



Determinación de los niveles del receptor soluble de IL-23 en suero y plasma de pacientes con periodontitis crónica y agresiva[‡]

Carolina Rivadeneyra-Burgos,* Ruth Rodríguez-Montaño,** Alondra del Carmen Ruíz-Gutiérrez,*,** Vianeth del Carmen Martínez-Rodríguez,* José Luis Meléndez-Ruiz,** María Luisa Pita-López,***, José Alberto Alcázar-Ríos,***, Celia Guerrero-Velázquez**

RESUMEN

Antecedentes: La periodontitis es una enfermedad inmunoinflamatoria crónica causada principalmente por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*. Los tipos más comunes de enfermedad periodontal son la periodontitis crónica (PC) y la periodontitis agresiva (PA) que se caracterizan por inflamación gingival, formación de bolsas periodontales, pérdida de inserción y destrucción de hueso alveolar. Sin embargo, la principal diferencia entre la PC y la PA radica en que en la PA la pérdida de inserción es más rápida que en la PC. Las células dendríticas ante el estímulo de las bacterias periodontopatógenas producen IL-23, esta citocina se une a su receptor específico (IL-23R) en las células Th17 para inducir la producción de IL-17, citocina que participa indirectamente en la resorción ósea alveolar. Se ha observado que la IL-17 está elevada en pacientes con PC en comparación con los sujetos sanos (SS). No obstante, poco se conoce de la IL-23 y el IL-23R en la periodontitis. Cabe mencionar que el IL-23R puede ser escindido y resultar en una forma soluble del IL-23R (IL-23Rs). **Objetivo:** Medir los niveles del IL-23Rs en suero y plasma de pacientes con PC, PA y SS. **Material y métodos:** Se recolectó suero y plasma de pacientes con PC (n = 8) y PA (n = 8), así como de sujetos sanos (SS) (n = 8) y se determinó la concentración del IL-23Rs por la técnica de ELISA. **Resultados:** No se encontraron diferencias del IL-23Rs entre los pacientes con PA y PC en comparación con los SS, aun cuando se observó un aumento significativo del IL-23Rs en plasma de pacientes con PA y PC en comparación con los SS. **Conclusiones:** Existe un incremento del IL-23Rs en plasma de pacientes con PC y PA en comparación con los SS, aunque no se detectaron diferencias significativas del IL-23Rs en suero entre los grupos de PC, PA y SS.

Palabras clave: IL-23Rs, periodontitis crónica, periodontitis agresiva.

ABSTRACT

*Periodontitis is a chronic immunologic-inflammatory disease primarily caused by Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. The most common types of periodontal disease are: chronic (CP) and aggressive (AP) which are characterized by gingival inflammation, formation of periodontal pockets, and loss of insertion and destruction of alveolar bone. However, attachment loss and tissue destruction is faster in AP than CP. Dendritic cells are stimulated by periodontopathogenic bacteria and produce IL-23; this cytokine binds to its specific receptor (IL-23R) through Th17 cells to induce production of IL-17. It is to be noted that IL-23R can be cleaved and remain as a soluble receptor (IL-23Rs). IL-23 and IL-17 and its receptors indirectly participate in alveolar bone resorption. In this sense, it was found that IL-17 is elevated in patients with CP compared to healthy subjects (HS). However, little has been said about IL-23 and its receptor in periodontitis. **Objective:** Type of study: descriptive, cross-sectional and analytical. Measuring IL-23Rs levels in serum and plasma of patients with PC, PA and healthy subjects. **Material and methods:** Serum and plasma were collected from patients with CP (n = 8) and AP (n = 8) as well as from HS (n = 8). The concentration of IL-23Rs was determined by ELISA. **Results:** There were no significant differences in IL-23Rs between patients with PA and PC compared with SS. However, we found a significant increase in IL-23Rs in the plasma of patients with AP compared to SS. Likewise, we observed a significant increase in PC patients compared with SS. **Conclusions:** There is an increase in plasma IL-23Rs in patients with PC and PA compared to SS. However, we found no significant differences in serum IL-23Rs between the PC, PA and SS groups.*

Key words: IL-23Rs, chronic periodontitis, aggressive periodontitis.

[‡] Segundo lugar en el concurso de Investigación, Asociación Mexicana de Periodontología 2016, Monterrey, Nuevo León, México.

* Especialidad de Periodoncia. Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales. Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

** Instituto de Investigación en Odontología. Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales. Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

*** Centro de investigación en Biología Molecular de las Enfermedades Crónicas (CIBIMEC). Centro Universitario Sur.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) es una de las dos patologías bucales principales que afectan a la población mundial. En México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucles (SIVEPAB) describió que de un total de 87,764 personas, solamente 40% tenía un periodonto sano.^{1,2}

La EP es un grupo de trastornos con diversas etiologías y manifestaciones clínicas en la que se incluyen las periodontitis. Se identifican principalmente dos tipos de periodontitis: periodontitis crónica (PC) y periodontitis agresiva (PA) causadas por varias especies bacterianas que se adhieren a la base de los dientes como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* y *Bacteroides forsythus*, entre otras.³⁻⁵ La PC y la PA se caracterizan por inflamación gingival, pérdida de inserción, formación de bolsas periodontales y destrucción de hueso alveolar. La principal diferencia entre la PC y la PA radica en que en la PA, la pérdida de inserción es más rápida que en la PC.^{2,4} Los lipopolisacáridos (LPS) y otros componentes de las bacterias periodontopatógenas son reconocidas por las células dendríticas y éstas secretan citocinas proinflamatorias como IL-1, TGF- β , IL-6 e IL-23. La IL-23 se une a su receptor específico (IL-23R) en las células Th17 para activar y mantener la clona, así como para producir IL-17 y RANKL.⁶ Cabe señalar que la IL-23 es una citocina heterodimérica compuesta de dos subunidades enlazadas por un puente de disulfuro, una subunidad soluble p40 y una subunidad de haz tetra-helical p19, mientras que el receptor a IL-23 (IL-23R) está constituido por una subunidad llamada IL-23R que forma un complejo con la subunidad beta 1 del receptor a IL-12 (IL-12R β 1) (Figura 1).⁷ El IL-23R también puede presentarse en forma soluble (IL-23Rs) por corte y empalme alternativo o mediante la escisión desde la membrana por adamalisin.^{8,9} La señalización a través del IL-23R es por las Janus cinasa 2 (JAK2) y tirosina cinasa 2 (tyk2), la cual activa STAT3 permitiendo la sobreexpresión de ROR γ T y subsecuentemente se incrementa la producción de IL-17.¹⁰ De esta manera, la IL-17 producida por las Th17 se une a los fibroblastos a través de su receptor induciendo la producción de RANKL. Tanto el RANKL producido por las células Th17 como los fibroblastos activan los preosteoclastos para su diferenciación en osteoclastos maduros, los cuales se encargan de la reabsorción

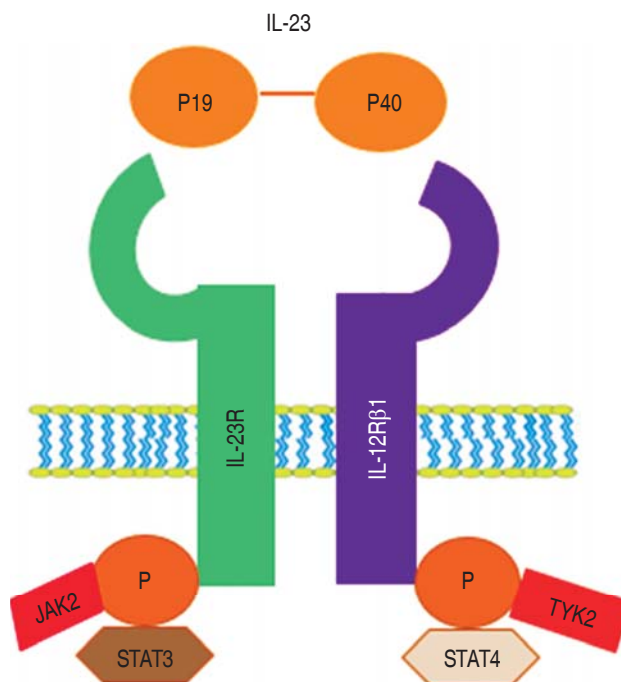


Figura 1. IL-23 y su receptor. La IL-23 está formada por la subunidad P19 y P40. La P19 se une a la subunidad del receptor a IL-23 (IL-23R) y la P40 se une al IL-12-R β . La señalización del IL-23R se genera a través de la ruta de las JAK2 y Tyk2 y las STAT3 y STAT4 (a) (Imagen modificada de: Awasthi K, 2009; Teng B, 2009).

ósea alveolar (Figura 2).¹¹⁻¹³ En este sentido, se ha descrito que existen desregulaciones en el eje IL-23/IL-17 y sus receptores en enfermedades autoinmunes en las que hay destrucción de órganos o tejidos^{14,15} o en enfermedades degenerativas como en la artritis reumatoide.¹⁶⁻¹⁹ En la periodontitis (enfermedad crónica degenerativa) se ha publicado que los niveles de IL-23 e IL-17 están elevados en pacientes con periodontitis en comparación con SS.²⁰⁻²⁵ Sin embargo, no se han estudiado los receptores a estas citocinas en PA y PC. El objetivo de este estudio fue medir los niveles del IL-23Rs en el suero y plasma de pacientes con PC y PA en comparación con muestras de SS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Universo de estudio

El presente trabajo es de tipo descriptivo analítico y observacional y se llevó a cabo en conformidad con las normas de buenas prácticas clínicas y éticas

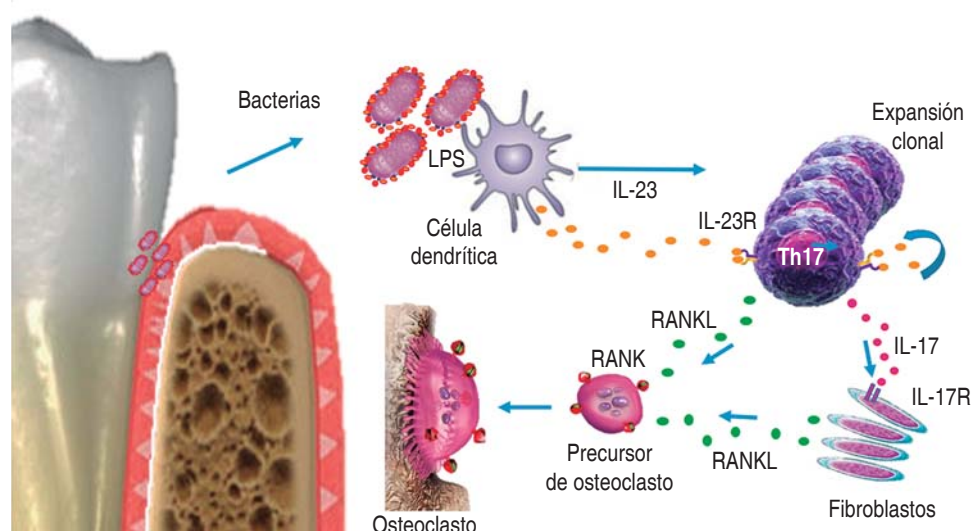


Figura 2. Modelo de erosión ósea alveolar. Los lipopolisacáridos (LPS) y otros componentes de las bacterias periodontopatógenas inducen la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-23 por parte de las células dendríticas. La IL-23 se une a su receptor específico (IL-23R) en células Th17 ayudando a mantener la clona e induciendo la producción de IL-17 y RANKL. Por otra parte, la IL-17 se une al IL-17R en fibroblastos y estos secretan RANKL. El RANKL producido por las Th17 o fibroblastos activan a los preosteoclastos para su diferenciación en osteoclastos maduros, los cuales se encargan de la reabsorción ósea alveolar (Takahashi K, 2005; Vernal R; 2006; Hajishengallis G, 2013).

establecidas en la versión 64 de la Declaración de Helsinki y sus modificaciones en Brasil en 2013.²⁶ El propósito de este estudio se explicó a cada paciente antes de que él/ella aceptara participar y posteriormente se le proporcionó el consentimiento informado que cumple con los lineamientos antes mencionados.

El protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación, Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Guadalajara en junio de 2016 (CI-00714). A cada paciente se le explicó con detalle la naturaleza del estudio y se obtuvo el consentimiento bajo información basándose en la Ley General de Salud y en la norma NOM-008-SSA2 1993.

Los sujetos de estudio fueron seleccionados de las Clínicas Odontológicas Integrales del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara. Este estudio es de tipo analítico, transversal y descriptivo. A todos los participantes se les realizó una historia médica dental y se diagnosticaron de acuerdo con el Taller Internacional para la Clasificación de Enfermedades Periodontales y Estados Periodontales, organizado por la Academia Americana de Periodontología.^{3,16}

Dentro del examen periodontal se registró la pérdida de inserción clínica (PI) y la profundidad al sondeo (PS).²⁷ El examen se realizó con la ayuda de una sonda periodontal (Hu-friedy, Chicago, IL, USA) por un solo periodoncista.

Grupos de estudio

Grupo sujetos sanos (SS): $n = 8$, sujetos periodontalmente sanos (cuatro mujeres y cuatro hombres; edad media: 38.5; rango de edad: 20-53 años) sin PI, inflamación, sangrado ni pérdida ósea radiográfica, con una media de las PS ≤ 3 mm que acudieron a la clínica para cirugía estética.^{27,28}

Grupo con PC: $n = 8$, (cinco mujeres y tres hombres) pacientes con presencia de daño en varios sitios de la cavidad oral incluyendo PS ≥ 4 mm y PI ≥ 4 mm, con presencia de sangrado al sondeo e inflamación.^{27,28}

Grupo PA: $n = 8$, pacientes (cinco mujeres y tres hombres) con PI ≥ 5 mm en más de ocho dientes, tres de los cuales no eran incisivos ni primeros molares y que mostraron evidencia radiográfica de pérdida de hueso alveolar avanzada.^{27,28}

Se excluyeron del estudio a todos los sujetos fumadores, con enfermedades sistémicas sumadas, con prescripción o uso de antibióticos y/o antiinflamatorios en un periodo de tres meses anteriores al estudio; así como a individuos que presentaran enfermedades infecciosas como hepatitis, infección por virus de inmunodeficiencia adquirida y tuberculosis o que hayan estado en tratamiento con fenitoína, ciclosporina o bloqueadores de los canales de calcio; al igual que a mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

Recolección de suero y plasma

De todos los sujetos de estudio se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción venosa en tubos sin anticoagulante y en tubos con EDTA. Enseguida los tubos se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min y del tubo sin anticoagulante se obtuvo suero y del tubo con anticoagulante EDTA, el plasma. Tanto el suero como el plasma se recolectaron y se almacenaron a -80 °C hasta que se realizó el ensayo de ELISA.

Medición de IL-23Rs por inmunoensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA)

El IL-23Rs se midió a partir del suero y plasma por duplicado en los pocillos de microplacas para determinar las concentraciones de IL-23Rs ELISA kit (R & D Systems, Mineapolis MN). La absorbancia de cada pocillo fue leída a 450 nm en espectrofotómetro.

La concentración del IL-23Rs se calculó a partir de la curva estándar incluida en el kit de ensayo. Los controles para la variación de placa a placa también se usaron cuando era apropiado. Los resultados se expresaron como pg/mL del IL-23Rs en el plasma y suero de los sujetos de estudio.

Análisis estadístico

Los resultados de la concentración de IL-23 e IL-17Rs (pg/mL) en suero y plasma se presentan gráficamente como el promedio \pm la desviación estándar de los grupos estudiados. Se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de medias independientes de tres o más grupos y se observaron diferencias significativas. Posteriormente de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilks los resultados mostraron una distribución anormal. Finalmente, conforme a la anomalía de los datos, se aplicó una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para conocer las diferencias entre

las medias de SS, PC y PA. El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS v 22.0 para Windows.

RESULTADOS

IL-23Rs en suero y plasma

En el estudio que nos ocupa no se encontraron diferencias estadísticamente significativas del IL-23Rs en suero entre los SS ($3,665 \pm 1,025$), pacientes con PC ($5,246 \pm 752$) y pacientes con PA ($3,627 \pm 825$). Sin embargo, en plasma se detectó un aumento significativo del IL-23Rs en pacientes con PA ($11,558 \pm 3,100$) en comparación con los SS ($3,958 \pm 720$) con una $p = 0.031$. También se observó un aumento significativo del IL-23Rs en los pacientes con PC ($7,233 \pm 1,218$) en comparación con los SS ($3,958 \pm 720$) con una $p = 0.045$ (Figura 3).

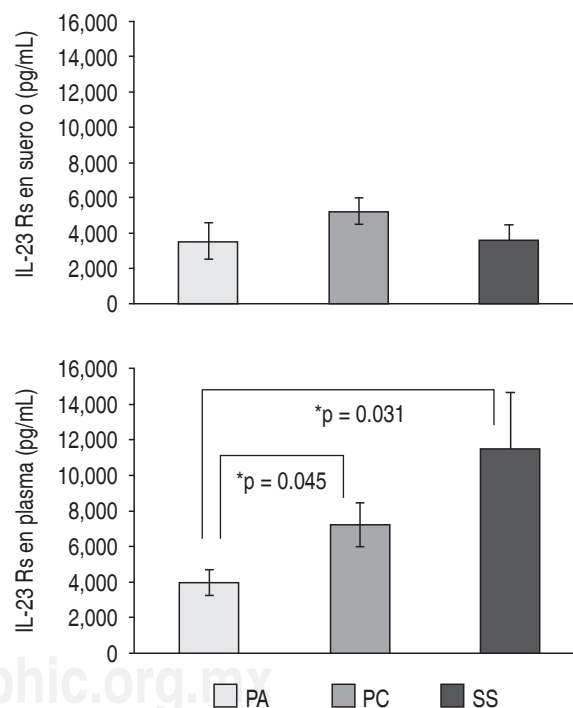


Figura 3. Niveles del IL-23Rs en pacientes con periodontitis crónica y agresiva. La concentración del receptor soluble a IL-23 (IL-23Rs) se midió en muestras de suero y plasma de pacientes con PC, PA y SS. Una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney demostró un aumento significativo del IL-23Rs en plasma de pacientes con PA y PC en comparación con los SS. * Niveles de significancia $p \leq 0.05$; PC = Periodontitis crónica; PA = Periodontitis agresiva, SS = Sujetos sanos.

DISCUSIÓN

Se ha estudiado la IL-23 e IL-17 en diferentes tipos de muestras de pacientes con periodontitis y se ha encontrado un aumento de ambas interleucinas en pacientes con periodontitis en comparación con SS,²⁰⁻²⁵ aunque los receptores a estas interleucinas, así como sus formas solubles no se han determinado en pacientes con periodontitis en comparación con SS. En este trabajo se determinó la concentración del IL-23Rs en el suero y plasma de pacientes con PC y PA en comparación de SS. Por otra parte, se ha demostrado que existen dos mecanismos para que se genere una porción soluble del IL-23R (IL-23Rs): 1) el IL-23Rs puede producirse por medio de corte y empalme alternativo y después es secretado en vesículas;⁸ 2) el IL-23R es escindido de las membranas celulares por proteasas como ADAM10 y ADAM17.⁹ El IL-23Rs puede unirse a la IL-23 intercelular formando un complejo (IL-23-IL-23Rs) para funcionar como estimulador de la activación de la célula Th17 a través del propio IL-23R unido a la membrana (IL-23-IL-23Rs-IL-23R). De forma antagónica el complejo IL-23-IL-23Rs puede funcionar como un bloqueador de la activación de las Th17 cuando no se une al IL-23R anclado a la membrana. Hasta el momento no se ha descrito qué es lo que determina que el complejo IL-23-IL-23Rs funcione como un estimulador o un bloqueador de la activación de las células Th17.^{8,9}

En la presente investigación se observó un aumento significativo del IL-23Rs en el plasma de pacientes con PA en comparación con SS y un incremento significativo de los pacientes con PC en comparación con los SS, lo que coincide con el aumento de la IL-23 en pacientes con periodontitis descrito por otros autores.^{23,24} También se conoce que hay un incremento de la IL-17 en pacientes con PC en comparación con SS.^{20,22,25} Probablemente el aumento de la IL-17 en la periodontitis se debe a la elevación del IL-23Rs que puede formar complejos con la IL-23 (IL-23R-IL-23Rs) y este complejo posee una función activadora en las células Th17 que participan en la destrucción del hueso en la periodontitis. De forma contraria, el complejo IL-23R-IL-23Rs puede tener una función inhibidora, debido a que se han detectado niveles bajos de la IL-17 en sujetos sanos en comparación con PC y PA²⁰⁻²⁴ aunado a estos hallazgos en los que se observaron bajos niveles del IL-23Rs en los SS en comparación con pacientes con PC y PA.

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas del IL-23Rs en el suero de los grupos de estudio. Cabe destacar que la diferencia entre el suero y el plasma radica en que en el suero se encuentran todos los factores de la coagulación incluyendo el fibrinógeno, en cambio en el plasma los factores de la coagulación quedan capturados por los anticoagulantes utilizados para la separación.²⁹ En este sentido, se ha descrito que existen discrepancias de los niveles de varias moléculas entre suero y plasma.^{29,30} También se observaron diferencias de los niveles del IL-23Rs entre suero y plasma. Probablemente en el coágulo que se forma en el tubo de recolección queden atrapadas algunas moléculas, entre ellas las citocinas y receptores, por lo que la concentración del IL-23Rs en el plasma se aprecia con un patrón diferente al del suero, aun cuando ambas son muestras sistémicas.

Estudios detallados de la función del IL-23Rs nos darán la pauta para conocer los mecanismos de activación de las Th17 y el papel que desempeñan en la patogenia de la periodontitis.

CONCLUSIONES

Existe un aumento del IL-23Rs en plasma de los pacientes con PC y PA en comparación con los SS. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas del IL-23Rs en suero entre los grupos de PC, PA y SS.

REFERENCIAS

1. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol*. 2005; 76 (12): 2187-3193.
2. Craig RG, Pernat AM, Pecoits-Filho R, Levin NW, Kotanko P. Periodontal diseases and systemic inflammation. *Seminars in Dialysis*. 2013; 26: 16-39.
3. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*. *Ann Periodontol*. 1999; 4 (1): 1-6.
4. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4th ed. Oxford, UK ; Malden, MA: Blackwell; 2003; XXIV: p. 1044.
5. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005; 366 (9499): 1809-1820.
6. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*. 2005; 6 (11): 1123-1132.
7. Abdi K, Singh NJ, Spooner E, Kessler BM, Radaev S, Lantz L et al. Free IL-12p40 monomer is a polyfunctional adaptor for generating novel IL-12-like heterodimers extracellularly. *J Immunol*. 2014; 92 (12): 6028-6036.

8. Kan SH, Mancini G, Gallagher G. Identification and characterization of multiple splice forms of the human interleukin-23 receptor alpha chain in mitogen-activated leukocytes. *Genes Immun.* 2008; 9 (7): 631-639.
9. Franke M, Schroder J, Monhasery N, Ackfeld T, Hummel TM, Rabe B et al. Human and Murine Interleukin 23 Receptors Are Novel Substrates for A Disintegrin and Metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *J Biol Chem.* 2016; 91 (20): 10551-1061.
10. Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR et al. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature immunology.* 2011; 12 (3): 247-254.
11. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature.* 2010; 467 (7318): 967-971.
12. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19 (6): 652-657.
13. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014; 35 (1): 3-11.
14. Ruggeri RM, Saitta S, Cristani M, Giovinazzo S, Tigano V, Trimarchi F et al. Serum interleukin-23 (IL-23) is increased in Hashimoto's thyroiditis. *Endocr J.* 2014; 61 (4): 359-363.
15. Yilmaz SB, Cicek N, Coskun M, Yegin O, Alpsoy E. Serum and tissue levels of IL-17 in different clinical subtypes of psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2012; 304 (6): 465-469.
16. Przepiera-Będzak H, Fischer K, Brzosko M. Serum IL-6 and IL-23 Levels and Their Correlation with Angiogenic Cytokines and Disease Activity in Ankylosing Spondylitis, Psoriatic Arthritis, and SAPHO Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 785705.
17. Xia LP, Li BF, Shen H, Lu J. Interleukin-27 and interleukin-23 in patients with systemic lupus erythematosus: possible role in lupus nephritis. *Scand J Rheumatol.* 2015; 4(3):200-5.
18. van Baarsen LG, Lebre MC, van der Coelen D, Aarass S, Tang MW, Ramwadhoebe TH et al. Heterogeneous expression pattern of interleukin 17A (IL-17A), IL-17F and their receptors in synovium of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis: possible explanation for nonresponse to anti-IL-17 therapy? *Arthritis Res Ther.* 2014; 16 (4): 426.
19. Gumus P, Buduneli E, Bykoğlu B, Aksu K, Saraç F, Nile C et al. Gingival crevicular fluid, serum levels of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and interleukin 17 in patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis and with periodontal disease. *J Periodontol.* 2013; 84 (11): 1627-1637.
20. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (4): 369-374.
21. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta VM, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (4): 383-389.
22. Vernal R, Dutzan N, Hernández M, Chandia S, Puente J, León R et al. High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol.* 2006; 77 (10): 1772-1780.
23. Himani GS, Prabhuji ML, Karthikeyan BV. Gingival crevicular fluid and interleukin-23 concentration in systemically healthy subjects: their relationship in periodontal health and disease. *J Periodontol Res.* 2014; 49 (2): 237-245.
24. Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *Journal of periodontology.* 2007; 78 (8): 1545-1550.
25. Cifcibasi E, Koyuncuoglu C, Ciblak M, Badur S, Kasali K, Firatli E et al. Evaluation of Local and Systemic Levels of Interleukin-17, Interleukin-23, and Myeloperoxidase in Response to Periodontal Therapy in Patients with Generalized Aggressive Periodontitis. *Inflammation.* 2015; 38 (5): 1959-1968.
26. Cantín M. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial: Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Revisando su última versión. *Int J Med Surg Sci.* 2013; 1 (4): 339-346, 2014.
27. Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol.* 1967; 38: 610-616.
28. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC et al. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol.* 2010; 81 (7): 1056-1063.
29. Rosenberg-Hasson Y, Hansmann L, Liedtke M, Herschmann I, Maecker HT. Effects of serum and plasma matrices on multiplex immunoassays. *Immunol Res.* 2014; 58 (2-3): 224-233.
30. Lee JE, Kim JW, Han BG, Shin SY. Impact of whole-blood processing conditions on plasma and serum concentrations of cytokines. *Biopreserv Biobank.* 2016; 14 (1): 51-55.

Correspondencia:

Dra. en. C. Celia Guerrero-Velázquez

Profesor Docente con funciones de Investigación de Tiempo completo
Universidad de Guadalajara
Manuel R. Alatorre Núm. 3246, Casa 81,
Col. Jardines de los Poetas, 44800,
Guadalajara, Jal. México.
Tel: 01(33) 10994182, Cel: 3310050480
E-mail: celiagv2001@yahoo.com.mx