



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA**

**Variabilidad en la expresión de quimioquinas CC y sus receptores
CCRs en linfocitos T humanos activados con distintos serotipos de
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Carla Andrea Álvarez Rivas

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Jaime Díaz Zúñiga

Prof. Dra. Samanta Melgar Rodríguez

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 11100298 y 1140904
Santiago – Chile
2014**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

**Variabilidad en la expresión de quimioquinas CC y sus receptores
CCRs en linfocitos T humanos activados con distintos serotipos de
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Carla Andrea Álvarez Rivas

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Jaime Díaz Zúñiga

Prof. Dra. Samanta Melgar Rodríguez

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 11100298 y 1140904
Santiago – Chile
2014**

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	6
Respuesta inmune durante las periodontitis	7
Quimioquinas y receptores de quimioquinas.....	8
Tipos de quimioquinas y receptores de quimioquinas.....	9
Quimioquinas y receptores de quimioquinas y su asociación a patologías.....	9
Quimioquinas y receptores de quimioquinas en las periodontitis.....	11
Planteamiento del problema.....	12
3. HIPÓTESIS.....	13
4. OBJETIVO GENERAL.....	14
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Selección de los sujetos y obtención de las muestras biológicas	15
Cultivo y curvas de crecimiento de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	15
Purificación de monocitos	15
Purificación de linfocitos TCD4 ⁺ <i>naïve</i>	16
Estimulación de las células dendríticas y activación de linfocitos TCD4 ⁺ <i>naïve</i> ..	17
Análisis de fenotipo celular.....	17
Expresión de CD80, CD83 y CD86	18
Purificación de RNA citoplasmático total.....	18
Síntesis de la primera cadena de cDNA, expresión de CCRs, CCLs y factores de transcripción mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real	19
Análisis de los datos.....	19

7. RESULTADOS	22
Purificación de monocitos y linfocitos TCD4 ⁺ <i>naïve</i> y diferenciación de células dendríticas.....	22
Activación de las células dendríticas.....	23
Activación de linfocitos TCD4 ⁺ <i>naïve</i>	24
Expresión de CCLs y CCRs	24
Expresión de <i>T-bet</i> , <i>GATA3</i> , <i>RORC2</i> y <i>Foxp3</i>	26
Correlación entre los niveles de expresión de CCLs, CCRs y los distintos factores de transcripción	27
8. DISCUSIÓN.....	29
9. CONCLUSIONES	34
10. BIBLIOGRAFÍA	35

1. RESUMEN

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades infecciosas cuya causa es la bio-película patogénica subgingival. Las bacterias que constituyen esta bio-película pueden provocar daño directo a los tejidos de inserción periodontal; sin embargo, la destrucción de ellos es producida principalmente por la respuesta inmune desarrollada por el hospedero ante ellas. Durante esta respuesta inmuno-inflamatoria, las quimioquinas, en particular las quimioquinas CC (CCLs), y sus receptores específicos (CCRs) definen la migración de células inmunológicas, por ejemplo los linfocitos T, y determinan, al menos en parte, el inicio, progresión y severidad de las periodontitis.

En diversas enfermedades infecciosas, distintos patrones de CCLs y CCRs se expresan en los tejidos afectados y estos se asocian a la diferenciación y función de fenotipos de linfocitos T colaboradores (Th) particulares. Por ejemplo, en las lesiones periapicales consecutivas a necrosis pulpar séptica, un patrón con predominio de CCL5 y CCR5 se asocia a un fenotipo Th1 pro-inflamatorio y un patrón con predominio de CCL21 y CCR7 favorece una respuesta tipo Th17 osteo-destructiva. En las periodontitis, aún no se ha descrito la asociación entre un patrón particular de CCLs y CCRs y la inflamación y osteo-destrucción que caracterizan a la enfermedad.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria que compone la bio-película patogénica subgingival de pacientes con periodontitis y uno de los principales factores de virulencia que expresa es el lipopolisacárido (LPS). Sobre la base de la variable inmunogenicidad de las distintas formas de LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se describen distintos serotipos y entre ellos se especula que existen diferencias en su asociación a la enfermedad.

Con el objeto de realizar una aproximación en la asociación entre los patrones de CCLs y CCRs característicos de los distintos fenotipos efectores de linfocitos Th y la patogenia de las periodontitis, en este trabajo de investigación se

analizó la expresión de distintos CCLs y CCRs en linfocitos T estimulados *in vitro* con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

En linfocitos T estimulados con el serotipo b, se detectó un incremento en los niveles de expresión de CCL3, CCL5, CCL20, CCL21, CCL28 y sus receptores CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7 y CCR9, característicos de un patrón de respuesta tipo Th1 y Th17, en comparación a las células estimuladas con los serotipos a o c. Además, este incremento de expresión de CCLs y CCRs tipo Th1/Th17 se correlacionó positivamente con los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* y *RORC2*, determinantes de la diferenciación selectiva de estos fenotipos.

En conclusión, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce un incremento en los niveles de expresión de CCLs y CCRs asociados a los linfocitos Th1 y Th17.

2. INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa, cuya causa principal son las bacterias periodonto-patógenas que residen en la bio-película subgingival (Armitage, 1999).

Estas bacterias pueden causar daño directo a los tejidos de inserción de los dientes; no obstante, la respuesta inmune del hospedero inducida ante ellas es la principal causa de la destrucción tisular (Hernandez y cols., 2011, Gemmell y cols., 2002). En efecto, las interacciones bacteria-hospedero inducen la secreción de mediadores pro-inflamatorios, citoquinas, quimioquinas, receptores de superficie y factores osteo-destructivos que determinan la destrucción del cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar, que finalmente lleva a la pérdida de los dientes (Listgarten, 1986, Offenbacher, 1996, Salvi y Lang, 2005).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

A. actinomycetemcomitans es una bacteria periodonto-patógena que compone la bio-película subgingival asociada a inicio y progresión de las periodontitis, en particular, a las formas agresivas de la enfermedad (Asikainen y cols., 1991). Corresponde a un cocobacilo Gram-negativo, pequeño, no móvil, anaerobio facultativo, microaerofílico y capnofílico (Henderson y cols., 2002, Schacher y cols., 2006) que en cultivo crece como colonias circulares aplanadas con borde festoneado, generalmente con una forma de estrella central (Fine y cols., 1999).

A. actinomycetemcomitans posee diversos factores de virulencia, entre ellos, la leucotoxina A (LtxA), la toxina distensora citoletal (Cdt) y el lipopolisacárido (LPS), principal inductor de la respuesta inmune en el hospedero (Díaz-Zúñiga y cols., 2012). El LPS cubre el 75% de su superficie externa y está constituido por un lípido A, una cadena central de oligosacáridos y un O-polisacárido, principal antígeno del LPS.

Sobre la base de la antigenicidad del O-polisacárido, en *A. actinomycetemcomitans* se describen 6 serotipos bacterianos distintos, denominados de la “a” a “f” (Page y cols., 1991, Gmur y cols., 1993, Kaplan y cols., 2001). En europeos, latino-americanos, africanos y asiáticos, los serotipos a, b y c son los detectados más frecuentemente (van der Reijden y cols., 2008, Jentsch y cols., 2012, Bandhaya y cols., 2012, Díaz-Zúñiga y cols., 2012), con variaciones de prevalencia dependiendo del estado clínico periodontal del sujeto. En efecto, el serotipo b es más frecuentemente aislado de lesiones periodontales activas en pacientes afectados de periodontitis crónica y agresiva (Paju y cols., 2000).

La distribución variable de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* entre sujetos sanos y enfermos y, entre lesiones periodontales activas e inactivas en un individuo enfermo, sugiere que tienen una patogenicidad diferente. En efecto, recientemente se ha demostrado que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* tiene un mayor potencial inmunogénico, al inducir mayor producción de citoquinas en células dendríticas y linfocitos T, en comparación a los otros serotipos, lo que explicaría, al menos desde el punto de vista inmune, esta mayor patogenicidad (Schacher y cols., 2007, Haraszthy y cols., 2000, Yang y cols., 2005, Díaz-Zúñiga y cols., 2014).

Respuesta inmune durante las periodontitis

Las células dendríticas identifican los microorganismos a través de receptores de reconocimiento de patrón (PRR, del inglés pathogen recognizing pattern), los que reconocen patrones microbianos altamente conservados (PAMPs, del inglés pathogen-associated molecular pattern). Entre los PRRs, destacan los receptores tipo Toll (TLR, del inglés toll-like receptor), capaces de identificar, entre otros, al LPS de los patógenos-periodontales (Azuma, 2006). En particular, el LPS de *A. actinomycetemcomitans* es reconocido por las células dendríticas mediante TLR2 y TLR4. En efecto, en células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* se detecta un incremento en los niveles de expresión de TLR2 y TLR4, con mayores

niveles de expresión de TLR2 en células estimuladas con el serotipo b en comparación a los serotipos a o c (Kikkert y cols., 2007).

Posterior al reconocimiento antigénico, las células dendríticas fagocitan las bacterias y procesan sus antígenos, conjugándolos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés major histocompatibility complex) clase II. Así, las células dendríticas se activan y presentan los antígenos a los linfocitos TCD4⁺ *naïve* (Azuma, 2006). Durante este proceso, las células dendríticas maduran y secretan citoquinas y, dependiendo en parte del patrón de citoquinas que predomina en el territorio anatómico en donde ocurre la presentación antigénica, los linfocitos TCD4⁺ *naïve* pueden diferenciarse selectivamente a 4 fenotipos efectoros distintos, denominados linfocitos T colaboradores (Th, del inglés T-helper) tipo Th1, Th2 y Th17 o linfocitos T reguladores (Treg).

Cada fenotipo linfocitario se define por la expresión de un factor de transcripción particular y la secreción de un perfil de citoquinas específico que determina su función. En términos generales, la expresión del factor de transcripción *T-bet* determina el fenotipo Th1 con una actividad pro-inflamatoria (Szabo y cols., 2000, Dutzan y cols., 2009a), la expresión del factor de transcripción *GATA3* determina el fenotipo Th2 con una actividad inmuno-moduladora (Zheng y Flavell, 1997), la expresión del factor de transcripción *RORC2* determina el fenotipo Th17 con una actividad pro-inflamatoria y osteo-destructiva (Vernal y Garcia-Sanz, 2008, Vernal y cols., 2005, Dutzan y cols., 2009a) y la expresión del factor de transcripción *Foxp3* induce la diferenciación del fenotipo Treg con una actividad inmuno-reguladora (Li y Greene, 2008).

Quimioquinas y receptores de quimioquinas

Las quimioquinas son un grupo de citoquinas que cumplen un rol fundamental en la quimiotaxis de las células del sistema inmune, tanto en condiciones fisiológicas homeostáticas como patológicas (Rossi y Zlotnik, 2000, Garlet y cols., 2003).

La producción de quimioquinas y expresión de sus receptores específicos genera un gradiente de concentración quimiotáctica entre los tejidos infectados y los linfonodos regionales que drenan estos tejidos, en donde ocurre la presentación antigénica. Así, se establece una migración celular en ambos sentidos, en donde las células dendríticas migran hacia los linfonodos para presentar los antígenos microbianos (Moschovakis y Forster, 2012) y los linfocitos T diferenciados y activados migran hacia los tejidos infectados para cumplir su función fenotipo-específica (Garlet y cols., 2003, Fernandez y Lolis, 2002).

Además, la expresión de las quimioquinas y sus receptores específicos cumplen un rol auxiliar durante la diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4⁺ a los distintos fenotipos linfocitarios efectoros durante la presentación antigénica, contribuyendo en la definición del tipo de respuesta inmune inducido (Kuwabara y cols., 2009, Loetscher y cols., 1998, Miyagaki y cols., 2010).

Tipos de quimioquinas y receptores de quimioquinas

Las quimioquinas CC (CCLs) y los receptores de quimioquinas (CCRs) corresponden a una sub-familia de 28 quimioquinas y 10 receptores sintetizados por células endoteliales, epiteliales, dendríticas, fibroblastos y linfocitos T de forma constitutiva y sobre-expresadas en condiciones patológicas (Garlet y cols., 2003, Fernandez y Lolis, 2002). Su estructura central corresponde a una cadena de aminoácidos con dos cisteínas unidas por puentes disulfuros (Silva y cols., 2007) y, sobre la base de las variaciones moleculares a partir de esta estructura central, se define la clasificación actual (**Tabla 1**).

Quimioquinas, receptores de quimioquinas y sus asociaciones a patologías

Las quimioquinas CCLs y sus receptores CCRs específicos han sido ampliamente estudiados en enfermedades inflamatorias crónicas (Hjelmstrom y cols., 2000). En la artritis reumatoide, los fibroblastos sinoviales producen CCL19 y CCL21, induciendo la quimiotaxis de linfocitos TCD4⁺ CCR7⁺ de tipo Th17, incrementando la reabsorción del cartílago y hueso articular en las articulaciones

afectadas (Moschovakis y Forster, 2012). En el asma, la síntesis de CCL17 y CCL22 promueve la polarización celular hacia el fenotipo linfocitario Th2 e induce inflamación de las vías aéreas (Perros y cols., 2009).

Tabla 1. Quimioquinas (CCLs) y sus receptores de quimioquinas (CCRs) específicos.

Receptor	Quimioquina
CCR1	CCL3, CCL3L1, CCL5, CCL7 CCL14, CCL16, CCL23, CCL9
CCR2	CCL2, CCL5, CCL7, CCL13
CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24 CCL26, CCL28
CCR4	CCL2, CCL17, CCL22
CCR5	CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL5,
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, CCL28

En términos generales, durante las enfermedades crónicas existe una asociación entre los CCRs expresados por los linfocitos T, la respuesta inmune Th efectora generada y las quimioquinas producidas por ellos en los tejidos afectados. Un patrón de respuesta tipo Th1 se asocia con un incremento en la expresión de los CCRs: CCR1, CCR2, CCR5 y CCR6 y producción de los CCLs: CCL3, CCL4 y CCL5 (Shadidi y cols., 2003, Loetscher y cols., 1998, Garlet y cols., 2010), una respuesta Th2 se asocia con mayor expresión de los CCRs: CCR3,

CCR4 y CCR8 (Perros y cols., 2009, Miyagaki y cols., 2010, Gonzalo y cols., 2007) y producción de los CCLs: CCL2, CCL11 y CCL17 y un patrón de respuesta de linfocitos Th17 se asocia con la expresión de los CCRs: CCR6 y CCR7 y producción de los CCLs: CCL19 y CCL21 (Lim y cols., 2008, Wang y cols., 2009) (**Tabla 2**).

Tabla 2. CCRs y CCLs asociados a los fenotipos Th1, Th2 y Th17.

Fenotipo de linfocito TCD4 ⁺	CCRs y CCLs asociados
Th1	CCR: CCR1, CCR2, CCR5
	CCL: CCL3, CCL4, CCL5
Th2	CCR: CCR3, CCR4 y CCR8
	CCL: CCL1, CCL11, CCL17
Th17	CCR: CCR6 y CCR7
	CCL: CCL19, CCL20, CCL21

Quimioquinas y receptores de quimioquinas en las periodontitis

Durante las periodontitis, los CCRs y CCLs son determinantes del establecimiento de la respuesta inmuno-inflamatoria y la definición del tipo de respuesta Th generada en los tejidos afectados (Silva y cols., 2007, Garlet y cols., 2003). De este modo, mientras el incremento en los niveles de IFN- γ se asocia con elevados niveles de expresión de CCR5 y la diferenciación de linfocitos Th1 (Loetscher y cols., 1998), el incremento en los niveles de IL-6 e IL-23 inducen la expresión de CCL2, CCR6 y CCR, determinando la activación, diferenciación y migración de los linfocitos Th1 y Th17 (Kuwabara y cols., 2009, Kabashima y cols., 2002). Por otro lado, la presencia de IL-4 e IL-10 inhibe la expresión de CCR5 e

incrementa los niveles de CCL11, CCR3 y CCR4 asociándose con linfocitos Th2 (Perros y cols., 2009). Así, es posible asociar la producción de CCLs y CCRs particulares con un tipo de respuesta inmune particular y, así, con el fenotipo clínico de las periodontitis. En efecto, en las lesiones periodontales de pacientes con periodontitis agresiva se detectan mayores niveles de expresión de las quimioquinas CCL3, CCL4, CCL5, CCL28 y los receptores CCR1, CCR5 y CCR9, y en las lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica se detectan mayores niveles de expresión de CCL2 y del receptor CCR4 (Ferreira y cols., 2011, Garlet y cols., 2010).

Planteamiento del problema

Recientemente, se ha descrito una patogenicidad serotipo-dependiente de *A. actinomycetemcomitans*, asociada a la mayor inmunogenicidad del serotipo b. En particular, en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detectan mayores niveles de producción de citoquinas y factores de transcripción característicos de los fenotipos Th1 y Th17 en comparación a las mismas células activadas con los serotipos a y c (Díaz-Zúñiga y cols., 2015).

La expresión de CCLs y CCRs es necesaria para la definición de la diferenciación selectiva y la posterior migración de los linfocitos T diferenciados hacia los sitios periodontales infectados. Por lo tanto, un incremento en la expresión de CCLs y CCRs asociados a los fenotipos Th1 y Th17 se induciría en linfocitos T *naïve* al ser estimulados con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en comparación a los otros serotipos.

3. HIPÓTESIS

En linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce mayores niveles de expresión de las quimioquinas CCL3, CCL5, CCL20, CCL21, CCL28, y sus receptores específicos CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7 y CCR9, asociados a un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17, en comparación a los serotipos a o c.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de las distintas quimioquinas CCLs y sus receptores específicos CCRs en linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos activados en presencia de células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles de expresión de las quimioquinas CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CCL21, CCL25 y CCL28 en linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos activados en presencia de células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.
2. Cuantificar los niveles de expresión de los receptores de quimioquinas CCR1 a CCR10 en linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.
3. Cuantificar la expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA3*, *RORC2* y *Foxp3*, factores de transcripción específicos determinantes de la diferenciación selectiva Th1, Th2, Th17 y Treg, respectivamente, en linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.
4. Asociar los niveles de expresión de los CCRs y CCLs con los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA3* y *RORC2* en linfocitos TCD4⁺ humanos activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los sujetos y obtención de las muestras biológicas

Los monocitos y linfocitos TCD4⁺ *naïve* circulantes periféricos fueron purificados, como se detalla más adelante, a partir de leuco-reducciones de sangre periférica obtenidas de 5 donantes sanos en el banco de sangre del Hospital San Salvador. 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 fue explicado 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 FONDECYT (Anexo).

Cultivo y curvas de crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*

Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC[®] 43717TM (serotipo a), ATCC[®] 43718TM (serotipo b) y ATCC[®] 43719TM (serotipo c) fueron sembradas en medio de cultivo agar infusión cerebro-corazón (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) e incubadas a 37°C en condiciones de capnofilia (8% O₂ y 12% CO₂), usando generadores CampyGenTM (Oxoid Ltd). Para obtener un número similar de microorganismos de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* para la estimulación de las células dendríticas, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano tal como ha sido descrito previamente (Díaz-Zúñiga y cols., 2014).

Purificación de monocitos

A partir de las leuco-reducciones, fueron aisladas las células periféricas mononucleares (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) usando

una gradiente de concentración, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Ficoll-Paque Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Los monocitos fueron purificados desde las PBMCs por separación inmuno-magnética (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany). Brevemente, las PBMCs fueron lavadas 2 veces en tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS) y posteriormente incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD14 humano conjugado con partículas inmuno-magnéticas, durante 15 min a 4°C. Luego de ser lavadas, las células fueron resuspendidas en PBS y los monocitos fueron purificados usando columnas de separación MS montadas en un campo magnético (MACS; Miltenyi Biotec). La fracción de células CD14⁺ separadas corresponden a los monocitos, cuyo recuento se realizó utilizando una cámara de Neubauer[®] y el fenotipo fue confirmado usando anticuerpos monoclonales específicos analizados mediante citometría de flujo, tal como se detalla más adelante.

Purificación de linfocitos TCD4⁺ *naïve*

Posteriormente, los linfocitos TCD4⁺ *naïve* fueron purificados utilizando un kit de depleción celular específico, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MACS; Miltenyi Biotec). Para esto, la fracción CD14⁻ de las PBMCs fue incubada con anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ y CD235a humanos conjugados con biotina durante 20 min a 4°C y posteriormente con anticuerpo anti-biotina conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 15 min a 4°C. Luego de ser lavadas, las células fueron resuspendidas en PBS y los linfocitos TCD4⁺ *naïve* fueron aislados usando columnas de depleción LD montadas en un campo magnético. Las células fueron contadas y el fenotipo celular fue confirmado usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo, tal como se detalla más adelante.

Estimulación de las células dendríticas y activación de linfocitos TCD4⁺ naïve

Los monocitos purificados fueron sometidos a un protocolo estandarizado de diferenciación *in vitro* a células dendríticas (Díaz-Zúñiga y cols., 2014). Brevemente, los monocitos CD14⁺ fueron cultivados durante 6 días a una concentración de $0,7 \times 10^6$ 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). Las células dendríticas diferenciadas fueron estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* a una multiplicidad infectante incremental (MOI) de 10^{-1} - 10^2 (razón bacterias/células dendríticas) durante 2 días. Como control positivo, una fracción de las células dendríticas fue estimulada con 10 ng/mL del LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland). Células dendríticas no estimuladas fueron utilizadas como control negativo. La diferenciación y estimulación de las células dendríticas fue evaluada con anticuerpos específicos mediante citometría de flujo, detallado más adelante. Posteriormente, las células dendríticas estimuladas fueron lavadas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina y co-cultivadas con linfocitos TCD4⁺ naïve autólogos a una razón de 1:10 durante 5 días.

Análisis de fenotipo celular

La purificación de los monocitos, su diferenciación a células dendríticas y su posterior maduración ante la estimulación con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* se evaluó mediante citometría de flujo usando los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugados con fluorocromos PE, FITC o PE/Cy5: anti-CD14 (monocitos), CD1a (células dendríticas inmaduras) y CD83 (células dendríticas maduras) (BD Biosciences Pharmingen, San José, CA, USA) utilizando un equipo FACScan de citometría de flujo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). La purificación de linfocitos

TCD4⁺ naïve fue evaluada mediante citometría de flujo usando los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugado con fluorocromos PE o FITC: anti-CD4 (linfocitos TCD4⁺) y anti-CD14 (monocitos) (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA).

Expresión de CD80, CD83 y CD86

Con el objetivo de comparar los niveles de activación de las células dendríticas ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, la expresión de CD83 (marcador de células dendríticas maduras), CD80 y CD86 (moléculas co-estimuladoras de la presentación antigénica a los linfocitos T) fue evaluada mediante citometría de flujo usando anticuerpos de ratón anti-humano conjugados con fluorocromos PE y FITC, respectivamente (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA).

Purificación de RNA citoplasmático total

Luego de la activación de los linfocitos T durante 5 días, estos fueron lavados dos veces en PBS y lisados en 400 µL de amortiguador de lisis conteniendo Igepal[®] CA-630 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl, 100 mM, MgCl₂ 5 mM y vanadyl-ribonucleosidos (VRC) 10 mM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Luego de centrifugar a 14.000 x g durante 10 s, el sobrenadante fue digerido con 25 µg/mL de proteinasa K (Roche Ltd, Basel, Switzerland), sulfato de sodio dodecil 1% y EDTA 15 mM (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 30 min a 37°C. El RNA citoplasmático total fue extraído con 400 µL de solución fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1 (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), precipitado a -20°C con acetato de sodio 0,3 M, 1 mL de etanol 100% y 20 µg/µL de glicógeno (Roche Ltd, Basel, Switzerland) y recuperado mediante centrifugación a 14.000 x g durante 30 min. Finalmente, el RNA se resuspendió en 30 µL de agua milliQ libre de RNAsas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Síntesis de la primera cadena de cDNA, expresión de CCRs, CCLs y factores de transcripción mediante RT-PCR cuantitativo

A partir de 2 µg de RNA citoplasmático total se procedió a la síntesis de la primera cadena de cDNA mediante transcripción reversa, utilizando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), según las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión de los mRNA de las quimioquinas CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CCL21, CCL25 y CCL28, los receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y los factores de transcripción *T-bet*, *GATA3*, *RORC2* y *Foxp3* fueron cuantificados a partir de 50 ng de cDNA mediante RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos (**Tabla 3**) y un kit DNA polimerasa-SYBR Green (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). La amplificación fue realizada en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystem, CA, USA) utilizando el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 min y 40 ciclos de 95°C durante 3 s y 60°C durante 30 s. Como control de amplificación y referencia para la cuantificación relativa se analizaron los niveles de expresión de la subunidad 18S de RNA ribosomal (rRNA).

Análisis de los datos

Los datos de la citometría de flujo se representan como histogramas usando el software WinMDi 2.9 (The Scripps Research Inst., La Jolla, CA, USA) y se expresan como porcentaje promedio ± desviación estándar de células positivas sobre el total. Los niveles de expresión de los CCRs, CCLs y factores de transcripción fueron evaluados mediante RT-PCR en tiempo real y expresados como niveles de expresión relativo promedio ± desviación estándar. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). La normalidad de la distribución de los datos fue determinada usando la prueba de Kolgomorov-Smirnov. Las diferencias en la expresión de los marcadores de activación de las células dendríticas CD80, CD83 y CD86 fueron analizados mediante la prueba χ^2 y los niveles de expresión de los CCLs, CCRs y los factores de transcripción mediante las pruebas de

ANOVA y *post hoc* de Tukey. La asociación entre los niveles de expresión de los distintos CCLs o CCRs con los de expresión de los diferentes factores de transcripción fue analizada usando la prueba de correlación de Pearson. Los datos fueron considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

Tabla 3. Partidores utilizados para la cuantificación mediante RT-PCR tiempo real de los receptores CCRs, las quimioquinas y factores de transcripción.

CCRs y Quimioquinas	Partidor →3'	Partidor →5'
CCR1	agtacctgcggcagttgttc	aaggggagccatttaaccag
CCR2	ttctgataaaccgagaacgaga	gagacaagccacaagctgaa
CCR3	gagtgtgtggccagaagaca	cttcctggattcagccctct
CCR4	accgctgcacaattgc	tttacagtggcatattctttgtcatg
CCR5	gaccagccccaagatgacta	cttgggtgggtggctgtgt
CCR6	tcagcccctcagctcac	actgtggctgttggtttgtg
CCR7	ttggttaggggacaatagcc	ggctgataagctaacaccagaca
CCR8	atgcctagggagagctgtga	aaaatgtagtctacgctggagga
CCR9	ttccccagacactgagagc	tgtaggaatagggctgtgg
CCR10	agtagtgggggaacactga	gcaaggcacagaggtagtcc
CCL1	ttgctgctagctgggatgt	ctggagaagggtacctgcat
CCL2	gcctccagcatgaaagtctc	ggaatgaagggtggctgctat
CCL3	cagcagacagtggtcagtcc	ttctgagcaggtgacggaat
CCL5	ggtgtggtgtccgaggaata	cctcattgctactgccctct
CCL11	cccttcagcgactagagagc	cagcttctggggacatttg
CCL17	ggcttctctgcagcacatc	ggaatggctccctgaagta
CCL20	gctgctttgatgtcagtgtct	gcagtcaaagttgcttgctg
CCL21	cacccttaccacagacatgg	aggccagaaccaggataagg
CCL25	ctgagttggtcctccctctg	aatcaggccaactccctctt
CCL28	ccacctacctggttcaaacg	cgggctgacacagattcttc
<i>T-bet</i>	tccaagttaatcagcaccaga	tgacaggaatgggaacatcc
<i>GATA3</i>	ctcattaagccaagcgaag	tctgacagttcgacaggac
<i>RORC2</i>	agaaggacagggagccaag	caagggatcactcaatttg
<i>Foxp3</i>	acctacgccacgctcatc	tcattgagtgctcgctgct
18S rRNA	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

7. RESULTADOS

Purificación de monocitos y linfocitos TCD4⁺ *naïve* y diferenciación de células dendríticas

La purificación de monocitos, su diferenciación a células dendríticas y la purificación de linfocitos TCD4⁺ *naïve* fue evaluada mediante citometría de flujo (**Figuras 1 y 2**). A partir de PBMCs aisladas de sangre periférica, se obtuvo una población de monocitos de alta pureza, demostrado por los altos niveles de expresión del marcador específico CD14 (>97%). Sobre un 98% de ellos se diferenció a células dendríticas ante la estimulación con rhIL-4 y rhGM-CSF, demostrado por la pérdida del marcador CD14 y el incremento en la expresión del marcador específico CD1a. Por otro lado, se obtuvo una población de linfocitos TCD4⁺ *naïve* de alta pureza, demostrado por los elevados niveles de expresión del marcador CD4 (>98%) y los bajos niveles de detección del marcador CD14 (<0,2%).

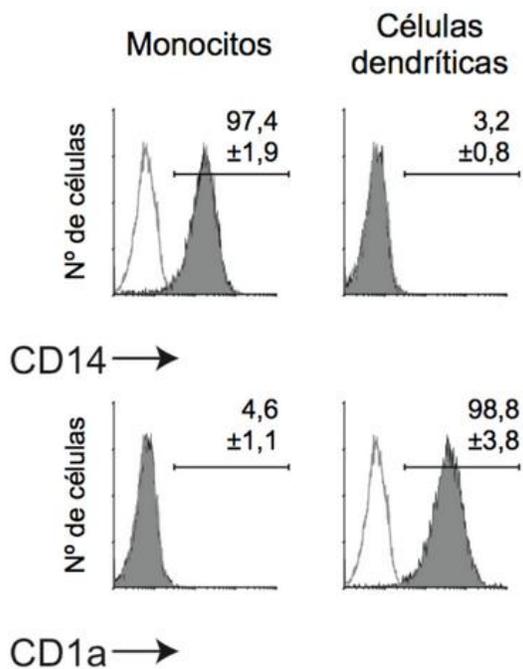


Figura 1. Purificación de monocitos y su diferenciación a células dendríticas.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de monocitos (CD14⁺) a partir de PBMCs de sangre periférica y su diferenciación *in vitro* a células dendríticas (CD1a⁺).

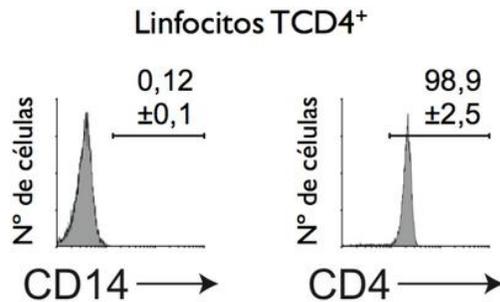


Figura 2. Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de linfocitos T colaboradores (CD4⁺).

Activación de las células dendríticas

Los niveles de activación de las células dendríticas luego de la estimulación con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* fueron analizados cuantificando los niveles de expresión de CD83 (marcador de células dendríticas maduras), CD80 y CD86 (señales co-estimuladoras necesarias para la presentación antigénica a los linfocitos TCD4⁺ naïve) mediante citometría de flujo (**Figura 3**). Un alto porcentaje de las células dendríticas se activó luego de la estimulación microbiana, sin detectarse diferencias entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* en los niveles de expresión de los marcadores CD80 (>95%), CD83 (>95%) y CD86 (>94%).

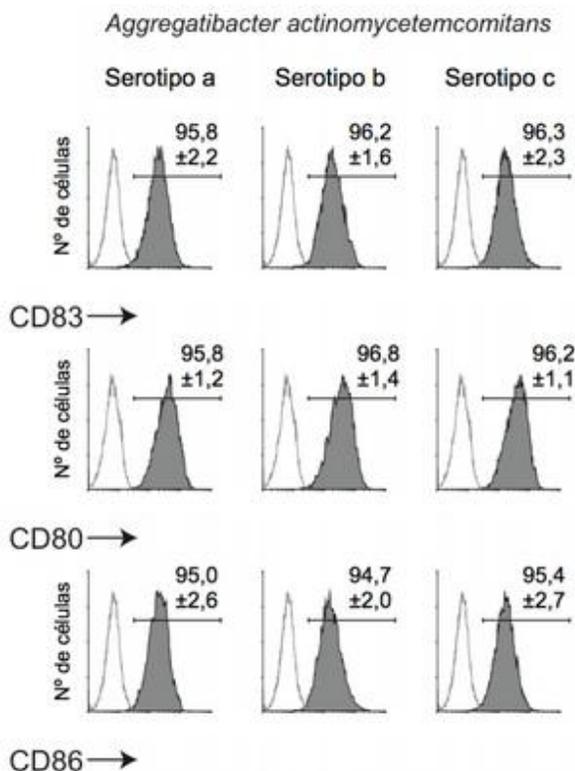


Figura 3. Activación de las células dendríticas ante la estimulación con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CD80, CD83 y CD86 que evidencian la activación de las células dendríticas luego de 48 horas de estimulación ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

Activación de linfocitos TCD4⁺ naïve

Los niveles de activación de los linfocitos TCD4⁺ naïve luego de ser expuestos ante células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* fueron analizados cuantificando los niveles de expresión del marcador CD25 α mediante PCR en tiempo real (**Figura 4**). Similares niveles de activación de linfocitos TCD4⁺ fueron observados luego de la estimulación con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. Así, las posibles diferencias de respuesta en la expresión de CCRs y producción de CCLs no se deberían a diferencias en la cantidad de células activadas, sino que a un distinto patrón de respuesta linfocitaria ante la estimulación bacteriana.

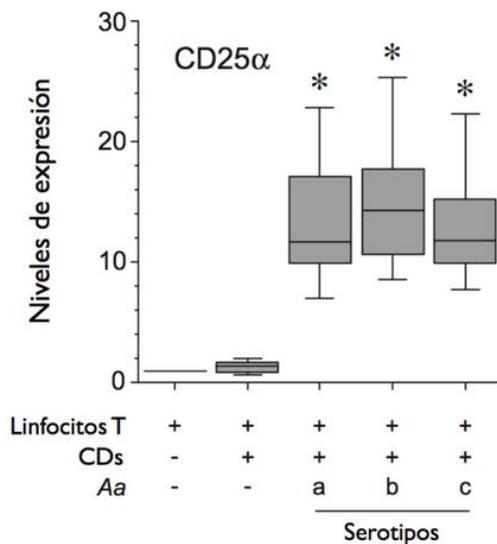


Figura 4. Linfocitos TCD4⁺ activados en presencia de células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

Análisis mediante PCR en tiempo real de la expresión del marcador CD25 α en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* (Aa) (*p<0,05).

Expresión de CCLs y CCRs

En linfocitos TCD4⁺ activados en presencia de células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*, se cuantificó la expresión de las quimioquinas CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CCL21, CCCL25 y CCL28 y sus receptores específicos CCR1 a CCR10 (**Figura 5 y 6**). Mayores niveles de expresión de las quimioquinas CCL2 (p=0,025 y p=0,024), CCL3 (p=0,003 y p=0,005), CCL5 (p=0,004 y p=0,013), CCL20

($p=0,05$ y $p=0,02$), CCL21 ($p<0,001$ y $p<0,001$), CCL28 ($p=0,004$ y $p=0,008$) y los receptores CCR1 ($p=0,036$ y $p=0,026$), CCR2 ($p=0,041$ y $p=0,042$), CCR5 ($p=0,029$ y $p=0,035$), CCR7 ($p=0,039$ y $p=0,020$) y CCR10 ($p=0,018$ y $p=0,022$) se detectaron en los linfocitos T activados ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en comparación a las mismas células expuestas a los serotipos a y c, respectivamente. Por otro lado, en linfocitos TCD4⁺ activados ante el serotipo a de *A. actinomycetemcomitans* se detectó un incremento en los niveles de expresión de CCL1 ($p=0,008$ y $p=0,009$) y su receptor CCR3 ($p=0,006$ y $p=0,007$) en comparación a las células activadas en presencia de los serotipos b o c, respectivamente.

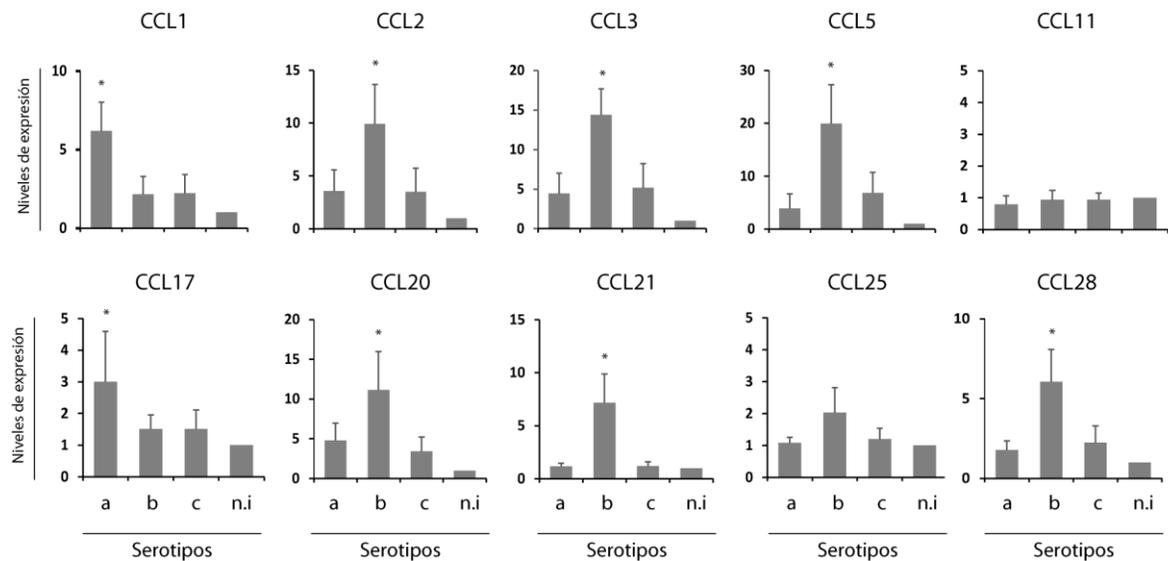


Figura 5. Expresión de CCLs en linfocitos TCD4⁺ activados ante los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. Niveles de expresión de los mRNA de las quimioquinas CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CCL21, CCL25 y CCL28 en linfocitos TCD4⁺ activados en presencia de células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. * $p<0,05$. n.i.= no inducido.

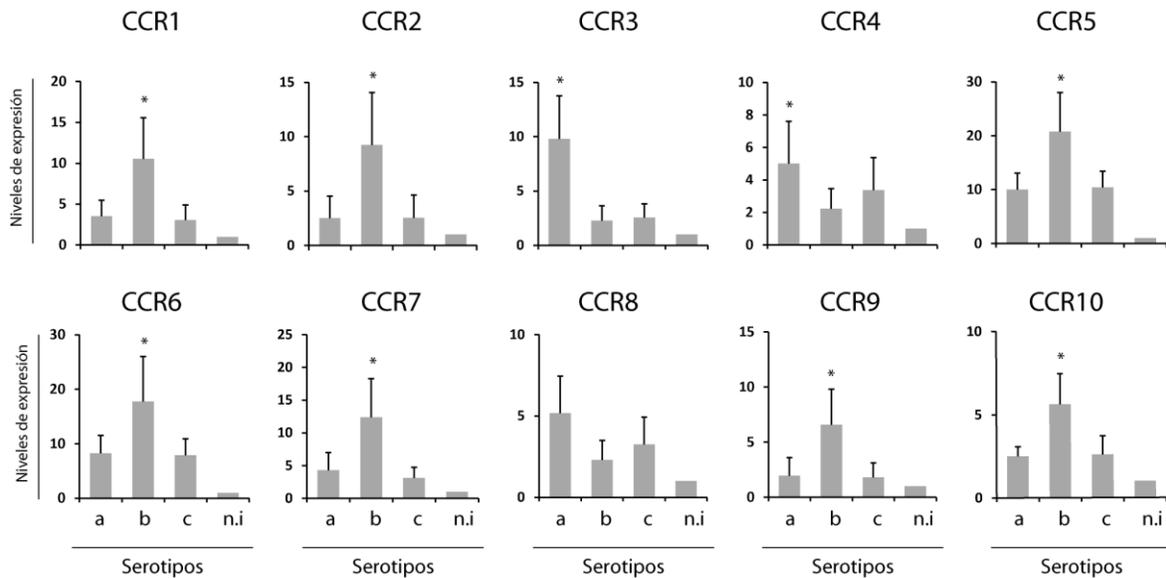


Figura 6. Expresión de receptores CCR1 a CCR10 en linfocitos TCD4⁺ activados ante los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. Niveles de expresión de los mRNA de los receptores CCR1 a CCR10 en linfocitos TCD4⁺ activados en presencia de células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. *p<0,05. n.i.= no inducido

Expresión de *T-bet*, *GATA3*, *RORC2* y *Foxp3*

En linfocitos TCD4⁺ activados en presencia de células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*, se cuantificó la expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA3*, *RORC2* y *Foxp3* (**Figura 7**). Cuando los linfocitos TCD4⁺ fueron activados ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, mayores niveles de expresión de *T-bet* (p=0,0001 y p=0,0001) y *RORC2* (p=0,0001 y p=0,0001) se detectaron en comparación con los linfocitos TCD4⁺ activados ante los serotipos a y c, respectivamente.

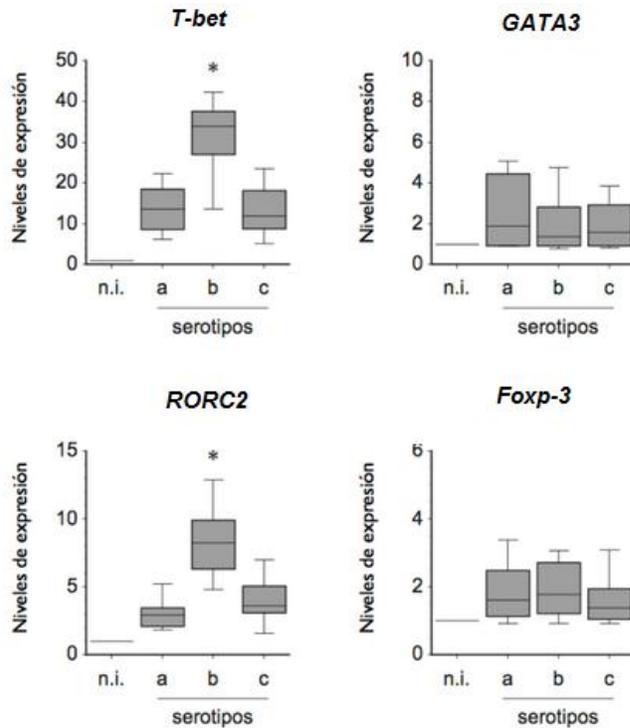


Figura 7. Expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA3*, *RORC2* y *Foxp3* en linfocitos $TCD4^+$ activados ante los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

Niveles de expresión de los mRNA de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA3*, *RORC2* y *Foxp3* en linfocitos $TCD4^+$ activados en presencia de células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. * $p < 0,05$. n.i.= no inducido

Correlación entre los niveles de expresión de CCLs, CCRs y los distintos factores de transcripción

A partir de los datos de PCR en tiempo real, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los niveles de expresión de los CCLs y CCRs, y los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA3* y *RORC2* (**Tabla 4**). Cuando los linfocitos T se estimularon con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, se detectó una correlación positiva entre los niveles de expresión de CCLs y CCRs asociados al fenotipo linfocitario Th1 y la expresión de *T-bet* (CCL2 $r=0,918$, CCL3 $r=0,882$, CCL5 $r=0,931$, CCL25 $r=0,909$, CCR1 $r=0,956$, CCR2 $r=0,934$, CCR5 $r=0,882$ y CCR9 $r=0,896$), entre los CCLs y CCRs asociados al fenotipo linfocitario Th17 y la expresión de *RORC2* (CCL20 $r=0,939$, CCL21 $r=0,996$, CCR6 $r=0,875$ y CCR7 $r=0,970$).

Tabla 4. Correlación entre los niveles de expresión de los CCLs y CCRs, y los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA3* y *RORC2*.

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>							
		Serotipo a		Serotipo b		Serotipo c	
		r	p-value	r	p-value	r	p-value
T-bet	CCL2	-0.606	0.394	0.918	0.082	-0.487	0.513
	CCL3	-0.755	0.245	0.882	0.118	-0.799	0.201
	CCL5	-0.485	0.515	0.931	0.049*	-0.682	0.318
	CCL25	0.585	0.415	0.909	0.091	0.800	0.200
	CCR1	-0.250	0.750	0.956	0.040*	0.522	0.478
	CCR2	-0.800	0.200	0.934	0.046*	-0.762	0.238
	CCR5	-0.745	0.255	0.882	0.118	-0.966	0.004
	CCR9	-0.971	0.029	0.896	0.104	-0.711	0.289
GATA3	CCL1	0.920	0.050*	0.837	0.063	0.130	0.870
	CCL11	-0.125	0.825	0.912	0.088	-0.178	0.822
	CCL17	0.934	0.046*	0.519	0.481	-0.072	0.928
	CCL28	-0.231	0.769	0.304	0.696	0.251	0.749
	CCR3	0.880	0.120	0.628	0.372	0.620	0.380
	CCR4	0.998	0.002*	-0.020	0.980	0.578	0.422
	CCR8	0.932	0.048*	0.940	0.060	0.956	0.044*
	CCR10	0.162	0.838	-0.878	0.122	0.144	0.856
RORC2	CCL20	0.897	0.103	0.939	0.041*	0.357	0.643
	CCL21	0.403	0.597	0.996	0.004*	-0.229	0.771
	CCR6	-0.852	0.148	0.875	0.125	-0.717	0.283
	CCR7	0.998	0.002*	0.970	0.030*	0.909	0.091

8. DISCUSIÓN

Durante las periodontitis, la destrucción de los tejidos de inserción periodontal y la consecutiva pérdida de los dientes se asocia a un patrón de respuesta inmune local de tipo Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteo-destructivo), desarrollado por el hospedero en respuesta a las bacterias que constituyen la bio-película patogénica subgingival (Díaz-Zúñiga y cols., 2014, Dutzan y cols., 2009b, Dutzan y cols., 2009a, Hernandez y cols., 2011). En este estudio, se analizó la expresión de distintos CCLs y CCRs en linfocitos TCD4⁺ purificados de sangre periférica de sujetos donantes sanos luego de ser estimulados *in vitro* con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* indujo mayores niveles de expresión de CCLs y CCRs en comparación con los otros serotipos y, en particular, se sobre-expresaron CCLs y CCRs característicos de un patrón de respuesta tipo de Th1 y Th17.

La asociación del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* a la periodontitis y la inducción de una respuesta inmuno-inflamatoria local de tipo Th1 y Th17 ha sido previamente analizada (Asikainen y cols., 1991, Cortelli y cols., 2012, Roman-Torres y cols., 2010, Díaz-Zúñiga y cols., 2014, Díaz-Zúñiga y cols., 2015, Vernal y cols., 2008). En efecto, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* es el más frecuentemente aislado desde lesiones periodontales activas de pacientes afectados de periodontitis (Aberg y cols., 2012, Bandhaya y cols., 2012, Chen y cols., 2010, Cortelli y cols., 2012, Jentsch y cols., 2012, Roman-Torres y cols., 2010, Sakellari y cols., 2011). Por otro lado, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* provoca una mayor respuesta de naturaleza inmunogénica y patogénica en distintas células del hospedero, cuando se compara con la inducida por los otros serotipos. Por ejemplo, el serotipo b induce mayor producción de microvesículas citotóxicas de membrana, expresión más temprana de la fase acuosa del LPS, una más potente interferencia en la co-agregación entre *A. actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, mayor resistencia a la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos, un incremento en los niveles de expresión de IL-8 e ICAM-1 en células epiteliales gingivales e IL-1 β en

macrófagos, y una más potente inducción de una respuesta de tipo Th1 y Th17 en células dendríticas (Kikuchi y cols., 2012, Nowotny y cols., 1982, Rosen y cols., 2003, Shimada y cols., 2008, Takahashi y cols., 1991, Yamaguchi y cols., 1995, Díaz-Zúñiga y cols., 2015).

La presente investigación, es la primera que analiza la asociación del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* a una respuesta inmune tipo Th1 y Th17 mediante el análisis de las quimioquinas CCLs y sus receptores de quimioquinas CCRs específicos implicados en la quimio-atracción selectiva de los distintos fenotipos efectores linfocitarios. Nuestros datos nos permiten especular que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* estaría implicado en la generación de un ambiente molecular inflamatorio local que favorece la quimio-atracción de linfocitos Th1 y Th17 hacia los sitios periodontales infectados.

En la artritis reumatoide, enfermedad caracterizada por el desarrollo de una respuesta inmuno-inflamatoria de tipo Th1 y Th17 en los tejidos articulares afectados (Gonzalo y cols., 2007), se ha caracterizado el patrón de expresión local de CCRs y CCLs. En particular, en las articulaciones inflamadas, se sobre-expresan CCR1, CCR2, CCR5, CCL2, CCL3 y CCL5, característicos de una respuesta Th1 (Subasinghe y cols., 2013, Shadidi y cols., 2003), y CCR6, CCR7, CCL20 y CCL21 (Moschovakis y Forster, 2012, Ren y cols., 2014, Kochi y cols., 2014), asociados a un perfil Th17, y estos perfiles definirían el carácter crónico de la enfermedad. En efecto, en las articulaciones afectadas, existe un incremento en la expresión de CCL20 asociado a un infiltrado inmuno-inflamatorio predominante de linfocitos Th17 (Hirota y cols., 2007) y el bloqueo de los receptores CCR1, CCR2, CCR5 y CCR6 provoca la disminución de la migración de linfocitos Th1 hacia las articulaciones afectadas y la resolución de la enfermedad (Shadidi y cols., 2003, Hirota y cols., 2007).

Nuestros resultados son consistentes con la evidencia científica actual al demostrar que un perfil de respuesta inmune de tipo Th1 y Th17 se desarrolla durante la infección periodontal, al menos durante una mono-infección experimental *in vitro* por *A. actinomycetemcomitans*. Además, nos permiten

especular que estos patrones de respuesta se pueden deber a un incremento de la quimio-atracción de linfocitos T *naïve* recientemente activados y diferenciados hacia los fenotipos Th1 o Th17 en los linfonodos regionales y/o a la activación de linfocitos T de memoria Th1 o Th17 residentes en los tejidos periodontales infectados.

Sin embargo, nuestros datos también muestran que, ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, también se incrementan los niveles de expresión de CCR10, receptor de quimioquinas que ha sido asociado a la migración y diferenciación de linfocitos Th2 (Xia y cols., 2014). Esto podría ser explicado porque el receptor CCR10 también es expresado por linfocitos Th22, fenotipo recientemente descrito con funciones pro-inflamatorias y osteo-destructivas similares a las del perfil Th17 (Fujita, 2013); sin embargo, este fenotipo linfocitario aún no ha sido descrito en periodontitis. En este contexto, datos aún no publicados de nuestro grupo de investigación permitirían establecer que un perfil tanto Th9 como Th22 se asociarían a la patogenia de las periodontitis y explicaría el incremento de expresión de CCR10 detectado en este estudio. En efecto, CCL28, quimioquina ligando específica de CCR10, ha sido detectada con mayor prevalencia en pacientes con periodontitis en comparación con sujetos sanos o afectados de gingivitis (Ertugrul y cols., 2013).

Debido a que las quimioquinas son redundantes y pleitrópicas, la comprensión de sus funciones debe ser contextualizada según el tipo y ambiente fisiopatológico en que se sobre-expresan, sea este de tipo homeostático, tumoral o inmuno-inflamatorio (Hjelmstrom, 2001). Es así como CCR7, antes considerado un receptor homeostático, recientemente se ha vinculado a la polarización de linfocitos Th17 y al carácter crónico de enfermedades inmuno-inflamatorias y osteo-destructivas (Kochi y cols., 2014, Moschovakis y Forster, 2012, Hjelmstrom y cols., 2000).

Nuestros resultados nos permiten especular el rol selectivo de un patrón particular de expresión de CCRs y CCLs en la migración y diferenciación de un fenotipo específico de linfocitos TCD4⁺, dependiente del serotipo del

microorganismo infectante. Debido a que no existen diferencias significativas en los niveles de activación de los linfocitos TCD4⁺ ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (expresión de CD25, **Figura 4**), la inducción de una variable expresión de CCRs y CCLs de tipo Th1 o Th17 se debe exclusivamente a la variable inmunogenicidad de estos serotipos, en particular de su LPS (Díaz-Zúñiga y cols., 2015, Díaz-Zúñiga y cols., 2014). Así, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce una respuesta pro-inflamatoria y osteo-destructiva, donde los linfocitos no sólo expresan receptores CCR tipo Th1 o Th17, sino que también simultáneamente expresan quimioquinas de estos fenotipos, en una especie de feedback-positivo.

En términos generales, la migración celular ocurre a favor de la gradiente de concentración de quimioquinas (Rossi y Zlotnik, 2000); por tanto, la producción de quimioquinas por los linfocitos TCD4⁺ en el sitio periodontal afectado favorecería la subsecuente migración de otros linfocitos Th1 o Th17. Además, los CCRs y CCLs inducidos por el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en linfocitos TCD4⁺ son mediadores de la osteo-destrucción (Silva y cols., 2007); así, podría inducirse la diferenciación y activación de osteoclastos mediada por CCR1, CCR2 y CCR5 (Garlet y cols., 2005, Garlet y cols., 2003, Garlet y cols., 2010), junto con la acción de los linfocitos Th17 CCR7⁺ productores de RANKL, IL-6 e IL-17 (Vernal y Garcia-Sanz, 2008), provocando finalmente la reabsorción del hueso alveolar característica de las periodontitis.

Finalmente, proyectando los resultados de este estudio, es posible especular que mediante la inhibición de los receptores asociados a la infección provocada por serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, en particular CCR1, CCR2 y CCR5, se podría modular la respuesta inmuno-inflamatoria inducida. Así, probablemente, se favorecería la señalización mediante otros receptores, tal como CCR3 y CCR4, incrementando la migración selectiva de linfocitos Th2 y, de este modo, inducir una respuesta asociada a la salud periodontal. En este contexto, un inhibidor que se ha utilizado con éxito es MET-RANTES, un compuesto derivado de CCL5 que se une específicamente a los receptores CCR1, CCR2 y CCR5,

impidiendo la subsecuente señalización intracelular (Proudfoot y cols., 1996). Este compuesto se ha utilizado con éxito en la atenuación de la respuesta inflamatoria en modelo animales de periodontitis, inhibiendo la migración de linfocitos Th1 y la osteoclastogénesis en los sitios inflamados, permitiendo proyectar su utilización en la clínica odontológica (Repeke y cols., 2011).

Durante las periodontitis, la presentación antigénica podría ocurrir tanto en los linfonodos regionales que drenan los tejidos periodontales, como localmente en los tejidos periodontales infectados, de manera sitio-específica. Debido a que las señales de reclutamiento de linfocitos hacia los sitios inflamados son similares a las señales de migración homeostática desde y hacia los linfonodos, durante la inflamación crónica periodontal se podría favorecer la formación de agrupaciones linfoides *in situ* (Hjelmstrom y cols., 2000). En estas agrupaciones linfoides periodontales, podría ocurrir la presentación antigénica y la polarización de linfocitos T, tanto *naïve* como de memoria, aumentando la cronicidad de la enfermedad. En las periodontitis, se ha descrito la formación de agrupaciones linfoides gingivales y periodontales (Schroeder y Graf-de Beer, 1976) y, probablemente, el receptor CCR7 y sus quimioquinas ligandos específicos CCL19 y CCL21 participan en la conformación de estas agrupaciones celulares, favoreciendo la presentación antigénica *in situ* y el desarrollo de una respuesta inmuno-inflamatoria local de tipo Th17 osteo-destructiva (Moschovakis y Forster, 2012).

9. CONCLUSIONES

1. Los linfocitos TCD4⁺ humanos activados ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* expresan mayores niveles de las quimioquinas, asociadas a un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17, en comparación a las células estimuladas con los otros serotipos.
2. Los linfocitos TCD4⁺ humanos activados ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* expresan mayores niveles de los receptores de quimioquinas, asociados a un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17, en comparación a las células estimuladas con los otros serotipos.
3. Los linfocitos TCD4⁺ humanos activados ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* expresan mayores niveles de los factores de transcripción *T-bet* y *RORC2*, determinantes de la diferenciación selectiva Th1 y Th17, respectivamente, en comparación a las células estimuladas con los otros serotipos.
4. En los linfocitos TCD4⁺ humanos activados ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, el incremento en los niveles de expresión de las quimioquinas y los receptores de quimioquinas de tipo Th1 y Th17 se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* y *RORC2*.
5. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce un patrón de respuesta de quimioquinas CC y receptores de quimioquinas CCRs de tipo Th1 y Th17, explicando, al menos en parte, su asociación a la etiopatogenia de las periodontitis.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, C. H., Kwamin, F., Claesson, R., Johansson, A. & Haubek, D. (2012) Presence of JP2 and Non-JP2 Genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and attachment loss in adolescents in Ghana. *J Periodontol* **83**, 1520-1528.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6.
- Asikainen, S., Lai, C. H., Alaluusua, S. & Slots, J. (1991) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* **6**, 115-118.
- Azuma, M. (2006) Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res* **41**, 361-373.
- Bandhaya, P., Saraithong, P., Likittanasombat, K., Hengprasith, B. & Torrungruang, K. (2012) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes, the JP2 clone and cytolethal distending toxin genes in a Thai population. *J Clin Periodontol* **39**, 519-525.
- Cortelli, J. R., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Roman-Torres, C. V., Franco, G. C., Gomez, R. S., Batista, L. H. & Costa, F. O. (2012) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 1311-1318.
- Chen, C., Wang, T. & Chen, W. (2010) Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Mol Oral Microbiol* **25**, 207-214.
- Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodriguez, S., Benitez, A., Ciuchi, P., Garcia, M., Arias, J., Sanz, M. & Vernal, R. (2015) Variability on the dendritic cell response triggered by the different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* is Toll Like Receptor-2 (TLR2) or TLR4 dependent. *J Periodontol* **86**, 1-21. [Early view article in press]

- Díaz-Zúñiga, J., Yanez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodriguez, S., Hernandez, M., Sanz, M. & Vernal, R. (2014) Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* **41**, 242-251.
- Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J., Melgar-Rodríguez, S., Álvarez, C., Rojas, C. & Vernal, R. (2012) Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* **5**, 40-45.
- 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**, 290-296.
- Ertugrul, A. S., Sahin, H., Dikilitas, A., Alpaslan, N. & Bozoglan, A. (2013) Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* **48**, 44-51.
- Fernandez, E. J. & Lolis, E. (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 469-499.
- Ferreira, S. B., Jr., Repeke, C. E., Raimundo, F. M., Nunes, I. S., Avila-Campos, M. J., Ferreira, B. R., Santana da Silva, J., Campanelli, A. P. & Garlet, G. P. (2011) CCR5 mediates pro-osteoclastic and osteoclastogenic leukocyte chemoattraction. *J Dent Res* **90**, 632-637.
- 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. *Microbiology* **145** 1335-1347.

- Fujita, H. (2013) The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci* **72**, 3-8.
- Garlet, G. P., Avila-Campos, M. J., Milanezi, C. M., Ferreira, B. R. & Silva, J. S. (2005) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect* **7**, 738-747.
- Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M. & Silva, J. S. (2003) Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* **38**, 210-217.
- Garlet, T. P., Fukada, S. Y., Saconato, I. F., Avila-Campos, M. J., da Silva, T. A., Garlet, G. P. & Cunha Fde, Q. (2010) CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *J Endod* **36**, 244-250.
- Gemmell, E., Yamazaki, K. & Seymour, G. J. (2002) Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 17-34.
- Gmur, R., McNabb, H., van Steenberg, 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**, 116-120.
- Gonzalo, J. A., Qiu, Y., Lora, J. M., Al-Garawi, A., Villeval, J. L., Boyce, J. A., Martinez, A. C., Marquez, G., Goya, I., Hamid, Q., Fraser, C. C., Picarella, D., Cote-Sierra, J., Hodge, M. R., Gutierrez-Ramos, J. C., Kolbeck, R. & Coyle, A. J. (2007) Coordinated involvement of mast cells and T cells in allergic mucosal inflammation: critical role of the CC chemokine ligand 1:CCR8 axis. *J Immunol* **179**, 1740-1750.
- Haraszthy, V. I., Hariharan, G., Tinoco, E. M., Cortelli, J. R., Lally, E. T., Davis, E. & Zambon, J. J. (2000) Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol* **71**, 912-922.

- Henderson, B., Wilson, M., Sharp, L. & Ward, J. M. (2002) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol* **51**, 1013-1020.
- 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**, 1164-1170.
- Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ito, H., Nakamura, T., Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S. (2007) Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* **204**, 2803-2812.
- Hjelmstrom, P. (2001) Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines. *J Leukoc Biol* **69**, 331-339.
- Hjelmstrom, P., Fjell, J., Nakagawa, T., Sacca, R., Cuff, C. A. & Ruddle, N. H. (2000) Lymphoid tissue homing chemokines are expressed in chronic inflammation. *Am J Pathol* **156**, 1133-1138.
- Jentsch, H., Cachovan, G., Guentsch, A., Eickholz, P., Pfister, W. & Eick, S. (2012) Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. *Clin Oral Investig* **16**, 1589-1597.
- Kabashima, H., Yoneda, M., Nagata, K., Hirofuji, T. & Maeda, K. (2002) The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. *Cytokine* **20**, 70-77.
- 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. *Infect Immun* **69**, 5375-5384.
- Kikkert, R., Laine, M. L., Aarden, L. A. & van Winkelhoff, A. J. (2007) Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **22**, 145-151.

- Kikuchi, H., Fujise, O., Miura, M., Tanaka, A., Hisano, K., Haraguchi, A., Hamachi, T. & Maeda, K. (2012) Serotype-dependent expression patterns of stabilized lipopolysaccharide aggregates in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains. *Microbiol Immunol* **56**, 680-691.
- Kochi, Y., Suzuki, A. & Yamamoto, K. (2014) Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review. *Biochem Biophys Res Commun* **452**, 254-262.
- Kuwabara, T., Ishikawa, F., Yasuda, T., Aritomi, K., Nakano, H., Tanaka, Y., Okada, Y., Lipp, M. & Kakiuchi, T. (2009) CCR7 ligands are required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis through generating IL-23-dependent Th17 cells. *J Immunol* **183**, 2513-2521.
- Li, B. & Greene, M. I. (2008) Special regulatory T-cell review: FOXP3 biochemistry in regulatory T cells-how diverse signals regulate suppression. *Immunology* **123**, 17-19.
- Lim, H. W., Lee, J., Hillsamer, P. & Kim, C. H. (2008) Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* **180**, 122-129.
- Listgarten, M. A. (1986) A perspective on periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol* **13**, 175-181.
- Loetscher, P., Uguccioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C. & Dayer, J. M. (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**, 344-345.
- Miyagaki, T., Sugaya, M., Fujita, H., Ohmatsu, H., Kakinuma, T., Kadono, T., Tamaki, K. & Sato, S. (2010) Eotaxins and CCR3 interaction regulates the Th2 environment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* **130**, 2304-2311.
- Moschovakis, G. L. & Forster, R. (2012) Multifaceted activities of CCR7 regulate T-cell homeostasis in health and disease. *Eur J Immunol* **42**, 1949-1955.
- Nowotny, A., Behling, U. H., Hammond, B., Lai, C. H., Listgarten, M., Pham, P. H. & Sanavi, F. (1982) Release of toxic microvesicles by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **37**, 151-154.

- Offenbacher, S. (1996) Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* **1**, 821-878.
- Page, R. C., Sims, T. J., Engel, L. D., Moncla, B. J., Bainbridge, B., Stray, J. & Darveau, R. P. (1991) The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infect Immun* **59**, 3451-3462.
- Paju, S., Carlson, P., Jousimies-Somer, H. & Asikainen, S. (2000) Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *J Clin Microbiol* **38**, 79-84.
- Perros, F., Hoogsteden, H. C., Coyle, A. J., Lambrecht, B. N. & Hammad, H. (2009) Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy* **64**, 995-1002.
- Proudfoot, A. E., Power, C. A., Hoogewerf, A. J., Montjovent, M. O., Borlat, F., Offord, R. E. & Wells, T. N. (1996) Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* **271**, 2599-2603.
- Ren, Y., Yang, B., Yin, Y., Leng, X., Jiang, Y., Zhang, L., Li, Y., Li, X., Zhang, F., He, W., Zhang, X. & Cao, X. (2014) Aberrant CD200/CD200R1 expression and its potential role in Th17 cell differentiation, chemotaxis and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **53**, 1-10. [Early view article in press]
- Repeke, C. E., Ferreira, S. B., Jr., Vieira, A. E., Silveira, E. M., Avila-Campos, M. J., da Silva, J. S., Santos, C. F., Campanelli, A. P., Trombone, A. P. & Garlet, G. P. (2011) Dose-response met-RANTES treatment of experimental periodontitis: a narrow edge between the disease severity attenuation and infection control. *PLoS One* **6**, e22526.
- Roman-Torres, C. V., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Franco, G. C., Dos Santos, J. G., Corraini, P., Holzhausen, M., Diniz, M. G., Gomez, R. S. & Cortelli, J. R.

- (2010) Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Arch Oral Biol* **55**, 242-248.
- Rosen, G., Nisimov, I., Helcer, M. & Sela, M. N. (2003) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b lipopolysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun* **71**, 3652-3656.
- Rossi, D. & Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-242.
- Sakellari, D., Katsikari, A., Slini, T., Ioannidis, I., Konstantinidis, A. & Arsenakis, M. (2011) Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *J Clin Periodontol* **38**, 108-114.
- Salvi, G. E. & Lang, N. P. (2005) Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **32** 108-129.
- Schacher, B., Baron, F., Ludwig, B., Valesky, E., Noack, B. & Eickholz, P. (2006) Periodontal therapy in siblings with Papillon-Lefevre syndrome and tinea capitis: a report of two cases. *J Clin Periodontol* **33**, 829-836.
- Schacher, B., Baron, F., Rossberg, M., Wohlfeil, M., Arndt, R. & Eickholz, P. (2007) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol* **34**, 566-573.
- Schroeder, H. E. & Graf-de Beer, M. (1976) Stereologic analysis of chronic lymphoid cell infiltrates in human gingiva. *Arch Oral Biol* **21**, 527-537.
- Shadidi, K. R., Aarvak, T., Henriksen, J. E., Natvig, J. B. & Thompson, K. M. (2003) The chemokines CCL5, CCL2 and CXCL12 play significant roles in the migration of Th1 cells into rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* **57**, 192-198.
- 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**, 455-458.

- Silva, T. A., Garlet, G. P., Fukada, S. Y., Silva, J. S. & Cunha, F. Q. (2007) Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* **86**, 306-319.
- Subasinghe, N. L., Lanter, J., Markotan, T., Opas, E., McKenney, S., Crysler, C., Hou, C., O'Neill, J., Johnson, D. & Sui, Z. (2013) A novel series of N-(azetidin-3-yl)-2-(heteroaryl-amino)acetamide CCR2 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **23**, 1063-1069.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G. & Glimcher, L. H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669.
- Takahashi, T., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Shibuya, N., Moro, I. & Koga, T. (1991) Murine macrophage interleukin-1 release by capsular-like serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **59**, 18-23.
- van der Reijden, W. A., Bosch-Tijhof, C. J., van der Velden, U. & van Winkelhoff, A. J. (2008) Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol* **35**, 487-492.
- 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. *J Clin Periodontol* **32**, 383-389.
- 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. *Infect Disord Drug Targets* **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.

- Wang, C., Kang, S. G., Lee, J., Sun, Z. & Kim, C. H. (2009) The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* **2**, 173-183.
- Xia, M., Hu, S., Fu, Y., Jin, W., Yi, Q., Matsui, Y., Yang, J., McDowell, M. A., Sarkar, S., Kalia, V. & Xiong, N. (2014) CCR10 regulates balanced maintenance and function of resident regulatory and effector T cells to promote immune homeostasis in the skin. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 634-644 e610.
- 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**, 4589-4594.
- Yang, H. W., Huang, Y. F., Chan, Y. & Chou, M. Y. (2005) Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* **113**, 28-33.
- Zheng, W. & Flavell, R. A. (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-596.

11. ANEXOS

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 genéticos.

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

