



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL

Niveles de expresión de citoquinas y factores de transcripción tipo Th1, Th17 y Th22 en linfocitos T CD4⁺ activados por células dendríticas expuestas ante hialuronano de bajo peso molecular y estimuladas con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o *Porphyromonas gingivalis*.

Juan Pablo Ibarra Torres

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

Tutor Principal: Dr. Rolando Vernal Astudillo
Tutor Asociado: Dr. Gustavo Monasterio Ocares

Adscrito a proyecto FONDECYT 1181780

Santiago-Chile
Enero 2019

Agradecimientos

Primero que todo debo dar gracias a mi familia que me apoyo durante todos estos años de carrera, en especial a mi madre que siempre estuvo ahí para escucharme y aconsejarme cuando la carrera se puso, en más de alguna ocasión, cuesta arriba. Además, por ser la que me dio la base en mi educación postulándome al IN, y si no fuera por ese hecho no creo estar donde estoy ahora, ni haber forjado las grandes amistades que conservo hasta el día de hoy. A mis tutores Rolando Y Gustavo, por darme la oportunidad de formar parte de este equipo, salvarme de apuros en más de alguna ocasión y enseñarme una parte de la odontología, que si bien no es el área que quiero formar parte a futuro, me llevo las más grandes enseñanzas de ustedes. A mis amigos Che y Gonzalo, por ser los pilares de mi vida universitaria y mis grandes amigos de todo este proceso y que espero, siempre tener a mi lado. A mis amigas Vale, Fran y Diana que, si bien nos conocimos “practicando atletismo”, la amistad continuó mas allá de eso y espero que en el futuro sigamos juntándonos, carreteando y que la amistad crezca aún más con los años. A mis queridos Gunus, por ser mis amigos que siempre dieron apoyo y alegría en esos momentos mas complicados cuando la clínica y el estrés de la U era más importante que comer o dormir; y en especial a Cami y Fernán por ser tan buenos amigos y siempre estar ahí cuando más los necesité. A mi amigo y sensei Pablo, por haber sido una parte importante de este proceso entregándome grandes enseñanzas, uno que otro moretón y una amistad que espero que perdurará con los años y algún día podamos volver a entrenar juntos y sin lesiones jajaja.

Y a todos mis amigos y familia que de alguna forma me dieron su apoyo o estuvieron ahí ya sea dándome alegrías o escuchando GRACIAS por haber estado dentro de este proceso.

Un abrazo a todos y espero ser digno de su amistad y cariño durante todos estos años, que espero no sean pocos.

JUAN PABLO IBARRA TORRES.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
a. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	5
b. Destrucción tisular y fragmentación del hialuronano	6
c. Células dendríticas	8
d. Respuesta inmune tipo Th1, Th17 y Th22 durante la periodontitis	8
e. Planteamiento del problema científico	11
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
a. Bacterias periodontales	13
b. Obtención de sangre periférica	13
c. Obtención de células dendríticas	14
d. Obtención de linfocitos T <i>naïve</i>	14
e. Estimulación con LMW-HA y estimulación con Periodonto-patógenos	15
f. Grupos experimentales	15
g. Purificación de RNA citoplasmático total	16
h. Síntesis de la primera cadena de cDNA y cuantificación mediante RT-qPCR	16
i. Análisis de los datos	17
6. RESULTADOS	19
a. Niveles de expresión relativa de las citoquinas IFN- γ , IL-17 e IL-22	19
b. Niveles de expresión relativa de los factores de Transcripción T-bet, RORC2 y AhR	22
c. Niveles de expresión de RANKL y CD44	24
7. DISCUSIÓN	26
8. CONCLUSIÓN	33
9. BIBLIOGRAFÍA	34
10. ANEXO	42

RESUMEN

La periodontitis es un conjunto de enfermedades de carácter inflamatorio y etiología infecciosa que afectan a los tejidos de soporte de los dientes. Entre las bacterias asociadas a su etiología, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* han sido identificadas como claves en la activación de la respuesta inmune del hospedero que conduce a la destrucción tisular.

Los procesos de destrucción tisular desencadenados durante las periodontitis pueden inducir el fraccionamiento de las macromoléculas que componen la matriz extracelular (MEC) de los tejidos periodontales, tal como el ácido hialurónico o hialuronano (HA). Se ha descrito que los fragmentos de hialuronano de bajo peso molecular (LMW-HA), liberados por el fraccionamiento de la MEC, inducen la activación de la respuesta inmune en el hospedero al ser reconocidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) por células presentadoras de antígeno (APCs), las cuales a su vez pueden activar la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T. En el contexto de la periodontitis, aún no se ha establecido el potencial efecto del LMW-HA en la polarización funcional de los linfocitos T hacia los fenotipos T colaboradores (Th) tipo Th1, Th17 y Th22, asociados a inflamación periodontal y la resorción del hueso alveolar mediada principalmente por RANKL, ni la relevancia de la unión del LMW-HA a CD44 como principal receptor de unión al HA, durante la respuesta inmune desencadenada por *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.

Con el propósito de dilucidar el efecto que tiene el LMW-HA en la activación y/o polarización de linfocitos T colaboradores durante la periodontitis, en el presente trabajo se estableció un modelo *in vitro* de activación de linfocitos T con células dendríticas autólogas expuestas a *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis* y estimuladas con LMW-HA, para determinar las variaciones en los niveles de expresión de citoquinas y factores de transcripción representativos de las respuestas Th1, Th17 y Th22 como también cuantificar la variación en la expresión de CD44 y RANKL.

INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son un conjunto de patologías de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa, cuya causa principal son las bacterias periodonto-patógenas que colonizan el surco gingivodentario (Offenbacher, 1996, Darveau, 2010, Page and Kornman, 1997). El inicio de la enfermedad se asocia a un desequilibrio ecológico dentro de la comunidad de microorganismos que componen el microbioma subgingival, fenómeno conocido como disbiosis (Hajishengallis & Lamont, 2012). Esta disbiosis se traduce en el incremento de ciertos componentes bacterianos individuales que promueven fenómenos de destrucción de los tejidos de soporte de los dientes al interactuar con los mecanismos de respuesta del hospedero (Hajishengallis & Lamont, 2012).

Entre las bacterias asociadas con mayor frecuencia a la inducción de fenómenos de destrucción tisular están *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. En efecto, la destrucción tisular durante la periodontitis se asocia principalmente a una hiper-activación de la respuesta inmune del hospedero inducida por el incremento local de ciertos componentes estructurales inmunógenos de estos patógenos periodontales (Armitage, 1999, Kinane and Lappin, 2001).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis

A. actinomycetemcomitans es un cocobacilo Gram-negativo, capnofílico, no móvil, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Suzuki et al., 2001), el cual se asocia particularmente a la periodontitis agresiva localizada (Fine et al., 2007). Entre sus diversos factores de virulencia, el lipopolisacárido (LPS) se caracteriza por ser el factor de virulencia inmuno-dominante de *A. actinomycetemcomitans* (Perry et al., 1996b, Perry et al., 1996a, Kaplan et al., 2001, Díaz Zúñiga et al., 2012). Sobre la base de la antigenicidad de la fracción de O-polisacáridos componentes de su LPS, se describen siete serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, denominados *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* y *g* (King and Tatum, 1962, Zambon et al., 1983, Page et al., 1991, Gmür et al., 1993, Perry et al., 1996a, Perry et al., 1996b, Kaplan et al., 2001). Entre ellos, el

serotipo *b* presenta un potencial inmunogénico mayor al de los demás y se asocia a formas más severas de periodontitis (Díaz-Zuñiga et al., 2015).

P. gingivalis es un cocobacilo Gram-negativo, no móvil, anaerobio estricto, asacarolítico, perteneciente a la familia *Bacteroidetes* (Olsen et al., 2017). Se asocia principalmente al inicio y progresión de la periodontitis, siendo considerado un periodonto-patógeno de alta prevalencia en las lesiones periodontales severas (Hajishengallis and Lamont, 2012). Sobre la base de la antigenicidad de la cápsula extracelular, se han identificado 6 serotipos diferentes de *P. gingivalis*, denominados *K1*, *K2*, *K3*, *K4*, *K5* y *K6* (Kikkert et al., 2007, Laine et al., 1996), entre los cuales el serotipo *K1* es descrito como el más inmunogénico (Vernal et al., 2008).

Si bien la destrucción tisular característica de las periodontitis puede ser producida en parte por los mecanismos de virulencia de los patógenos periodontales, el determinante principal de la destrucción tisular es la respuesta inmune del hospedero que se despliega ante estos microorganismos, la cual puede modular diversos procesos que afectan la integridad de los tejidos periodontales (Hajishengallis and Lamont, 2012).

Destrucción tisular y fragmentación del hialuronano

Un fenómeno central en el inicio y progresión de la periodontitis es la desorganización y destrucción de la matriz extracelular (MEC), tanto por enzimas bacterianas como por las enzimas y compuestos presentes en los tejidos periodontales (Embery and Waddington, 1994). La inflamación periodontal, producto de la acción persistente del microbioma periodontal disbiótico, conduce a la activación de diversas enzimas que en estado de salud se encuentran inactivas y que en estado de activación producen la fragmentación de los componentes de la MEC en los tejidos periodontales (Silva et al., 2015).

Entre los principales componentes de la MEC se encuentra el ácido hialurónico (HA) o hialuronano, el cual es un glicosaminoglicano de alto peso molecular ($>10^6$ kDa) que se distribuye ampliamente en diversos tejidos del

organismo, tal como los tejidos periodontales (Laurent and Fraser, 1992, Laurent et al., 1995). En los tejidos inflamados, su forma natural de alto peso molecular (HMW-HA) puede degradarse a fragmentos de bajo peso molecular (LMW-HA) de tamaño menor a 500 kDa, por acción de especies reactivas de oxígeno (ROS y NRS) y degradación enzimática por hialuronidasas (HYAL), β -glucuronidasas o hexosaminidasas (Sampson et al., 1992).

La molécula de superficie CD44 es el principal receptor de HA y su señalización intracelular contribuye a activar los fenómenos de proliferación, diferenciación y migración celular; presentación de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento a los receptores correspondientes; acoplamiento de proteasas en la membrana celular; y también como señalización para la supervivencia celular (Naor et al., 2002). Aunque estas propiedades son esenciales para las actividades fisiológicas normales de los tejidos, también se asocian a fenómenos patológicos, tal como en el desarrollo de cáncer (Chen et al., 2018). En este contexto, el HA puede presentarse en formas de alto y bajo peso molecular, donde el HMW-HA participa en el desarrollo de algunos tipos de cáncer, mediante la inducción de respuestas antiinflamatorias, antiangiogénicas e induciendo tumorigénesis (Louderbough and Schroeder, 2011, Senbanjo and Chellaiah, 2017). Por su parte, el LMW-HA puede señalar además a través de los receptores tipo toll (TLR)2 y/o TLR4 (Liang et al., 2016, Lee-Sayer et al., 2015). En fibroblastos y queratinocitos, el LMW-HA promueve la secreción de especies reactivas de oxígeno, citoquinas, quimioquinas y enzimas destructivas (Termeer et al., 2000, Powell and Horton, 2005, Scheibner et al., 2006). Por otro lado, macrófagos expuestos a LMW-HA incrementan la producción de quimioquinas, tales como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1 y CXCL10, citoquinas, tales como interleuquina (IL)-1 β , IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α , y metaloproteinasas de matriz (MMPs), tales como MMP-8, MMP-9 y MMP-12 (Hodge-Dufour et al., 1997, Horton et al., 2002, Horton et al., 1998, Horton et al., 2000, Horton et al., 1999, Noble et al., 1993).

Células dendríticas

Las células dendríticas (CDs) son células presentadoras de antígeno profesionales pertenecientes a la respuesta inmune innata, que cumplen un rol central en el inicio y regulación de la respuesta inmune adquirida mediada por los linfocitos T (Bousso, 2008). Las CDs pueden reconocer antígenos de origen microbiano, tales como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), mediante receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs). Los TLRs son los principales PRRs que reconocen antígenos bacterianos y, entre ellos, TLR2 y TLR4 están involucrados en el reconocimiento de antígenos de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, tal como el LPS y la cápsula extracelular (Kikkert et al., 2007). Además, las CDs pueden reconocer fragmentos tisulares del hospedero liberados en condiciones de destrucción tisular, denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), los cuales pueden desencadenar una respuesta inmune en consecuencia a daño tisular (Land, 2015).

Respuesta inmune tipo Th1, Th17 y Th22 durante la periodontitis

Durante la presentación antigénica, las CDs maduras determinan la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos T CD4⁺ (T colaboradores) *naïve*. La activación del receptor del linfocito T (TCR) induce la expresión de factores de transcripción que determinan su activación y proliferación y, en conjunto con las moléculas co-estimuladoras y las citoquinas secretadas por las células dendríticas, inducen la diferenciación selectiva a los distintos fenotipos linfocitarios T colaboradores (Th): Th1, Th2, Th17 y Th22 (Zhu and Paul, 2008, Banchereau et al., 2000). Cada fenotipo efector se caracteriza por la activación de un factor de transcripción específico que determina su diferenciación fenotípica y función, definida por la producción de citoquinas características, detalladas en la Tabla 1 (Veldhoen et al., 2008, Takami et al., 2012, Baba et al., 2012, Goswami and Kaplan, 2012, Azuma, 2006, Banchereau et al., 2000, Bluestone et al., 2009, Galy et al., 1995, Steinman et al., 2003, Zhu and Paul, 2008).

Durante las periodontitis, la inflamación y destrucción de los tejidos periodontales es mediada principalmente por respuestas tipo Th1, Th17 y/o Th22 (Díaz-Zúñiga et al., 2017). Los linfocitos Th1 participan en la activación de la fagocitosis, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y se han asociado a la inflamación local (Appay et al., 2008, Garlet, 2010). IFN- γ , la citoquina característica producida por linfocitos Th1, induce mayores niveles de expresión de TNF- α , IL-1 β y se asocia predominantemente a inflamación y destrucción tisular (Repeke et al., 2010). Por otro lado, los linfocitos Th17 se asocian con enfermedades osteo-destructivas de carácter crónico, tal como la periodontitis y la artritis reumatoide (Vernal et al., 2006a, Vernal and Garcia-Sanz, 2008, Vernal et al., 2006b). En particular, las citoquinas IL-17, IL-23 y el factor pro-resorción ósea denominado ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) secretados por los linfocitos Th17 se relacionan con los procesos osteo-destructivos durante la periodontitis (Ohyama et al., 2009). En efecto, los linfocitos Th17 inducen la osteoclastogénesis y la resorción ósea alveolar mediante la secreción de IL-17 y RANKL (Taubman and Kawai, 2001, Vernal et al., 2005, Vernal et al., 2006a, Kramer and Gaffen, 2007). Por otro lado, recientemente se describió el rol de los linfocitos Th22 durante las periodontitis al detectar niveles incrementados de IL-22 y AhR en el fluido gingival crevicular de pacientes con periodontitis en comparación a pacientes con gingivitis o sanos, y describir una correlación positiva entre los niveles de resorción ósea alveolar e IL-22 (Díaz-Zúñiga et al., 2017).

Tabla 1. Factores de transcripción, citoquinas y función principal periodontal de los distintos fenotipos efectores de linfocitos T CD4⁺.

Fenotipo efector	Factor de transcripción	Citoquinas (en negrita la citoquina representativa)	Función en periodontitis
Th1	T-bet	IFN-γ , TNF- α , TNF- β	Pro-inflamatoria
Th2	GATA3	IL-4 , IL-5, IL-13	Inmunomoduladora
Th17	RORC2 (ROR γ t en ratones)	IL-6, IL-17 , IL-21, IL-23, RANKL	Pro-inflamatoria y osteodestructiva
Th22	AhR	IL-22	Pro-inflamatoria

Planteamiento del problema científico

El LMW-HA es un DAMP asociado a diversas patologías, tales como artritis reumatoide, enfisema pulmonar y enfermedades autoinmunes (Powell and Horton, 2005 , Land, 2015). Durante la periodontitis, se han detectado elevados niveles tisulares de LMW-HA (Yamalik et al., 1998) como resultado de la acción de las enzimas bacterianas, hialuronidasas endógenas tisulares y especies reactivas de oxígeno (Casale et al., 2016). En efecto, existe una relación directa entre la severidad de la periodontitis, la actividad de hialuronidasas endógenas y la detección de LMW-HA en el fluido crevicular gingival (Aisenberg and Aisenberg, 1951, Last and Embery, 1987, Ohno et al., 2002). Adicionalmente, las CDs mediante sus TLRs pueden activar vías de señalización intracelulares sinérgicas entre PAMPs y DAMPs, lo cual confiere un rol relevante a las señales derivadas de la destrucción tisular durante la activación de la respuesta inmune adaptativa inducida por procesos infecciosos (Powell and Horton, 2005). Si bien el HA es la principal molécula de unión a CD44, recientemente, se ha reportado que puede reconocer a LMW-HA a través de un complejo entre TLR4 y CD44, por lo tanto el LMW-HA a través de CD44 podría inducir una respuesta inmune o tener una función como molécula adyuvante mediado por células del sistema inmune (Lee-Sayer et al., 2015).

Sobre la base de estos antecedentes, es posible especular que el LMW-HA puede desempeñar un rol en la en la activación y/o polarización de linfocitos T colaboradores durante la respuesta inmune desencadenada por *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.

HIPÓTESIS

El LMW-HA induce un incremento en los niveles de expresión de citoquinas y factores de transcripción asociados a los fenotipos linfocitarios Th1, Th17 y Th22, como también CD44 y RANKL en linfocitos T CD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de citoquinas y factores de transcripción asociados a los fenotipos linfocitarios Th1, Th17 y Th22, y el nivel de expresión de CD44 y RANKL en linfocitos T CD4⁺ activados por células dendríticas expuestas o no a LMW-HA y estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar y comparar los niveles de expresión de IFN- γ (Th1), IL-17 (Th17) e IL-22 (Th22) en linfocitos T CD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas expuestas o no a LMW-HA y estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.
2. Cuantificar y comparar los niveles de expresión de los factores de transcripción T-bet (Th1), RORC2 (Th17) y AhR (Th22) en linfocitos T CD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas expuestas o no a LMW-HA y estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.
3. Cuantificar y comparar los niveles de expresión de RANKL y CD44 en linfocitos T CD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas expuestas o no a LMW-HA y estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias periodontales

La cepa *P. gingivalis* W50, perteneciente al serotipo *K1*, se sembró en medio agar sangre hemina-menadiona (5% de sangre desfibrinada de caballo y 0,5 mg/L de hemina y menadiona) en condiciones de anaerobiosis (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) a 37°C usando generadores AnaeroGen™ (Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra). La cepa *A. actinomycetemcomitans* ATCC®43718™, perteneciente al serotipo *b*, se sembró en medio agar infusión cerebro-corazón (BHI; Oxoid LTD, Hampshire, England) en condiciones de capnofilia (O₂ 8% y CO₂ 12%) a 37°C usando generadores CampyGen™ (Oxoid Ltd).

Obtención de sangre periférica

Se purificaron las células sanguíneas a partir de donaciones de sangre total obtenidas por el método de capa leucoplaquetar (“*buffy-coat*”) de individuos sanos asistentes al banco de sangre del Hospital Clínico Dr. José Joaquín Aguirre, Universidad de Chile. Los criterios de exclusión fueron la prueba positiva del virus VIH y/o de hepatitis B o C, la presencia de infecciones manifiestas durante el último mes, fiebre, alergias sintomáticas, recuentos anormales de células sanguíneas, aumento de enzimas hepáticas o consumo de medicamentos de cualquier tipo, excepto vitaminas y anticonceptivos orales. Los individuos participantes fueron voluntarios que firmaron un consentimiento informado que fue aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Obtención de células dendríticas

De cada muestra, se aislaron las células sanguíneas mononucleares usando un gradiente de concentración, (Ficoll-Paque Plus[®], Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia) y a partir de ellas se purificaron los monocitos mediante separación inmuno-magnética, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD14 conjugado con partículas inmuno-magnéticas (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Alemania). Luego, los monocitos purificados se sometieron inmediatamente a un protocolo estandarizado de diferenciación a CDs. Los monocitos CD14⁺ se cultivaron durante 6 días a una concentración de 1×10^6 células/mL en 2 mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp) y 20 ng/mL del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-4 (R&D, Minneapolis, MN, EEUU).

Obtención de linfocitos T CD4⁺ *naïve*

Posteriormente, los linfocitos T CD4⁺ *naïve* se purificaron utilizando un kit de depleción celular específico de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Alemania). Para esto, una fracción de las células sanguíneas mononucleares se incubaron con un mix de anticuerpos monoclonales anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ y CD235a conjugados con biotina y posteriormente con un anticuerpo anti-biotina conjugado con partículas inmuno-magnéticas. Luego, los linfocitos T CD4⁺ *naïve* se purificaron usando columnas de depleción LD montadas en un campo magnético.

Estimulación con LMW-HA y estimulación con periodonto-patógenos

Las CDs se pulsaron con LMW-HA 20 kDa (R&D systems, Minneapolis, MN Estados Unidos) a 100 µg/mL, los días 3 y 5 de diferenciación celular. CDs sin pulsar se utilizaron como control. Luego, las CDs se estimularon con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis* a una multiplicidad infectante (MOI) de 10² (razón bacterias/CDs) durante 48 horas. CDs no estimuladas se utilizaron como control. Finalmente, los linfocitos T CD4⁺ *naïve* autólogos se activaron en presencia de las CDs en una relación de 1:10 (razón CDs/linfocitos T) durante 5 días mediante un co-cultivo. Además, se incluyeron 6 condiciones con estimulación con 100 µg/mL de LMW-HA durante el protocolo de co-cultivo con linfocitos T.

Grupos experimentales

Con el objetivo de evaluar los efectos del LMW-HA, tanto durante la estimulación con periodonto-patógenos como durante la presentación antigénica a Linfocitos T, hubo 12 condiciones de estudio: El primer grupo fue estimulado con LMW-HA a 100 µg/mL en la etapa de estimulación de células dendríticas, pero no durante el co-cultivo como ha sido descrito, mientras el segundo grupo incluyó estimulación con LMW-HA a 100 µg/mL tanto en la estimulación como durante el co-cultivo con Linfocitos T.

Grupo 1: Co-cultivos de Linfocitos T sin LMW-HA adicionado a su medio (efecto durante el reconocimiento antigénico):

1. CDs estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* y no expuestas LMW-HA.
2. CDs estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* y expuestas a LMW-HA.
3. CDs estimuladas con *P. gingivalis* y no expuestas a LMW-HA.
4. CDs estimuladas con *P. gingivalis* y expuestas a LMW-HA.
5. CDs sin estimulación de patógenos y no expuestas a LMW-HA.
6. CDs sin estimulación de patógenos y expuestas a LMW-HA.

Grupo 2: Co-cultivos de Linfocitos T con LMW-HA adicionado a su medio (efecto durante la presentación antigénica):

1. CDs estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* y no expuestas a LMW-HA
2. CDs estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* y expuestas a LMW-HA.
3. CDs estimuladas con *P. gingivalis* y no expuestas a LMW-HA
4. CDs estimuladas con *P. gingivalis* y expuestas a LMW-HA.
5. CDs sin estimulación de patógenos y no expuestas a LMW-HA.
6. CDs sin estimulación de patógenos y expuestas a LMW-HA.

Purificación de RNA citoplasmático total

Se extrajo el RNA citoplasmático total de los linfocitos T CD4⁺ utilizando 400 µL de buffer de lisis celular Igepal® CA-630 0,5% (SigmaAldrich, Saint Louis, MO, EEUU), Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM y VRC-40 10 mM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Para ello, los linfocitos T se centrifugaron a 2.000 xg durante 5 minutos a 20°C y luego se lavaron con 1 mL de PBS. Luego de eliminar el sobrenadante, las células se lisaron realizando movimientos vigorosos con la micropipeta. El lisado celular se centrifugó a 8.000 xg durante 10 segundos y el sobrenadante libre de fragmentos celulares se depositó en tubos nuevos, para ser incubado con SDS 20%, EDTA 0,5 M y proteinasa K 10 mg/mL durante 2 horas a 37°C. Luego de agregar 400 uL de un mix de fenol:alcohol isoamílico: cloroformo, se recuperó el RNA total mediante centrifugación a 8.000 xg durante 10 minutos. El RNA total se precipitó en presencia de acetato de sodio 3 M, glicógeno y alcohol etílico a -80°C durante 24 horas y se cuantificó usando un espectrofotómetro (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EEUU).

Síntesis de la primera cadena de cDNA y cuantificación mediante RT-qPCR

Las primeras cadenas de cDNA se sintetizaron a partir 5 µg del RNA total usando un kit de transcripción reversa siguiendo las instrucciones del fabricante (SuperScrip™; Invitrogen, Grand Island, NY, EEUU). Posteriormente, a partir de 50 ng de cDNA, se cuantificaron los niveles de expresión de los mRNA de las citoquinas

IFN- γ , IL-17 e IL-22, los factores de transcripción T-bet, RORC2 y Ahr y además RANKL y CD44, usando partidores específicos (Tabla 2) y el reactivo de qPCR KAPA™ SYBR® (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EEUU). Para ello se utilizó en un equipo de qPCR StepOnePlus® (Applied Biosystems, Singapore) siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos. Finalmente se realizó una curva de degradación de los productos de amplificación de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos, para detectar la formación de productos no específicos y amplificación de falsos positivos. Los niveles de rRNA 18S fueron cuantificados y se utilizaron como referencia para la cuantificación relativa.

Análisis de los datos

Los niveles relativos de expresión de los mRNA de las citoquinas, factores de transcripción, RANKL y CD44, se determinaron usando el programa StepOne v2.2.2 (Applied Biosystems), normalizando la expresión de los mRNA de IFN- γ , IL-17, IL-22, T-bet, RORC2, AhR, RANKL y CD44 a los niveles de expresión de 18S rRNA usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Utilizando un software estadístico SPSS v.22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU) se determinó la normalidad de la distribución de datos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante los test ANOVA y post-hoc Tukey o Kruskal Wallis y post-hoc de Dunn. Se asumió significancia estadística para el valor $p < 0.05$.

Tabla 2. Partidores utilizados para la amplificación de receptor, citoquinas y factores de transcripción.

Nombre	Partidor forward	Partidor reverse
AhR	caacatcacctacgccagtc	ctatgccgcttgaaggat
CD44	caagcaggaagaaggatgga	tccaaatctccaccaaacc
IFN-γ	ggcatttgaagaattggaaag	ttggatgctctggcatctt
IL-17	ttcagggcogagaagatgct	aaacgtgggggttcttagg
IL-22	accttccttgaccaaactca	agcttctctcgctcagacg
RANKL	tgattcatgtaggagaattaaacagg	gatgtgctgtgatccaacga
RORC2	agaaggacagggagccaag	caagggatcactcaatttg
T-bet	tccaagtttaatcagcaccaga	tgacaggaatgggaacatcc
18s	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

AhR, Factor de transcripción receptor de Aril hidrocarburos; *CD44*, Clúster de diferenciación 44; *IFN- γ* , Interferon gamma; *IL*, interleuquina; *RANKL*, ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B; *RORC2*, Factor de transcripción receptor huérfano tipo C2 del ácido retinoico; *T-bet*, Factor de transcripción T-box expresado en células T.

RESULTADOS

Niveles de expresión relativa de las citoquinas IFN- γ , IL-17 e IL-22

Los niveles de expresión de los mRNA de IFN- γ , IL-17 e IL-22 se cuantificaron mediante RT-qPCR en co-cultivos de CDs estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis* y linfocitos T *naïve* autólogos. Las células fueron expuestas a LMW-HA en distintos momentos de la interacción celular, considerando el contexto de reconocimiento y/o presentación antigénica: LMW-HA durante reconocimiento antigénico (HA1); LMW-HA durante presentación antigénica (HA2); LMW-HA durante reconocimiento y presentación antigénica (HA3) (Figura 1).

En los experimentos realizados con *A. actinomycetemcomitans*, se observó un incremento en los niveles de expresión relativa de IFN- γ en HA1 ($p= 0,039$), en HA2 ($p< 0,001$) y en HA3 ($p< 0,001$) (Figura 2A). En los experimentos realizados con *P. gingivalis*, se observó un incremento en los niveles de expresión de IFN- γ en HA2 ($p< 0,001$) y en HA3 ($p< 0,001$) (Figura 2A). En aquellos experimentos realizados con células dendríticas sin estimulación bacteriana, se observó únicamente un incremento en los niveles de expresión de IFN- γ en HA3 ($p< 0,001$), respecto de aquellas células sin estimulación con LMW-HA (Figura 2A).

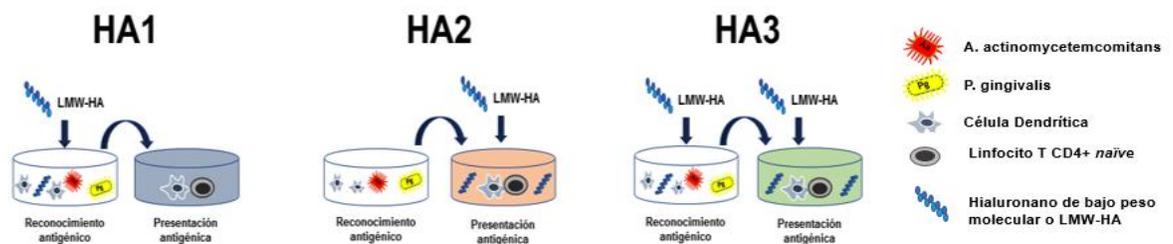


Figura 1. Esquema representativo de las etapas de estimulación con ácido hialurónico de bajo peso molecular (LMW-HA). HA1: Estímulo con LMW-HA sobre las células dendríticas, durante el reconocimiento antigénico de *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*. HA2: Estímulo con LMW-HA durante la presentación antigénica de células dendríticas a linfocitos T autólogos. HA3: Estímulo con LMW-HA durante el reconocimiento antigénico y presentación antigénica.

En los resultados obtenidos para IL-17, se observó que en los experimentos realizados con *A. actinomycetemcomitans* existe un incremento en los niveles de expresión relativa en HA2 ($p < 0,001$) y en HA3 ($p < 0,001$) (Figura 2B). Por otro lado, en los experimentos realizados con *P. gingivalis* se observó un incremento en los niveles de expresión relativa en HA2 ($p < 0,001$) y en HA3 ($p < 0,001$) (Figura 2B). No se observaron variaciones estadísticamente significativas en los niveles de expresión relativa de IL-17 en linfocitos T para ninguna de las condiciones sin estimulación bacteriana (Figura 2B).

Respecto de los niveles de expresión relativa de IL-22, en los experimentos realizados con *A. actinomycetemcomitans* se observó un incremento en HA2 ($p < 0,001$) y en HA3 ($p < 0,001$), mientras que en los grupos estimulados con *P. gingivalis* se observó un incremento en los niveles de expresión relativa en HA2 ($p < 0,001$) y en HA3 ($p < 0,001$) (Figura 2C). En los experimentos sin estimulación bacteriana no se observaron variaciones estadísticamente significativas en los niveles de expresión relativa de IL-22 en linfocitos T para ninguna de las condiciones (Figura 2C).

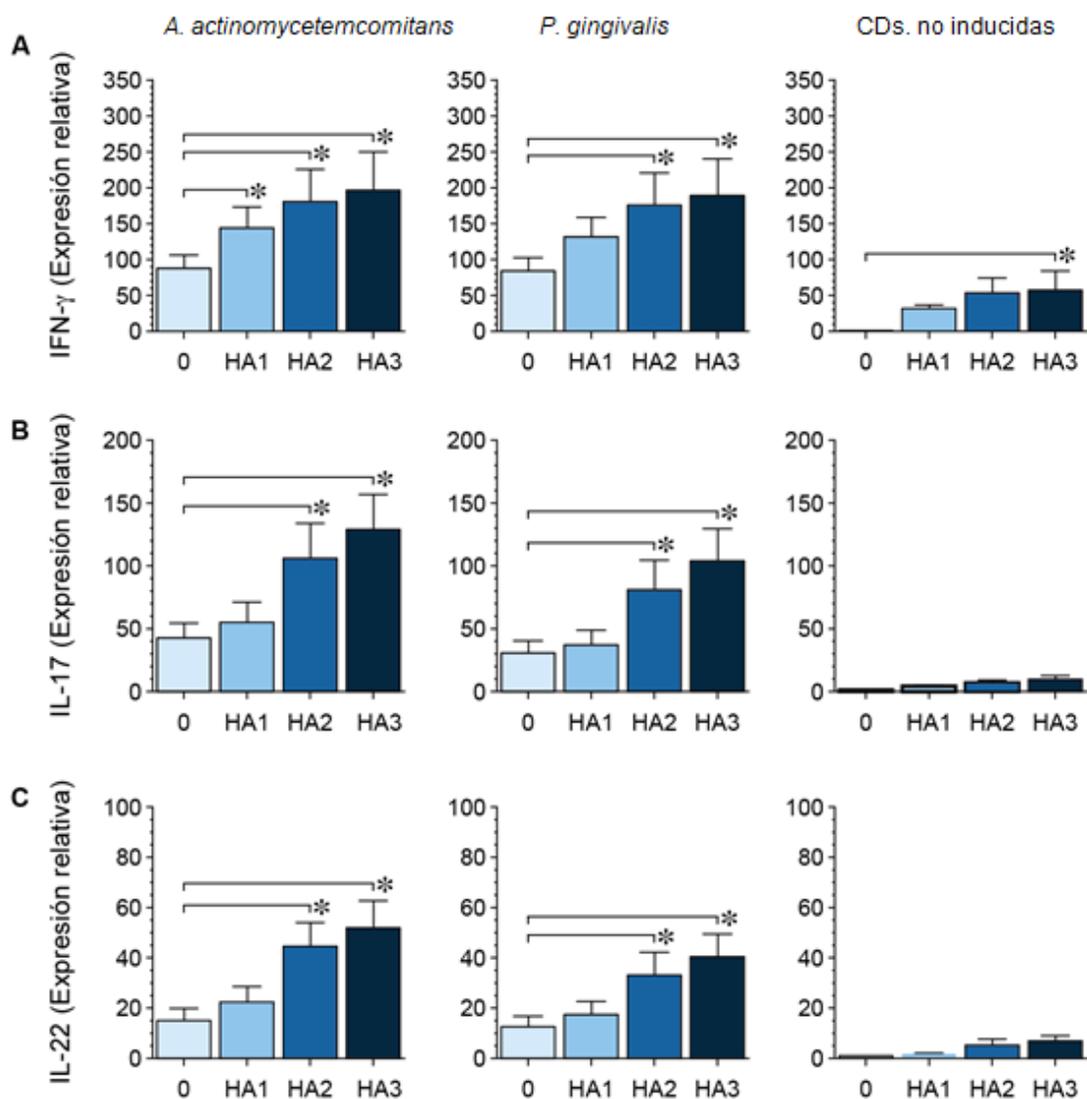


Figura 2. Niveles de expresión relativa de citoquinas en linfocitos T CD4⁺ estimulados *in vitro* con LMW-HA en HA1, HA2 o HA3. Niveles de expresión relativa de IFN- γ (A), IL-17 (B) e IL-22 (C) en linfocitos T CD4⁺ expuestos ante células dendríticas estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*. Como control, se cuantificaron los niveles de citoquinas en células sin estimulación bacteriana. Resultados a partir de 5 experimentos independientes. Los niveles de expresión obtenidos en células no expuestas a LMW-HA (Grupo 0) fueron considerados como valor 1 para la cuantificación relativa. * $p < 0,05$.

Niveles de expresión relativa de los factores de transcripción T-bet, RORC2 y AhR

Con el objetivo de cuantificar los niveles de expresión de los factores de transcripción T-bet, RORC2 y AhR en linfocitos T CD4+ *naïve* activados con células dendríticas autólogas expuestas a LMW-HA en HA1, HA2 o HA3 y estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*, se cuantificaron los niveles de expresión relativa de mRNA mediante RT-qPCR.

En los resultados obtenidos de los experimentos realizados con *A. actinomycetemcomitans* para los niveles de expresión relativa de T-bet, el factor de transcripción de linfocitos Th1, se observó un incremento en los niveles de expresión relativa en HA1 ($p= 0,038$), en HA2 ($p< 0,001$) y en HA3 ($p< 0,001$) (Figura 3A). Resultados similares se observaron en experimentos realizados con *P. gingivalis* en HA2 ($p< 0,001$) y HA3 ($p< 0,001$) (Figura 3A). En los grupos sin estimulación bacteriana, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 3A).

Al comparar los niveles expresión relativa de RORC2, el factor de transcripción característico de linfocitos Th17, se observó que en los grupos estimulados con *A. actinomycetemcomitans* existe un incremento en HA2 ($p< 0,002$) y en HA3 ($p< 0,001$) (Figura 3B). Siguiendo la misma tendencia, los resultados obtenidos de los experimentos con *P. gingivalis* arrojaron un incremento en los niveles de expresión de RORC2 en HA2 ($p< 0,004$) y en HA3 ($p< 0,001$) (Figura 3B). En grupos sin estimulación bacteriana no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 3B).

Respecto de los niveles de expresión relativa de AhR, factor de transcripción característico de linfocitos Th22, se observó un incremento en HA2 ($p< 0,001$) y en HA3 ($p< 0,001$) en experimentos realizados con *A. actinomycetemcomitans*, mientras que en aquellos realizados con *P. gingivalis* se observó un incremento de en HA2 ($p< 0,001$) y en HA3 ($p< 0,001$) (Figura 3C). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los grupos sin estimulación bacteriana (Figura 3C).

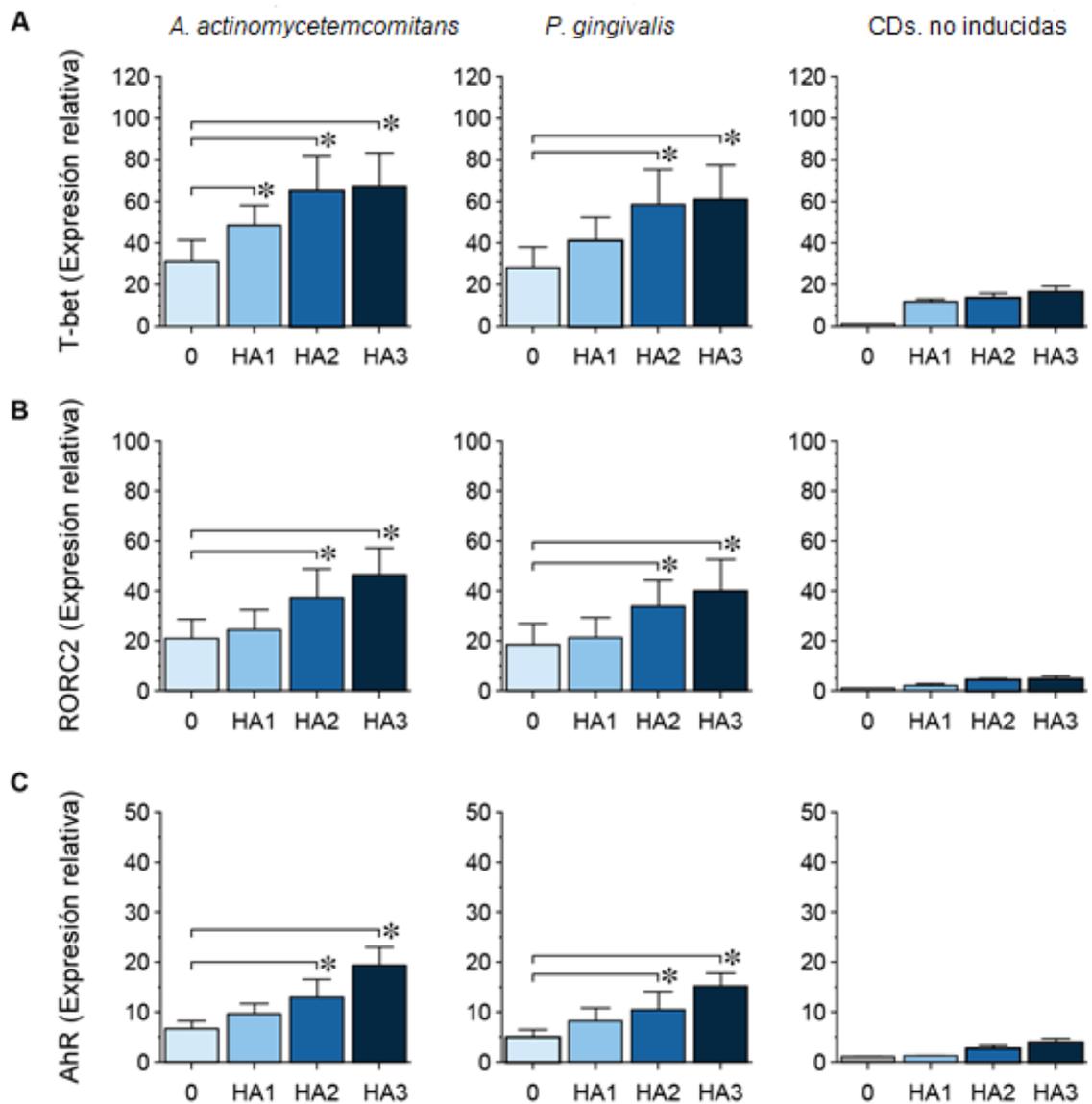


Figura 3. Niveles de expresión relativa de factores de transcripción en linfocitos T CD4+ estimulados *in vitro* con LMW-HA en HA1, HA2 o HA3. Niveles de expresión relativa de T-bet (A), RORC2 (B) y AhR (C) en linfocitos T CD4+ expuestos ante células dendríticas estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*. Como control, se cuantificaron los niveles de factores de transcripción en células sin estimulación bacteriana. Resultados a partir de 5 experimentos independientes. Los niveles de expresión obtenidos en células no expuestas a LMW-HA (Grupo 0) fueron considerados como valor 1 para la cuantificación relativa. * $p < 0,05$.

Niveles de expresión de RANKL y CD44

Se cuantificaron los niveles de expresión génica del factor pro-resorción ósea RANKL y el receptor de HA CD44, en linfocitos T mediante RT-qPCR, y se compararon entre los distintos grupos de estimulación con LMW-HA, HA1, HA2 o HA3 tanto en experimentos realizados con *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, o sin estimulación bacteriana.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados con *A. actinomycetemcomitans* arrojaron un incremento en los niveles de expresión relativa de RANKL en HA2 ($p < 0,001$) y en HA3 ($p < 0,001$) (Figura 4). Por otro lado, en los grupos estimulados con *P. gingivalis* se observó un incremento en los niveles de expresión relativa en HA2 ($p < 0,001$) y en HA3 ($p < 0,001$), mientras que en los grupos sin estimulación bacteriana no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4).

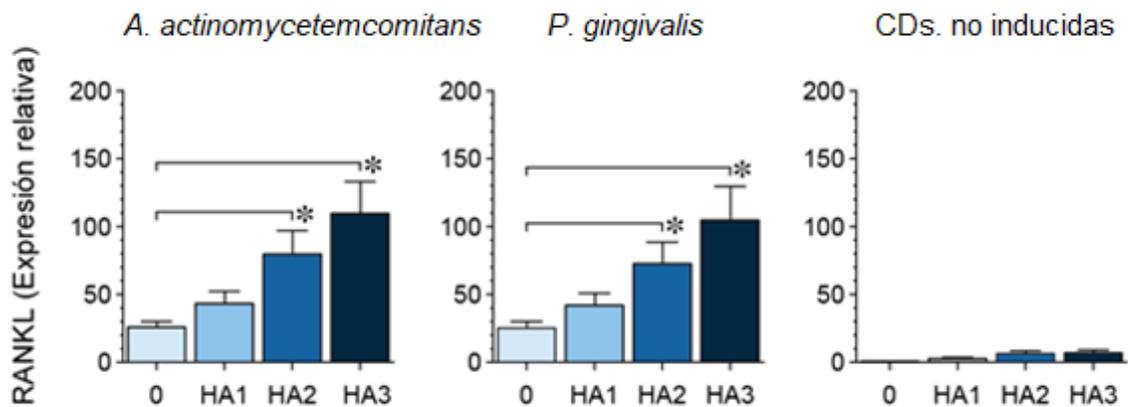


Figura 4. Niveles de expresión relativa del factor pro-resorción ósea RANKL en linfocitos T estimulados *in vitro* con LMW-HA en HA1, HA2 o HA3. Niveles de expresión relativa de mRNA de RANKL en linfocitos T CD4+ expuestos ante células dendríticas estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*. Como control, se cuantificaron los niveles de RANKL en células sin estimulación bacteriana. Resultados a partir de 5 experimentos independientes. Los niveles de expresión obtenidos en células no expuestas a LMW-HA (Grupo 0) fueron considerados como valor 1 para la cuantificación relativa. * $p < 0,05$.

Los niveles de expresión relativa de mRNA del receptor específico de HA, CD44, arrojaron un incremento en HA2 ($p < 0,001$) y en HA3 ($p < 0,001$), en los experimentos realizados con *A. actinomycetemcomitans*, mientras que en los grupos estimulados con *P. gingivalis* se observó un incremento en HA2 ($p < 0,001$) y en HA3 ($p < 0,001$) (Figura 5). Interesantemente, en los experimentos que no tuvieron presencia de bacterias periodontales, se observó un incremento ($p < 0,001$) cuando el LMW-HA estuvo presente al momento de la presentación antigénica (HA2) y cuando el LMW-HA ($p < 0,001$) estuvo presente al momento del reconocimiento y presentación antigénica (HA3) (Figura 5).

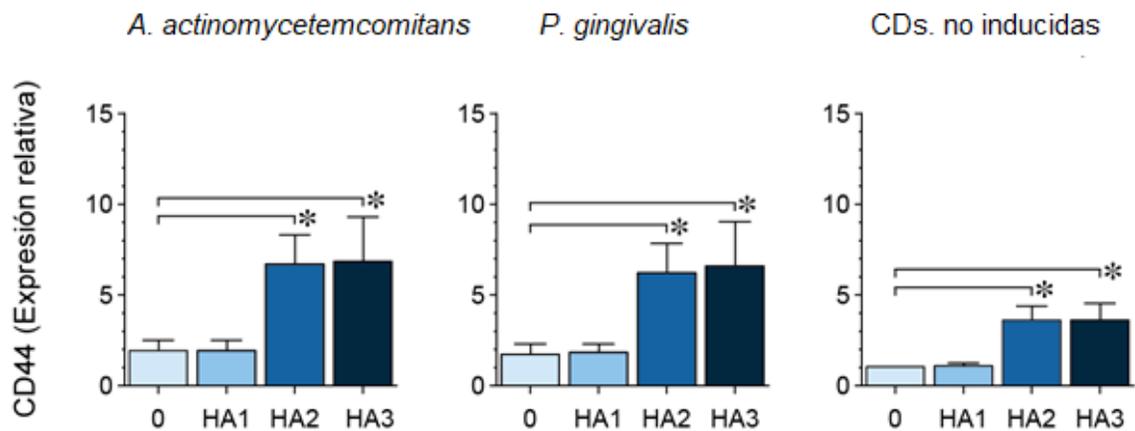


Figura 5. Niveles de expresión relativa del receptor de HA CD44 en linfocitos T estimulados *in vitro* con LMW-HA en HA1, HA2 o HA3. Niveles de expresión relativa de mRNA de CD44 en linfocitos T CD4⁺ expuestos ante células dendríticas estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*. Como control, se cuantificaron los niveles de CD44 en células sin estimulación bacteriana. Resultados a partir de 5 experimentos independientes. Los niveles de expresión obtenidos en células no expuestas a LMW-HA (Grupo 0) fueron considerados como valor 1 para la cuantificación relativa. * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demuestran que los fragmentos de LMW-HA poseen actividad inmuno-estimuladora al favorecer la activación y función de los linfocitos T CD4⁺ estimulados con *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Para ello, se utilizó un modelo *in vitro* de estimulación de linfocitos T CD4⁺ humanos ante CDs autólogas previamente expuestas a *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*, en presencia o no de LMW-HA, con el objeto de analizar el rol de LMW-HA durante el reconocimiento antigénico y la presentación antigénica. La mayor actividad inmunogénica se observó cuando LMW-HA estimuló el co-cultivo de CDs y linfocitos T CD4⁺ (condiciones HA2 y HA3), lo que permite sugerir que la actividad inmuno-estimuladora de LMW-HA en la producción de factores de transcripción y citoquinas asociadas a los fenotipos linfocitarios Th1, Th17 y Th22, así como la producción de RANKL, ocurre principalmente durante la presentación antigénica. El efecto directo de LMW-HA en los linfocitos T CD4⁺ se ratificó al analizar los niveles de expresión de CD44, receptor específico de HA. En este caso, CD44 se sobre-expresó en los co-cultivos celulares (condición HA2 y HA3) y no en cultivos individuales de CDs (condición HA1).

Las CDs desempeñan un rol central en la activación de la respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos T CD4⁺ (Collin and Bigley, 2018). Diversos estudios han demostrado el efecto inmunogénico del LMW-HA sobre las CDs y macrófagos, particularmente incrementando los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Tamaki et al., 1996, Termeer et al., 2000, Termeer et al., 2002, Monasterio et al., 2018, McKee et al., 1996). A su vez, se ha demostrado que los fragmentos de HA promueven la migración de CDs hacia los linfonodos y potencian la presentación antigénica, estimulando la expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas del MHC-II (Mummert et al., 2003, Rizzo et al., 2014). Recientemente, se reportó que en CDs expuestas a *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*, LMW-HA incrementa los niveles de expresión de citoquinas y factores de transcripción asociados a respuestas tipo Th1 y Th17 (Monasterio et al., 2018). En el presente trabajo se estableció que únicamente las CDs expuestas a LMW-HA y *A.*

actinomycetemcomitans promueven la polarización linfocitaria hacia un perfil Th1, incrementando los niveles de expresión de IFN- γ y T-bet, lo que no sucede en presencia de *P. gingivalis*. Estos resultados pueden deberse a la menor inmunogenicidad de *P. gingivalis* respecto en comparación a *A. actinomycetemcomitans* (Vernal et al., 2008), o bien al efecto sinérgico que tienen *A. actinomycetemcomitans* y LMW-HA en la maduración de subtipos de CDs tipo 1 y 2, las cuales poseen la capacidad de activar predominantemente respuestas tipo Th1 (Monasterio et al., 2018).

El HA puede cumplir un rol como sustrato de adhesión para la migración celular o como molécula de señalización, con efectos en el reconocimiento y la presentación antigénica (Mummert, 2005). En el contexto de la presentación antigénica, HA actúa como una molécula co-estimuladora de las vías de señalización activadas por ligandos del complejo TCR/CD3, promoviendo la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y la producción de IL-2 (Galandrini et al., 1994). La actividad co-estimuladora, sin embargo, requiere la estimulación previa de CD3, lo que incrementa la capacidad de interacción de los linfocitos T CD4 con el HA a través de la activación de su receptor específico CD44 (Galandrini et al., 1994). Además, durante la presentación antigénica las CDs pueden expresar HA como molécula co-estimuladora, lo que incrementa la producción de IL-2 e IFN- γ por parte de los linfocitos T CD4⁺, y favorece la adhesión inter-celular durante la sinapsis inmunológica (Mummert et al., 2002). En el presente estudio, cuando LMW-HA fue utilizado para estimular a los linfocitos T CD4⁺, se demostró un efecto inmuno-estimulador en los niveles expresados de citoquinas y factores de transcripción característicos de las respuestas tipo Th1, Th17 y Th22. Este efecto fue aún mayor cuando los linfocitos T CD4⁺ fueron expuestos ante CDs infectadas en presencia de LMW-HA, ratificando el efecto inmuno-estimulador de LMW-HA tanto en el reconocimiento como en la presentación antigénica. Sin embargo, se observó que el LMW-HA no posee efectos significativos sobre los linfocitos T CD4⁺ que fueron activados con CDs sin estimulación bacteriana, lo cual puede explicarse, al menos en parte, por la necesidad de activación previa del complejo TCR/CD3 en los linfocitos T para lograr la sensibilización ante HA (Galandrini et al., 1994). Sin embargo, si se observó un incremento de 57 veces en los niveles de expresión de

IFN- γ en linfocitos T expuestos a LMW-HA y activados con CDs sin estimulación bacteriana pero expuestos a LMW-HA, lo cual permite especular que LMW-HA poseen un efecto directo en la expresión de esta citoquina y, por lo tanto, favorecería la polarización parcial tipo Th1 en ausencia de presentación antigénica.

Los efectos del HA en el metabolismo óseo son también dependientes de su tamaño molecular (Bastow et al., 2008). Mientras las cadenas largas de HA tienen un efecto inhibitorio sobre la osteoclastogénesis mediada por RANKL, el LMW-HA promueve la osteoclastogénesis mediante el incremento tanto de los niveles de RANKL secretados por los osteoblastos como la expresión de RANK en los precursores de osteoclastos (Watanabe et al., 2016, Ariyoshi et al., 2005). Concomitantemente, el efecto de LMW-HA se traduce también en mayor actividad de los osteoclastos, con mayor resorción ósea *in vitro* (Ariyoshi et al., 2005). En el presente trabajo se describe por primera vez un incremento en la expresión de RANKL en linfocitos T CD4⁺ activados en presencia de CDs estimuladas con bacterias periodontales y LMW-HA. El efecto de LMW-HA sobre la expresión de RANKL se observó únicamente en el contexto de la presentación antigénica (condición HA2 y HA3) y no así en ausencia de bacterias, lo que puede deberse al efecto mediado por CD44, el cual incrementa su afinidad por HA en los linfocitos T activados con antígenos presentados en el contexto de MHC-II (DeGrendele et al., 1997a, DeGrendele et al., 1997b).

En efecto, LMW-HA induce un incremento en los niveles de expresión de RANKL en células estromales de médula ósea, mediante su interacción con CD44 (Cao et al., 2005). Dado que los linfocitos Th17 son el subtipo linfocitario productor de RANKL, es posible especular que el incremento en los niveles de expresión de RANKL frente al estímulo de LMW-HA puede deberse a una mayor polarización Th17, lo que es coherente con los resultados obtenidos para RORC2 e IL-17, cuyos niveles de expresión incrementaron de manera similar a los de RANKL.

Entre las proteínas de unión a HA, CD44 es el receptor que posee mayor afinidad por los sitios de unión de HA y se expresa principalmente en líneas celulares de origen linfoide (Jackson, 2009). Sin embargo, en linfocitos T circulantes en estado quiescente, el receptor CD44 se encuentra inactivo y por tanto no posee

la capacidad de interactuar con HA (Siegelman et al., 1999). La activación de CD44 en linfocitos T requiere de la presencia de citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α e IFN- γ , la unión de antígenos al TCR, la presencia de complejos proteína-HA derivados de sitios de inflamación o la formación de clusters de CD44 (Levesque and Haynes, 1997, Lesley et al., 1994, Lesley and Hyman, 1992, Lesley et al., 1992, DeGrendele et al., 1997b). De manera similar, el LPS bacteriano posee un efecto activador de CD44 en monocitos mediante la secreción autocrina de TNF- α y posterior sialilación del sitio de unión a HA (Gee et al., 2003). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron el efecto inductor de LMW-HA sobre los niveles de expresión de CD44, incluso en ausencia de estímulo bacteriano. Este incremento puede explicarse por la activación del receptor CD44 en presencia de TNF- α , citoquina que se ha reportado que incrementa en las CDs expuestas a LMW-HA y bacterias periodontales (Monasterio et al., 2018), y que por ende induce la sobreexpresión de CD44 incluso en ausencia de señalización TCR. Sin embargo, los resultados obtenidos en los niveles de expresión de citoquinas, factores de transcripción y RANKL en ausencia de antígenos bacterianos no se asocian al mismo patrón de variación que CD44. Tomando en consideración estos antecedentes, es posible especular que, si bien la presencia de citoquinas pro-inflamatorias secretadas por las CDs expuestas únicamente a LMW-HA pueden inducir la sobreexpresión de CD44, la sobreexpresión de CD44 no representa un estímulo suficiente para promover la polarización y activación de linfocitos T, para la cual es requisito fundamental la activación antigénica del complejo TCR/CD3. Así, el efecto inmunogénico del LMW-HA podría presentar similitudes con el LPS, en el sentido que presenta funciones estimuladoras como una molécula coadyuvante de la activación de la respuesta inmune adaptativa (Figura 6) (McAleer and Vella, 2008).

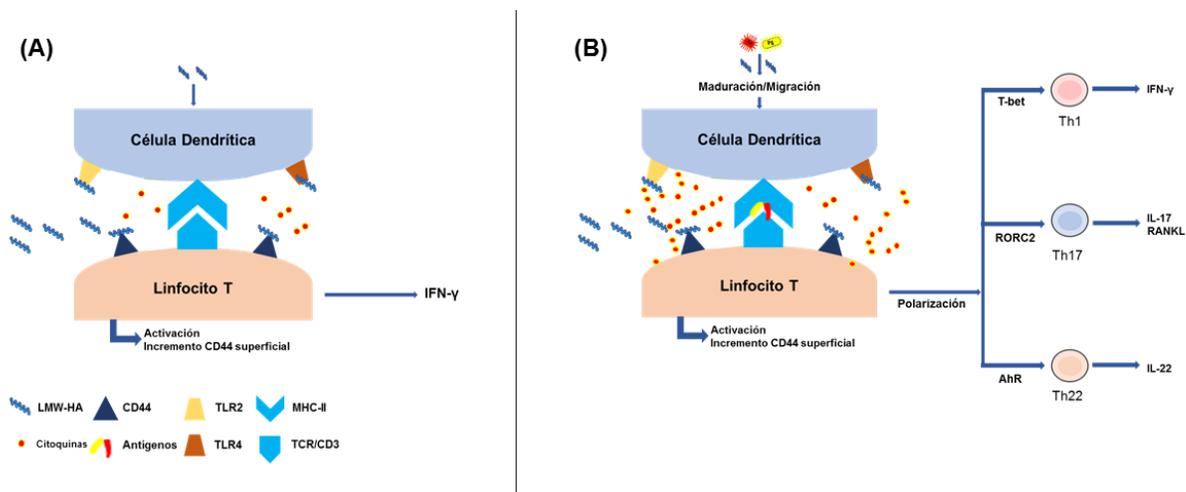


Figura 6. Rol del LMW-HA en el contexto de la presentación antigénica. (A) En presencia de LMW-HA la célula dendrítica puede secretar citoquinas pro-inflamatorias que promoverán la activación parcial del Linfocito Th y activarán el receptor CD44 superficial, lo que puede incrementar los niveles de expresión de IFN- γ , pero no inducirá la polarización linfocitaria. **(B)** En presencia de bacterias periodontales y LMW-HA, la célula dendrítica secretará altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, presentará antígenos bacterianos en el contexto de MHC-II y promoverá la activación y polarización de los linfocitos Th. A su vez, incrementará la afinidad de CD44 por HA y aumentará su expresión en los linfocitos, lo que permitirá que en presencia de LMW-HA durante la presentación antigénica, incrementen los niveles de expresión de citoquinas y factores de transcripción asociados a linfocitos Th1, Th17 y Th22.

El HA es una molécula fundamental que forma parte de los tejidos blandos y duros del periodonto (Dahiya and Kamal, 2013). Durante la periodontitis, el estado inflamatorio crónico, el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad enzimática bacteriana inducen la degradación del HA, lo cual incrementa la acumulación local de LMW-HA (Bartold and Page, 1986, Waddington et al., 2000, Yamalik et al., 1998). Resultados no publicados de nuestro grupo de investigación ratifican el incremento de LMW-HA durante la periodontitis, y que altos niveles de LMW-HA detectados en fluido gingival crevicular de pacientes con periodontitis se mantienen incluso 6 meses después de finalizada la terapia convencional no quirúrgica exitosa (datos no publicados). Esto podría sugerir que la disrupción mecánica profesional de la placa bacteriana subgingival no provee mejoras significativas en los niveles de fragmentación de la MEC gingival, convirtiéndola en una fuente activa de señales de daño. Más aún, la terapia convencional, así como otros procedimientos quirúrgicos intra-orales, pueden favorecer la fragmentación del HA debido a la injuria tisular, tal como se observa en otros procedimientos quirúrgicos que involucran daño tisular (Huber-Lang et al., 2018, Jiang et al., 2005).

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la diferenciación de los linfocitos Th17 en la barrera gingival, a diferencia de otras barreras epiteliales, no depende de la microbiota comensal, sino de la presentación antigénica asociada a la IL-6 secretada durante el daño tisular inducido por las fuerzas masticatorias (Dutzan et al., 2017). A su vez, este daño tisular sostenido en el tiempo actúa como una señal amplificadora de la respuesta inmuno-inflamatoria mediada por los linfocitos Th17 y contribuye a la resorción ósea patológica característica de la periodontitis (Dutzan et al., 2017). Al respecto, nuestros resultados contribuyen a explicar en parte dichos hallazgos, particularmente por el incremento en los niveles de expresión de IL-6 que induce LMW-HA en las CDs (Monasterio et al., 2018) y su efecto posterior en la activación y polarización de linfocitos Th17 demostrada en el presente estudio.

El pulido y alisado radicular es considerado el tratamiento “estándar de oro” entre los métodos convencionales de control de la placa bacteriana subgingival; sin embargo, su efectividad disminuye a mayor profundidad de los sacos periodontales (Cobb, 2002). En este sentido, se han propuesto diversos tratamientos coadyuvantes como complemento al pulido y alisado radicular, entre los cuales se incluye el uso de antibióticos locales o sistémicos, bifosfonatos, láser y terapia fotodinámica, entre otros (Zandbergen et al., 2013, Akram et al., 2017, Vohra et al., 2016, Abduljabbar et al., 2017). Así, la implicancia clínica del presente estudio radica en la importancia de la integridad tisular antes, durante y después de un tratamiento periodontal, por lo cual se deberían utilizar estrategias que permitan mitigar los efectos inmunogénicos de la fragmentación tisular, que si bien este estudio se centra únicamente en LMW-HA, sus resultados pueden ser extrapolables a otras moléculas consideradas como DAMPs. Para ello, se podrían seguir al menos tres estrategias distintas: (1) Reducir la generación de fragmentos de HA, (2) bloquear selectivamente la señalización del LMW-HA en los tejidos periodontales, y/o (3) utilizar moléculas que antagonicen el efecto del LMW-HA. Así, podría considerarse el uso de anti-hialuronidasas, las cuales bloquearían la acción de las enzimas específicas que degradan al HA, tal como se ha probado en el tratamiento de la hepatitis crónica o en infecciones del tracto respiratorio superior, donde han demostrado tener propiedades anti-inflamatorias (Erickson and Stern, 2012, Mio and Stern, 2002, Harunari et al., 2014, Yanagawa et al., 2004). Por otro lado, se

podría considerar el uso terapéutico de HMW-HA, debido a su capacidad de inhibir la señalización vía TLR2 en células presentadoras de antígeno (Scheibner et al., 2006) ya que es un inhibidor competitivo de CD44, con mayor afinidad que LMW-HA (Liang et al., 2016). HMW-HA posee un efecto antagónico a LMW-HA, particularmente en sus propiedades anti- o pro-inflamatorias y angiogénicas (Altman et al., 2016, Stern et al., 2006, Zhao et al., 2015). Así, el uso de un gel de HMW-HA al 0,2% como coadyuvante al pulido y alisado radicular en el tratamiento de la periodontitis promueve mejoras en los parámetros clínicos de la enfermedad (Rajan et al., 2014). Además, el uso de HMW-HA asociado al tratamiento de la periodontitis reduce la proliferación de fibroblastos y linfocitos T en las lesiones periodontales y promueve la resolución de la inflamación (Mesa et al., 2002). Por lo tanto, los resultados del presente estudio contribuyen a explicar, al menos en parte, la cronicidad de la periodontitis en función del daño tisular generado durante la progresión de la enfermedad y la refractariedad al tratamiento convencional. Lo anterior, debiera estimular a los clínicos tratantes a otorgarle un espacio relevante en la planificación del tratamiento a la integridad de la MEC en los tejidos periodontales, la cual más allá de ser una matriz de soporte, debe ser considerada como una fuente activa y dinámica de señales que pueden determinar la progresión de la enfermedad y, eventualmente, un tratamiento poco exitoso.

Entre las limitaciones de este estudio se encuentra el uso exclusivo de la técnica qPCR para analizar las citoquinas y factores de transcripción, aunque este es un método sensible que permite determinar variaciones en los niveles de mRNAs que muestran bajos niveles de expresión (Giulietti et al., 2001). Este estudio, se puede complementar a futuro con el análisis de los niveles de proteína, mediante el uso de ensayos ELISA y citometría de flujo, que contribuyan a determinar los niveles de secreción efectivos de las citoquinas estudiadas y la expresión real de los factores de transcripción. Por otro lado, los resultados aquí presentados fueron obtenidos únicamente utilizando LMW-HA, dejando abierta la pregunta del posible efecto que podrían tener otras formas de HA existentes, con tamaños moleculares intermedios o altos. Por otra parte, sería interesante determinar el efecto del LMW-HA en otras subpoblaciones linfocitarias, asociadas al control o regulación de la inflamación y la osteo-destrucción, tales como los linfocitos Th2 y T reguladores.

CONCLUSIÓN

El LMW-HA tiene un efecto inmuno-estimulador de la expresión de citoquinas y factores de transcripción característicos de los linfocitos Th1, Th17 y Th22, así como RANKL y el receptor CD44, en el contexto de la presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ mediada por CDs estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abduljabbar, T., Javed, F., Shah, A., Samer, M. S., Vohra, F. & Akram, Z. (2017) Role of lasers as an adjunct to scaling and root planing in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Lasers in medical science* **32**, 449-459.
- Aisenberg, M. & Aisenberg, A. (1951) Hyaluronidase in periodontal disease. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **4**, 317-320.
- Akram, Z., Abduljabbar, T., Kellesarian, S. V., Hassan, A., Ibrahim, M., Javed, F. & Vohra, F. (2017) Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. *British journal of clinical pharmacology* **83**, 444-454.
- Altman, R. D., Bedi, A., Karlsson, J., Sancheti, P. & Schemitsch, E. (2016) Product differences in intra-articular hyaluronic acids for osteoarthritis of the knee. *The American journal of sports medicine* **44**, 2158-2165.
- Appay, V., van Lier, R. A., Sallusto, F. & Roederer, M. (2008) Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry Part A* **73**, 975-983.
- Ariyoshi, W., Takahashi, T., Kanno, T., Ichimiya, H., Takano, H., Koseki, T. & Nishihara, T. (2005) Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid. *J Biol Chem* **280**, 18967-18972. doi:10.1074/jbc.M412740200.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology* **4**, 1-6.
- Azuma, M. (2006) Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *Journal of Periodontal Research* **41**, 361-373.
- Baba, N., Rubio, M., Kenins, L., Regairaz, C., Woisetschlager, M., Carballido, J. M. & Sarfati, M. (2012) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAF347 selectively acts on monocytes and naïve CD4+ Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells. *Human immunology* **73**, 795-800.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* **18**, 767-811.
- Bartold, P. M. & Page, R. C. (1986) The effect of chronic inflammation on gingival connective tissue proteoglycans and hyaluronic acid. *J Oral Pathol* **15**, 367-374.
- Bastow, E. R., Byers, S., Golub, S. B., Clarkin, C. E., Pitsillides, A. A. & Fosang, A. J. (2008) Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 395-413. doi:10.1007/s00018-007-7360-z.
- Bluestone, J. A., Mackay, C. R., O'Shea, J. J. & Stockinger, B. (2009) The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* **9**, 811-816. doi:10.1038/nri2654.
- Bouso, P. (2008) T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nature Reviews Immunology* **8**, 675.
- Cao, J. J., Singleton, P. A., Majumdar, S., Boudignon, B., Burghardt, A., Kurimoto, P., Wronski, T. J., Bourguignon, L. Y. & Halloran, B. P. (2005) Hyaluronan

- increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. *J Bone Miner Res* **20**, 30-40. doi:10.1359/JBMR.041014.
- Casale, M., Moffa, A., Vella, P., Sabatino, L., Capuano, F., Salvinelli, B., Lopez, M. A., Carinci, F. & Salvinelli, F. (2016) Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *Int J Immunopathol Pharmacol* **29**, 572-582. doi:10.1177/0394632016652906.
- Cobb, C. M. (2002) Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 22-32.
- Collin, M. & Bigley, V. (2018) Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* **154**, 3-20. doi:10.1111/imm.12888.
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A. & Freeman, J. W. (2018) The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of hematology & oncology* **11**, 64.
- Dahiya, P. & Kamal, R. (2013) Hyaluronic Acid: a boon in periodontal therapy. *N Am J Med Sci* **5**, 309-315. doi:10.4103/1947-2714.112473.
- Darveau, R. P. (2010) Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* **8**, 481-490. doi:10.1038/nrmicro2337.
- DeGrendele, H. C., Estess, P. & Siegelman, M. H. (1997a) Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* **278**, 672-675.
- DeGrendele, H. C., Kosfisz, M., Estess, P. & Siegelman, M. H. (1997b) CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J Immunol* **159**, 2549-2553.
- Díaz-Zuñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benitez, A., Ciuchi, P., Garcia, M., Arias, J., Sanz, M. & Vernal, R. (2015) Variability of the dendritic cell response triggered by different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 dependent. *J Periodontol* **86**, 108-119. doi:10.1902/jop.2014.140326.
- Díaz-Zuñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Rojas, L., Alvarez, C., Monasterio, G., Carvajal, P. & Vernal, R. (2017) Increased levels of the T-helper 22-associated cytokine (interleukin-22) and transcription factor (aryl hydrocarbon receptor) in patients with periodontitis are associated with osteoclast resorptive activity and severity of the disease. *Journal of periodontal research* **52**, 893-902.
- Díaz Zuñiga, J., Yáñez Figueroa, J., Melgar Rodríguez, S., Álvarez Rivas, C., Rojas Lagos, C. & Vernal Astudillo, R. (2012) Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral* **5**, 40-45.
- Dutzan, N., Abusleme, L., Bridgeman, H., Greenwell-Wild, T., Zangerle-Murray, T., Fife, M. E., Bouladoux, N., Linley, H., Brenchley, L., Wemyss, K., Calderon, G., Hong, B. Y., Break, T. J., Bowdish, D. M. E., Lionakis, M. S., Jones, S. A., Trinchieri, G., Diaz, P. I., Belkaid, Y., Konkel, J. E. & Moutsopoulos, N. M. (2017) On-going Mechanical Damage from Mastication Drives Homeostatic Th17 Cell Responses at the Oral Barrier. *Immunity* **46**, 133-147. doi:10.1016/j.immuni.2016.12.010.

- Embery, G. & Waddington, R. (1994) Gingival crevicular fluid: biomarkers of periodontal tissue activity. *Advances in dental research* **8**, 329-336.
- Erickson, M. & Stern, R. (2012) Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochemistry research international* **2012**.
- Galandrini, R., Galluzzo, E., Albi, N., Grossi, C. E. & Velardi, A. (1994) Hyaluronate is costimulatory for human T cell effector functions and binds to CD44 on activated T cells. *J Immunol* **153**, 21-31.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D. & Chen, B. (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**, 459-473.
- Garlet, G. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research* **89**, 1349-1363.
- Gee, K., Kozlowski, M. & Kumar, A. (2003) Tumor necrosis factor-alpha induces functionally active hyaluronan-adhesive CD44 by activating sialidase through p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J Biol Chem* **278**, 37275-37287. doi:10.1074/jbc.M302309200.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**, 386-401.
- Gmür, R., McNabb, H., Steenbergen, T., Baehni, P., Mombelli, A., Winkelhoff, A. & Guggenheim, B. (1993) Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype. *Molecular Oral Microbiology* **8**, 116-120.
- Goswami, R. & Kaplan, M. H. (2012) Gcn5 is required for PU. 1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *The Journal of Immunology* **189**, 3026-3033.
- Hajishengallis, G. & Lamont, R. J. (2012) Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology* **27**, 409-419.
- Harunari, E., Imada, C., Igarashi, Y., Fukuda, T., Terahara, T. & Kobayashi, T. (2014) Hyaluromycin, a new hyaluronidase inhibitor of polyketide origin from marine *Streptomyces* sp. *Marine drugs* **12**, 491-507.
- Hodge-Dufour, J., Noble, P. W., Horton, M. R., Bao, C., Wysoka, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Trinchieri, G. & Puré, E. (1997) Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *The Journal of Immunology* **159**, 2492-2500.
- Horton, M. R., Boodoo, S. & Powell, J. D. (2002) NF- κ B activation mediates the cross-talk between extracellular matrix and interferon- γ (IFN- γ) leading to enhanced monokine induced by IFN- γ (MIG) expression in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43757-43762.
- Horton, M. R., McKee, C. M., Bao, C., Liao, F., Farber, J. M., Hodge-DuFour, J., Puré, E., Oliver, B. L., Wright, T. M. & Noble, P. W. (1998) Hyaluronan fragments synergize with interferon- γ to induce the CXC chemokines mig and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 35088-35094.
- Horton, M. R., Olan, M. A., Bao, C., White, K. E., Choi, A. M., Chin, B.-Y., Noble, P. W. & Lowenstein, C. J. (2000) Regulation of plasminogen activator

- inhibitor-1 and urokinase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**, L707-L715.
- Horton, M. R., Shapiro, S., Bao, C., Lowenstein, C. J. & Noble, P. W. (1999) Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *The Journal of Immunology* **162**, 4171-4176.
- Huber-Lang, M., Lambris, J. D. & Ward, P. A. (2018) Innate immune responses to trauma. *Nat Immunol* **19**, 327-341. doi:10.1038/s41590-018-0064-8.
- Jackson, D. G. (2009) Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. *Immunol Rev* **230**, 216-231. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00803.x.
- Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G. D., Mascarenhas, M. M., Garg, H. G., Quinn, D. A., Homer, R. J., Goldstein, D. R., Bucala, R., Lee, P. J., Medzhitov, R. & Noble, P. W. (2005) Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* **11**, 1173-1179. doi:10.1038/nm1315.
- Kaplan, J. B., Perry, M. B., MacLean, L. L., Furgang, D., Wilson, M. E. & Fine, D. H. (2001) Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infection and Immunity* **69**, 5375-5384.
- Kikkert, R., Laine, M., Aarden, L. & Van Winkelhoff, A. (2007) Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Molecular Oral Microbiology* **22**, 145-151.
- Kinane, D. F. & Lappin, D. F. (2001) Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontologica Scandinavica* **59**, 154-160.
- King, E. O. & Tatum, H. W. (1962) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Hemophilus aphrophilus*. *The Journal of infectious diseases*, 85-94.
- Kramer, J. M. & Gaffen, S. L. (2007) Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *Journal of periodontology* **78**, 1083-1093.
- Laine, M., Appelmelk, B. & Winkelhoff, A. v. (1996) Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **31**, 278-284.
- Land, W. G. (2015) The role of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in human diseases: part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos University Medical Journal* **15**, e157.
- Last, K. & Embery, G. (1987) Hyaluronic acid and hyaluronidase activity in gingival exudate from sites of acute ulcerative gingivitis in man. *Archives of oral biology* **32**, 811-815.
- Laurent, T. C. & Fraser, J. (1992) Hyaluronan. *The FASEB journal* **6**, 2397-2404.
- Laurent, T. C., Laurent, U. & Fraser, J. (1995) Functions of hyaluronan. *Annals of the rheumatic diseases* **54**, 429.
- Lee-Sayer, S. S., Dong, Y., Arif, A. A., Olsson, M., Brown, K. L. & Johnson, P. (2015) The where, when, how, and why of hyaluronan binding by immune cells. *Frontiers in Immunology* **6**, 150.

- Lesley, J., He, Q., Miyake, K., Hamann, A., Hyman, R. & Kincade, P. W. (1992) Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J Exp Med* **175**, 257-266.
- Lesley, J., Howes, N., Perschl, A. & Hyman, R. (1994) Hyaluronan binding function of CD44 is transiently activated on T cells during an in vivo immune response. *J Exp Med* **180**, 383-387.
- Lesley, J. & Hyman, R. (1992) CD44 can be activated to function as an hyaluronic acid receptor in normal murine T cells. *Eur J Immunol* **22**, 2719-2723. doi:10.1002/eji.1830221036.
- Levesque, M. C. & Haynes, B. F. (1997) Cytokine induction of the ability of human monocyte CD44 to bind hyaluronan is mediated primarily by TNF-alpha and is inhibited by IL-4 and IL-13. *J Immunol* **159**, 6184-6194.
- Liang, J., Jiang, D. & Noble, P. W. (2016) Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Advanced drug delivery reviews* **97**, 186-203.
- Louderbough, J. M. & Schroeder, J. A. (2011) Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular Cancer Research*, molcanres. 0156.2011.
- McAleer, J. P. & Vella, A. T. (2008) Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity. *Crit Rev Immunol* **28**, 281-299.
- McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C. & Noble, P. W. (1996) Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest* **98**, 2403-2413. doi:10.1172/JCI119054.
- Mesa, F. L., Aneiros, J., Cabrera, A., Bravo, M., Caballero, T., Revelles, F., del Moral, R. G. & O'Valle, F. (2002) Antiproliferative effect of topic hyaluronic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. *Histol Histopathol* **17**, 747-753. doi:10.14670/HH-17.747.
- Mio, K. & Stern, R. (2002) Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biology* **21**, 31-37.
- Monasterio, G., Guevara, J., Ibarra, J. P., Castillo, F., Diaz-Zuniga, J., Alvarez, C., Cafferata, E. A. & Vernal, R. (2018) Immunostimulatory activity of low-molecular-weight hyaluronan on dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Oral Investig*. doi:10.1007/s00784-018-2641-5.
- Mummert, D. I., Takashima, A., Ellinger, L. & Mummert, M. E. (2003) Involvement of hyaluronan in epidermal Langerhans cell maturation and migration in vivo. *J Dermatol Sci* **33**, 91-97.
- Mummert, M. E. (2005) Immunologic roles of hyaluronan. *Immunol Res* **31**, 189-206. doi:10.1385/IR:31:3:189.
- Mummert, M. E., Mummert, D., Edelbaum, D., Hui, F., Matsue, H. & Takashima, A. (2002) Synthesis and surface expression of hyaluronan by dendritic cells and its potential role in antigen presentation. *J Immunol* **169**, 4322-4331.
- Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L. & Faitelson, Y. (2002) CD44 in cancer. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **39**, 527-579.
- Noble, P. W., Lake, F. R., Henson, P. M. & Riches, D. (1993) Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *Journal of Clinical Investigation* **91**, 2368.

- Offenbacher, S. (1996) Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* **1**, 821-878. doi:10.1902/annals.1996.1.1.821.
- Ohno, S., Ijuin, C., Doi, T., Yoneno, K. & Tanne, K. (2002) Expression and activity of hyaluronidase in human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of periodontology* **73**, 1331-1337.
- Ohyama, H., Kato-Kogoe, N., Kuhara, A., Nishimura, F., Nakasho, K., Yamanegi, K., Yamada, N., Hata, M., Yamane, J. & Terada, N. (2009) The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *Journal of dental research* **88**, 633-638.
- Olsen, I., Lambris, J. D. & Hajishengallis, G. (2017) Porphyromonas gingivalis disturbs host–commensal homeostasis by changing complement function. *Journal of oral microbiology* **9**, 1340085.
- Page, R., Sims, T., Engel, L., Moncla, B., Bainbridge, B., Stray, J. & Darveau, R. (1991) The immunodominant outer membrane antigen of Actinobacillus actinomycetemcomitans is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* **59**, 3451-3462.
- Page, R. C. & Kornman, K. S. (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000* **14**, 9-11.
- Perry, M. B., Maclean, L. M., Brisson, J. R. & Wilson, M. E. (1996a) Structures of the Antigenic O-Polysaccharides of Lipopolysaccharides Produced by Actinobacillus actinomycetemcomitans Serotypes a, c, d and e. *The FEBS Journal* **242**, 682-688.
- Perry, M. B., MacLean, L. L., Gmür, R. & Wilson, M. E. (1996b) Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype b. *Infection and Immunity* **64**, 1215-1219.
- Powell, J. D. & Horton, M. R. (2005) Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol Res* **31**, 207-218. doi:10.1385/IR:31:3:207.
- Rajan, P., Baramappa, R., Rao, N. M. & Pavaluri, A. K. (2014) Hyaluronic Acid as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis. A randomized clinical trial. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* **8**, ZC11.
- Repeke, C. E., Ferreira, S. B., Claudino, M., Silveira, E. M., de Assis, G. F., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S. & Garlet, G. P. (2010) Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone* **46**, 1122-1130.
- Rizzo, M., Bayo, J., Piccioni, F., Malvicini, M., Fiore, E., Peixoto, E., Garcia, M. G., Aquino, J. B., Gonzalez Campana, A., Podesta, G., Terres, M., Andriani, O., Alaniz, L. & Mazzolini, G. (2014) Low molecular weight hyaluronan-pulsed human dendritic cells showed increased migration capacity and induced resistance to tumor chemoattraction. *PLoS One* **9**, e107944. doi:10.1371/journal.pone.0107944.
- Sampson, P. M., Rochester, C. L., Freundlich, B. & Elias, J. A. (1992) Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic acid) production. Evidence for cytokine-regulated hyaluronan (hyaluronic acid) degradation and human lung fibroblast-derived hyaluronidase. *J Clin Invest* **90**, 1492-1503. doi:10.1172/JCI116017.

- Scheibner, K. A., Lutz, M. A., Boodoo, S., Fenton, M. J., Powell, J. D. & Horton, M. R. (2006) Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* **177**, 1272-1281.
- Senbanjo, L. T. & Chellaiah, M. A. (2017) CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Frontiers in cell and developmental biology* **5**, 18.
- Siegelman, M. H., DeGrendele, H. C. & Estess, P. (1999) Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. *J Leukoc Biol* **66**, 315-321.
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernandez, M. & Gamonal, J. (2015) Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science* **23**, 329-355.
- Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* **21**, 685-711.
- Stern, R., Asari, A. A. & Sugahara, K. N. (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European journal of cell biology* **85**, 699-715.
- Suzuki, N., Nakano, Y., Yoshida, Y., Ikeda, D. & Koga, T. (2001) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* **39**, 2002-2005.
- Takami, M., Love, R. B. & Iwashima, M. (2012) TGF- β converts apoptotic stimuli into the signal for Th9 differentiation. *The Journal of Immunology* **188**, 4369-4375.
- Tamaki, K., Yasaka, N., Chang, C. H., Ohtake, N., Saitoh, A., Nakamura, K. & Furue, M. (1996) Identification and characterization of novel dermal Thy-1 antigen-bearing dendritic cells in murine skin. *J Invest Dermatol* **106**, 571-575.
- Taubman, M. & Kawai, T. (2001) Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **12**, 125-135.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. & Simon, J. C. (2002) Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, 99-111.
- Termeer, C. C., Hennies, J., Voith, U., Ahrens, T., Weiss, J. M., Prehm, P. & Simon, J. C. (2000) Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol* **165**, 1863-1870.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., Van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. & Stockinger, B. (2008) Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* **9**, 1341-1346.
- Vernal, R., Dezerega, A., Dutzan, N., Chaparro, A., Leon, R., Chandía, S., Silva, A. & Gamonal, J. (2006a) RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral diseases* **12**, 283-289.
- Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Antonieta 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. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 383-389.

- 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. *Journal of periodontology* **77**, 1772-1780.
- Vernal, R. & Garcia-Sanz, J. A. (2008) Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)* **8**, 207-220.
- Vernal, R., Leon, R., Herrera, D., Garcia-Sanz, J. A., Silva & Sanz, M. (2008) Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* **43**, 689-697.
- Vohra, F., Akram, Z., Safii, S. H., Vaithilingam, R. D., Ghanem, A., Sergis, K. & Javed, F. (2016) Role of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **13**, 139-147.
- Waddington, R. J., Moseley, R. & Embery, G. (2000) Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* **6**, 138-151.
- Watanabe, T., Takahashi, N., Hirabara, S., Ishiguro, N. & Kojima, T. (2016) Hyaluronan Inhibits Tlr-4-Dependent RANKL Expression in Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *PLoS One* **11**, e0153142. doi:10.1371/journal.pone.0153142.
- Yamalik, N., Kilinc, K., Caglayan, F., Eratalay, K. & Caglayan, G. (1998) Molecular size distribution analysis of human gingival proteoglycans and glycosaminoglycans in specific periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **25**, 145-152.
- Yanagawa, Y., Ogura, M., Fujimoto, E., Shono, S. & Okuda, E. (2004) Effects and cost of glycyrrhizin in the treatment of upper respiratory tract infections in members of the Japanese maritime self-defense force: Preliminary report of a prospective, randomized, double-blind, controlled, parallel-group, alternate-day treatment assignment clinical trial. *Current therapeutic research* **65**, 26-33.
- Zambon, J., Slots, J. & Genco, R. (1983) Serology of oral Actinobacillus actinomycetemcomitans and serotype distribution in human periodontal disease. *Infection and Immunity* **41**, 19-27.
- Zandbergen, D., Slot, D. E., Cobb, C. M. & Van der Weijden, F. A. (2013) The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *Journal of periodontology* **84**, 332-351.
- Zhao, N., Wang, X., Qin, L., Guo, Z. & Li, D. (2015) Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan on cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **465**, 569-574.
- Zhu, J. & Paul, W. E. (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557-1569.

Anexo

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto

“Niveles de expresión de citoquinas y factores de transcripción tipo Th1, Th17 y Th22 en linfocitos T CD4⁺ activados por células dendríticas expuestas ante hialuronano de bajo peso molecular y estimuladas con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o *Porphyromonas gingivalis*”.

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 y factores de transcripción 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 15 pacientes sanos invitados a participar voluntariamente del estudio. Los criterios de exclusión serán la prueba positiva del virus VIH y/o de hepatitis B ó C, la presencia de infecciones manifiestas durante el último mes, fiebre, alergias sintomáticas, recuentos anormales de células sanguíneas, aumento de enzimas hepáticas y consumo de medicamentos de cualquier tipo, excepto vitaminas y anticonceptivos orales.

La persona invitada a participar del estudio tiene derecho a rechazar la incorporación, retirar sus datos o abandonar el estudio en cualquier momento.

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

Toma de muestra

A las personas que participen del estudio se les tomará una muestra 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 y factores de transcripción que producen. Cualquier resto sobrante de sangre será destruido.

En las muestras de sangre NO se realizarán estudios genéticos.

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

El procedimiento de toma de muestra de sangre es inocuo y estándar. 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:

Una vez tomada la muestra de sangre, el paciente terminará su participación en el estudio.

Beneficios de 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 en las encías y los dientes (gingivitis y periodontitis). Esto implica beneficios para el investigador y eventualmente para la odontología clínica.

Los pacientes 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. Eduardo Fernández Godoy, quien se domicilia en la calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.

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 del 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>	