siguiente tabla se especifican los pacientes que cumplieron con los criterios:

TABLA 8: Pacientes con dx gingivitis o periodonto sano

Número	NOMBRE	EDAD	TELÉFONO
1	Carolina Rentería	29	3142560375
2	José Antonio Sánchez	21	3214694661
3	Kerly Andrea Pulido	23	3185568861
4	Lina Ardila	26	3146311905
5	Mirabai Bermúdez Nur	28	3102078040
6	Orlando Cruz	31	301522325
7	Patricia Castellanos	25	3017568301
8	Adriana Triana	43	3125399243
9	Asterlis Buitrago	28	3155173602
10	Daniel Mayorga	39	3142932657

Tabla 9: Pacientes con dx periodontitis crónica severa generalizada

Número	NOMBRE	EDAD	TELÉFONO
11	David Pérez	26	3144049613
12	Mavel Bejarano	33	3125554466
13	Milena Hernández	35	3106130226
14	Tatiana Díaz	27	3202283428
15	Viviana Hincapié	40	3013716975
16	Efraín Hernández	35	3106130226
17	Yolanda Cubides	43	3202137088
18	Lilia González	47	3003943982
19	Miguel Cardona	50	2318628
20	Jaime Moreno	53	3142006340

Posterior a este proceso de les informo a los pacientes que habían sido seleccionados para continuar en el estudio.

CONCLUSIONES

- Regidos por el protocolo estandarizado en el presente proyecto es posible la cuantificación de células linfoides productoras de citocinas a nivel intracelular, mediante la activación con PMA/ionomicina a diferentes concentraciones de acuerdo con la proteína particular de interés.
- Las células del sub-perfil Th17 efector productoras de IL-17A e IL-17F son posibles de cuantificar utilizando el protocolo mencionado pues los porcentajes de detección celular coincidieron con los reportados en la literatura bajo estas condiciones.
- El protocolo para detección intracelular de IL-10 por parte de las células sub-perfil Th17 regulador requiere continuar en estudio y re-formularse para llegar a una detección eficaz de la misma.
- Las células del sub-perfil Th17/Th1 productoras de IFN- γ son posibles de cuantificar utilizando el protocolo mencionado pues los porcentajes de detección celular coincidieron con los reportados en la literatura bajo estas condiciones.

RECOMENDACIONES

-Previo al desarrollo de cualquier ensayo de laboratorio que implique el uso de diferentes productos biológicos es necesaria la estandarización de la técnica para certificar la veracidad y reproducibilidad de los resultados, de lo contrario se puede incurrir en un gasto de material, económico y de tiempo.

-La elaboración de protocolos estandarizados implica una previa revisión minuciosa de la literatura enfocado en los objetivos a conseguir. De ahí que, este tipo de protocolos deben nutrirse de diferentes fuentes bibliográficas para su desarrollo.

-Una vez escrito y validado el protocolo, debe tenerse siempre como documento guía durante la elaboración de los ensayos preferiblemente impreso en el sitio de trabajo pues esto disminuye significativamente la probabilidad de error si se encuentra escrito clara y consecutivamente.

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Kwok C, Choi L, Shan L, Kwok E, Tsz P, Wai kei C. **Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: Implications for Th17-mediated inflammation in autoimmunity.** *Clinical Immunology*. 2008; 127: 385-393.
- ² Miossec P. **IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases.** *Microbes and Infection*. 2009; 11: 625-630.
- ³ Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. **The potential rol of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease.** *Journal of clinical periodontology*. 2005; 32. 369-374.
- ⁴ Seymour GJ, Gemmel E, Reinhart RA, Eastcott J, Taubman MA. **Immunologopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanism.** *Journal of Periodontal Research*. 1993; 28. 478-486.
- ⁵ Ebersole JL, Taubman MA. **The protective nature of host responses in periodontal disease.** *Periodontology 2000*. 1994; 5: 112-141.
- ⁶ Yao Z, Painter S, Fanslow D, Ulrich B, Macduff M, Spriggs R, et al. **Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells.** *Journal of Immunology*. 1995; 155. 5438-5486.
- ⁷ Park H, Li Z, Yang X, Chang SH, Nurieva R, Wang Y, et al. **A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.** *Natural Immunology*. 2005; 6: 1133-1141.
- ⁸
- ⁹ Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, et al. **Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor.** *Journal of Experimental Medicine*. 2008; 205 (8): 1903-1916.
- ¹⁰ Lee, Y. K., Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O., Weaver, C. T. **Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage.** *Immunity*. 2009; 30:1. doi: 871 10.1016/j.immuni.2008.11.005
- ¹¹ Kleinewietfeld M, Hafler D. **The plasticity of human Treg asnd Th17 cells and its role in autoimmunity.** *Seminars in Immunology*. 2013;25: 305-312.
- ¹² Singh B, Schwartz J, Sandrock C, Bellemore S & Nikoopour E. **Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells.** *Indian J Med Res* 138, November 2013, pp 591-594.
- ¹³ Annunziato F, Santarlasci V, Maggi L, Cosmi L, Liotta F, Romagnani S. **Reasons of rarity of Th17 cells in inflammatory sites of human disorders.** *Seminars in Immunology*. 2013, 25: 299-304.
- ¹⁴ Voo KS, Wang Y, Santori FR, Boggiano C, Y. Wang Y, Arima K, et al. **Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106 : 4793-8.
- ¹⁵ Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Cürgan C, Sorsa T, Konttinen Y.T. **MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis.** *Journal of Dental Research*. 2007; 86(4): 347-351.
- ¹⁶ Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. **Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of celular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis.** *Journal of Clinical Periodontology*. 2005; 32: 383-389.

-
- ¹⁷ Öscaka Ö, Nalbantsoy A, Buduneli N. **Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis.** Journal of periodontal Research. 2011; 46: 592-598.
- ¹⁸ Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, et al. **Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease.** Oral Microbiology and Immunology. 2009; 24: 1-6.
- ¹⁹ Novo E, Garcia-MacGregor E, Viera N, Chaparro N, Crozzoli Y. **Periodontitis and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a comparative study.** Journal of Periodontology. 1999; 70: 185–8
- ²⁰ Chee B, Park B, Bartold PM. **Periodontitis and type II diabetes: a two way relationship.** International Journal of Evidence-based healthcare. 2013; 11(4): 317-329.
- ²¹ Jeong E, Kim K, Kim JH, Cha GS, Kim S-J, et al. **Porphyromonas gingivalis HSP60 peptide have distinct roles in the development of atherosclerosis.** Molecular Immunology. 2015; 63(2): 489-496.
- ²² Zekonis G, Barzdziukaite, I, Zekonis, J, Sadzeviciene, R, Simonyte, S, et al. **Local and systemic immune responses in gingivitis and periodontitis.** Central European Journal of Medicine. 2014; 9(5): 694-703.
- ²³ Mc Guire M. **Should we focus on inflammation change the way we practice?** J periodontol 2008;79:2016-2020
- ²⁴ Nibali L, D’Aiuto F, Griffiths G, Patel K, Suvan J, Tonetti MS. **Severe periodontitis is associated with systemic inflammation and a dysmetabolic status: a case-control study.** J Clin Periodontol. 2007; 34(11): 931-937.
- ²⁵ D’Aiuto F, Pakar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J, Tonetti MS. **Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical trial.** Am Heart J. 2006; 151(15): 977-984.
- ²⁶ Brandtzaeg P, Kraus FW. **Autoimmunity and periodontal disease.** Odontology. 1965; 73: 285–393.
- ²⁷ Gustafsson A, Ito H, Asman B, Bergström K. **Hyper-reactive mononuclear cells and neutrophils in chronic periodontitis.** Journal of Clinical Periodontology. 2006; 33(2): 126-129.
- ²⁸ Papadopoulos G, Weinberg E, Massari P, Gibson F, Wetzler L, et al. **Macrophage- Specific TLR2 signaling mediates pathogen induced TNF dependent inflammatory oral bone loss..** The Journal of immunology. 2013; 190: 1148-1157.
- ²⁹ Hajishengallis G. **Complement and periodontitis.** Biochemical Pharmacology. 2010; 80: 1992-2001.
- ³⁰ Teng YT. **The role of acquired immunity and periodontal disease progression.** Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2003; 14(4): 237-252.
- ³¹ Kramer J, Gaffen S. **Interleukin-17: A new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy.** Journal of Periodontology. 2007; 78: 1083-1093.
- ³² Suárez L, Roa N, Vargas D. **Expresión de Linfocitos T CD4+ Th17 en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos con Periodontitis Crónica.** Universidad Nacional de Colombia – Facultad de Odontología. 2014.

-
- ³³ Moutsopoulos N, Madianos P. **Low-grade inflammation in chronic infectious diseases. Paradigm of periodontal infections.** Annals New York Academy of Sciences. 2006; 1088: 251-264.
- ³⁴ Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology* 2000 **35**: 158–182.
- ³⁵ Van Dyke TE, Serhan CN. **Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases.** *J. Dent. Res.* 2003; 82: 82–90.
- ³⁶ Haraszthy VI. **Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques.** *J. Periodontol.* 2000. 71: 1554–1560.
- ³⁷ Chang S, Li L. **Metabolic endotoxemia: A novel concept in chronic disease pathology.** *Journal of Medical Sciences.* 2001; 31(5): 191-209.
- ³⁸ Glaros TG, Chang S, Gilliam EA, Maitra U, Deng H, et al. **Causes and consequences of low grade endotoxemia and inflammatory diseases.** *Frontiers in Bioscience.* 2013; 5 (2): 754-765.
- ³⁹ Van Dyke TE, van Winkelhoff. **Infection and inflammatory mechanism.** *Journal of Clinical Periodontology.* 2013; 40 (Suppl. 14): S1-S7 doi 10.1111/jcpe.12088.
- ⁴⁰ Borgnakke WS. **Does treatment of periodontal disease influence systemic disease?** *Dent Clin N Am.* 2015; 59: 885-917.
- ⁴¹ Tomas I, Diz P, Tobias A, et al. **Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis.** *J Clin Periodontol* 2012; 39(3):213–28.
- ⁴² Kinane, D. F., Riggio, M. P., Walker, K. F., MacKenzie, D. & Shearer, B. **Bacteraemia following periodontal procedures.** *Journal of Clinical Periodontology.* 2005; 32: 708–713. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00741.x.
- ⁴³ Li, X., Kolltveit, K. M., Tronstad, L. & Olsen, I. **Systemic diseases caused by oral infection.** *Clinical Microbiology Reviews.* 2000; 13: 547–558.
- ⁴⁴ Van Dyke, T. E. **Control of inflammation and periodontitis.** *Periodontology* 2000. 2007; 45: 158 –166. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00229.x.
- ⁴⁵ Hefti A. **Aspects of cell biology of the normal periodontium.** *Periodontology* 2000. 1993; 3: 64-75.
- ⁴⁶ Seymour GJ, Gemmel E, Reinhart RA, Eastcott J, Taubman MA. **Immunologopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanism.** *Journal of Periodontal Research.* 1993; 28: 478-486.
- ⁴⁷ Ebersole JL, Taubman MA. **The protective nature of host responses in periodontal disease.** *Periodontology* 2000. 1994; 5: 112-141.
- ⁴⁸ Steinman L. **A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage.** *Natural Medicine.* 2007; 13: 139-145.
- ⁴⁹ Yao Z, Painter S, Fanslow D, Ulrich B, Macduff M, Spriggs R, et al. **Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells.** *Journal of Immunology.* 1995; 155. 5438-5486.

-
- ⁵⁰ Kwok C, Choi L, Shan L, Kwok E, Tsz P, Wai kei C. **Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: Implications for Th17-mediated inflammation in autoimmunity.** *Clinical Immunology*. 2008; 127: 385-393.
- ⁵¹ Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. **Interleukin-17 family and IL-17 receptors.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003; 14: 155-174.
- ⁵² Park H, Li Z, Yang X, Chang SH, Nurieva R, Wang Y, et al. **A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.** *Natural Immunology*. 2005; 6: 1133-1141.
- ⁵³ Reynolds J, Angkasekwinai P, Dong C. **IL-17 family member cytokines: Regulation and function in the innate immunity.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2010; 21: 413-423.
- ⁵⁴ Singh R, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi D, et al. **Th17 cells in inflammation and autoimmunity.** *Autoimmunity Reviews*. 2014; 13: 1174-1181.
- ⁵⁵ Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang S. **IL-17 cytokine family.** *Molecular mechanism in allergy and clinical immunology*. 2004; 114 : 1265-1273.
- ⁵⁶ Zheng, SG. **Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive?** *Am J Clin Exp Immunol* 2013;2(1):94-106.
- ⁵⁷ Martin J, Baeten D, Josien R. **Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus.** *Clinical Immunology*. 2014; 154: 1-12.
- ⁵⁸ Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, F, et al. **Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissueinflammation.** *Immunity* 2011; 35: 986–96.
- ⁵⁹ Kramer J, Gaffen S. **Interleukin-17: A new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy.** *Journal of Periodontology*. 2007; 78: 1083-1093.
- ⁶⁰
- ⁶¹ Zhang L, Wang T, Wang XQ, Du RZ, Zhang KN, et al. **Elevated frequencies of circulating Th22 cell in addition to Th17 cell and Th17/Th1 cell in patients with acute coronary syndrome.** *PLoS One*. 2013; 3(8): e71466
- ⁶² Zhao Z, Wu Y, Cheng M, Ji Y, Yang X, et al. **Activation of Th17/Th1 and Th1, but not Th17, is associated with the acute cardiac event in patients with acute coronary syndrome.** *Atherosclerosis*. 2011; 217: 518-524.
- ⁶³ Kistowska M, Mejer B, Proust T, Feldmeyer L, Cozzio A, et al. **Propionibacterium acnes promotes Th17 and Th17/Th1 responses in Acne Patients.** *J Invest Dermatol*. 2014; Jul 10. doi: 10.1038/jid.2014.290. [Epub ahead of print]
- ⁶⁴ D. Brouty-Boyé, C. Pottin-Clémenceau, C. Doucet, C. Jasmin, B. Azzarone. **Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts.** *European Journal of Immunology*. 2000; 30: 914-919.
- ⁶⁵ Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Cürgan C, Sorsa T, Konttinen Y.T. **MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis.** *Journal of Dental Research*. 2007; 86(4): 347-351.

-
- ⁶⁶ Papadopoulos G, Weinberg E, Massari P, Gibson F, Wetzler L, et al. **Macrophage- Specific TLR2 signaling mediates pathogen induced TNF dependent inflammatory oral bone loss.** The Journal of immunology. 2013; 190: 1148-1157.
- ⁶⁷ Konermann A, Beyer M, Deschner J, Allam J.P, Novak N, Winter J, et al. **Human periodontal ligament cells facilitate leukocyte recruitment and are influenced in their immunomodulatory function by Th17 cytokine release.** Cellular Immunology. 2012; 272: 137-143.
- ⁶⁸ Reid S, Bain J, Johnson R, Serio F. **Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at Healthy Sites and at Sites of clinical Attachment Loss.** Journal of Periodontology. 2007; 78: 1545-1550.
- ⁶⁹ Tomoyuki H, Aoki Y, Takahashi N, Maekawa T, Nakajima T, Ito H, et al. **Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease.** Clinica Chimica Acta. 2008; 395: 137-141.
- ⁷⁰ Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. **Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of celular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis.** Journal of Clinical Periodontology. 2005; 32: 383-389.
- ⁷¹ Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S. **Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis.** Journal of Autoimmunity. 2012: 1-10.
- ⁷² Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. **Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-κB ligand in vitro.** Oral Microbiology and Immunology. 2003; 18: 30-36.
- ⁷³ Allam JP, Duan Y, Heinemann F, Winer J, Götz W, Deschner J, et al. **IL-23-producing CD68+ macrophage-like cells predominate within an IL-17-polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions.** Journal of Clinical Periodontology. 2011; 38: 879-886.
- ⁷⁴ Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L, Chen W. **Effect of non surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients.** Journal of Clinical Periodontology. 2011; 38: 509-516.
- ⁷⁵ Lockhart P, Bolger A, Papapanou P, Osinbowale O, Trevisan M. **Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an Independent association?** American Heart Association. Circulation. 2012; 125: 2520-2544.
- ⁷⁶ Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen TA. **Periodontal disease and coronary heart disease risk.** JAMA. 2000; 284: 1406 –1410.
- ⁷⁷ Chun YH, Chun KR, Olguin D, Wang HL. **Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis.** J Periodontal Res. 2005; 40: 87–95.
- ⁷⁸ Anaya J, Shoenfeld Y, Correa P, García M, Cervera R. **Autoinmunidad y enfermedad autoinmune.** Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 2005.
- ⁷⁹ Alard JE, Dueymes M, Youinou P, Jamin C. **Modulation of endothelial cell damages by anti-Hsp60 autoantibodies in systemic autoimmune diseases.** Autoimmunity Reviews. 2007; 6: 438–443.
- ⁸⁰ Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. **Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques.** J Periodontol. 2000; 71:1554 –1560.

-
- ⁸¹ Armitage, G. **Development of a classification system for periodontal diseases and conditions.** Ann Periodontology. 1999; 4: 1-6.
- ⁸² Chang MS. **Phorbol 12 –myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase- 2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NK-kappaβ, but not p38 MAPK, pathways.** Cell Signal. 2005; 17(3): 299-310.
- ⁸³ Andersson K, Filluelo N, Hu D, Brisslert M, Ciliac R, et al. **Pathogenic transdifferentiation of Th17 cells contribute to perpetuation of rheumatoid arthritis during anti – TNF treatment.** Molecular Medicine. 2015; 21: 536-543.
- ⁸⁴ Yin Y. **Detection of Intracellular Cytokines by Flow Cytometry.** Current protocols in immunology. 2015; 3 (110). doi: 10.1002/0471142735.im0624s110.
- ⁸⁵ Karlsson F, Hassan-Zahraee M. **Quantification of Th1 and Th17 Cells with intracellular Staining Following PMA/Ionomycin Stimulation.** Curr Protoc Cytom. 2015; 5 (71): 1-7.
- ⁸⁶ Vikingsson A, Pederson K, Muller D. **Enumeration of IFN-gamma producing lymphocytes flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN-gamma.** J Immunol Methods. 173:219.
- ⁸⁷ Shan K, lee W, Lee S. Kim S. **Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus.** Arthritis Research and Therapy. 2010; 12: R53.
- ⁸⁸ Shan K, lee W, Lee S. Kim S. **Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus.** Arthritis Research and Therapy. 2010; 12: R53.
- ⁸⁹ Liu Y, Li L, Huang F. **Characterization of memory CD4+ IL-21+ T cells in human PBMC.** Journal of cellular and molecular immunology. 2010; 26 (11): 1063-1066.
- ⁹⁰ Holan H, Zajicova A, Javorkova E, Trosan P, Chudickova M, et al. **Distinct cytokines balance the development of regulatory T cells and interleukin-10-producing regulatory cells.** Immunology. 2014; 141 (4): 577-586.
- ⁹¹ Apostolopoulos V, de Courten MP, Stojanivska L, Blatch GL, Tangalakis K, et al. **The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity.** Mol Nutr Food Res. 2015. Sep 1. doi: 10.1002/mnfr.201500272. [Epub ahead of print]

ANEXO # 1: Escalas para exámenes de laboratorio.

1. HEMOGRAMA

1.1 LEUCOCITOS

Célula	Unidad medida	Valor referencia
WBC	10 ³ /μL	4.4-11.3
Neutrófilos	%	40-75
Linfocitos	%	20-45
Monocitos	%	2-10
Eosinófilos	%	2-4
Basófilos.	%	0-1
Neutrófilos	10 ³ / μL	2-7.5
Linfocitos	10 ³ / μL	1.5-4
Monocitos	10 ³ / μL	0.2-0.8
Eosinófilos	10 ³ / μL	0.04-0.4
Basófilos.	10 ³ / μL	0-0.1

1.2 HEMATÍES

Célula	Unidad medida	Valor referencia
RBC	10 ⁶ / μL	4.1-5.1
HGB	g/dL	12.3-15.3
HCT	%	35-47
MCV	fL	80-96
MCH	Pg	28-33
MCHC	g/dL	33-36
RDWCV	%	11.5-15.5
RDWSD	fL	37-51.

1.3 PLAQUETAS

Célula	Unidad medida	Valor referencia
PLT	10 ³ / μL	149-409
MPV	fL	

2. HEMOGLOBINA GLICOSILADA

Rango normal	4.0%-6.0%
Diabético controlado	Hasta 7.0%
Admisible para diabético	7.1%-8.0%
Inadmisible	>8.0%

3. PERFIL LIPÍDICO

3.1 COLESTEROL TOTAL

Interpretación de resultados (NCEP ATP III):

Deseable	Menor de 200 mg/dL
Limítrofe	200-239 mg/dL
Alto	>240 mg/dL

3.2 COLESTEROL HDL

Interpretación de resultados (NCEP ATP III):

Riesgo bajo	Mayor de 60 mg/dL
Riesgo alto	Menor de 40 mg/dL

3.3 COLESTEROL LDL CALCULADO

Interpretación de resultados (NCEP ATP III):

Óptimo	Menor de 100 mg/dL
Ligeramente elevado	100-129 mg/dL
Limítrofe	130-159 mg/dL

Elevado	160-189 mg/dL
Muy elevado	>190 mg/dL

Calculado de acuerdo con la fórmula de Friedewald.

3.4 COLESTEROL LDL DIRECTO

Interpretación de resultados (NCEP ATP III):

Óptimo	Menor de 100 mg/dL
Ligeramente elevado	100-129 mg/dL
Limítrofe	130-159 mg/dL
Elevado	160-189 mg/dL
Muy elevado	>190 mg/dL

3.5 TRIGLICÉRIDOS

Interpretación de resultados (NCEP ATP III):

Deseable	Menor de 150 mg/dL
Limítrofe	150-199 mg/dL
Alto	200-499 mg/dL

ANEXO # 2

Historia Clínica

N°: _____

HISTORIA CLÍNICA – PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

ALERTA MÉDICA: _____

PRIMER APELLIDO		SEGUNDO APELLIDO		NOMBRES	
Tipo documento	Numero	Pais Nacimiento		Departamento	Ciudad
Edad	Genero	Tipo de sangre		EPS	
____ Años	M F				
Direccion de Residencia				Barrio	Estrato
Telefonos				Correo electronico	
Escolaridad				Estado Civil	

MOTIVO DE CONSULTA:

ANAMNESIS PRÓXIMA:

ANTECEDENTES PERSONALES								
	SI	NO		SI	NO		SI	NO
1. Cardiovasculares			10. Renal / Urinario			19. Reumatico		
2. Infecciosos			11. Inmunologico			20. Traumatico		
3. Dermatologicos			12. Endocrino			21. Quirurgico		
4. Respiratorios			13. Neurologico			22. Psicologico		
5. Hematologicos			14. Genital			23. Hereditarias		
6. Alergicos			15. Neoplasico			24. Hipertension Arterial		
7. Gastricos / digestivos			16. Quimio / Radioterapia			25. Gineco-obsetricos		
8. Metabolicos			17. Transfusiones			26. Otros		
9. Organos de los sentidos			18. Oseoarticulares					

Especifique los antecedentes positivos:

Tratamiento farmacológico actual: SI _____ NO _____

Formulación antibiótica, anti-inflamatoria o corticosteroides en los últimos seis meses:

SI: _____ NO: _____

Embarazo o lactancia:

SI: _____ NO: _____

Fuma:

SI: _____ NO: _____

EXAMEN FÍSICO:

Signos vitales:

TA: _____ mms / Hg.

FC: _____ x min

Talla: _____ m

Peso: _____

IMC: _____

EXAMEN INTRAORAL:

Dental:

Periodontal: Ver periodontograma.

Diagnóstico periodontal principal:

Grupo: _____

MUESTRA #1: Resultados exámenes de laboratorio

EXAMEN	RESULTADO
1. CUADRO HEMÁTICO	NORMAL: _____ ALTERADO: _____
2. HB GLICOSILADA.	NORMAL: _____ ALTERADO: _____
3. PERFIL LIPÍDICO	NORMAL: _____ ALTERADO: _____
4. FACTOR REUMATOIDEO	NORMAL: _____ ALTERADO: _____

CONTINÚA EN EL ESTUDIO:

SI: _____ NO: _____

REQUIERE SER NOTIFICADO POR RESULTADO ALTERADO DE LOS EXAMENES DE LABORATORIO:

SI: _____ NO: _____

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN DE SALUD - HAQ

Nombre _____ Fecha _____

En esta sección nos interesa conocer cómo afecta la enfermedad su capacidad para desempeñar sus actividades en la vida diaria. Puede agregar cualquier comentario que crea oportuno al dorso de esta página.

Por favor, marque con una X la respuesta que mejor describa su capacidad para llevar a cabo actividades habituales DURANTE LOS ÚLTIMOS 7 DÍAS:

	Sin NINGUNA <u>Dificultad</u>	Con ALGUNA <u>Dificultad</u>	Con MUCHA <u>Dificultad</u>	NO PUDE <u>Hacerlo</u>
VESTIRSE Y ARREGLARSE				
¿Pudo, usted:				
- Vestirse solo/a, incluyendo amarrarse los zapatos y abrocharse los botones?	_____	_____	_____	_____
- Lavarse el pelo?	_____	_____	_____	_____
LEVANTARSE				
¿Pudo, usted:				
- Levantarse de una silla sin brazos?	_____	_____	_____	_____
- Acostarse y levantarse de la cama?	_____	_____	_____	_____
COMER				
¿Pudo usted:				
- Cortar la carne en el plato?	_____	_____	_____	_____
- Llevarse a la boca una taza o un vaso lleno?	_____	_____	_____	_____
- Abrir una caja nueva de leche?	_____	_____	_____	_____
CAMINAR				
¿Pudo, usted:				
- Caminar afuera de su casa por un terreno plano?	_____	_____	_____	_____
- Subir cinco escalones?	_____	_____	_____	_____

Si utiliza habitualmente algún **UTENSILIO O APARATO DE AYUDA** para hacer alguna de las actividades arriba mencionadas, por favor, márkelo con una X en la lista siguiente:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Bastón | <input type="checkbox"/> Aparatos utilizados para vestirse (gancho para abrocharse los botones, aparato para subir cierres, calzador con mango largo, etc.) |
| <input type="checkbox"/> Caminador | <input type="checkbox"/> Utensilios especialmente adaptados para cocinar o para comer |
| <input type="checkbox"/> Muletas | <input type="checkbox"/> Silla especialmente adaptada |
| <input type="checkbox"/> Silla de ruedas | <input type="checkbox"/> Otros (Especifique los: _____) |

Si en alguna de estas actividades suele necesitar **LA AYUDA DE OTRA PERSONA**, por favor, márkela con una X en la lista siguiente:

- | | |
|--|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Vestirse y arreglarse | <input type="checkbox"/> Comer |
| <input type="checkbox"/> Levantarse | <input type="checkbox"/> Caminar |

PATKEY# _____
 QUESTDAT _____
 HAQADMIN _____
 QUESTYPE 2 _____
 PMSVIS 1 _____
 RASTUDY _____
 QUESTNUM _____
 DRESSNEW _____
 RISENEW _____
 EATNEW _____
 WALKNEW _____
 DRSGASST _____
 RISEASST _____
 EATASST _____
 WALKASST _____

HABITUDES DURANTE LOS ÚLTIMOS 7 DÍAS.

	Sin NINGUNA Dificultad	Con ALGUNA Dificultad	Con MUCHA Dificultad	NO PUEDE Hacerlo
HIGIENE PERSONAL				
¿Pudo usted:				
- Lavarse y secarse el cuerpo?	_____	_____	_____	_____
- Tomar un baño de tina (por ej. doblando las rodillas, etc.)?	_____	_____	_____	_____
- Sentarse y levantarse del inodoro?	_____	_____	_____	_____
ALCANZAR COSAS				
¿Pudo usted:				
- Alcanzar y bajar un objeto de aproximadamente 2 kilos (por ej. una botella de gaseosa 2 litros) que estuviera a una altura por encima de su cabeza?	_____	_____	_____	_____
- Agacharse para recoger ropa del suelo?	_____	_____	_____	_____
AGARRAR				
¿Pudo usted:				
- Abrir las puertas de un carro?	_____	_____	_____	_____
- Abrir frascos que ya habían sido abiertos?	_____	_____	_____	_____
- Abrir y cerrar las llaves del agua?	_____	_____	_____	_____
ACTIVIDADES				
¿Pudo usted:				
- Hacer mandados e ir de compras?	_____	_____	_____	_____
- Entrar y salir de un carro?	_____	_____	_____	_____
- Hacer tareas domésticas (por ej. barrer, arreglar el jardín)?	_____	_____	_____	_____

HYGNNEW _____

REACHNEW _____

GRIPNEW _____

ACTIVNEW _____

Si utiliza habitualmente algún UTENSILIO O APARATO DE AYUDA para hacer alguna de las actividades arriba mencionadas, por favor, márkelo con una X en la lista siguiente:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Asiento elevado para el inodoro | <input type="checkbox"/> Barra para agarrarse en la tina/ducha |
| <input type="checkbox"/> Asiento para la tina/ducha | <input type="checkbox"/> Aparatos con mango largo para alcanzar cosas |
| <input type="checkbox"/> Abridor de frascos (para frascos que ya habían sido abiertos) | <input type="checkbox"/> Utensilios con mango largo en el baño (tales como un cepillo para la espalda) |
| <input type="checkbox"/> Otros (Especifíquelos: _____) | |

Si en alguna de estas actividades suele necesitar LA AYUDA DE OTRA PERSONA, por favor, márkela con una X en la lista siguiente:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Higiene personal | <input type="checkbox"/> Agarrar y abrir cosas |
| <input type="checkbox"/> Alcanzar cosas | <input type="checkbox"/> Mandados y tareas domésticas |

HYGNASST _____

RCHASST _____

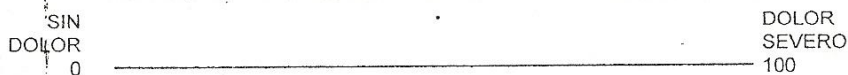
GRIPASST _____

ACTVASST _____

También estamos interesados en conocer si está o no afectado/a por el dolor a causa de su enfermedad.

¿Cuánto dolor le causó su enfermedad DURANTE LOS ÚLTIMOS 7 DÍAS?

PONGA UNA RAYA VERTICAL | SOBRE LA LÍNEA PARA INDICAR LA SEVERIDAD DEL DOLOR.



PAINSCAL _____

MUESTRA #2: Resultados exámenes de laboratorio

1. Th17 total

NÚMERO TOTAL	
---------------------	--

1. Th17 patológico

MARCADOR	RESULTADO
CD4	
CD161	
IL-17A	
IL-17F	
VALOR/PORCENTAJE	

2. Th2 regulador

MARCADOR	RESULTADO
CD4	
CD161	
IL-10	
IL-21	
VALOR/PORCENTAJE	

3. Th17/Th1

MARCADOR	RESULTADO
CD4	
CD161	
IFN- γ	
VALOR/PORCENTAJE	

Tratamiento requerido:

Estudiante a cargo:

Elaborado por:

Estudiante: Hernán Santiago Garzón V.

Directora: Dra. Lina Suárez.

Co-Directora: Dra. Nelly Roa.

ANEXO #3: CONSENTIMIENTO INFORMADO.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Investigación: Cuantificación de las sub-poblaciones de linfocitos Th17 en sangre periférica de pacientes sistémicamente sanos con periodontitis crónica generalizada.

El siguiente consentimiento se realiza para contar con su participación en el desarrollo de la presente investigación. Es realizada con fines académicos, para esclarecer un vacío en el conocimiento. Al finalizar, si se encuentra de acuerdo deberá firmar el documento, aceptando su participación.

El entendimiento de la Enfermedad Periodontal ha implicado muchos años de investigaciones, sin llegar aún a un consenso. La presencia de estos linfocitos Th17 se ha relacionado con la enfermedad periodontal, no obstante es necesario determinar cuál es su función dentro de esta entidad y si su presencia implica otro tipo de alteraciones en todo el cuerpo. Por tal motivo, resulta de vital importancia realizar esta investigación.

Desarrollaremos las siguientes fases:

1. Historia clínica y examen clínico periodontal: determinación del diagnóstico periodontal.
2. Toma de dos muestras de sangre periférica con una sola venopunción:
 - Primera: Sometida a cuatro pruebas de laboratorio: Cuadro hemático, hemoglobina glicosilada, perfil lipídico y factor reumatoideo. Esto con el fin de descartar algún tipo de patología en su cuerpo. De encontrarse algo anormal en sus exámenes, será informado de inmediato para tomar las medidas respectivas.
 - Segunda: Permitirá determinar el número y subtipos de linfocitos Th17 en su sangre a través de diferentes pruebas de laboratorio.
3. Análisis de los resultados.

En cualquiera de las etapas de la investigación usted es libre de denegar el uso de su información si lo considera pertinente, aclarando que esto **no** repercutirá negativamente en la atención odontológica que puede recibir en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia.

Los datos obtenidos serán manejados confidencialmente por los investigadores adscritos al proyecto. Si bien los resultados generales deben ser publicados, sus datos personales no serán nunca revelados públicamente. Esta investigación tiene el aval de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional para su realización.

Las preguntas que durante el curso de la investigación le puedan surgir, serán aclaradas de forma oportuna y veraz.

Recuerde que si decide no participar esto no trae ninguna consecuencia negativa.

Recuerde que si ingresa a este estudio es un paciente que requiere tratamiento periodontal, por tal motivo usted será atendido en las clínicas de pregrado o posgrado de Periodoncia de la Universidad Nacional, como paciente regular. El costo del tratamiento periodontal será asumido por usted como paciente regular de la Facultad.

Agradecemos su participación, pues su contribución es valiosa para el desarrollo científico en el área de Periodoncia.

Declaro que todas las preguntas fueron aclaradas de forma comprensible, previa a la firma de este documento.

Paciente:

Identificación:

Coordinador: Dra. Lina Suárez.

Estudiante: Hernán Santiago Garzón.

Testigo:

Identificación:

ANEXO #4: PROTOCOLO TOMA INDIVIDUAL DE MUESTRA DE SANGRE VENOSA

1. MATERIALES

- 1 jeringa de 10 cc desechable
- Algodón en rama.
- 2 tubos de recolección.
- 1 torniquete o ligadura.
- 1 almohadilla.
- 1 par de guantes desechables.
- Alcohol al 70%
- Gasas estériles.
- Implementos de bioseguridad del operador (tapabocas, visor, gorro desechable, bata).

2. MÉTODO:

1. Lavado de manos del operador, previo a cualquier procedimiento.
2. Paciente debe sentarse y colocar el brazo sobre la almohadilla.
3. Revisar la piel y venas del paciente (ubicación).
4. Seleccione el sitio que tenga mayor seguridad de éxito y de menor riesgo para el paciente.
5. Coloque la ligadura aproximadamente cuatro dedos arriba del codo.
6. Desinfecte el área de toma de la muestra con alcohol al 70%.
7. Fije la vena traccionando la piel que la circunda y solicite al paciente que empuñe la mano suavemente.
8. Inserte la aguja con el bisel hacia arriba, puncione la vena , dirigiendo la aguja en la misma dirección en que ésta se encuentra (puncionando primero la piel, trate de no puncionar directamente sobre la vena porque la puede atravesar e impedir la toma de la muestra.
9. Obtener 10 ml.
10. Suelte la ligadura, pídale al paciente que suelte la mano empuñada.
11. Retire la jeringa, deje la torunda de algodón en el sitio puncionado. Pídale al paciente que sostenga con los dedos de su otra mano el algodón para generar hemostasia.
12. Llene con la cantidad necesaria los frascos de examen, siempre llene primero los frascos que tienen anticoagulantes, girándolos según corresponda.
13. Coloque tela adhesiva con una gasa seca en el sitio de la punción.
14. Acomode al paciente e infórmele las indicaciones.
15. Deseche el material cortopunzante en el guardián y el resto, en la caneca roja.
16. Retírese los guantes y deséchelos en la caneca roja.
17. Lávese las manos.
18. Llevar la muestra en menos de 30 minutos al sitio de análisis.