

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS
MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA**



**EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN CON LOS DISTINTOS SEROTIPOS DE
PORPHYROMONAS GINGIVALIS Y *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS EN LA ACTIVIDAD DE LOS LINFOCITOS TCD4⁺ Y LA
REABSORCIÓN ÓSEA *IN VITRO***

Samanta Azucena Melgar Rodríguez

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

TUTOR PRINCIPAL
Rolando Vernal Astudillo

TUTORES ASOCIADOS
Marcela Hernández Ríos
Alejandro Escobar Álvarez

**Santiago - Chile
2014**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata

Samanta Azucena Melgar Rodríguez

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Periodontología en examen rendido el martes 19 de Agosto del 2014

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Irene Morales Bozo

Prof. Dra. Andrea Paula Lima

Prof. Dr. Jorge Gamonal Aravena

“Hay, hermanos, muchísimo que hacer”

César Vallejo “Los nueve monstruos”

DEDICATORIA

A mis padres Azucena y Edmundo: Por ser ese apoyo constante y sin descanso, que aunque la distancia sea un obstáculo, las enseñanzas siempre estuvieron presentes, por ser ejemplo de camino y vida para seguir adelante con mis ideales y sueños y por simplemente ser las personas que me trajeron al mundo, para que el día de hoy les pueda decir GRACIAS MAMÁ y PAPÁ.

A mi Gianina y Marcial: Por ser mis hermanos y confidentes en todo momento, por ser parte importante de mi crecimiento y por poner toda la confianza en mis capacidades.

A mi querido Jaime: Gracias por darme el “empujón” para seguir adelante, gracias porque cada vez que estaba cayendo venias a levantarme, gracias por animarme a confiar en mis habilidades y gracias por ser el mejor amigo, compañero, colega y esposo.

A Rolando: Por ser el profesor que alienta en todo momento, por confiar en mis habilidades aunque yo no las vea y por creer que seré la mejor investigadora.

A Marcel: Por ser mi fuente de inspiración desde el momento que decidí seguir esta carrera. Gracias porque siempre estuviste, estas y estarás presente en toda mi vida profesional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de forma especial a Carla, Álvaro, Gustavo, Pía y Matías que son una parte fundamental del laboratorio, ya que son de una valiosa ayuda.

Además, quiero agradecer a Andrea, que con el apoyo que nos ofreció en todo momento, se pudo obtener un trabajo pulcro y eficiente. De igual forma, a Pablo, Leslie y Jocelyn por siempre tener las puertas abiertas y ofrecerme su ayuda para poder concluir este trabajo.

A mi familia, mis amigos peruanos y chilenos porque siempre confiaron que podía lograr este objetivo.

Y finalmente, a mi querido Perú, que como dijo Mario Vargas Llosa: “Al Perú yo lo llevo en las entrañas porque en él nací, crecí, me formé, y viví aquellas experiencias de niñez y juventud que modelaron mi personalidad, fraguaron mi vocación, y porque allí amé, odié, gocé, sufrí y soñé.”

ÍNDICE

1. ABREVIACIONES	8
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	9
3. RESUMEN	10
4. INTRODUCCIÓN	12
4.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	13
4.2 Linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg	15
4.3 Reabsorción ósea	17
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
6. HIPÓTESIS	20
7. OBJETIVO GENERAL	21
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
9. MATERIALES Y MÉTODOS	22
9.1 Selección de los sujetos	22
9.2 Diagnóstico de la condición periodontal	22
9.3 Obtención de la muestra biológica	23
9.4 Purificación de los monocitos	23
9.5 Diferenciación de los monocitos a células dendríticas	23
9.6 Purificación de linfocitos TCD4 ⁺ naïve	24
9.7 Purificación de linfocitos TCD4 ⁺ memoria	24
9.8 Cultivos de <i>P. gingivalis</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i>	25
9.9 Curvas de crecimiento bacteriano	25
9.10 Estimulación de las células dendríticas	26
9.11 Estimulación de los linfocitos TCD4 ⁺ naïve	26
9.12 Análisis del fenotipo celular	26
9.13 Extracción de RNA citoplasmático total	27
9.14 Síntesis de la primera cadena de cDNA	28
9.15 Análisis de la expresión de RANKL y factores de transcripción	28

<i>9.16 Análisis de la secreción de RANKL</i>	29
<i>9.17 Análisis de frecuencia de respuesta de linfocitos T de memoria</i>	29
<i>9.18 Activación de osteoclastos TRAP⁺</i>	29
<i>9.19 Análisis de los datos</i>	30
10. RESULTADOS	31
<i>10.1 Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas</i>	31
<i>10.2 Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve</i>	31
<i>10.3 Activación de células dendríticas</i>	32
<i>10.4 Activación de linfocitos TCD4⁺ naïve</i>	33
<i>10.5 Niveles de expresión y secreción de RANKL en linfocitos TCD4⁺ naïve</i>	34
<i>10.6 Niveles de expresión de los factores de transcripción en linfocitos TCD4⁺ naïve</i>	35
<i>10.7 Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción y de secreción de RANKL</i>	36
<i>10.8 Niveles de activación de osteoclastos mediante la secreción de TRAP⁺</i>	38
<i>10.9 Frecuencia de proliferación de linfocitos T de memoria</i>	39
11. DISCUSIÓN	41
12. CONCLUSIONES	46
13. REFERENCIAS	47
14. ANEXOS	54
<i>14.1 Consentimiento informado</i>	54
<i>14.2 Diagnóstico de la condición periodontal</i>	58
<i>14.3 Resúmenes de presentaciones a congresos nacionales e internacionales</i>	59
<i>14.4 Distinción</i>	60
<i>14.5 Publicación ISI</i>	61

1. ABREVIACIONES

Th: Linfocito **T** helper.

Treg: Linfocito **T** regulador.

LPS: Lipopolisacárido.

TCD4⁺: Linfocito **T CD4** positivo.

TRAP⁺: Fosfatasa **á**cida **r**esistente a **t**artrato.

RANK: **R**ecceptor **a**ctivador del factor **n**uclear **k**appa B.

RANKL: **L**igando del **r**ecceptor **a**ctivador del factor **n**uclear **k**appa B.

OPG: **O**steoprotegerina.

NF-κB: **F**actor **n**uclear **k**appa **B**.

IL: **I**nterleuquina.

IFN: **I**nterferón.

TNF: **F**actor de **n**ecrosis **t**umoral.

TGF-β1: **F**actor de **c**recimiento **t**umoral-**β**1.

TLR: **R**ecceptor tipo **T**oll.

CD: **G**rupos de **d**iferenciación.

PBMCs: **C**élulas **p**eriféricas **m**ononucleares.

RPMI: **R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute.

PE: **F**icoeritrina.

FITC: **I**sotiocianato de **F**luoresceína.

PE/Cy5: **F**icoeritrina/**C**ianina**5**.

PBS: **T**ampón de **f**osfato **s**alino.

GM-CSF: **F**actor **e**stimulante de **c**olonias de **g**ranulocitos y **m**onocitos.

MOI: **M**ultiplicidad **i**nfectante **i**ncremental.

UFC: **U**nidades **f**ormadoras de **c**olonias.

PCR: **R**eacción en **c**adena de la **p**olimerasa.

ELISA: **E**nsayo por **i**mmuno-**a**bsorción **l**igado a **e**nzimas.

2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1.</i>	<i>pág. 31</i>
<i>Figura 2.</i>	<i>pág. 32</i>
<i>Figura 3a.</i>	<i>pág. 32</i>
<i>Figura 3b.</i>	<i>pág. 33</i>
<i>Figura 4.</i>	<i>pág. 33</i>
<i>Figura 5.</i>	<i>pág. 34</i>
<i>Figura 6a.</i>	<i>pág. 35</i>
<i>Figura 6b.</i>	<i>pág. 36</i>
<i>Figura 7a.</i>	<i>pág. 37</i>
<i>Figura 7b.</i>	<i>pág. 37</i>
<i>Figura 8.</i>	<i>pág. 38</i>
<i>Figura 9.</i>	<i>pág. 40</i>
<i>Tabla 1.</i>	<i>pág. 28</i>

3. RESUMEN

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa cuya causa es la biopelícula subgingival. Esta biopelícula está conformada por una amplia variedad de bacterias *Gram*-negativas anaerobias, entre ellas, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sobre la base de la antigenicidad de la cápsula de *P. gingivalis* y del lipopolisacárido de *A. actinomycetemcomitans* se describen distintos serotipos bacterianos y se ha demostrado que entre estos distintos serotipos existe una potencialidad inmunogénica distinta en los linfocitos TCD4⁺. En particular, ante los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se describe un patrón de respuesta predominantemente tipo Th1 y Th17.

En este estudio, linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos fueron activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos K1-K6 de *P. gingivalis* o a-c de *A. actinomycetemcomitans*. Ante los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* se detectaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* (Th1) y *RORC2* (Th17), de secreción de RANKL y de diferenciación de osteoclastos TRAP⁺ en comparación a los otros serotipos bacterianos. Ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detectaron mayores niveles de expresión de *T-bet* y *RORC2* y de secreción de RANKL en comparación a los serotipos a o c. Además, se analizó la frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria obtenidos de pacientes con periodontitis y se detectó mayor respuesta ante los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o b de *A. actinomycetemcomitans*.

Estos resultados confirman que los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o b de *A. actinomycetemcomitans* inducen un patrón de respuesta inmune predominantemente tipo Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteo-destructivo). Este patrón de respuesta Th1/Th17 se asoció a un incremento en la diferenciación de osteoclastos TRAP⁺ mediada por la producción de mayores niveles de RANKL. Finalmente, la mayor frecuencia de proliferación de linfocitos T de memoria ante los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o b de *A. actinomycetemcomitans* permite especular su participación durante la patogenia de la periodontitis, reflejada por la inducción de memoria inmunológica antígeno-específica.

En conclusión, se demuestran diferencias en la respuesta de los linfocitos TCD4⁺ ante los distintos serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* y una mayor asociación de los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o b de *A. actinomycetemcomitans* a los fenómenos celulares y moleculares que explican la reabsorción ósea característica de las periodontitis.

4. INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa cuya causa principal son las bacterias patógenas que residen en la biopelícula subgingival (Armitage, 1999). Aunque estas bacterias pueden provocar daño directo a los tejidos de inserción de los dientes, la principal causa de la destrucción tisular es la respuesta inmune del hospedero que se induce ante ellas (Teng, 2003). Durante esta respuesta inmune, en los tejidos periodontales se produce un incremento en la producción de mediadores pro-inflamatorios, citoquinas, quimioquinas, metaloproteinasas de matriz (MMPs) y factores osteo-destructivos, los que determinan la destrucción del ligamento periodontal y la reabsorción del hueso alveolar que finalmente lleva a la pérdida de los dientes (Listgarten, 1986, Tonetti et al., 2005, Garlet, 2010, Hernandez et al., 2011, Di Benedetto et al., 2013).

Porphyromonas gingivalis y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se han definido como los agentes etiológicos principales de las periodontitis crónica y agresiva (Socransky et al., 2002). Distintos serotipos bacterianos se describen sobre la base de la antigenicidad de las cadenas de polisacáridos componentes de la cápsula extracelular de *P. gingivalis* y del O-polisacárido componente del lipopolisacárido (LPS) de *A. actinomycetemcomitans*. La frecuencia de detección de los distintos serotipos de *P. gingivalis* (K1-K6) y *A. actinomycetemcomitans* (a-f) varía según el estado clínico periodontal del sujeto, según su localización geográfica e, inmunológicamente, inducen una respuesta diferente en distintas células del hospedero (Zambon et al., 1983b).

En linfocitos TCD4⁺ activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los diferentes serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* se evidenciaron niveles variables de expresión de citoquinas (Vernal et al., 2008b, Vernal et al., 2009, Díaz-Zúñiga et al., 2014). En particular, los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* indujeron un incremento en los niveles de producción de citoquinas asociadas a un patrón de respuesta tipo T colaboradora (del inglés *T helper*, Th) 1 y Th17, en comparación a los otros serotipos bacterianos.

Los linfocitos TCD4⁺ son determinantes clave de la patogénesis de las periodontitis y el patrón de citoquinas pro-inflamatorias y osteo-destructivas que ellos producen define el fenotipo

clínico de la enfermedad. Una respuesta tanto tipo Th1 como Th17 se ha asociado al inicio y progresión de las periodontitis y una respuesta tipo Th2 y/o T reguladora (Treg) se ha vinculado a la remisión de la enfermedad (Gemmell et al., 2007). En términos generales, los linfocitos Th1 secretan citoquinas que condicionarán un ambiente inflamatorio local y los linfocitos Th17 secretan citoquinas que determinarán la reabsorción ósea durante las periodontitis (Taubman et al., 2001), por lo tanto, ambos fenotipos linfocitarios podrían asociarse directa o indirectamente a la reabsorción ósea alveolar producida durante las periodontitis.

4.1 *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

P. gingivalis es una bacteria pequeña, mótil, Gram-negativa, anaerobia estricta y sacarolítica, miembro del género *Porphyromonas* que pertenece a la familia de *Bacteroidaceae* (Holt et al., 1999). En cultivo, crece formando colonias convexas, lisas y brillantes de 1 a 2 mm de diámetro, con un color oscuro debido a la producción de protohemo (complejos quelatos con alto contenido de Fe²) (White et al., 1981).

P. gingivalis expresa diversos factores de virulencia, entre ellos, produce una cápsula extracelular compuesta de polisacáridos cargados negativamente (Schifferle et al., 1989). Sobre la base de la antigenicidad de los polisacáridos capsulares (K), se describen seis serotipos bacterianos diferentes: K1-K6 (van Winkelhoff et al., 1993, Laine et al., 1996, Laine et al., 1997, Laine et al., 1998), los que se distribuyen de manera diferente entre los pacientes afectados de periodontitis y los sujetos sanos (Dzink et al., 1988).

Los distintos serotipos de *P. gingivalis* interactúan y producen respuestas diferentes en diversas células del hospedero. En efecto, el serotipo K4 se adhiere más eficazmente a las células epiteliales de los sacos periodontales (Dierickx et al., 2003), los serotipos K1 y K2 tienen una mayor resistencia a la fagocitosis y destrucción por neutrófilos (Sundqvist et al., 1991) y el serotipo K1 induce una mayor expresión y secreción de citoquinas y quimioquinas en macrófagos murinos (Cutler et al., 1999), mayor producción de citoquinas en células dendríticas (Vernal et al., 2008b) y un patrón de respuesta tipo Th1 y Th17 en linfocitos TCD4⁺ naïve (Vernal et al., 2014), en comparación a los otros serotipos.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es un cocobacilo Gram-negativo, pequeño, no mótil, anaerobio facultativo, microaerofílico y capnofílico (Henderson et al., 2002), miembro del género *Aggregatibacter* perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Norskov-Lauritsen et al., 2006). En cultivo, las colonias tienen forma circular aplanada con borde festoneado, generalmente con una forma de estrella central (Fine et al., 1999).

Diversos factores de virulencia se han descrito en *A. actinomycetemcomitans*, entre ellos el LPS, que compone cerca del 75% de su membrana externa y es esencial para la mantención de la integridad celular (Shimada et al., 2008). Está conformado por un lípido A, una cadena central de oligosacáridos y un O-polisacárido, principal inductor de la respuesta inmune del hospedero (Holt et al., 1980). Sobre la base de la antigenicidad del O-polisacárido, en *A. actinomycetemcomitans* se describen 6 serotipos bacterianos diferentes: a-f (King et al., 1962, Zambon et al., 1983b, Zambon et al., 1983a, Gmur et al., 1993, Kaplan et al., 2001).

Los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* detectados más frecuentemente en la cavidad oral en humanos son a, b y c, siendo el serotipo b el detectado con mayor frecuencia en pacientes afectados de periodontitis agresiva (Asikainen et al., 1991). Además, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se ha asociado a una inducción de respuesta más potente en distintas células de la inmunidad innata del hospedero. En efecto, el serotipo b inhibe la proliferación de células epiteliales gingivales e incrementa en ellas los niveles de expresión de interleuquina (IL)-8 y de la molécula de adhesión intracelular (ICAM)-1 en comparación con los serotipos a o c (Shimada et al., 2008). Además, su LPS induce mayores niveles de secreción de IL-1 β en macrófagos murinos (Takahashi et al., 1991) y una mayor resistencia a la fagocitosis y destrucción por neutrófilos (Yamaguchi et al., 1995) en comparación al LPS de los otros serotipos bacterianos. Finalmente, el serotipo b produce mayor número de micro-vesículas citotóxicas recubiertas de LPS que invaden los tejidos periodontales (Asikainen et al., 1991), estimula a las células dendríticas a producir mayores niveles de citoquinas (Vernal et al., 2008b) y en linfocitos TCD4⁺ produce un incremento en la expresión de factores de transcripción y secreción de citoquinas asociadas a un patrón de respuesta tipo Th1 y Th17 (Díaz-Zúñiga et al., 2014), en comparación a los otros serotipos.

La variable inmunogenicidad detectada en diferentes células del hospedero entre los distintos serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* podría determinar diferencias en su rol etiopatogénico durante las periodontitis; sin embargo, los mecanismos asociados a esta potencial variable patogenicidad no se han descrito claramente.

4.2 Linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg

La respuesta inmune del hospedero, en particular el fenotipo y función de los linfocitos TCD4⁺, es un factor determinante del inicio, progresión y severidad de las periodontitis (Hourihaddad et al., 2007). Diversos estudios han establecido que los periodonto-patógenos son capaces de inducir una respuesta inmune linfocitaria particular y, en este sentido, la presencia de un serotipo bacteriano más inmunogénico dentro de una especie particular podría determinar un tipo de respuesta linfocitaria más patogénica (Kaplan et al., 2001).

Luego de la presentación antigénica mediada por las células presentadoras de antígenos, tal como las células dendríticas periodontales, los linfocitos TCD4⁺ *naïve* se activan, proliferan y diferencian selectivamente en 4 tipos efectoros distintos: Th1, Th2, Th17 y Treg (Abbas et al., 1996). La diferenciación del fenotipo Th1 está determinada por la expresión del factor de transcripción *T-bet* (Seder et al., 1994), el fenotipo Th2 por la expresión del factor de transcripción *GATA-3* (Amano et al., 2004), la diferenciación del fenotipo Th17 por la expresión del factor de transcripción *RORC2* (Harrington et al., 2006) y el fenotipo Treg por la expresión del factor de transcripción *Foxp3* (Vernal et al., 2008a).

Los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg secretan distintos patrones de citoquinas que determinan su función durante las periodontitis. El fenotipo Th1 se caracteriza por la secreción de IL-1 β , IL-12, interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α y TNF- β , responsables de una respuesta pro-inflamatoria, el fenotipo Th2 secreta IL-4, IL-5 e IL-13, asociados a una respuesta moduladora de la inflamación (Seder et al., 1994), el fenotipo Th17 se caracteriza por la secreción de IL-6, IL-17, IL-21, IL-23 y el ligando del receptor activador nuclear *kappa* B (RANKL), considerándose un fenotipo pro-inflamatorio y osteo-destructivo al estimular la diferenciación y activación de los osteoclastos (Harrington et al., 2006), y el fenotipo Treg se

caracteriza por la secreción de IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 que cumplen un rol inmuno-regulador (Reiner, 2007).

En los tejidos periodontales afectados de periodontitis se describe un patrón de respuesta linfocitario predominantemente tipo Th1 y Th17. En modelos animales, se produce mayor secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-12 en los tejidos afectados de periodontitis (Baker et al., 1999) y en humanos, se produce un incremento en los niveles de IFN- γ , IL-17, *T-bet* y *RORC2* en las lesiones periodontales activas (Dutzan et al., 2009b). Similarmente, en pacientes afectados de periodontitis crónica, mayores niveles de IL-1 β , IL-8, IL-17, RANKL y RANTES se detectan en el fluido gingival crevicular y mayores niveles de IL-17, IL-23, TNF- α y RANKL son producidos por fibroblastos gingivales (Takahashi et al., 2005, Zhu et al., 2011, Baek et al., 2013).

Los linfocitos Th1 se asocian a la inflamación y osteo-destrucción local (Baker et al., 1999). Cuando *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* son detectados en las lesiones periodontales, se asocian con mayores niveles locales de IL-1 β e IFN- γ (Baker et al., 1999). En este contexto, elevados niveles de IFN- γ provocan un incremento en la expresión de TNF- α , IL-1 β y RANKL y, de esta forma, la inducción indirecta de la diferenciación y activación de osteoclastos y la consecuente reabsorción del hueso alveolar (Garlet, 2010).

Los linfocitos Th17 se han asociado con diversas enfermedades osteo-destructivas de carácter crónico, tal como las periodontitis (Vernal et al., 2006b) y se ha correlacionado la producción de sus citoquinas fenotipo-específicas con la progresión de la destrucción periodontal (Takahashi et al., 2005). RANKL cumple un rol fundamental en la modulación fisiológica y patológica de la reabsorción ósea (Walsh et al., 2003) y se ha establecido que los linfocitos Th17 inducen la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea directamente mediante la secreción de RANKL (Taubman et al., 2001).

En conjunto, los linfocitos Th1 y Th17 secretan las citoquinas osteo-activas que incrementan indirectamente y directamente los niveles de secreción de RANKL en los tejidos periodontales infectados, en particular por la inducción de fibroblastos, osteoblastos y pre-osteoclastos, y, en este escenario, se induce la diferenciación y activación de osteoclastos y se produce la reabsorción del hueso alveolar (Taubman et al., 2001).

4.3 Reabsorción ósea

La homeostasis del tejido óseo depende del equilibrio entre la reabsorción y formación ósea mediadas por osteoclastos y osteoblastos. En condiciones fisiológicas, el principal factor regulador de la actividad de los osteoclastos es RANKL. Las periodontitis se caracterizan por la destrucción del hueso alveolar que rodea a los dientes y esta destrucción se asocia a incrementos en la producción de RANKL, IL-6, IL-17 y la expresión del factor de transcripción *RORC2*, característico de los linfocitos Th17 (Vernal et al., 2006a, Cardoso et al., 2009, Garlet, 2010, Hernandez et al., 2011, Di Benedetto et al., 2013). En efecto, se han observado incrementos en los niveles de RANKL e IL-17 en pacientes con periodontitis tanto crónicas como agresivas asociados a la actividad de los linfocitos Th1 y/o Th17 (Vernal et al., 2005, Dutzan et al., 2009a, Dutzan et al., 2009b, Schenkein et al., 2010).

Diferentes estudios han analizado los niveles de RANKL y osteoprotegerina (OPG), su regulador biológico natural, en los tejidos periodontales de pacientes con periodontitis y sujetos sanos. En general, existe un aumento en la razón RANKL/OPG en periodontitis en comparación a la salud periodontal y una disminución luego del tratamiento periodontal (Taubman et al., 2001). Entre las células que expresan y secretan RANKL se describen los osteoblastos, fibroblastos y linfocitos Th17. Los osteoblastos reconocen el LPS bacteriano mediante el receptor tipo *Toll* (TLR)1, TLR2, TLR4 y TLR6 y, mediante el complejo NEMO-IKK α -IKK β , activan la vía de señalización NF- κ B incrementando los niveles de expresión de RANKL (Matsumoto et al., 2012). Los fibroblastos expresan bajas concentraciones de RANKL en condiciones fisiológicas e incrementan su secreción luego del reconocimiento de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* en condiciones patológicas (Takahashi et al., 2005). Los linfocitos Th17 promueven la osteoclastogénesis en forma directa mediante la producción de RANKL y los linfocitos Th1 en forma indirecta mediante la producción de citoquinas que inducen la síntesis de RANKL en osteoblastos y fibroblastos (Vernal et al., 2008a). Durante la activación de los osteoclastos, RANKL induce la expresión de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), MMPs y catepsina K, determinando un aumento en su actividad osteo-destructiva (Udagawa et al., 1989). En efecto, la expresión de TRAP es utilizada como un marcador específico de osteoclastos maduros en ensayos *in vitro* de reabsorción ósea (Hallen, 2003).

En términos generales, la asociación entre los linfocitos Th1 y Th17 con los osteoclastos es determinada por la secreción de sus citoquinas fenotipo-específicas que inducen la diferenciación de sus precursores y la activación de los osteoclastos diferenciados (Vernal et al., 2008a). Así, durante las periodontitis, se ha observado que los mayores niveles de RANKL se asocian a la progresión de la enfermedad y a la presencia de los factores de transcripción *T-bet* (Th1) y *RORC2* (Th17) (Kawai et al., 2006).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

P. gingivalis y *A. actinomycetemcomitans* son bacterias patógenas asociadas a la etiología de las periodontitis (Socransky et al., 2002). Entre los factores de virulencia que expresan, los polisacáridos capsulares de *P. gingivalis* y el LPS de *A. actinomycetemcomitans* cumplen un rol importante en su patogenicidad y sobre la base de su antigenicidad se describen distintos serotipos (King et al., 1962). Los polisacáridos capsulares y el O-polisacárido expresados por *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, respectivamente, desencadenan la respuesta inmune del hospedero alterando el equilibrio entre la reabsorción y aposición ósea (Kong et al., 1999). En este sentido, existe una asociación entre el estado periodontal del sujeto y los niveles de anticuerpos séricos bacteria-específicos, sugiriendo su participación en la inducción de la inmunidad innata y adaptativa durante la progresión de la enfermedad (Ebersole et al., 1982).

Los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detectan con mayor frecuencia en las lesiones periodontales de pacientes con periodontitis e inducen una respuesta de mayor intensidad en distintas células de la inmunidad innata del hospedero en comparación a los otros serotipos bacterianos, lo que sugiere un mayor potencial patogénico que podría asociarse a una mayor inmunogenicidad en linfocitos TCD4⁺ naïve y de memoria (Vernal et al., 2008b, Vernal et al., 2009, Vernal et al., 2014, Díaz-Zúñiga et al., 2014). En las células dendríticas, los diferentes serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* inducen diferencias cualitativas y cuantitativas en la síntesis de citoquinas (Jotwani et al., 2004) y, en linfocitos TCD4⁺ naïve, los serotipos de K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* inducen mayor diferenciación y actividad de los linfocitos Th1 y Th17, determinantes de una respuesta pro-inflamatoria y osteo-destructiva periodontal (Vernal et al., 2014).

En términos generales, los serotipos de K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* podrían asociarse a una mayor activación de osteoclastos TRAP⁺ y posterior reabsorción ósea, los que se producirían por un incremento en la actividad de linfocitos Th17 RORC2⁺ mediante la secreción de RANKL. Además, podrían generar un incremento en la memoria inmunológica durante las periodontitis, evidenciándose con mayores niveles de activación de linfocitos TCD4⁺ de memoria específicos ante los antígenos de estos serotipos bacterianos.

6. HIPÓTESIS

Los serotipos K1 o K2 de *Porphyromonas gingivalis* o b de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inducen mayor producción de RANKL y expresión de *T-bet* y *RORC2* en linfocitos TCD4⁺ *naïve* en comparación a los otros serotipos bacterianos y estos mayores niveles se asocian a una mayor activación de osteoclastos TRAP⁺. Además, estos serotipos bacterianos inducen un incremento en la frecuencia de proliferación en linfocitos TCD4⁺ de memoria, obtenidos de pacientes con periodontitis en comparación a los de sujetos sanos.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar la producción de RANKL y la expresión de *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* en linfocitos TCD4⁺ *naïve* al ser estimulados con los distintos serotipos de *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y establecer su asociación con la activación de osteoclastos TRAP⁺. Además, determinar la frecuencia de proliferación en linfocitos TCD4⁺ de memoria obtenidos de pacientes con periodontitis y sujetos sanos al ser estimulados con los distintos serotipos.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles de expresión y secreción de RANKL en linfocitos TCD4⁺ *naïve* estimulados con los serotipos K1 a K6 de *P. gingivalis* o a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.
2. Cuantificar los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* en linfocitos TCD4⁺ *naïve* estimulados con los serotipos K1 a K6 de *P. gingivalis* o a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* y asociarlos con los niveles secretados de RANKL.
3. Cuantificar la activación de osteoclastos TRAP⁺ inducida por linfocitos TCD4⁺ *naïve* estimulados con los serotipos K1 a K6 de *P. gingivalis*.
4. Cuantificar la frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria obtenidos de pacientes con periodontitis y sujetos sanos al ser estimulados con los serotipos K1 a K6 de *P. gingivalis* o a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Selección de los sujetos

Para los experimentos que involucraron la purificación y estimulación de linfocitos TCD4⁺ naïve, se seleccionaron mediante el método no probabilístico por conveniencia 18 sujetos sanos donantes de plaquetas que concurren al Banco de Sangre de los Hospitales Dr. Luis Calvo Mackenna o Del Salvador, pertenecientes al Servicio de Salud Metropolitano Oriente. Para los experimentos que involucraron la purificación y estimulación de linfocitos T de memoria, se seleccionaron mediante el método no probabilístico de casos consecutivos 10 sujetos sanos y 10 afectados de periodontitis crónica asistentes a la Clínica de Periodoncia y de Prótesis Fija de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los individuos seleccionados no tenían antecedentes de tratamiento periodontal en los 6 meses previos al estudio, no tenían alguna enfermedad distinta a periodontitis, por ejemplo diabetes, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, SIDA, cáncer o enfermedades cardiovasculares, no ingirieron antibióticos durante los 3 meses previos a su selección y, en caso de ser mujer, no estaban embarazadas. El protocolo de investigación se explicó a todos los participantes del estudio, quienes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y de CONICYT (Anexos).

9.2 Diagnóstico de la condición periodontal

A todos los sujetos se les realizó un examen clínico periodontal utilizando una sonda periodontal manual (UNC 15, HuFriedy, Chigaco, IL, USA) y evaluando los siguientes parámetros clínicos: profundidad al sondaje (PS), nivel de inserción clínica (NIC), sangrado al sondaje (BOP) e índice de higiene (IH) registrados en 6 sitios periodontales por diente: mesio-vestibular, medio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, medio-lingual y disto-lingual (Herrera et al., 2008). El diagnóstico de periodontitis crónica se realizó cuando los pacientes tenían 3 ó más sitios periodontales con $PS \geq 5$ mm y $NIC \geq 2$ mm y evidencia radiográfica de reabsorción ósea, siguiendo los criterios establecidos en el Consenso de Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales realizado por la Academia Americana de

Periodontología (Armitage, 1999, Gajardo et al., 2005). El diagnóstico de salud periodontal se realizó ante la ausencia de signos clínicos de enfermedad periodontal (Anexos).

9.3 Obtención de la muestra biológica

En los sujetos donantes sanos, se purificaron los monocitos y linfocitos TCD4⁺ *naïve* a partir de 10 mL de sangre periférica obtenida de los filtros de leuco-reducciones durante el proceso de plaquetoféresis. En los pacientes con periodontitis y salud periodontal, se purificaron los monocitos y linfocitos TCD4⁺ de memoria a partir de 40 mL de sangre venosa obtenida mediante punción braquial mediante métodos estándar.

9.4 Purificación de los monocitos

Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas mediante un gradiente de Ficoll[®] de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Ficoll-Paque Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Los monocitos se purificaron a partir de las PBMCs mediante separación inmuno-magnética (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany). Para ello, las PBMCs se lavaron 2 veces en amortiguador fosfato salino (PBS) y posteriormente se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD14 humano conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 10 min a 4°C. Luego de ser lavadas, las células se resuspendieron en PBS a 4°C y los monocitos se purificaron usando columnas de separación MS montadas en un campo magnético. La fracción de células CD14⁺ purificadas corresponden a los monocitos, los que se contabilizaron usando una cámara de Neubauer[®] y se analizaron en relación a su viabilidad determinando el porcentaje de células que incorporaron el pigmento azul de Tripán, para finalmente confirmar su fenotipo celular usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.5 Diferenciación de los monocitos a células dendríticas

Los monocitos purificados se sometieron inmediatamente a un protocolo estandarizado de diferenciación *in vitro* a células dendríticas (Vernal et al., 2008b, Vernal et al., 2009, Díaz-

Zúñiga et al., 2014). Brevemente, los monocitos CD14⁺ fueron cultivados por 6 días a una concentración de 0,7x10⁶ células/mL en 3 mL medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) y 20 ng/mL del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-4 (R&D, Minneapolis, MN USA), a 37°C y 5% de CO₂. El fenotipo celular se confirmó usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.6 Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve

Los linfocitos TCD4⁺ naïve se purificaron para realizar los experimentos de determinación de los niveles de secreción y expresión de RANKL, expresión de *T-bet* (Th1), *GATA-3* (Th2), *RORC2* (Th17) y *Foxp3* (Treg) y activación de osteoclastos, utilizando un *kit* de depleción celular específico de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MACS; Miltenyi Biotec). Para esto, una fracción de PBMCs se incubó con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD45RO, CD56, CD123, TCR γ/δ , HLA-DR y CD235a humanos conjugados con biotina durante 20 min a 4°C y posteriormente con un anticuerpo anti-biotina conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 10 min a 4°C. Luego de ser lavadas, las células se resuspendieron en PBS a 4°C y los linfocitos TCD4⁺ naïve se purificaron usando columnas de depleción LD montadas en un campo magnético. La fracción de células CD4⁺ separadas corresponden a los linfocitos TCD4⁺ naïve, los que se contaron utilizando una cámara de Neubauer[®]. El fenotipo celular se confirmó con anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.7 Purificación de linfocitos TCD4⁺ memoria

Los linfocitos TCD4⁺ de memoria se purificaron para realizar el experimento de frecuencia de proliferación ante los distintos serotipos bacterianos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*, utilizando un *kit* de depleción celular específico de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MACS; Miltenyi Biotec). Para esto, una fracción de PBMCs se incubó con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RA, CD56, CD123, TCR γ/δ y glicoforina A humanos conjugados con biotina durante 10

min a 4°C y posteriormente con un anticuerpo anti-biotina conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 15 min a 4°C. Luego de ser lavadas, las células se resuspendieron en PBS a 4°C y los linfocitos TCD4⁺ de memoria se purificaron usando columna de depleción LD montadas en un campo magnético. Se determinó el número de células usando una cámara de Neubauer[®]. El fenotipo celular se confirmó usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.8 Cultivos de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*

Las cepas encapsuladas de *P. gingivalis* W83 (Serotipo K1), HG184 (Serotipo K2), A7A1-28 (Serotipo K3), ATCC[®] 49417[™] (Serotipo K4), HG1690 (Serotipo K5) o HG1691 (Serotipo K6) o la cepa ATCC[®] 33277[™] carente de cápsula extracelular (K⁻) fueron cultivadas en medio agar sangre de caballo al 5%, suplementado con hemina (5 mg/L) y menadiona (1 mg/L), a 37°C en condiciones anaerobias (80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂) usando generadores AnaeroGen[™] (OxoidLtd, Basingstoke, Hampshire, England). Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC[®] 43717[™] (Serotipo a), ATCC[®] 43718[™] (Serotipo b) o ATCC[®] 43719[™] (Serotipo c) fueron cultivadas en medio agar infusión cerebro-corazón (OxoidLtd) a 37°C en condiciones de capnofilia (8% O₂ y 12% CO₂) usando generadores CampyGen[™] (OxoidLtd).

9.9 Curvas de crecimiento bacteriano

Para tener un número conocido de unidades formadoras de colonias (UFC) para la estimulación de las células dendríticas, se confeccionaron curvas de crecimiento bacteriano de cada cepa de *P. gingivalis* o de *A. actinomycetemcomitans*. Cada cepa bacteriana se inoculó en 10 mL de caldo de cultivo sangre de caballo al 5% suplementado con hemina y menadiona o caldo infusión cerebro-corazón hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,05 medida en espectrofotómetro a un longitud de onda de 560 nm (Halo RB-10 UV-VIS Spectrophotometer, Dynamica, Germany). Lecturas de espectrofotómetro adicionales se realizaron en distintos tiempos hasta que el microorganismo alcanzó la fase de crecimiento estacionario. Con cada medición de DO, se tomó una muestra de 100 µL, la que se diluyó de forma seriada (log₁₀) en

PBS y 100 μ L de cada dilución se sembró en agar sangre de caballo al 5% suplementado con hemina y menadiona o medio de cultivo infusión cerebro-corazón. Luego de 5-7 días, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias y se contrastó con las DO correspondientes. Se graficó las curvas DO *versus* tiempo y DO *versus* UFCx10⁶/mL para obtener un número conocido de UFC/mL en fase de crecimiento exponencial para realizar la estimulación celular.

9.10 Estimulación de las células dendríticas

Las células dendríticas diferenciadas se estimularon durante 2 días y a una multiplicidad infectante incremental (MOI) de 10⁻¹ a 10³ (razón bacterias/células dendríticas) con los distintos serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*. Como control positivo, células dendríticas se estimularon con 10 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland). Células dendríticas no estimuladas fueron utilizadas como control negativo. La estimulación de las células dendríticas se evaluó con anticuerpos específicos mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.11 Estimulación de los linfocitos TCD4⁺ naïve

Los linfocitos TCD4⁺ naïve fueron activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos K1 a K6 de *P. gingivalis* o a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*, a una razón de 10:1 (linfocitos T:células dendríticas), durante 5-7 días y a una concentración de 1x10⁶ células/mL en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal.

9.12 Análisis del fenotipo celular

La purificación de monocitos, su diferenciación a células dendríticas y su posterior estimulación en presencia de los distintos serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* se evaluó usando los siguientes anticuerpos de ratón anti-humano conjugados con los fluorocromos PE, FITC o PE/Cy5: anti-CD14 (monocitos), CD1a (células dendríticas

inmaduras), CD83 (células dendríticas maduras), CD80 y CD86 (moléculas co-estimuladoras de la presentación antigénica) (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA) y utilizando un equipo FACSCalibur de citometría de flujo (BD Biosciences Pharmigen). La purificación de linfocitos TCD4⁺ se evaluó usando los anticuerpos de ratón anti-humano anti-CD4 (linfocitos T CD4⁺), CD14 (monocitos), CD45RA (linfocitos TCD4⁺ naïve) y CD45RO (linfocitos T de memoria) conjugados con los fluorocromos PE o FITC (BD Biosciences Pharmigen).

9.13 Extracción de RNA citoplasmático total

Luego de 5 días de estimulación celular, los linfocitos TCD4⁺ naïve fueron recuperados mediante centrifugación a 10.000 xg durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes de cultivo celular fueron almacenados a -80°C para los siguientes experimentos.

Para la extracción del RNA citoplasmático total, las células fueron lavadas 2 veces en PBS y lisadas en 400 µL de amortiguador de lisis que contiene 0,5% Igepal[®] CA-630 (Rhodia Inc, Cranbury, NJ, USA), 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂, suplementado con 10 mM del complejo vanadyl-ribonucleosidos (VRC)-40 (Gibco). La lisis celular completa se llevó a cabo resuspendiendo vigorosamente las células 10 veces en el amortiguador de lisis. El núcleo fue removido mediante centrifugación por 10 seg a 14.000 xg y 400 µL del sobrenadante fueron sometidos a digestión con 25 µg/mL de proteinasa K (Roche Ltd, basel, Switzerland), en presencia de SDS 1% y 15 mM EDTA (Fluka) por 30 min a 37°C. Posteriormente, el RNA fue extraído con 400 µL de fenol:cloroformo:isoamylalcohol 25:24:1 (Fluka) centrifugado por 10 min a 14.000 xg a temperatura ambiente. El RNA presente en la solución acuosa se precipitó por 1 hora a -20°C con 0,3 M acetato de sodio, 1 mL de etanol 100% y 20 µg/µL de glicógeno (Roche), se recuperó mediante centrifugación por 30 min a 14.000 xg y se resuspendió en 20 µL de agua milli-Q libre de RNAsas. El RNA citoplasmático fue cuantificado usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (Halo RB-10 UV-VIS Spectrophotometer) y almacenado a -80°C a una concentración de 1 µg/µL.

9.14 Síntesis de la primera cadena de cDNA

Para obtener la primera cadena de cDNA, 2 µg/µL de RNA total fueron retrotranscritos usando un *kit* específico y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Transcriptor First Strand cDNA, Roche).

9.15 Análisis de la expresión de RANKL y factores de transcripción

Los niveles de expresión de los mRNA de RANKL, *T-bet* (Th1), *GATA-3* (Th2), *RORC2* (Th17) y *Foxp3* (Treg) fueron determinados mediante PCR en tiempo real a partir de 20 ng de cDNA, utilizando partidores específicos (Tabla 1). La amplificación mediante PCR en tiempo real se realizó utilizando un reactivo específico (KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix Universal, KAPA Biosystems, Boston, MA, USA) y se cuantificó en un termociclador en tiempo real (StepOnePlus, Applied Biosystems). Como control de amplificación se analizaron los niveles de expresión de la subunidad de rRNA 18S

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación mediante PCR en tiempo real

Nombre	Partidor→3'	Partidor→5'
RANKL	tgattcatgtaggagaattaaacagg	gatgtgctgtgatccaacga
<i>T-bet</i>	tccaagttaatcagcaccaga	tgacaggaatgggaacatcc
<i>GATA-3</i>	ctcattaagcccaagcgaag	tctgacagttcgacaggac
<i>RORC2</i>	agaaggacagggagccaag	caagggatcacttcaattgtg
<i>Foxp3</i>	acctacgccacgctcatc	tcattgagtgtccgctgct
18S rRNA	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

9.16 Análisis de la secreción de RANKL

A partir de 100 μL del sobrenadante de cultivo celular de linfocitos TCD4^+ *naïve* se cuantificó la secreción de RANKL mediante ELISA siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (R&D Systems, Quantikine[®], MN, USA) en un espectrofotómetro a 492 nm (ELx800 Universal Microplate Reader, Biotek Instruments, INC. Virginia, USA).

9.17 Análisis de frecuencia de respuesta de linfocitos T de memoria

La frecuencia de proliferación de linfocitos T de memoria, obtenidos de sujetos sanos y con periodontitis, se analizó mediante dilución límite. Los linfocitos TCD4^+ de memoria expuestos a células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células/mL en 200 μL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal en placas de cultivo de 96 pocillos en diluciones seriadas (\log_3) a 37°C y 5% CO_2 . Luego de 5 días, se analizó la frecuencia de proliferación de los linfocitos TCD4^+ de memoria utilizando microscopio de luz (Axiostar plus, Carl Zeiss, Germany) y un *kit* de proliferación de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Formazan, MTT Assay, R&D Systems). La frecuencia de proliferación de cultivos celulares capaces de proliferar en cada condición experimental se determinó contabilizando los pocillos negativos y comparando con el estimado de células/pocillo proliferantes positivas en escala logarítmica con la distribución de Poisson como referencia.

9.18 Activación de osteoclastos TRAP⁺

Macrófagos/monocitos RAW 264.7 (TIB-71) se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium, Gibco Invitrogen Corp.), suplementado con 1,5 g/L de bicarbonato de sodio y 10% de suero bovino fetal, y se diferenciaron a osteoclastos en presencia de 50 ng/mL de RANKL durante 5 días. Los osteoclastos diferenciados se lavaron 2 veces en PBS para dejarlos libres de RANKL y se cultivaron a una concentración de 1×10^5 células/cm² durante 7 días en medio DMEM en presencia 100 μL de los distintos sobrenadantes de los cultivos de

linfocitos TCD4⁺ naïve expuestos a células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *P. gingivalis*. La activación de los osteoclastos se cuantificó determinando el número de células multinucleadas TRAP⁺ utilizando un *kit* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) observadas en un microscopio de luz (Axiostar plus).

9.19 Análisis de los datos

Los datos de la citometría de flujo se representaron como histogramas y se expresaron como porcentajes de células positivas usando el software WinMDi 2.9 (The Scripps Research Inst., La Jolla, CA, USA). Los datos de citometría de flujo (%), PCR en tiempo real (niveles de expresión), ELISA (pg/mL) y activación de osteoclastos (número absoluto) se expresaron como promedio \pm desviación estándar y fueron analizados usando el programa estadístico SPSS 15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). La normalidad de la distribución de los datos se determinó usando la prueba estadística de Shapiro-Wilk. Los datos de citometría de flujo se analizaron mediante la prueba de χ^2 . Los niveles de expresión de RANKL, *T-bet* (Th1), *GATA-3* (Th2), *RORC2* (Th17) y *Foxp3* (Treg) evaluados mediante PCR en tiempo real, los niveles de RANKL analizados mediante ELISA y el número de osteoclastos TRAP⁺ fueron analizados utilizando las pruebas estadísticas de ANOVA y el *post-hoc* de Tukey. La frecuencia de proliferación, evaluada mediante dilución límite, se analizó usando un programa disponible *on-line* (<http://bioinfo.wehi.edu.au/software/limdil/index.html>) (The Walter & Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia). Los coeficientes de correlación se obtuvieron usando las pruebas estadísticas de Pearson. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando *p-value* fue $< 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1 Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas

La purificación de monocitos y su diferenciación a células dendríticas fue evaluada mediante citometría de flujo (Figura 1). A partir de las PBMCs aisladas de sangre periférica, se obtuvo una población de monocitos de alta pureza, demostrado por los elevados niveles de expresión del marcador específico CD14 (> 97%). Un alto porcentaje de ellos (> 98%) se diferenció a células dendríticas ante la estimulación con GM-CSF e IL-4, tal como se demuestra por la pérdida del marcador de monocitos CD14 y el incremento en los niveles de expresión de CD1a.

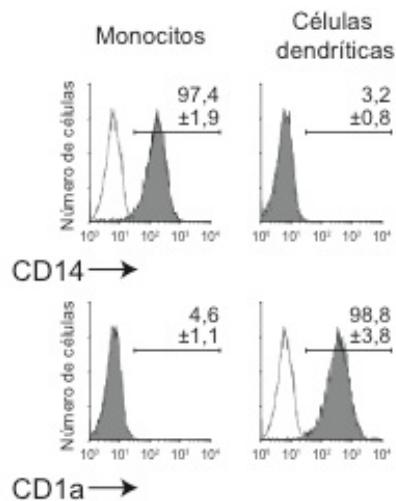


Figura 1. Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de monocitos (células CD14⁺) a partir de las PBMCs y de su diferenciación a células dendríticas (células CD1a⁺) en presencia de GM-CSF e IL-4.

10.2 Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve

La purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve fue evaluada mediante citometría de flujo (Figura 2). A partir de las PBMCs aisladas de sangre periférica, se obtuvo una población de linfocitos de alta pureza, demostrado por los elevados niveles de expresión del marcador específico CD4 (> 98%) y bajos niveles de expresión del marcador CD14 de monocitos (< 0,12%).

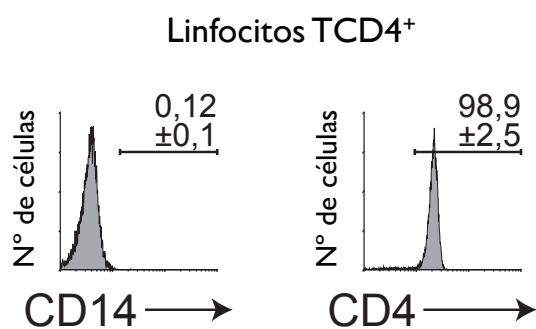


Figura 2. Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de linfocitos (células CD4⁺) a partir de las PBMCs.

10.3 Activación de células dendríticas

Los niveles de activación de las células dendríticas fueron evaluados analizando los niveles de expresión de CD80, CD83 y CD86 mediante citometría de flujo (Figura 3a y 3b). Un alto porcentaje de células dendríticas activas se observó posterior a la estimulación con los serotipos K1 a K6 de *P. gingivalis* tal como se demuestra por el incremento de los marcadores CD80 (> 97%) y CD83 (> 94%) o con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*, tal como se demuestra por el incremento de los marcadores CD80 (> 95%), CD83 (> 95%) y CD86 (> 94%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de activación de las células dendríticas ante la estimulación con los distintos serotipos *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*.

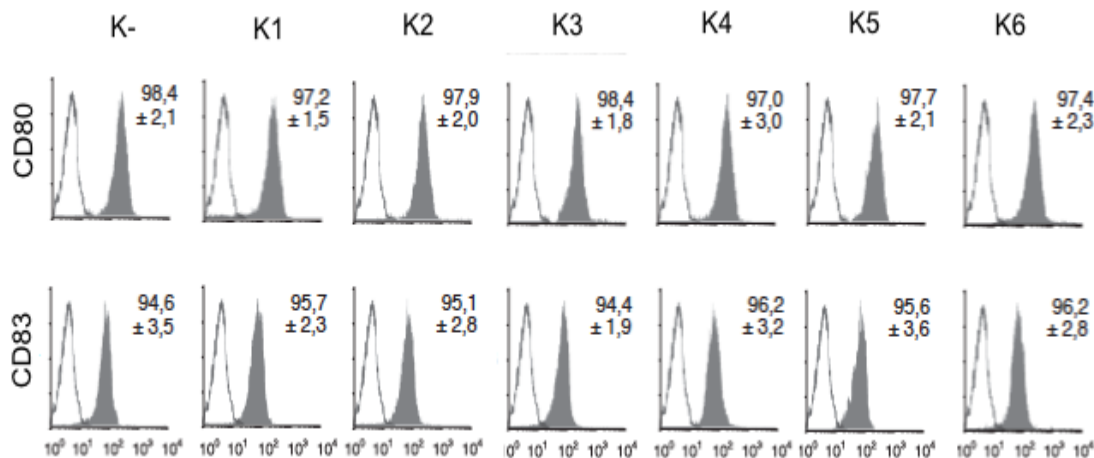


Figura 3a. Activación de las células dendríticas ante los serotipos K1 a K6 o K de *P. gingivalis*.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de expresión de CD80 y CD83 que evidencian la activación de las células dendríticas luego de la estimulación durante 48 horas con los serotipos K1 (*W83*), K2 (*HG184*), K3 (*A7A1-28*), K4 (*ATCC[®] 49417TM*), K5 (*HG1690*) o K6 (*HG1691*) o la cepa carente de cápsula extracelular K (*ATCC[®] 33277TM*) de *P. gingivalis* ($MOI=10^3$).

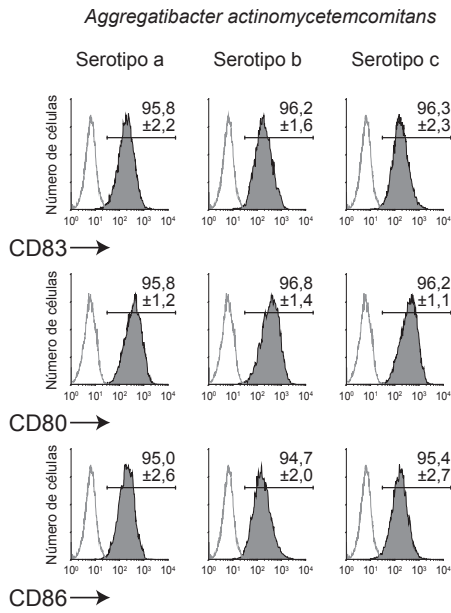


Figura 3b. Activación de las células dendríticas ante los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de expresión de CD83, CD80 y CD86 que evidencian la activación de las células dendríticas luego de la estimulación durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²).

10.4 Activación de linfocitos TCD4⁺ naïve

Los niveles de activación de los linfocitos TCD4⁺ naïve fueron evaluados analizando los niveles de expresión de CD25, CD62L y CD69 mediante citometría de flujo (figura 4). Un alto porcentaje de linfocitos TCD4⁺ naïve activos se observó posterior a la estimulación por 5 días con el serotipo K1 (W83) de *P. gingivalis* tal como se demuestra por el incremento de los marcadores CD25 (> 14,3%), CD62L (> 17,9%) y CD69 (> 13,5%).

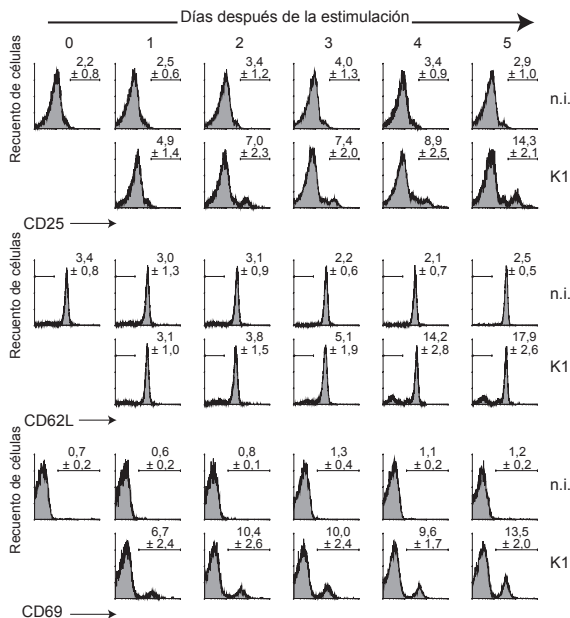


Figura 4. Cinética de activación de linfocitos TCD4⁺.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de expresión de CD25, CD62L y CD69 los días 1, 2, 3, 4 ó 5 luego de la activación de los linfocitos TCD4⁺ con células dendríticas estimuladas con el serotipo K1 (W83) de *P. gingivalis* (MOI=10³), detectándose mayores niveles de activación al quinto día.

10.5 Niveles de expresión y secreción de RANKL en linfocitos TCD4⁺ naïve

En linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos K1 (W83), K2 (HG184), K3 (A7A1-28), K4 (ATCC[®] 49417TM), K5 (HG1690) o K6 (HG1691) o la cepa carente de cápsula K⁻ (ATCC[®] 33277TM) de *P. gingivalis* (MOI=10³) o los serotipos a (ATCC[®] 43717TM), b (ATCC[®] 43718TM) o c (ATCC[®] 43719TM) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²) se cuantificaron los niveles de expresión y secreción de RANKL, mediante PCR en tiempo real y ELISA, respectivamente (Figura 5). Los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con el serotipo K1 (W83) o K2 (HG184) de *P. gingivalis* o el serotipo b (ATCC[®] 43718TM) de *A. actinomycetemcomitans* presentaron mayores niveles de expresión y secreción (p<0,05) de RANKL en comparación a los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los otros serotipos de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

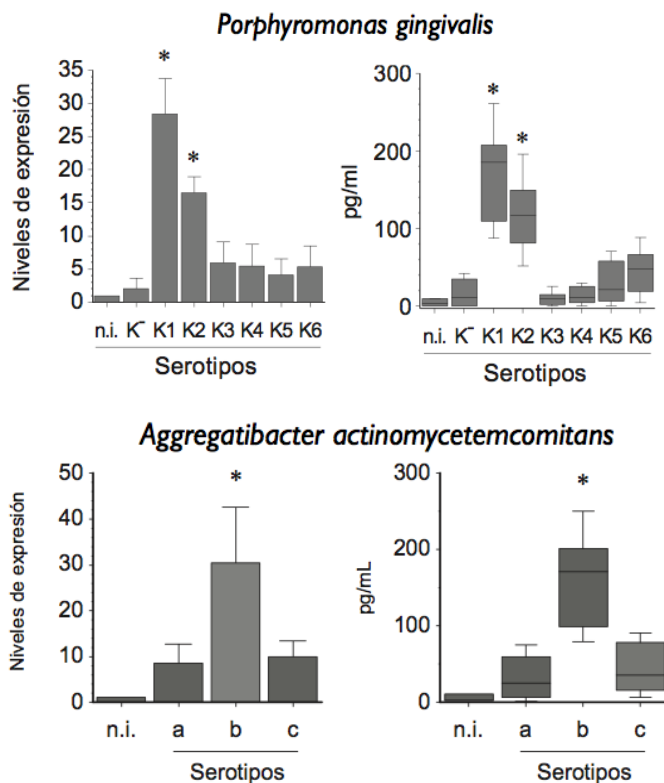


Figura 5. Niveles de expresión y secreción de RANKL en linfocitos TCD4⁺ naïve activados.

La expresión y secreción de RANKL en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos K1 (W83), K2 (HG184), K3 (A7A1-28), K4 (ATCC[®] 49417TM), K5 (HG1690) o K6 (HG1691) o la cepa K⁻ (ATCC[®] 33277TM) de *P. gingivalis* (MOI=10³) o a (ATCC[®] 43717TM), b (ATCC[®] 43718TM) o c (ATCC[®] 43719TM) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²) fue determinada mediante PCR en tiempo real y ELISA, respectivamente. Como control negativo se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). *p<0,05.

10.6 Niveles de expresión de los factores de transcripción en linfocitos TCD4⁺ naïve

Los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* (Th1), *GATA-3* (Th2), *RORC2* (Th17) y *Foxp3* (Treg) en linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos K1 (W83), K2 (HG184), K3 (A7A1-28), K4 (ATCC[®] 49417[™]), K5 (HG1690) o K6 (HG1691) o la cepa carente de cápsula K⁻ (ATCC[®] 33277[™]) de *P. gingivalis* (MOI=10³) o los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²) se cuantificaron mediante PCR en tiempo real (Figura 6a y 6b). Los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con K1 (W83) o K2 (HG184) de *P. gingivalis* o el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans* presentaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* (Th1) (p<0,05) y *RORC2* (Th17) (p<0,05) en comparación a los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los otros serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*. No hubo diferencias en los niveles de expresión de los factores de transcripción en los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los otros serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*.

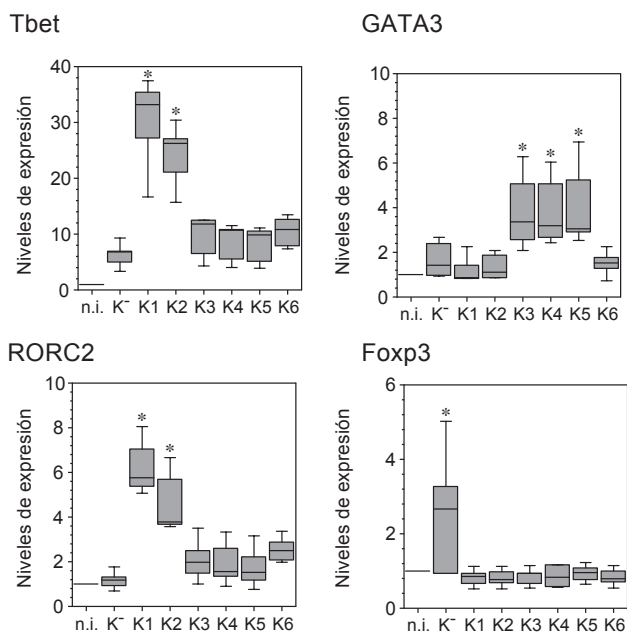


Figura 6a. Niveles de expresión de los factores de transcripción en linfocitos TCD4⁺ naïve estimulados con células dendríticas activadas con los distintos serotipos de *P. gingivalis*.

La expresión de los mRNA de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos K1 (W83), K2 (HG184), K3 (A7A1-28), K4 (ATCC[®] 49417[™]), K5 (HG1690) o K6 (HG1691) o la cepa K⁻ (ATCC[®] 33277[™]) de *P. gingivalis* (MOI=10³) fue determinada mediante PCR en tiempo real. Como control negativo se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). *p<0,05.

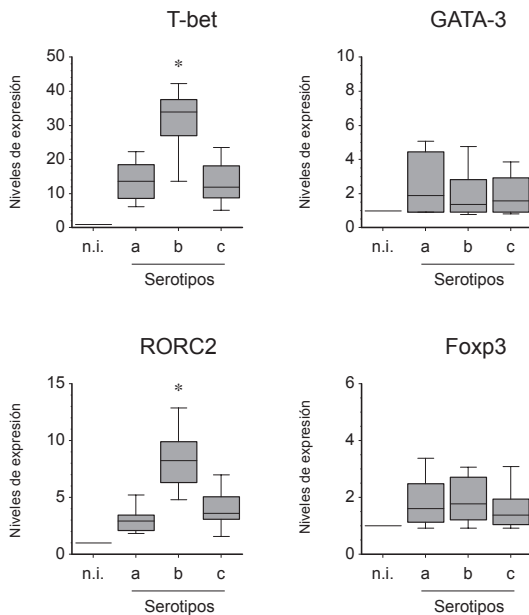


Figura 6b. Niveles de expresión de los factores de transcripción en linfocitos TCD4⁺ naïve estimulados con células dendríticas activadas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

La expresión de los mRNA de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²) fue determinada mediante PCR en tiempo real. Como control negativo se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). **p*<0,05.

10.7 Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción y de secreción de RANKL

En los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos K1 (W83) o K2 (HG184) de *P. gingivalis* (K1, *p* < 0.05) o los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (a, b o c, *p* < 0.05) se detectó una correlación positiva entre los niveles de expresión *T-bet* (Th1) y *RORC2* (Th17) con los niveles de secreción de RANKL y una ausencia de correlación entre los niveles de expresión de *GATA-3* y *Foxp3* con RANKL (Figura 7a y 7b). En linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos K3-K6 o la cepa carente de cápsula K⁻ de *P. gingivalis* se observó ausencia de correlación entre los niveles de expresión de *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* con RANKL. Estos datos sugieren una asociación entre los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* con la diferenciación y activación de los linfocitos Th17 y la producción de RANKL.

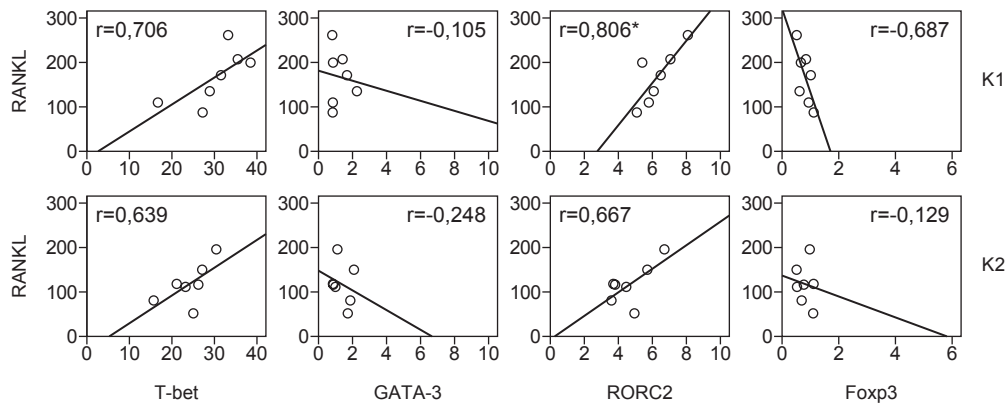


Figura 7a. Correlación entre los factores de transcripción y los niveles de secreción de RANKL.

La correlación entre los niveles expresados del mRNA de los factores de transcripción T-bet, GATA-3, RORC2 y Foxp3 y los niveles de RANKL producidos por los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos K1 (W83) o K2 (HG184) de *P. gingivalis* (MOI=10³). Los coeficientes de correlación de Pearson (r) fueron calculados a partir de 10 experimentos independientes. *p<0,05

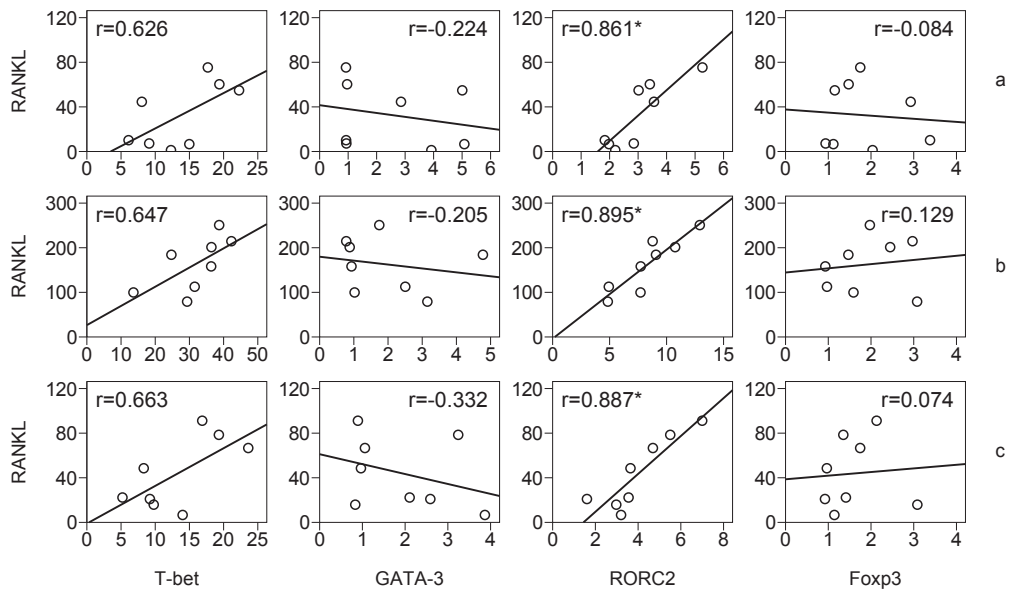


Figura 7b. Correlación entre los factores de transcripción y los niveles de secreción de RANKL.

La correlación entre los niveles expresados del mRNA de los factores de transcripción T-bet, GATA-3, RORC2 y Foxp3 y los niveles de RANKL producidos por los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²). Los coeficientes de correlación de Pearson (r) fueron calculados a partir de 10 experimentos independientes. *p<0,05

10.8 Niveles de activación de osteoclastos mediante la secreción de TRAP⁺

Para confirmar el rol de los diferentes serotipos K de *P. gingivalis* en la diferenciación y activación de osteoclastos, se cuantificó el número de osteoclastos TRAP⁺ inducidos en respuesta a los sobrenadantes recuperados de cada condición de estimulación en los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos K1 (W83), K2 (HG184), K3 (A7A1-28), K4 (ATCC[®] 49417[™]), K5 (HG1690) o K6 (HG1691) o la cepa carente de cápsula K⁻ (ATCC[®] 33277[™]) de *P. gingivalis* (MOI=10³). Después de 5 días de cultivo, el número de osteoclastos TRAP⁺ fue mayor en presencia de los sobrenadantes de linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* en comparación con los serotipos K3-K6 o la cepa carente de cápsula K⁻ de *P. gingivalis* (p <0,05) (Figura 8).

No se detectaron diferencias significativas en el número de células TRAP⁺ entre los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con las células dendríticas estimuladas con los serotipos K3-K6 o la cepa carente de cápsula K⁻ de *P. gingivalis*. Estos resultados demostraron un incremento en la osteoclastogénesis inducida por los linfocitos TCD4⁺ naïve expuestos a células dendríticas estimuladas con los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* en comparación con los otros serotipos. Estos mayores niveles de inducción se correlacionan con los elevados niveles expresados y secretados de RANKL.

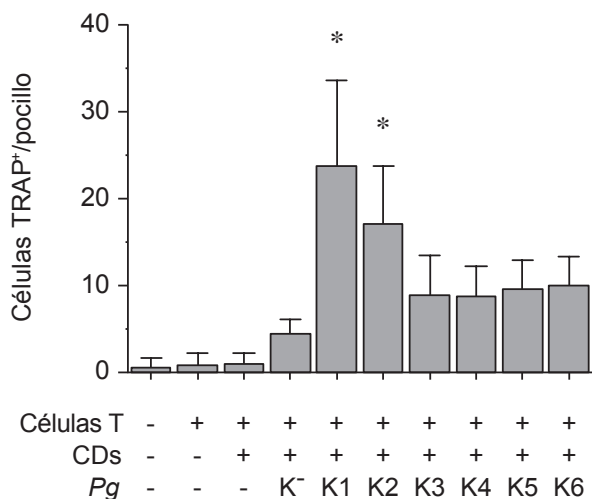


Figura 8. Niveles de activación de osteoclastos TRAP⁺.

El número de células multinucleadas TRAP⁺ inducido por linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos K1 (W83), K2 (HG184), K3 (A7A1-28), K4 (ATCC[®] 49417[™]), K5 (HG1690) o K6 (HG1691) o K⁻ (ATCC[®] 33277[™]) de *P. gingivalis* (MOI=10³). Como control, se utilizaron cultivos no inducidos. Los datos se expresan como número de células TRAP⁺ por pocillo. Cada experimento se realizó en triplicado. *p<0,05

10.9 Frecuencia de proliferación de linfocitos T de memoria

Para determinar si los distintos serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* están asociados con diferencias en la frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria obtenidos de pacientes con periodontitis y sujetos sanos, se realizaron experimentos de dilución límite para analizar la respuesta ante los serotipos K1 (W83), K2 (HG184) o K4 (ATCC[®] 49417[™]) o la cepa carente de cápsula K⁻ (ATCC[®] 33277[™]) de *P. gingivalis* o los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (Figura 9). En sujetos sanos no se mostraron diferencias significativas en la frecuencia de proliferación de los linfocitos TCD4⁺ de memoria en respuesta a los distintos serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*; sin embargo, en los pacientes con periodontitis, los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* indujeron significativamente una mayor la frecuencia de proliferación de los linfocitos TCD4⁺ de memoria en comparación a los otros serotipos.

La frecuencia de proliferación de los linfocitos TCD4⁺ de memoria ante los distintos serotipos K de *P. gingivalis* o a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* presentaron diferencias significativas entre los sujetos sanos y los pacientes afectados con periodontitis. Ante los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* la frecuencia de proliferación está incrementada en pacientes con periodontitis en comparación a sujetos sanos. Estos datos demuestran una asociación entre la activación de los linfocitos TCD4⁺ de memoria ante los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* y la presencia de periodontitis.

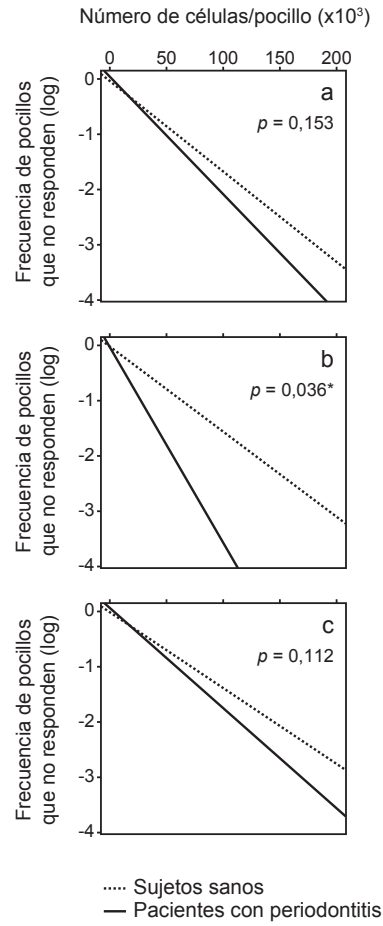
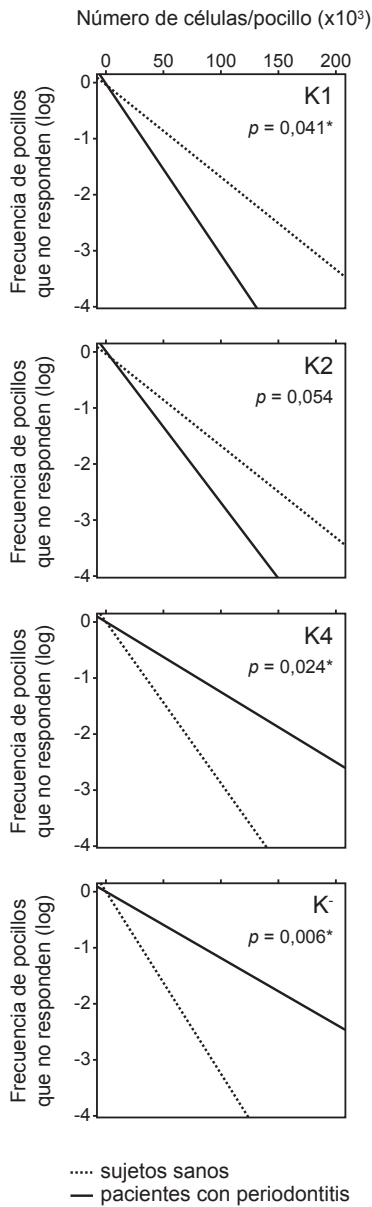


Figura 9. Frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria.

Para determinar la frecuencia de los linfocitos TCD4⁺ de memoria capaces de activarse en respuesta a los serotipos K1 (W83), K2 (HG184) o K4 (ATCC[®] 49417[™]) o la cepa K (ATCC[®] 33277[™]) de *P. gingivalis* (MOI=10³) o a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²), se aislaron las células de pacientes con periodontitis crónica. Sujetos sanos se utilizaron como control.

Los datos son expresados como la frecuencia de los pocillos que no respondieron versus el número de células cultivadas por pocillo. Cada experimento fue realizado por duplicado. * $p < 0,05$

11. DISCUSIÓN

La homeostasis del tejido óseo depende de un equilibrio dinámico entre los osteoblastos, células capaces de formar hueso, y osteoclastos, células responsables de la reabsorción ósea (Karsenty et al., 2002). Este acoplamiento celular está regulado por diversas moléculas osteo-activas, entre ellas RANKL. Durante las periodontitis, este equilibrio celular y molecular se desregula debido a los cambios en la respuesta inmune local provocados por la infección periodontal, produciéndose una mayor actividad de osteoclastos, un incremento en la reabsorción del hueso alveolar y, finalmente, la pérdida de los dientes (Listgarten, 1986, Tonetti et al., 2005, Garlet, 2010, Hernandez et al., 2011, Di Benedetto et al., 2013). El tipo de respuesta inmune inducido en el hospedero durante la infección periodontal determina el fenotipo clínico osteo-destructivo de la enfermedad; en particular, se ha asociado una respuesta linfocitaria tipo Th1 y Th17 a la destrucción del hueso alveolar (Rodan et al., 2000, Nagasawa et al., 2007). En este trabajo de investigación se cuantificaron los niveles de expresión de los factores de transcripción que determinan la diferenciación de los fenotipos Th1, Th2, Th17 y Treg posterior a la activación de linfocitos TCD4⁺ naïve por células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos de *P. gingivalis* y *A. Actinomycetemcomitans*. Además, se analizó la activación de los osteoclastos, mediante la cuantificación de los niveles expresión y secreción de RANKL y la inducción de osteoclastos TRAP⁺. Finalmente, se evaluó la frecuencia de proliferación de linfocitos TCD4⁺ de memoria ante los serotipos más inmunogénicos de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*.

Ante los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detectaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* y *RORC2*, determinantes de un patrón de respuesta inmune tipo Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteo-destructivo), respectivamente, y de expresión y secreción de RANKL, en comparación a las mismas células estimuladas con los otros serotipos de *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*. Ante estos mismos serotipos se detectó también una mayor inducción de osteoclastos TRAP⁺ en comparación a los otros serotipos bacterianos. Finalmente, también se observó mayor frecuencia de proliferación celular en los linfocitos TCD4⁺ de memoria ante estos serotipos bacterianos cuando las células se obtuvieron de pacientes con periodontitis crónica en comparación a los de sujetos sanos. En conjunto, estos datos nos permiten especular que los serotipos K1 y K2 de *P.*

gingivalis y b de *A. actinomycetemcomitans* tienen un rol en la actividad de los osteoclastos y la reabsorción ósea alveolar que ocurre durante las periodontitis a través de una mayor actividad de los linfocitos Th1 y Th17 mediada por RANKL.

Los linfocitos TCD4⁺ cumplen un rol central en la patogénesis de las periodontitis. Los linfocitos Th1 producen citoquinas pro-inflamatorias que facilitan la inflamación local mediante el reclutamiento y activación de células inmunes y, además, ejercen una actividad osteoclastogénica indirecta al inducir la expresión de RANKL en fibroblastos, osteoblastos y linfocitos Th17 (Boyle et al., 2003, Sato et al., 2006, Dutzan et al., 2009a, Dutzan et al., 2009b, Garlet, 2010, Hernandez et al., 2011, Di Benedetto et al., 2013). Por otro lado, los linfocitos Th17 producen IL-17 y RANKL, induciendo tanto indirectamente como directamente una actividad osteoclastogénica (Cardoso et al., 2009, Okui et al., 2012, Kayal, 2013). Indirectamente, IL-17 incrementa la reabsorción ósea mediante la inducción de la producción de RANKL en fibroblastos, osteoblastos, pre-osteoclastos y linfocitos Th17 (Boyle et al., 2003). Directamente, la producción de RANKL induce la diferenciación y activación de osteoclastos mediante la estimulación de su receptor específico RANK (Boyle et al., 2003). En efecto, en las lesiones periodontales el incremento en los niveles de RANKL se correlaciona con la detección local de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (Wara-aswapati et al., 2007) y la expresión del telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (ICTP), marcador de reabsorción ósea (Arikan et al., 2011). En conjunto, durante la reabsorción infecciosa del hueso alveolar, el incremento en los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, TNF- α , IFN- γ y RANKL son determinantes clave de la diferenciación de los pre-osteoclastos y activación de los osteoclastos maduros (Vernal et al., 2005, Vernal et al., 2006c). Considerando los hallazgos de este trabajo de investigación, el rol de los linfocitos Th1 y Th17 en la reabsorción del hueso alveolar inducida por *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* es serotipo-dependiente.

No obstante, los linfocitos Th17 se asocian a la actividad osteo-destructiva directa durante las periodontitis, también se describen otras células del sistema inmune que producen moléculas osteo-activas y contribuyen a la reabsorción ósea (Kayal, 2013). En animales infectados con *A. actinomycetemcomitans*, los linfocitos B activados producen mayores niveles de RANKL e inducen un incremento significativo en la diferenciación de osteoclastos, provocando la reabsorción ósea (Han et al., 2006, Kawai et al., 2006, Kayal, 2013). Los

linfocitos T y B en conjunto secretan el 20% de los niveles de RANKL detectados en sujetos sanos y entre el 50% y 90% de los detectados en pacientes con periodontitis (Kawai et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito que los neutrófilos cumplen un rol central en la patogenia de las periodontitis mediante la producción de citoquinas y productos citotóxicos (Kayal, 2013). Los neutrófilos producen ión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales libres, elastasas y colagenasas los que, junto a las citoquinas pro-inflamatorias, favorecen la inflamación periodontal y la reabsorción de hueso alveolar al inducir la producción de RANKL en fibroblastos y osteoblastos (Galli et al., 2011, Cooper et al., 2013). Finalmente, los macrófagos son importantes mediadores de la inflamación en los tejidos periodontales mediante la secreción de citoquinas y la presentación de antígenos bacterianos a los linfocitos T (Dennison et al., 1997). En presencia de RANKL, los macrófagos son capaces de producir TNF- α y favorecer la activación y diferenciación de los osteoclastos (Lam et al., 2000). Además, la presencia de macrófagos se asocia con incrementos en los niveles de RANKL, detección local de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* y producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α y prostaglandina E2 (Zadeh et al., 1999, Crotti et al., 2003, Pollreis et al., 2010, Hung et al., 2014).

En términos generales, los linfocitos Th17 son las principales células secretoras de RANKL durante la infección periodontal y las citoquinas que producen, IL-6, IL-17, IL-21 e IL-23, determinan un ambiente pro-inflamatorio que favorece la migración de células del sistema inmune hacia el foco infeccioso. Un incremento en la concentración de RANKL y una disminución de OPG determinará la diferenciación de los pre-osteoclastos y la activación de osteoclastos maduros, desencadenando la reabsorción ósea.

Durante las periodontitis, una respuesta inmune tipo Th1 y Th17 se asocia con la presencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. En este contexto, la detección de los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o b de *A. actinomycetemcomitans* en la biopelícula subgingival sería responsable de la respuesta inmune osteo-destructiva. Recientemente, se analizó la composición microbiana subgingival de pacientes afectados de periodontitis crónica o agresiva que asistieron a la Clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, con el objeto de caracterizar la composición serotípica de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis* fueron identificados en 40%

de los pacientes y el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en 16% de ellos (datos no publicados). La frecuencia de detección de estos serotipos asociada a la reactividad inducida en los linfocitos T de memoria permite establecer, al menos en parte, la importancia de la colonización subgingival de estos serotipos bacterianos en la etiopatogenia de las periodontitis.

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune de memoria ante *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis y sujetos sanos, linfocitos TCD4⁺ de memoria circulantes periféricos fueron purificados y expuestos ante los distintos serotipos bacterianos. Una mayor frecuencia de linfocitos TCD4⁺ de memoria reactivos ante los serotipos K1 o K2 de *P. gingivalis* o b de *A. actinomycetemcomitans* se detectó en los pacientes afectados con periodontitis en comparación a los sujetos sanos, evidenciando una exposición previa a estos serotipos bacterianos y sugiriendo su asociación a la periodontitis. Además, ante el serotipo K4 y la cepa carente de cápsula K⁻ de *P. gingivalis* se observó una mayor frecuencia de proliferación de linfocitos T de memoria en sujetos sanos en comparación a pacientes con periodontitis, lo que sugiere una asociación a la salud periodontal. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad que las periodontitis se asocien tanto a una mayor respuesta ante los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis*, como a una menor respuesta ante el serotipo K4 y la cepa carente de cápsula K⁻.

La existencia de una memoria inmunológica en pacientes con periodontitis ante los serotipos más inmunogénicos de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* permite proyectar el desarrollo e implementación de nuevas terapias enfocadas en la modulación de la respuesta inmune, las que permitirían controlar el desencadenamiento de los eventos biomoleculares asociados al proceso de reabsorción ósea, por ejemplo, mediante el incremento de los niveles de OPG o mediante trasplantes autólogos de linfocitos Treg. Estas terapias son utilizadas para el tratamiento complementario de otras patologías; sin embargo, el aún limitado conocimiento de la etiopatogenia de las periodontitis no ha permitido su oportuna aplicación. En este sentido, nuestros resultados contribuyen a una mejor comprensión de la etiopatogenia de las periodontitis como consecuencia de una serie de eventos biomoleculares desencadenados por serotipos bacterianos particulares con la capacidad de inducir una respuesta inmune pro-inflamatoria y osteo-destructiva; sin embargo, en la actualidad persisten vacíos en el conocimiento y comprensión de los mecanismos que regulan la respuesta celular ante la

estimulación con distintas bacterias inmunogénicas. En este contexto, se proponen mecanismos intracelulares capaces de regular la expresión génica acoplada al señalamiento intracelular vía receptores tipo *Toll* y nuestro grupo de investigación ha postulado que aquellas bacterias más inmunogénicas y sus serotipos tendrían una capacidad diferencial para bloquear la inhibición de la respuesta inmuno-inflamatoria o activar la inhibición de la respuesta inmuno-reguladora, sugiriendo que la respuesta inmune estaría siendo definida en eventos anteriores a la presentación antigénica a través de mecanismos regulados por RNAs nucleares pequeños, tales como los microRNAs.

El rol de los distintos serotipos de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en la etiopatogenia de las periodontitis está recién emergiendo y la proyección de estrategias microbiológicas o inmuno-terapéuticas de prevención y/o tratamiento de las periodontitis sobre la base de su distinta asociación a salud o enfermedad periodontal es aún hipotética. Una interpretación de los datos presentados en este trabajo de investigación se puede proyectar al diagnóstico microbiológico periodontal, en los cuales la evaluación de la composición microbiana serotipo-específica sería necesaria para *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Por otro lado, se podrían implementar terapias que busquen modificar la composición de la biopelícula patogénica subgingival con el objetivo de reemplazar del nicho ecológico de *P. gingivalis* y/o *A. actinomycetemcomitans* a los serotipos bacteriano más inmunogénicos y patogénicos por aquellos más asociados a la salud periodontal. Finalmente, se podrían diseñar estrategias genéticas dirigidas a modificar la secuencia de los genes codificantes involucrados en la composición y estructura de los polisacáridos capsulares de *P. gingivalis* o del LPS de *A. actinomycetemcomitans*, con el objetivo de transformar los serotipos más inmunogénicos en serotipos con cápsula o LPS menos inmunogénicos y patogénicos. Nuestros resultados permitirían proveer nuevos enfoques terapéuticos centrados en la modulación de la respuesta inmune del hospedero ante los distintos serotipos bacterianos, en lugar de la disminución a la exposición bacteriana total, corriente actual de la práctica clínica periodontal.

12. CONCLUSIONES

1. Los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis* y b de *A. actinomycetemcomitans* inducen mayores niveles de expresión y secreción de RANKL en comparación a los otros serotipos.
2. Los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis* y b de *A. actinomycetemcomitans* inducen mayores niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* (Th1) y *RORC2* (Th17) en comparación a los otros serotipos.
3. Los mayores niveles de expresión del factor de transcripción *RORC2* (Th17) inducidos por los serotipos K1 de *P. gingivalis* y b de *A. actinomycetemcomitans* se correlacionan positivamente con los niveles de secreción de RANKL.
4. Los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis* inducen mayor activación de osteoclastos TRAP⁺ en comparación a los otros serotipos.
5. Los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis* y b de *A. actinomycetemcomitans* inducen mayor frecuencia de proliferación de linfocitos T de memoria obtenidos de pacientes con periodontitis en comparación a los obtenidos de sujetos sanos.
6. Los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis* y b de *A. actinomycetemcomitans* tienen un rol en la actividad de los osteoclastos y la reabsorción ósea alveolar que ocurre durante las periodontitis a través de una mayor actividad de los linfocitos Th1 y Th17 mediada por RANKL.

13. REFERENCIAS

- Abbas, A., Murphy, K. & Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-93.
- Amano, A., Nakagawa, I., Okahashi, N. & Hamada, N. (2004) Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontol Res* **39**, 136-42.
- Arikan, F., Buduneli, N. & Lappin, D. F. (2011) C-telopeptide pyridinoline crosslinks of type I collagen, soluble RANKL, and osteoprotegerin levels in crevicular fluid of dental implants with peri-implantitis: a case-control study. *Int J Oral Maxillofac Implants* **26**, 282-9.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6.
- Asikainen, S., Lai, C., Alaluusua, S. & Slots, J. (1991) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* **6**, 115-18.
- Baek, K. J., Choi, Y. & Ji, S. (2013) Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol* **58**, 1282-92.
- Baker, P., Dixon, M., Evans, R., Dufour, L., Johnson, E. & Roopenian, D. (1999) CD4+T Cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* **67**, 2804-09.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-42.
- Cardoso, C. R., Garlet, G. P., Crippa, G. E., Rosa, A. L., Junior, W. M., Rossi, M. A. & Silva, J. S. (2009) Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* **24**, 1-6.
- Cooper, P. R., Palmer, L. J. & Chapple, I. L. (2013) Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol 2000* **63**, 165-97.
- Crotti, T., Smith, M. D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., Ahern, M. J. & Haynes, D. (2003) Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontol Res* **38**, 380-7.
- Cutler, C., Jowatni, R., Palucka, K., Davoust, J., Bell, D. & Banchereau, J. (1999) Evidence and a novel hypothesis for the role of dendritic cells and *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *J Periodontol Res* **34**, 406-12.
- Dennison, D. K. & Van Dyke, T. E. (1997) The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* **14**, 54-78.
- Di Benedetto, A., Gigante, I., Colucci, S. & Grano, M. (2013) Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol* **2013**, 503754.

- Díaz-Zúñiga, J., Yañez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernandez, M., Sanz, M. & Vernal, R. (2014) Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* **41**, 242-51.
- Dierickx, K., Pauwels, M., Laine, M., Eldere, J. v., Cassiman, J., Winkelhoff, A. v., Steenberghe, D. v. & Quirynen, M. (2003) Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* serotypes to pocket epithelium. *J Periodontol* **74**, 844-48.
- Dutzan, N., Gamonal, J., Silva, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2009a) Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **36**, 396-403.
- Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., Aguillon, J. C., Puente, J., Pozo, P. & Gamonal, J. (2009b) Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* **80**, 290-6.
- Dzink, J. L., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1988) The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **15**, 316-23.
- Ebersole, J. L., Taubman, M. A., Smith, D. J., Genco, R. J. & Frey, D. E. (1982) Human immune responses to oral micro-organisms. I. Association of localized juvenile periodontitis (LJP) with serum antibody responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Clin Exp Immunol* **47**, 43-52.
- Fine, D. H., Furgang, D., Schreiner, H. C., Goncharoff, P., Charlesworth, J., Ghazwan, G., Fitzgerald-Bocarsly, P. & Figurski, D. H. (1999) Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. *Microbiol* **145** (Pt 6), 1335-47.
- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A. & Gamonal, J. (2005) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* **76**, 289-94.
- Galli, C., Passeri, G. & Macaluso, G. M. (2011) FoxOs, Wnts and oxidative stress-induced bone loss: new players in the periodontitis arena? *J Periodontal Res* **46**, 397-406.
- Garlet, G. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* **89**, 1349-63.
- Gemmell, E., Yamazaki, K. & Seymour, G. J. (2007) The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000* **43**, 14-40.
- Gmur, R., McNabb, H., van Steenberghe, T. J., Baehni, P., Mombelli, A., van Winkelhoff, A. J. & Guggenheim, B. (1993) Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol Immunol* **8**, 116-20.
- Hallen, J. (2003) Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Anticancer Res* **23**, 1027-29.

- Han, X., Kawai, T., Eastcott, J. W. & Taubman, M. A. (2006) Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol* **176**, 625-31.
- Harrington, L., Mangan, P. & Weaver, C. (2006) Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* **18**, 349-56.
- Henderson, B., Wilson, M., Sharp, L. & Ward, J. M. (2002) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol* **51**, 1013-20.
- Hernandez, M., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., Gonzalez, F. E., Vernal, R., Sorsa, T. & Gamonal, J. (2011) Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res* **90**, 1164-70.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E. & Leon, R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* **35**, 106-13.
- Holt, S. C., Kesavalu, L., Walker, S. & Genco, C. A. (1999) Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000* **20**, 168-238.
- Holt, S. C., Tanner, A. C. & Socransky, S. S. (1980) Morphology and ultrastructure of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Infect Immun* **30**, 588-600.
- Houri-Haddad, Y., Wilensky, A. & Shapira, L. (2007) T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000* **45**, 67-75.
- Hung, S. L., Lee, N. G., Chang, L. Y., Chen, Y. T. & Lai, Y. L. (2014) Stimulatory effects of glucose and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on the secretion of inflammatory mediators from human macrophages. *J Periodontol* **85**, 140-9.
- Jotwani, R. & Cutler, C. W. (2004) Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th1 effector response. *Infect Immun* **72**, 1725-32.
- Kaplan, J., Perry, M., MacLean, L., Furganga, D., Wilson, M. & Fine, D. (2001) Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* **69**, 5375-84.
- Karsenty, G. & Wagner, E. F. (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* **2**, 389-406.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N., Gonçalves, R., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y., Miranda, L., Ernst, C., Izumi, Y. & Taubman, M. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Immun Infect Dis* **169**, 987-98.
- Kayal, R. A. (2013) The role of osteoimmunology in periodontal disease. *Biomed Res Int* **2013**, 639368.
- King, E. & Tatum, H. (1962) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *J Infect Dis* **111**, 85-94.

- Kong, Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E., Van, G., Nguyen, L., Ohashi, P., Lacey, D., Fish, E., Boyle, W. & Penninger, J. (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402**, 304-09.
- Laine, M. L., Appelmelk, B. J. & van Winkelhoff, A. J. (1996) Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* **31**, 278-84.
- Laine, M. L., Appelmelk, B. J. & van Winkelhoff, A. J. (1997) Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *J Dent Res* **76**, 1840-4.
- Laine, M. L. & van Winkelhoff, A. J. (1998) Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* **13**, 322-5.
- Lam, J., Takeshita, S., Barker, J. E., Kanagawa, O., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. (2000) TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* **106**, 1481-8.
- Listgarten, M. (1986) Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* **13**, 418-30.
- Matsumoto, C., Oda, T., Yokoyama, S., Tominari, T., Hirata, M., Miyaura, C. & Inada, M. (2012) Toll-like receptor 2 heterodimers, TLR2/6 and TLR2/1 induce prostaglandin E production by osteoblasts, osteoclast formation and inflammatory periodontitis. *Biochem Biophys Res Commun* **428**, 110-15.
- Nagasawa, T., Kiji, M., Yashiro, R., Hormdee, D., Lu, H., Kunze, M., Suda, T., Koshy, G., Kobayashi, H., Oda, S., Nitta, H. & Ishikawa, I. (2007) Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* **43**, 65-84.
- Norskov-Lauritsen, N. & Kilian, M. (2006) Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophillus*, *Haemophilus paraphrophillus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophillus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophillus* to include V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2135-46.
- Okui, T., Aoki, Y., Ito, H., Honda, T. & Yamazaki, K. (2012) The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *J Dent Res* **91**, 574-9.
- Pollreis, A., Huang, Y., Roth, G. A., Cheng, B., Kebschull, M., Papapanou, P. N., Schmidt, A. M. & Lalla, E. (2010) Enhanced monocyte migration and pro-inflammatory cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Periodontal Res* **45**, 239-45.
- Reiner, S. (2007) Development in motion: helper T cells at work. *Cell* **129**, 33-36.
- Rodan, G. A. & Martin, T. J. (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289**, 1508-14.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J. & Takayanagi, H. (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* **203**, 2673-82.

- Schenkein, H. A., Koertge, T. E., Brooks, C. N., Sabatini, R., Purkall, D. E. & Tew, J. G. (2010) IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* **89**, 943-7.
- Schifferle, R., Reddy, M., Zambon, J., Genco, R. & Levine, M. (1989) Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *J Immunol* **143**, 3035-42.
- Seder, R. & Paul, W. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* **12**, 635-73.
- Shimada, T., Sugano, N., Nishihara, R., Suzuki, K., Tanaka, H. & Ito, K. (2008) Differential effects of five *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains on gingival epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 455-58.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* **28**, 12-55.
- Sundqvist, G., Figdor, D., Hänström, L., Sörlin, S. & Sandström, G. (1991) Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand J Dent Res* **99**, 117-29.
- Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D. & Kitetsu, S. (2005) The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* **32**, 369-74.
- Takahashi, T., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Shibuya, N., Moro, I. & Koga, T. (1991) Murine macrophage interleukin-1 release by capsularlike serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **59**, 18-23.
- Taubman, M. & Kawai, T. (2001) Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**, 125-35.
- Teng, Y. (2003) The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med* **14**, 237-52.
- Tonetti, M. S., Claffey, N. & European Workshop in Periodontology group, C. (2005) Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* **32 Suppl 6**, 210-3.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., Martin, T. J. & Suda, T. (1989) The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinol* **125**, 1805-13.
- van Winkelhoff, A., Appelmelk, B., Kippuw, N. & De Graaff, J. (1993) K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiol Immunol* **8**, 259-65.
- Vernal, R., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M. & Garcia-Sanz, J. A. (2014) Distinct human T-lymphocyte responses triggered by *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol* **41**, 19-30.

- Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Valenzuela, M. & Gamonal, J. (2005) 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* **32**, 383-89.
- Vernal, R., Dutzan, N., Hernandez, M., Chandía, S., Puente, J., Leon, R., Garcia, L., Del Valle, I., Silva, A. & Gamonal, J. (2006a) 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* **77**, 1772-80.
- Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., García, L., Valle, I. D., Silva, A. & Gamonal, J. (2006b) 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* **77**, 1772-80.
- Vernal, R., Dutzan, N., León, R. & Gamonal, J. (2006c) Papel de los linfocitos T CD4⁺ en la destrucción ósea observada durante la periodontitis crónica. *Av Periodon Implantol* **18**, 149-62.
- Vernal, R. & Garcia-Sanz, J. (2008a) Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infect Disord Drug Targets* **8**, 207-20.
- Vernal, R., León, R., Herrera, D., García-Sanz, J., Silva, A. & Sanz, M. (2008b) Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* **43**, 689-97.
- Vernal, R., Leon, R., Silva, A., van Winkelhoff, A., Garcia-Sanz, J. & Sanz, M. (2009) Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol* **36**, 823-29.
- Walsh, M. & Choi, Y. (2003) Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 251-63.
- Wara-aswapati, N., Surarit, R., Chayasodom, A., Boch, J. A. & Pitiphat, W. (2007) RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* **78**, 1062-9.
- White, D. & Mayrand, D. (1981) Association of oral bacteroides with gingivitis and adult periodontitis. *J Periodontal Res* **16**, 259-65.
- Yamaguchi, N., Kawasaki, M., Yamashita, Y., Nakashima, K. & Koga, T. (1995) Role of the capsular polysaccharide-like serotype-specific antigen in resistance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **63**, 4589-94.
- Zadeh, H. H., Nichols, F. C. & Miyasaki, K. T. (1999) The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontol 2000* **20**, 239-88.
- Zambon, J. J., Christersson, L. A. & Slots, J. (1983a) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* **54**, 707-11.
- Zambon, J. J., Slots, J. & Genco, R. J. (1983b) Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun* **41**, 19-27.

Zhu, L., Wu, Y., Wei, H., Xing, X., Zhan, N., Xiong, H. & Peng, B. (2011) IL-17R activation of human periodontal ligament fibroblasts induces IL-23 p19 production: differential involvement of NF- κ B versus JNK/AP-1 pathways. *Mol Immun* **48**, 647-56.

14. ANEXOS

14.1 Consentimiento informado

Página 1/4

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

Impacto de la variabilidad bacteriana patógena periodontal en la respuesta inmune en humanos.
Asociación de serotipos bacterianos específicos con la salud o enfermedad periodontal.

Objetivo de la investigación:

El propósito del presente estudio es entender la respuesta defensiva que se desarrolla en las personas durante la infección de la encía y los dientes (gingivitis y periodontitis). En particular, analizar ciertas moléculas llamadas citoquinas que se producen en las células defensivas cuando se estimulan con 2 bacterias que causan la enfermedad: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*.

Personas estudiadas:

Se seleccionarán 30 pacientes enfermos de periodontitis agresiva, 30 pacientes enfermos de periodontitis crónica y 30 personas con las encías sanas. Todas las personas serán mayores de 30 años de edad y serán invitados a participar voluntariamente del estudio.

La persona invitada a participar del estudio tiene el derecho de rechazar la incorporación, retirar sus datos o abandonar el estudio en cualquier momento, sin que ello afecte, modifique o implique suspensión de su tratamiento dental.

Las personas que participen en el estudio NO recibirán retribución económica o material.

Examen clínico y toma de la muestra:

A las personas que participen del estudio se les realizará un examen dental completo y, si ingresan al estudio, se le tomará de una muestra de 10 mililitros de sangre venosa, que se obtendrá mediante punción en una vena del antebrazo utilizando los procedimientos estándar (aguja y jeringa).



Procedimiento de laboratorio y destino de las muestras de sangre:

Las muestras de sangre se utilizarán para aislar células, las que en los experimentos se estimularán con las bacterias en estudio para analizar las citoquinas que producen. Cualquier resto sobrante de sangre será destruido.

En las muestras de sangre NO se realizarán estudios genéricos.

Complicaciones que pueden suceder por la toma de las muestras de sangre:

El procedimiento de toma de muestra de sangre es inocuo y estándar. Aún así, en algunos casos puede ocurrir una leve molestia durante la punción con la aguja, desvanecimiento o la aparición de un hematoma o moretón en la zona de punción pasado algunos minutos. Todas estas complicaciones no implicarán riesgo, daño ni detrimento alguno en la salud o en la integridad física y/o síquica de las personas participantes.

Duración de la participación de las personas en el estudio:

Después de realizado el examen dental y tomada la muestra de sangre, si es necesario, al paciente se le realizará el tratamiento dental indicado en un plazo no superior a 2 semanas de realizado el diagnóstico. Una vez tomada la muestra de sangre, el paciente terminará su participación en el estudio.

Beneficios por participar en el estudio:

Los pacientes NO recibirán beneficios directos por participar en el estudio.

El estudio contribuirá a ampliar el conocimiento sobre las defensas de las personas cuando existen infecciones de las encías y los dientes (gingivitis y periodontitis). Esto implica beneficios para el investigador y eventualmente para la odontología clínica.

Aunque los resultados del estudio no implicarán un cambio en el tratamiento dental que los pacientes podrán recibir, los participantes pueden solicitar, si lo desean, información de los resultados del análisis individual y de todo el estudio.



Confidencialidad de los datos:

Todos los datos del paciente serán reservados y sólo se registrarán en la ficha clínica del paciente, manteniendo la confidencialidad tal como lo establece la normativa vigente.

Responsable del Proyecto de Investigación:

El responsable del Proyecto de Investigación es el Profesor Dr. Rolando Vernal Astudillo, quien trabaja en el Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile y que para tal efecto se domicilia en la calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.

Los pacientes pueden contactar al investigador cuando lo deseen para plantear cualquier duda que deseen aclarar.

Institución patrocinante:

La institución patrocinante del Responsable del Proyecto de Investigación es la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Comité Ético Científico:

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Este Comité es presidido por el Prof. Dr. Juan Cortés Araya, quien se domicilia en la calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.

Este Comité es independiente de los investigadores y no tiene conflictos de interés con la industria farmacéutica, cosmética y/o alimentaria.

El paciente que acepte participar en el presente estudio puede solicitar una copia del certificado de aprobación del Proyecto emitido por el Comité.



FORMULARIO
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaración del paciente:

He comprendido las explicaciones que se me han dado, en un lenguaje claro y sencillo, y el investigador me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado.

He comprendido que en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que presto ahora y abandonar la investigación.

Acepto voluntariamente tomar parte en el estudio.

<u>Identificación del Paciente:</u>	<u>Identificación del Investigador Responsable:</u>
Nombre:	Nombre: Rolando Vernal Astudillo
Rut:	Rut: 11.635.874-3
Fono:	Fono: +56-3-9781815
-----	-----
Firma	Firma
<u>Fecha de la firma del paciente:</u>	

Edición del Formulario de Consentimiento Informado: Diciembre de 2010



14.2 Diagnóstico de la condición periodontal

En la siguiente tabla, se muestran las condiciones clínicas de los pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos seleccionados para realizar el ensayo de proliferación.

La edad, la profundidad al sondaje y el nivel de inserción clínico se expresa en promedio \pm desviación estándar. La distribución por género se expresa en porcentaje de hombres seleccionados para cada condición. El sangrado al sondaje y placa bacteriana se expresan como el porcentaje de superficies positivas para cada índice, considerando 4 superficies por diente.

Los datos de periodontitis crónica corresponden a 17 pacientes, de los cuales en 10 se realizó la frecuencia de proliferación ante los distintos serotipos de *P. gingivalis* y 7 ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Los datos de los sujetos sanos corresponden a 10 donantes, de los cuales en 5 se realizó la frecuencia de proliferación ante los distintos serotipos de *P. gingivalis* y 5 ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

	Pacientes con periodontitis (17)	Sujetos sanos (10)
Edad (Rango)	44,1 \pm 5,77	36,1 \pm 6,18
Masculino (%)	35,29	29,41
Profundidad al sondaje (mm)	5,70 \pm 1,27	1,83 \pm 0,42
Nivel de inserción clínico (mm)	7,21 \pm 1,59	1,23 \pm 0,39
Sangrado al sondaje (%)	81,52	0,36
Placa bacteriana (%)	76,45	28,17

14.3 Resúmenes de presentaciones a congresos nacionales e internacionales

1. 4° Curso de Metodología de la Investigación en Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso, Noviembre 2011.
2. X Congreso Latinoamericano de Inmunología, Lima, Perú, Mayo 2012.
3. 15th International Congress of Immunology, Milán, Italia, Agosto 2013.
4. XXV Reunión Anual de la International Association for Dental Research (IADR), División Chile, Octubre 2013.
5. 7th Annual Congress of the IADR/PER, Dubroknik, Croacia, Setiembre 2014 (Aceptado).

14.4 Distinción

1. Premio al mejor trabajo de investigación durante el 4° Curso de Metodología de la Investigación en Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso, Noviembre 2013.

Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant

Rolando Vernal^{1,2}, Jaime Díaz-Zúñiga², Samanta Melgar-Rodríguez², Myriam Pujol², Eva Díaz-Guerra¹, Augusto Silva¹, Mariano Sanz³ and Jose A. Garcia-Sanz¹

¹Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, Spain; ²Periodontal Biology Laboratory, Department of Conservative Dentistry, Dental School, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile; ³EETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Vernal R, Díaz-Zúñiga J, Melgar-Rodríguez S, Pujol M, Díaz-Guerra E, Silva A, Sanz M, Garcia-Sanz JA. Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. J Clin Periodontol 2014; 41: 451–459. doi: 10.1111/jcpe.12236.

Abstract

Aim: Destructive periodontitis is associated with a Th1–Th17 immune response and activation of RANKL-induced osteoclasts. In addition, *Porphyromonas gingivalis* K1 and K2 serotypes induce a strong Th1–Th17 response. This study aimed to investigate whether these *P. gingivalis* serotypes induce higher osteoclasts activation, by increased Th17-associated RANKL production, and an antigen-specific memory T-lymphocyte response.

Material and Methods: The RANKL production and TRAP⁺ osteoclast induction were quantified on naïve T lymphocytes stimulated with dendritic cells primed with the *P. gingivalis* serotypes. The T-bet, GATA-3, RORC2 and Foxp3 expression was correlated with RANKL production. The frequency of proliferating memory T lymphocytes in response to *P. gingivalis* serotypes was determined in both periodontitis and healthy subjects.

Results: T lymphocytes stimulated by K1 or K2-primed dendritic cells elicited higher levels of RANKL and TRAP⁺ osteoclasts than cells stimulated with the other serotypes. RANKL positively correlated with RORC2. Whereas periodontitis patients had a higher frequency of memory T lymphocytes responding to K1 or K2, healthy subjects had a higher frequency of memory T lymphocytes responding to K4 or K⁻.

Conclusions: *P. gingivalis* serotypes K1 and K2, but not others, are associated with an increased production of the osteoclastogenesis-related factor RANKL. This important information suggests that these serotypes could elicit a greater bone resorption in vivo and have a role in the periodontitis pathogenesis.

MS and JAG-S contributed equally to this work and should be considered as joint last authors.

Key words: bone resorption; periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; RANKL; serotypes; T lymphocytes

Accepted for publication 23 January 2014

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that they have no conflict of interests. The research in our laboratories has been supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2009-07974), Instituto de Salud Carlos III (RD06/0010/1010), Spanish National Research Council (PIE200420E240 and PIE200420E586) and Chilean Government (FONDECYT 11100298).

Periodontitis is one of the most common human infectious diseases and one of the primary causes of tooth loss in adults (Tonetti & Claffey 2005, Cochran 2008). It is characterized by the destruction of periodontal connective tissues and