



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

**LINFOCITOS T COLABORADORES (TH) 9 Y TH22 Y SU ASOCIACIÓN CON
*AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS***

Álvaro Gustavo Benítez Cravero

**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

TUTOR EXPERTO

Prof. Dra. Paola Carvajal Pavez

**Adscrito a Proyectos FONDECYT 11100298 y 1140904
Santiago - Chile
2014**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por darme todo lo que estuvo a su alcance y hacer hasta lo imposible porque nunca me faltara nada, por su preocupación a veces desmedida, pero al fin y al cabo, de padres. Faltan palabras para agradecerles, a pesar de lo poco expresivo que soy, espero haberles hecho saber lo mucho que los quiero.

A mis hermanos, por tenerme paciencia y entregarme cariño y compañía, desde mi infancia hasta el día de hoy.

A mis amigos de la Universidad que pasaron a ser de la vida, nombrarlos está demás ya que creo que de una u otra forma les he hecho saber el cariño que les tengo, la dicha de tenerlos y el lugar que ocupan en mi corazón.

A los amigos de toda la vida, que pese a vernos y hablarnos poco, el cariño sigue intacto por contribuir a ser quien soy.

A mis tutores, Rolando, Samanta y Jaime, gracias por la paciencia vertida desde el año 2011, ya que pese a los reiterados errores cometidos, siempre existieron las palabras de aliento e incentivo a la superación, que pese a mi relajo me comprendieron en los momentos que apremiaba el tiempo, etc. Gracias infinitas por el ambiente humano dentro del equipo de trabajo y por aportar de una u otra forma con mi aprendizaje.

Al equipo del Laboratorio de Biología Periodontal, que los viejos, los nuevos y los que vendrán sigan contribuyendo al conocimiento.

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.	iv
II. ABREVIACIONES.	v
III. RESUMEN.	vi
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1
1.2 <i>Respuesta inmune durante las periodontitis</i>	3
1.3 <i>Linfocitos Th9 y Th22</i>	4
1.4 <i>Planteamiento del problema</i>	6
2. HIPÓTESIS.	8
3. OBJETIVO GENERAL.	9
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	9
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	10
5.1 <i>Selección de los sujetos y obtención de la muestra biológica</i>	10
5.2 <i>Cultivo bacteriano</i>	10
5.3 <i>Purificación del LPS bacteriano para la estimulación celular</i>	11
5.4 <i>Purificación de monocitos y linfocitos TCD4⁺ naïve</i>	11
5.5 <i>Diferenciación y estimulación de células dendríticas y activación de linfocitos TCD4⁺ naïve</i>	12
5.6 <i>Análisis de fenotipo celular</i>	13
5.7 <i>Purificación del RNA mensajero citoplasmático total</i>	13

5.8 Síntesis de la primera cadena de cDNA	14
5.9 Expresión de factores de transcripción y citoquinas mediante RT-PCR en tiempo real	14
5.10 Secreción de citoquinas mediante ELISA	15
5.11 Análisis de los datos	15
6. RESULTADOS.	17
6.1 Purificación de monocitos	17
6.2 Activación de las células dendríticas.....	17
6.3 Purificación de linfocitos TCD4 ⁺ naïve	18
6.4 Activación de linfocitos TCD4 ⁺ naïve	19
6.5 Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	20
6.6 Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	21
6.7 Secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	22
6.8 Expresión de citoquinas en linfocitos TCD4 ⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	23
6.9 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4 ⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	24
6.10 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4 ⁺ naïve activados con LPS purificado de los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	25
6.11 Expresión de factores de transcripción en linfocitos TCD4 ⁺ naïve activados	

.....	27
6.12 <i>Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción con los niveles de secreción de citoquinas</i>	28
7. DISCUSIÓN	29
8. CONCLUSIONES	36
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
10. ANEXOS	50
10.1 <i>Consentimiento Informado</i>	50
10.2 <i>Ficha Clínica</i>	54
10.3 <i>Trabajos presentados en congresos nacionales</i>	63
10.4 <i>Resúmenes aceptados en congresos internacionales</i>	64

I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1	17
Figura 2	18
Figura 3	19
Figura 4	20
Figura 5	21
Figura 6	22
Figura 7	23
Figura 8	24
Figura 9	25
Figura 10	26
Figura 11	27
Tabla 1	15
Tabla 2	28

II. ABREVIACIONES.

LPS: Lipopolisacárido (**L**ipopolysaccharide).

TLR: Receptor tipo Toll (**T**oll **L**ike **R**eceptor).

TCD4⁺: Linfocito TCD4⁺. (**CD4**⁺ **T** lymphocyte).

CD: Grupo de diferenciación (**C**luster of **d**ifferentiation).

Th: Linfocito T colaborador (**T** **h**elper).

Treg: Linfocito T regulador (**T** **r**egulatory).

IL: Interleuquina (**I**nterleukin).

IFN: Interferón (**I**nterferon).

TNF: Factor de necrosis tumoral (**T**umour **N**ecrosis **F**actor).

RANKL: Ligando del receptor nuclear *kappa* B (**R**eceptor **A**ctivator of **N**uclear Factor **k**appa B **L**igand).

TGF: Factor de crecimiento tumoral (**T**umoral **G**rowth **F**actor).

CCL: ligados de quimioquinas CC (**C**hemokine **C**-C **L**igand)

CCR: receptores de quimioquinas CC (**C**hemokine **C**-C **R**eceptor)

PBS: Amortiguador de fosfato salino (**P**hosphate **B**uffer **S**aline).

PBMCs: Células periféricas mononucleares (**P**eripheral **B**lood **M**ononuclear **C**ells).

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (**G**ranulocytes and **M**onocytes **C**olony **S**timulating **F**actor).

MOI: Multiplicidad infectante incremental (**M**ultiplicity **o**f **I**nfection).

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptas inversa (**R**reverse **t**ranscription **p**olymerase **c**hain **r**eaction).

ELISA: Ensayo de inmuno absorción enzimática (**E**nzymed-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay).

NF-κB: Factor nuclear κB (**N**uclear **f**actor **κB**).

III. RESUMEN.

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa. La biopelícula patogénica subgingival, constituida principalmente por bacterias anaerobias Gram-negativas, es el factor etiológico responsable del inicio y progresión de las periodontitis. Esta biopelícula está compuesta por una amplia variedad de bacterias, entre ellas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sobre la base de la antigenicidad del O-polisacárido componente del LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se describen distintos serotipos bacterianos y se ha propuesto que entre ellos existe una virulencia y patogenicidad distinta.

Las bacterias periodonto-patógenas son reconocidas por las células dendríticas periodontales. Una vez activadas, las células dendríticas expresan moléculas co-estimuladoras y liberan citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas, determinantes de la presentación antigénica a los linfocitos TCD4⁺. Durante esta presentación antigénica, las células dendríticas inducen la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4⁺ hacia los distintos fenotipos efectores, caracterizados por la expresión y secreción de un patrón específico de citoquinas que determina el tipo de respuesta inmune en el hospedero y, finalmente, el fenotipo clínico de las periodontitis.

En este estudio, se evaluó la respuesta de células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. Ante el serotipo b se detectaron mayores niveles de expresión y secreción de IL-6 y TNF- α en comparación a las células dendríticas estimuladas con los serotipos a o c. Adicionalmente, se analizó la activación de los linfocitos TCD4⁺ *naïve* ante células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* y se cuantificaron los niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* y de expresión y secreción de las citoquinas IL-9 e IL-22. En los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detectaron mayores niveles de

expresión del factor de transcripción *AhR* y de producción de las citoquinas IL-22, característicos de un patrón de respuesta inmune tipo Th22 (osteo-destructivo), en comparación a las mismas células estimuladas con los serotipos a o c.

En conjunto, estos datos permiten establecer que: (1) existe un mayor potencial inmuno-estimulador del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en las células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ *naïve* y (2) los linfocitos Th22 podrían cumplir un rol importante en la etiopatogenia de las periodontitis.

1. INTRODUCCIÓN.

Las periodontitis son un conjunto de patologías de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa producidas por la biopelícula subgingival que coloniza el surco gingivodentario (Offenbacher, 1996). Se caracterizan por la destrucción de la inserción periodontal, conformada por el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar y, en los estados más severos de la enfermedad, pueden causar la pérdida de los dientes (Offenbacher, 1996).

La biopelícula patogénica subgingival, constituida principalmente por bacterias anaerobias Gram-negativas, es el factor etiológico responsable del inicio y progresión de las periodontitis. Esta biopelícula está compuesta por una amplia variedad de bacterias, entre ellas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Clínicamente, *A. actinomycetemcomitans* se asocia tanto a la etiología de las periodontitis crónicas y agresivas (Genco y cols., 1986; Asikainen y cols., 1991) como al desarrollo de trastornos cardiovasculares, aterosclerosis, neumonías, parto prematuro y bajo peso neonatal (Asikainen y cols., 1991; López y cols., 2002; López y cols., 2005; Novak y cols., 2008; Zhang y cols., 2010; Hyvärinen y cols., 2012).

1.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es un cocobacilo Gram-negativo, capnofílico, no móvil, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Suzuki y cols., 2001). *A. actinomycetemcomitans* produce distintos factores de virulencia, entre ellos: leucotoxina, fimbria, toxina distensora citoletal, adhesinas epiteliales, proteínas de adhesión e invasión celular y lipopolisacárido (LPS), determinante clave del tipo de inmunidad inducida en los tejidos infectados del hospedero (Perry y cols., 1996a, Perry y cols., 1996b; Kaplan y cols., 2001; Díaz y cols., 2012). El LPS es una molécula ubicada en la membrana externa de bacterias Gram-negativas, cubre cerca del 75% de su superficie y es esencial para la mantención de la integridad bacteriana y el anclaje a proteínas de adhesión (Perry y cols., 1996a, Perry y cols., 1996b; Kaplan y cols., 2001; Reyes y cols., 2009). Está

conformado por el lípido A, un esqueleto central de oligosacáridos y un O-polisacárido, principal antígeno que estimula la respuesta inmune en el hospedero (Caroff & Karibian, 2003).

Sobre la base de la antigenicidad del O-polisacárido, se describen seis serotipos bacterianos de *A. actinomycetemcomitans*: a, b, c, d, e y f (King & Tatum, 1962; Zambon y cols., 1983; Page y cols., 1991; Gmür y cols., 1993; Perry y cols., 1996a, Perry y cols., 1996b; Kaplan y cols., 2001). En efecto, se ha detectado que los serotipos inducen una respuesta inmune diferente en distintas células del hospedero y esta respuesta depende de la estructura tridimensional y composición molecular de cada O-polisacárido, lo que define a cada serotipo (Takahashi y cols., 1991; Yamaguchi y cols., 1995; Shimada y cols., 2008; Díaz-Zúñiga y cols., 2014a; Díaz-Zúñiga y cols., 2014b).

En latino-americanos, europeos, africanos y asiáticos, los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans* son los detectados con mayor frecuencia (Kim y cols., 2009; Chen y cols., 2010; Roman-Torres y cols., 2010; Sakellari y cols., 2011; Cortelli y cols., 2012), variando en prevalencia dependiendo del estado clínico periodontal del sujeto. El serotipo b es aislado con mayor frecuencia en lesiones periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica severa y agresiva (Paju y cols., 2000; Roman-Torres y cols., 2010; Cortelli y cols., 2012) e induce mayor intensidad de respuesta cuando la producción de citoquinas es evaluada en células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ *naïve in vitro* (Díaz-Zúñiga y cols., 2014a; Díaz-Zúñiga y cols., 2014b).

En conjunto, la mayor frecuencia de detección del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en las formas más severas de la periodontitis y la mayor inmunogenicidad detectada ante células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ *naïve*, nos permite especular que, durante las periodontitis, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* es el determinante clave de la respuesta inmune inducida en el hospedero y por lo tanto, cuando está presente en un sitio periodontal infectado, sería determinante clave del inicio, progresión y severidad de la enfermedad.

Aunque *A. actinomycetemcomitans* puede causar daño directo a los tejidos periodontales durante las periodontitis, la respuesta inmune del hospedero inducida ante sus antígenos es el principal determinante de la destrucción de los tejidos de inserción periodontal.

1.2 Respuesta inmune durante las periodontitis

Durante las periodontitis, las bacterias periodonto-patógenas son reconocidas por las células dendríticas periodontales mediante los receptores tipo Toll (del inglés *Toll-like receptor*, TLR) 2 y 4. Estos receptores interactúan con los patrones moleculares conservados asociados a patógenos favoreciendo la fagocitosis bacteriana (Hajishengallis y cols., 2004; Kikkert y cols., 2007; Díaz-Zúñiga y cols., 2015). Así, las células dendríticas fagocitan las bacterias y procesan sus antígenos para presentarlos a los linfocitos T. Durante esta presentación antigénica, las células dendríticas producen citoquinas, las que cumplen un rol fundamental en la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4⁺ *naïve* (Brightbill y cols., 1999) hacia linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th) 1, Th2, Th17 o T regulador (Treg), determinando el tipo de respuesta inmune en el hospedero y, finalmente, el fenotipo clínico de la enfermedad.

En efecto, los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg secretan distintos patrones de citoquinas que determinan su función. El fenotipo Th1, determinado por el factor de transcripción *T-bet*, secreta interleuquina (IL)-1 β , IL-12, interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α y TNF- β , responsables de una respuesta pro-inflamatoria; el fenotipo Th2, determinado por el factor de transcripción *GATA3*, secreta IL-4, IL-5 e IL-13 y se asocia con una respuesta inmuno-moduladora (Abbas y cols., 1996; Jankovic y cols., 2001; Murphy & Reiner, 2002; Reiner, 2007; Seder & Paul, 1994); el fenotipo Th17, determinado por el factor de transcripción *RORC2*, secreta IL-6, IL-17, IL-21, IL-23 y RANKL y se considera un fenotipo pro-inflamatorio y osteo-destructivo (Harrington y cols., 2006; Stockinger & Veldhoen, 2007); y el fenotipo Treg, determinado por el factor de transcripción *Foxp3*, secreta IL-10 y factor de crecimiento tumoral (TGF)- β 1 y posee un rol inmuno-regulador (Bluestone & Abbas, 2003; Reiner, 2007; Appay y cols., 2008; Vernal & Garcia-

Sanz, 2008; Weaver & Hatton, 2009). En términos generales, los linfocitos Th1 condicionarán un ambiente inflamatorio y los linfocitos Th17 determinarán la reabsorción del hueso alveolar, característica principal de la enfermedad (Taubman & Kawai, 2001; Walsh & Choi, 2003; Brand y cols., 2005; Vernal y cols., 2005; Takahashi y cols., 2005; Ikeuchi y cols., 2005; Vernal y cols., 2006; Sato y cols., 2006; Kramer & Gaffen, 2007; Sa y cols., 2007; Ohyama y cols., 2009).

Recientemente, se han descrito 2 nuevos fenotipos de linfocitos T: los linfocitos Th9 y Th22. Los linfocitos Th9 se diferencian en presencia de TGF- β 1 e IL-4, que activan al factor de transcripción *Spi.B* (Chang y cols., 2010; Takami y cols., 2012; Baba y cols., 2012; Goswami & Kaplan., 2012; Leng y cols., 2012) y los linfocitos Th22 se diferencian en presencia de TNF- α e IL-6, que activan al factor de transcripción *AhR* (Ikeuchi y cols., 2005; Honda, 2012; Kim y cols., 2012; Baba y cols., 2012).

1.3 Linfocitos Th9 y Th22

Los linfocitos Th9 se han detectado en enfermedades alérgicas, autoinmunes y en patologías neoplásicas (Kaplan, 2013), se caracterizan por secretar IL-9, ligandos de quimioquinas CC (CCL)17 y CCL22 (Chang y cols., 2010) y se asocian a funciones inmuno-moduladoras y pro-inflamatorias (Leng y cols., 2012). Cumplen un rol pro-inflamatorio al inducir la secreción de IL-8 e IL-13 en células musculares lisas (Goswami & Kaplan, 2011), la expresión y secreción de IL-9 en células epiteliales intestinales (Gerlach y cols., 2014), la expresión de receptores de quimioquinas específicos para linfocitos Th1 (CXCR3), Th2 (CCR3), Th17 y Treg (CCR6) (Kara y cols., 2013), la proliferación y diferenciación de linfocitos Th17 en modelos experimentales de encefalomiелitis autoinmune (Goswami & Kaplan, 2011) y el incremento de la producción de IL-17 en pacientes con psoriasis (Singh y cols., 2013, Schlapbach y cols., 2014). Además, los linfocitos Th9 tendrían un rol anti-tumoral al inducir la migración de células dendríticas y linfocitos TCD8⁺ mediante la expresión de CCL20 en células cancerosas (Lu y cols., 2012), un rol inmuno-modulador en artritis reumatoide al inducir el incremento de los niveles de IL-9 (Khan y cols., 2009) y un rol inmuno-supresor, en pacientes con linfoma no Hodgkin de células B, al disminuir la función de los

linfocitos Treg, la diferenciación de linfocitos Th1 y la maduración de células dendríticas (Feng y cols., 2011). En este contexto, los linfocitos Th9 pueden inducir la inflamación, proteger al hospedero de las enfermedades auto-inmunes o mediar la destrucción tisular; sin embargo, no existen estudios que determinen su rol en las enfermedades osteo-destructivas, tal como las periodontitis.

Los linfocitos Th22 se han detectado en pacientes con artritis reumatoides, lupus eritematoso sistémico, síndrome mielodisplástico, trombocitopenia inmune y enfermedad de Crohn (Brand y cols., 2005; Ikeuchi y cols., 2005; Truchetet y cols., 2011; Hu y cols., 2012; Shao y cols., 2012; Michalak-Stoma y cols., 2013; Sugita y cols., 2013; Yang y cols., 2013) y se caracterizan por secretar IL-13, IL-22 e IL-26 y expresar CCR4 y CCR10 en su superficie (Duhon y cols., 2009; Akdis y cols., 2012; Fujita, 2013). Cumplen un rol anti-inflamatorio al inducir el incremento de IL-22 durante la infección viral por VIH (Missé y cols., 2007) o bacterianas en células epiteliales bronquiales humanas (Aujla y cols., 2008; Scriba y cols., 2008; Zheng y cols., 2008; Niebuhr y cols., 2010) y un rol pro-inflamatorio al inducir el incremento en la expresión de IL-8 y TNF- α en células epiteliales intestinales (Brand y cols., 2005; Fujita y cols., 2009; Akdis y cols., 2012; Michalak-Stoma y cols., 2013; Sugita y cols., 2013). Además, se describe un rol osteo-destructivo en pacientes con artritis reumatoide (Ikeuchi y cols., 2005; Kim y cols., 2012) al incrementar la producción de TNF- α , IL-1- β , IL-6 y RANKL en los fibroblastos sinoviales, determinando la diferenciación y activación de osteoclastos, células determinantes de la reabsorción del tejido óseo (Kim y cols., 2012). En este contexto, los linfocitos Th22 podrían estar asociados indirectamente con la reabsorción ósea durante las enfermedades osteo-destructivas, como la artritis reumatoide, aunque su rol en la patogenia de las periodontitis aún no se ha descrito.

Finalmente, un estudio reciente ha descrito la presencia de elevados niveles IL-9 e IL-22 en lesiones periapicales inactivas en comparación con lesiones activas, sugiriendo que una respuesta tipo Th9/Th22 podría contribuir a la estabilidad de los tejidos periapicales, planteando un rol inmuno-modulador para ambos fenotipos linfocitarios (Aranha y cols., 2013)

1.4 Planteamiento del problema

En las periodontitis, los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg secretan distintos patrones de citoquinas que determinan su función. En biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica se detectan elevados niveles de citoquinas y factores de transcripción asociados a los linfocitos Th1 y Th17 y su detección se correlaciona con la severidad de las lesiones, en comparación a biopsias de encía de individuos sanos donde se detectan predominantemente Th2 y Treg (Vernal y cols., 2005; Dutzan y cols., 2009; Vernal y cols., 2004; Vernal y cols., 2006). Además, los linfocitos Th1 y Th17 se describen en artritis reumatoide, psoriasis y otras enfermedades inmuno-inflamatorias. Recientemente, se definió que la presencia de los linfocitos Th9 en la psoriasis es un determinante clave de la inflamación local y en artritis reumatoide, mientras la presencia de los linfocitos Th9 cumple un rol inmuno-modulador, la presencia de los linfocitos Th22 incrementa la producción de RANKL en los fibroblastos sinoviales, induciendo la activación y maduración de los pre-osteoclastos (Wolk y cols., 2009; Sa y cols., 2007; Goswami & Kaplan, 2011; Ma y cols., 2010; Kaplan, 2013; Ikeuchi y cols., 2005; Kim y cols., 2012). En pacientes con artritis reumatoide, los linfocitos Th9 cumplirían un rol inmuno-modulador y los linfocitos Th22 un rol osteo- destructor. En este contexto, las periodontitis y la artritis reumatoide se caracterizan por la destrucción de los tejidos y por tanto, comparten las mismas vías de activación de la respuesta inmuno-inflamatoria y osteo-destructiva, con una etiología y manifestación clínica diferente.

Durante las periodontitis, *A. actinomycetemcomitans* es una bacteria que se asocia ampliamente a su etiología (Zambon, 1996; Socransky y cols., 1998; Socransky & Haffajee, 2005; Gajardo y cols., 2005; d'Empaire y cols., 2006; Lafaurie y cols., 2007). Recientemente, cuando células dendríticas humanas diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica fueron estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, se detectó que el serotipo b indujo mayor expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-12, IL-23, IFN- γ , TNF- α en comparación a los serotipos a o c (Díaz-Zúñiga y cols., 2014a). Usando el mismo modelo experimental, una respuesta Th distinta fue descrita en linfocitos T

estimulados, en particular, un fenotipo tanto Th1 como Th17 se indujo en presencia del serotipo b, caracterizándose por un incremento en los niveles de producción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α y la molécula RANKL (Díaz-Zúñiga y cols., 2014b). Además, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión y secreción de las distintas moléculas en presencia de los serotipos a o c, tanto con la bacteria *ad integrum* como su LPS purificado.

Estos datos nos permiten establecer el potencial rol del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en la definición del tipo de linfocito Th predominante en las lesiones periodontales luego de la presentación antigénica. Así, sobre la base de los datos presentados podemos especular que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induciría la diferenciación predominantemente de linfocitos Th22, determinando un posible rol pro-inflamatorio y osteo-destructor.

2. HIPÓTESIS.

Los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* poseen una inmunogenicidad diferente e inducen en los linfocitos TCD4⁺ naïve un patrón de respuesta distinta, en particular, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce mayores niveles de producción de citoquinas asociadas al fenotipo Th22 y menores niveles de producción de citoquinas asociadas al fenotipo Th9 en comparación a los serotipos a o c.

3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los niveles de expresión y secreción de los factores de transcripción y citoquinas asociadas a los fenotipos Th9 y Th22 en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Cuantificar los niveles de expresión y secreción de IL-4, IL-6, TNF- α y TGF- β 1 en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o su LPS purificado.
2. Cuantificar los niveles de expresión y secreción de IL-9 e IL-22 y los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o su LPS purificado.
3. Asociar los niveles de expresión de IL-9 con *Spi.B* e IL-22 con *AhR*, en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o su LPS purificado.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Selección de los sujetos y obtención de la muestra biológica

Muestras de sangre periférica se obtuvieron de 10 sujetos donantes sanos seleccionados por el método no probabilístico de casos consecutivos en el banco de sangre del Hospital del Salvador, perteneciente al Servicio de Salud Metropolitano Oriente. A partir de las leuco-reducciones obtenidas durante el proceso de plaquetoféresis, los monocitos y linfocitos TCD4⁺ *naïve* circulantes periféricos se purificaron tal como se describe en detalle más adelante. El protocolo de investigación se explicó a todos los participantes del estudio, quienes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 1).

5.2 Cultivo bacteriano

Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC[®] 43717[™] (serotipo a), ATCC[®] 43718[™] (serotipo b) y ATCC[®] 43719[™] (serotipo c) se sembraron en medio de cultivo agar infusión cerebro corazón (Oxoid LTD, Hampshire, England) e incubaron a 37°C en condiciones de capnofilia (O₂ 8% y CO₂ 12%) usando generadores CampyGen[™] (Oxoid Ltd). Para obtener un número similar de microorganismos de las distintas cepas de *A. actinomycetemcomitans* para la estimulación celular se realizaron curvas de crecimiento bacteriano, las cuales se obtuvieron en infusión de medio cerebro-corazón (BD, Le Pont de Claix, France), suplementado con 5 mg/mL de hemina y 1 mg/mL de menadiona. Muestras bacterianas se inocularon con 10 mL de medio hasta llegar a una densidad óptica de 0,05 medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm (Spectronic 20; Bausch & Lomb, Rochester, NY, USA). Las lecturas de espectrofotometría se tomaron en diferentes puntos de tiempo y el experimento se detuvo cuando las bacterias llegaron a la fase de crecimiento estacionario. En cada medición de densidad óptica, se tomó una muestra y realizó una dilución en serie (log₁₀) con amortiguador de fosfato salino (PBS), luego 100 µL de cada dilución se sembró sobre medio no selectivo e incubó a 37°C en condiciones

anaeróbicas. Después de 3 a 7 días, el número de colonias bacterianas contadas a partir de cada muestra se registró de acuerdo a la lectura de la densidad óptica correspondiente, obteniendo el número de unidades formadoras de colonias.

5.3 Purificación del LPS bacteriano para la estimulación celular

El LPS de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* se aisló usando una versión modificada del protocolo de TRI-reagent. Las cepas bacterianas se cultivaron en infusión de medio cerebro-corazón (BD) hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario. Luego de centrifugar a 6.000 xg a 4°C durante 4 min, el *pellet* se lavó tres veces con PBS e incubó en 3 ml de una mezcla de TRIzol[®] Reagent (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y cloroformo (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), en una proporción de 5:1 respectivamente, a temperatura ambiente durante 30 min. La fase acuosa se recuperó y liofilizó durante toda la noche.

La purificación del LPS se realizó usando 0,375 M de MgCl₂ en etanol 95% y se lavó 5 veces con una mezcla de etanol 95% con 1% de reactivo de Folch (cloroformo y MeOH en una proporción de 2:1). El LPS se visualizó mediante electroforesis en gel de Tris-glicina de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) con un 14% de gel de poliácridamida y tinción de ácido peryódico de plata, siendo cuantificado mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico malondialdehído.

5.4 Purificación de monocitos y linfocitos TCD4⁺ naïve

Usando una gradiente de Ficoll[®], las células periféricas mononucleares (del inglés *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) se aislaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Ficoll-Paque Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Los monocitos se purificaron desde una fracción de las PBMCs mediante separación inmuno-magnética (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany). Las PBMCs se lavaron 2 veces en PBS y posteriormente incubaron 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 se resuspendieron en PBS y los monocitos se aislaron usando columnas de separación MS montadas en un campo magnético.

Posteriormente los linfocitos TCD4⁺ *naïve* se purificaron utilizando un *kit* de depleción celular específico, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MACS; Miltenyi Biotec). Para esto, una fracción de las PBMCs se incubó con los 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 se resuspendieron en PBS y los linfocitos TCD4⁺ *naïve* se aislaron usando columnas de depleción LD montadas en un campo magnético.

La fracción de células CD14⁺ y CD4⁺ purificadas corresponden a los monocitos y linfocitos, respectivamente, los que se contaron utilizando una cámara de Neubauer[®]. Su fenotipo se confirmó usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

5.5 Diferenciación y estimulación de células dendríticas y activación de linfocitos TCD4⁺ *naïve*

Los monocitos purificados se sometieron inmediatamente a un protocolo estandarizado de diferenciación *in vitro* a células dendríticas. Los monocitos CD14⁺ se cultivaron durante 6 días a una concentración de $0,7 \times 10^6$ células/mL en 3mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp) y 20 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y la citoquina IL-4 (R&D, Minneapolis, MN USA).

Las células dendríticas diferenciadas se estimularon con las distintas cepas de *A. actinomycetemcomitans* a una multiplicidad infectante incremental (MOI) de 10^{-1} a 10^2 (razón bacterias/células dendríticas) durante 2 días. Como control positivo, células dendríticas se estimularon con 10 ng/mL del LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4 (Fluka, Sigma-Aldrich). Células dendríticas no estimuladas se utilizaron como control negativo. La diferenciación y estimulación de las células

dendríticas se evaluó con anticuerpos específicos mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

Las células dendríticas estimuladas se lavaron 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.

5.6 Análisis de fenotipo celular

La purificación de los monocitos, su diferenciación a células dendríticas y su posterior activación en presencia de 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), anti-CD1a (células dendríticas inmaduras), anti-CD83 (células dendríticas maduras), anti-CD80 (molécula co-estimuladora de la presentación antigénica) y anti-CD86 (molécula co-estimuladora de la presentación antigénica) (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA) y utilizando un equipo FACScan de citometría de flujo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). La purificación de linfocitos TCD4⁺ *naïve* se evaluó usando los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugado con fluorocromos PE o FITC: anti-CD45RA (linfocitos TCD4⁺ *naïve*), anti-CD45RO (linfocitos TCD4⁺ de memoria) y anti-CD14 (monocitos) (BD Biosciences Pharmigen).

5.7 Purificación del RNA mensajero citoplasmático total

Luego de la estimulación, las células se lavaron dos veces en PBS y lisaron en 400 µL de amortiguador de lisis conteniendo Igepal[®] CA-630 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 5 mM de MgCl₂ y 10 mM del vanadyl-ribonucleosidos (VRC) (Gibco Invitrogen). Después de centrifugar a 14.000 xg durante 10 seg, el sobrenadante se digirió con 25 µg/mL de proteinasa K (Roche Ltd, Basel, Switzerland), 1% de SDS y 15 mM de EDTA (Fluka Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C. El RNA citoplasmático total se extrajo con

400 μL de solución fenol:cloroformo:isoamylalcohol 25:24:1 (Fluka Sigma-Aldrich), precipitado a -20°C con 0,3 M de acetato de sodio, 1 mL de etanol 100% y 1 μL de glicógeno (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Roche Ltd), recuperándose por centrifugación a 14.000 $\times\text{g}$ durante 30 min y resuspendiéndose en 30 μL de agua milliQ libre de RNAsas. Para su análisis y cuantificación se utilizaron los equipos anteriormente mencionados.

5.8 Síntesis de la primera cadena de cDNA

A partir de 2 μg de RNA se procedió a la síntesis de la primera cadena de cDNA mediante transcripción reversa, utilizando el *kit* SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Grand Island), almacenándolo a -80°C a una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

5.9 Expresión de factores de transcripción y citoquinas mediante RT-PCR en tiempo real

La expresión de los mRNA de las citoquinas IL-4, IL-6, IL-9, IL-22, TNF- α y TGF- β 1 y de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* se analizaron a partir de 50 ng de cDNA mediante RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos (Tabla 1) y un *kit* SYBR Green[®] (Invitrogen, Grand Island). Utilizando un termociclador en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA) se realizó el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo de 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60° durante 30 segundos. Como control de amplificación se analizaron los niveles de expresión de la subunidad de RNA ribosomal 18S.

Citoquina / Factor transcripción	Partidor <i>Forward</i>	Partidor <i>Reverse</i>
IL-4	5'caccgagttgaccgtaacag	3'gccctgcagaaggtttcc
IL-6	5'gccagctatgaactccttct	3'gaaggcagcaggcaacac
TNF- α	5'cagcctcttctccttctgat	3'gccagagggctgattagaga
TGF- β 1	5'cacgtggagctgtaccagaa	3'cagccggttgctgaggta
IL-9	5'catccttgctctgttttgct	3'cggagagacacaagcagctgg
IL-22	5'accttccttgaccaaactca	3'agcttctctcgtcagacg
<i>Spi.B</i>	5'gcataccccacggagaact	3'cggaagtcttctcctctgatag
<i>AhR</i>	5'caacatcacctacgccagtc	3'ctatgccgcttgaaggat
18S	5'ctcaacacgggaaacctcac	3'cgctccaccaactaagaacg

Tabla 1. Partidores específicos

5.10 Secreción de citoquinas mediante ELISA

A partir de 100 ó 200 μ L del sobrenadante de cultivo celular, la secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- α se cuantificaron en células dendríticas y las citoquinas IL-9 e IL-22 en linfocitos TCD4⁺ *naïve* posterior a la estimulación con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* o su LPS purificado, mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D) y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

5.11 Análisis de los datos

Los datos de citometría de flujo se representaron como histogramas usando el software WinMDi 2.9 (The Scripps Research Inst., La Jolla, CA, USA) y expresaron como porcentaje promedio \pm desviación estándar de células positivas sobre el total. Los niveles de citoquinas evaluados mediante ELISA y RT-PCR en tiempo real se expresaron como concentración promedio \pm desviación estándar.

Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). La normalidad de la distribución de los datos se determinó usando la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias en la expresión de los marcadores de superficie CD1a, CD4, CD14, CD45RA, CD45RO, CD80, CD83 y CD86 se analizaron mediante la prueba χ^2 , los niveles de expresión y secreción de las citoquinas se analizaron utilizando las pruebas ANOVA y de Tukey o las pruebas de Kruskal-Wallis y de Dunn. La asociación de los datos se realizó con una correlación matemática utilizando el coeficiente de correlación de Spearman o de Pearson. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p\text{-value} < 0,05$.

6. RESULTADOS.

6.1 Purificación de monocitos

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

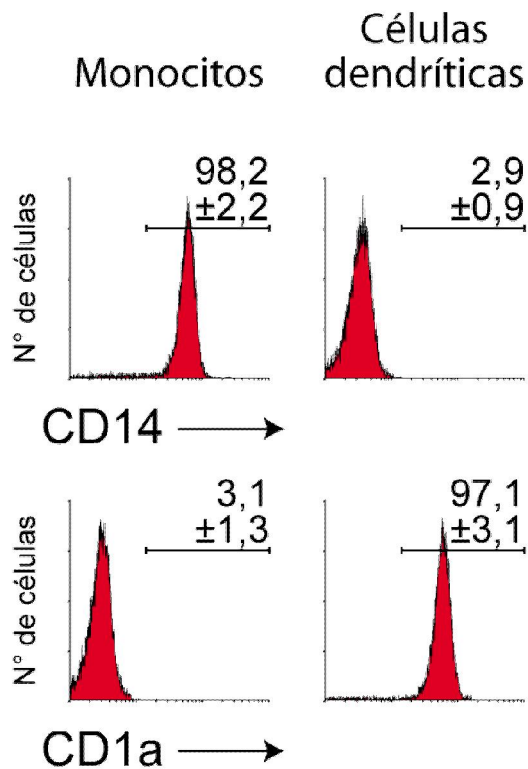


Figura 1. Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas. Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de monocitos (células CD14⁺) a partir de las PBMCs y de su diferenciación a células dendríticas (células CD1a⁺) en presencia de GM-CSF e IL-4.

6.2 Activación de las células dendríticas

Los niveles de activación de las células dendríticas fueron evaluados analizando los niveles de expresión de CD80, CD83 y CD86 mediante citometría de flujo (Figura 2). Un alto porcentaje de células dendríticas activas se observó posterior a la estimulación con los serotipos a, b o c de A.

actinomyetemcomitans, tal como se demuestra por el incremento de los marcadores CD80 (> 95%), CD83 (> 95%) y CD86 (> 94%). No se observaron diferencias estadísticas en los niveles de activación de las células dendríticas ante la estimulación con los distintos serotipos de *A. actinomyetemcomitans* (CD83 $p=0,938$; CD80 $p=0,532$ y CD86 $p=0,933$).

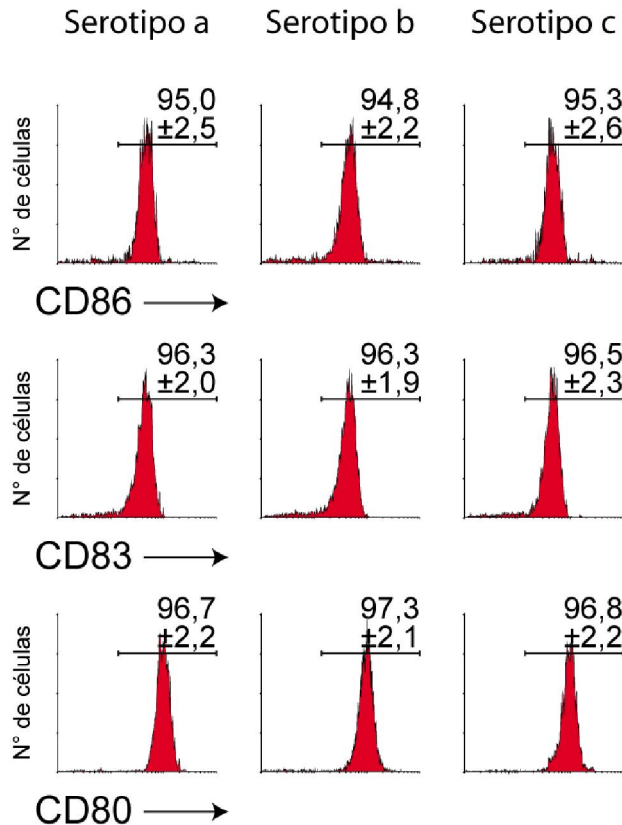


Figura 2. Activación de las células dendríticas ante los serotipos a, b o c de *A. actinomyetemcomitans*. Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de expresión de CD83, CD80 y CD86 luego de la estimulación durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomyetemcomitans* (MOI=2) que evidencian la activación de las células dendríticas.

6.3 Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve

La purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve fue evaluada mediante citometría de flujo (Figura 3). A partir de las PBMCs aisladas de sangre periférica, se obtuvo una población de linfocitos TCD4⁺ naïve de alta pureza, demostrado por los elevados niveles de expresión del marcador específico CD4 y CD45RA para la población TCD4⁺ naïve, (> 98%) y bajos niveles de expresión del marcador CD14 de monocitos (< 0,12%) y del marcador CD45RO para la población TCD4⁺ de memoria.

Linfocitos T CD4⁺ naïve

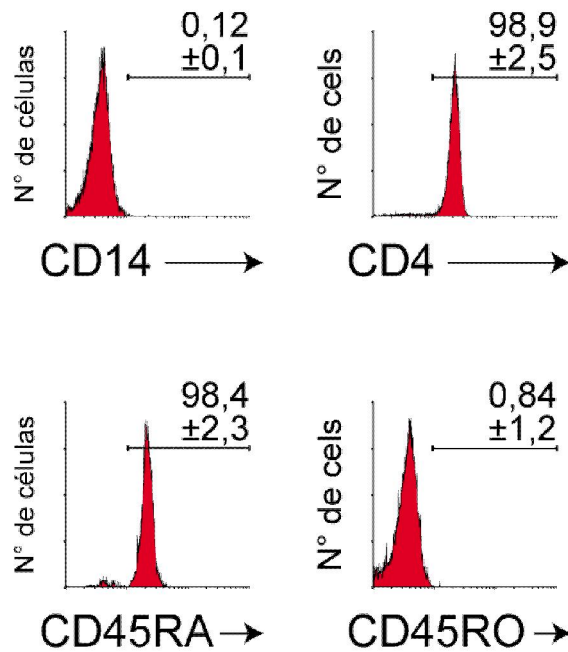


Figura 3. Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve. Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de linfocitos (células CD4⁺) a partir de las PBMCs.

6.4 Activación de linfocitos TCD4⁺ naïve

Los niveles de activación de los linfocitos TCD4⁺ naïve fueron evaluados analizando los niveles de expresión de CD25 α mediante RT-PCR en tiempo real (Figura 4). Elevados niveles de expresión de CD25 α se observaron posterior a la estimulación con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans*, al ser comparados con linfocitos TCD4⁺ naïve no inducidos ($p < 0,05$). No se observaron diferencias estadísticas en los niveles de expresión de CD25 α entre los linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (Figura 4)

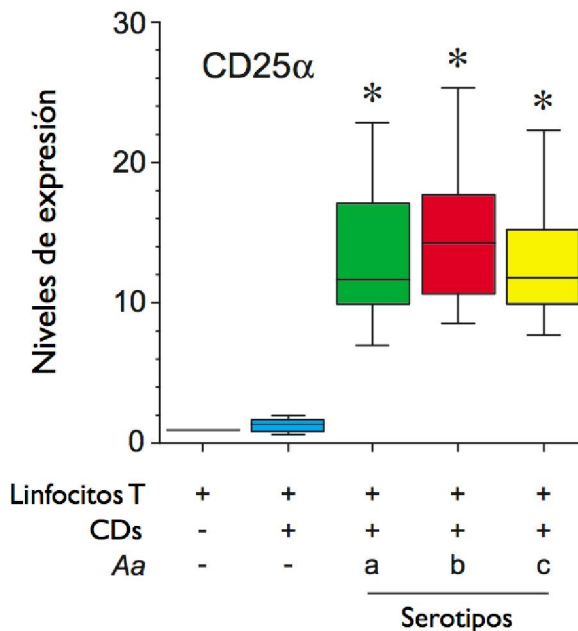


Figura 4. Linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans*. Análisis mediante RT-PCR en tiempo real de los niveles de expresión de CD25α que evidencian la activación de los linfocitos TCD4⁺ naïve luego de 5 días de activación por células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). * $p < 0,05$.

6.5 Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

El patrón de citoquinas expresadas por células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans*, asociados a la diferenciación de los fenotipos Th9 y Th22, fue confirmado mediante la cuantificación de los niveles de expresión de los mRNA de las citoquinas IL-4, IL-6, TNF- α y TGF- β 1 por RT-PCR en tiempo real (Figura 5). Las células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC® 43718™) expresaron mayores niveles de TNF- α ($p=0,006$ y $p=0,007$) en comparación a células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente. Además, el serotipo b indujo mayor nivel de expresión de IL-6 en comparación al serotipo a ($p=0,01$), pero no en comparación al serotipo c ($p=0,28$). No hubo diferencias en los niveles de expresión de las citoquinas IL-4 y TNF- α entre los serotipos a o c.

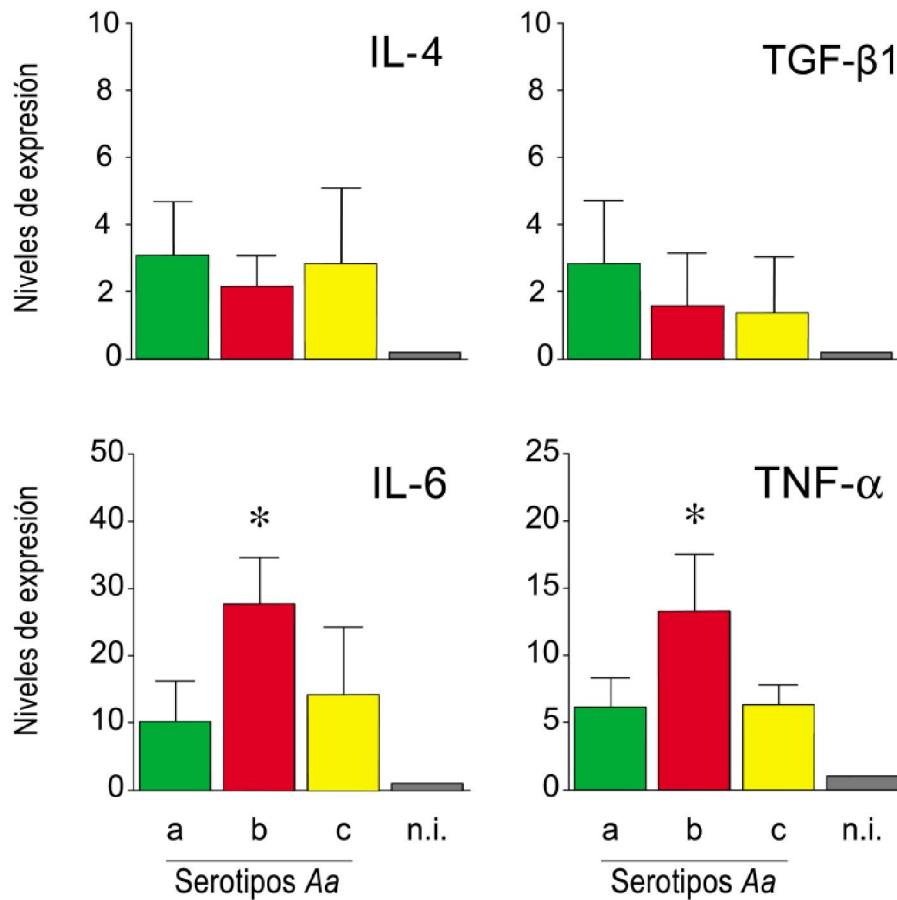


Figura 5. Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 10 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-4, IL-6, TNF- α y TGF- β fue determinada mediante cuantificación por RT-PCR en tiempo real, en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Como control negativo, se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). *p<0,05.

6.6 Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En células dendríticas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante RT-PCR en tiempo real, los niveles de expresión de las citoquinas IL-6 y TNF- α (Figura 6). Se

detectaron mayores niveles de expresión de TNF- α ($p=0,021$ y $p=0,012$) e IL-6 ($p=0,003$ y $p=0,004$) en células dendríticas estimuladas con 50 ng/mL de LPS del serotipo b, en comparación a las células dendríticas estimuladas con el LPS de los serotipos a o c, respectivamente.

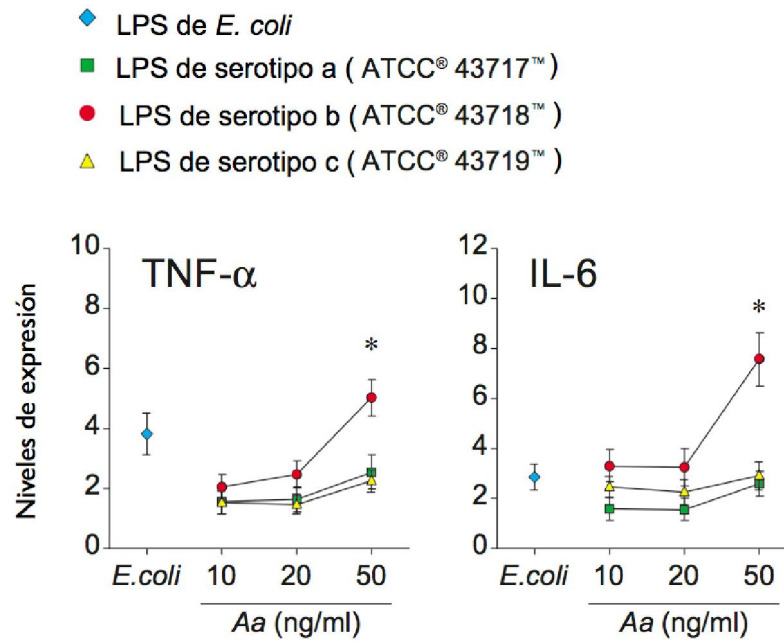


Figura 6. Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 6 experimentos independientes, la expresión de las citoquinas IL-6 y TNF- α fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con el LPS purificado del serotipo a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* a una concentración de 10, 20 ó 50 ng/mL. Como control positivo células dendríticas fueron estimuladas con 10 ng/mL de LPS de *E. coli* cepa 0111:B4. * $p<0,05$.

6.7 Secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En las células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se determinaron los niveles de secreción (pg/mL) de las citoquinas IL-6 y TNF- α mediante ELISA (Figura 7). Mayores niveles de

secreción de TNF- α (MOI=1, $p=0,002$; MOI=2, $p<0,001$) se detectaron en las células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans*, en comparación a los otros serotipos bacterianos. Además, no se detectaron diferencias de secreción de IL-6 entre los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans*.

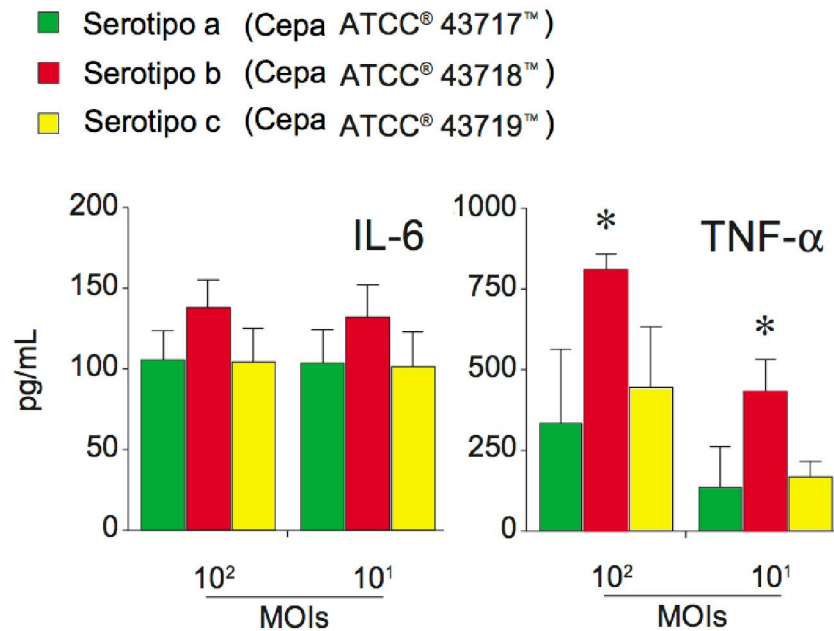


Figura 7. Secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 10 experimentos independientes, la secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- α fue cuantificada mediante ELISA en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=1 a 2). Como control negativo se utilizaron células dendríticas sin estimular y como control positivo, células dendríticas se estimularon durante 48 horas con 10 ng/mL del LPS de *E. coli* cepa 0111:B4. * $p<0,05$.

6.8 Expresión de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c

(ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante RT-PCR en tiempo real, los niveles de expresión de las citoquinas IL-9 e IL-22 (Figura 8). Mayores niveles de expresión de IL-22 ($p>0,05$) se detectaron en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b en comparación a los serotipos a o c. No se detectaron diferencias de expresión de IL-9 entre los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans*.

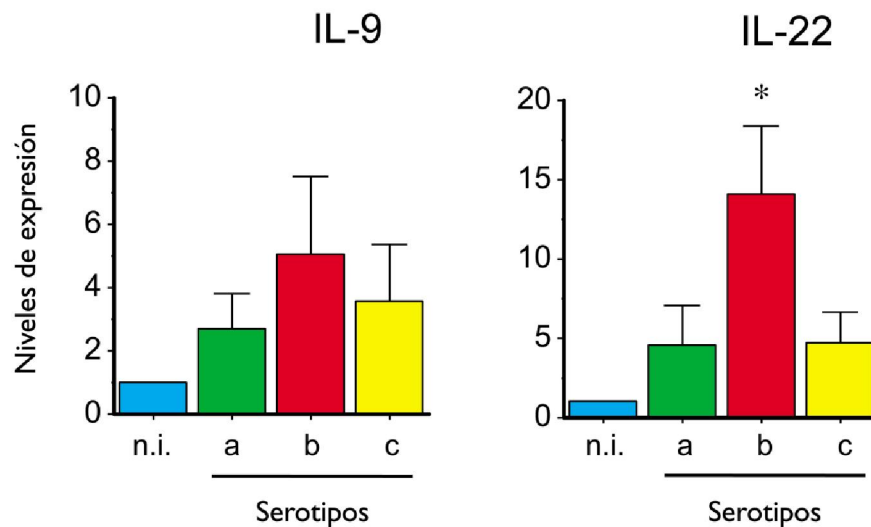


Figura 8. Niveles de expresión de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 6 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-9 e IL-22 en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2), fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real. Como control negativo se utilizaron linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). * $p<0,05$.

6.9 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

Para evaluar el patrón de citoquinas secretadas por los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a

(ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* se cuantificaron los niveles de secreción (pg/mL) de IL-9 e IL-22 mediante ELISA (Figura 9). Mayores niveles de secreción IL-22 ($p > 0,05$) MOI=2 se detectaron en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans*, en comparación a los otros serotipos bacterianos. No se detectaron diferencias de secreción de IL-9 entre los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans*.

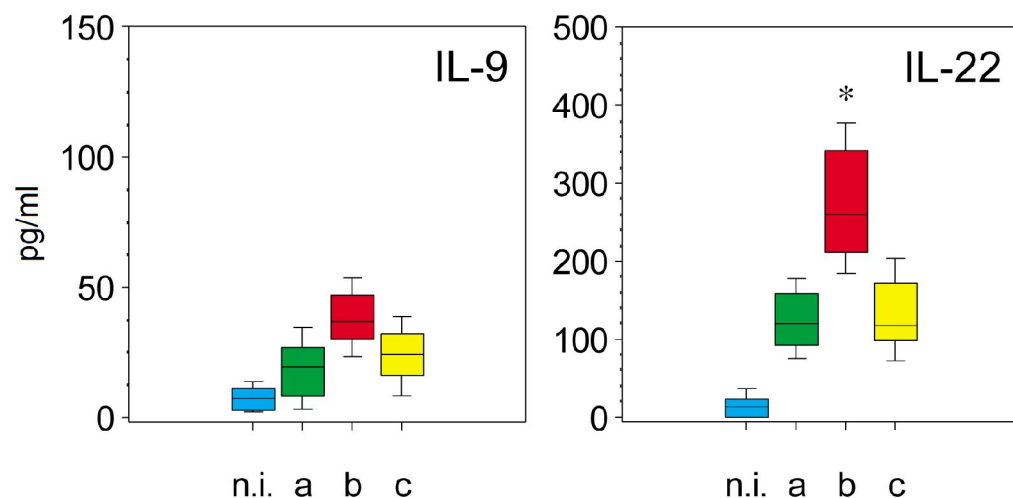


Figura 9. Secreción de citoquinas linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 6 experimentos independientes, la secreción de las citoquinas IL-9 e IL-22 fue cuantificada mediante ELISA en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Como control positivo, los niveles de secreción de citoquinas fueron cuantificados en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). * $p < 0,05$.

6.10 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC[®]

43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante ELISA, los niveles de secreción de las citoquinas IL-9 e IL-22 (Figura 10). Se detectaron mayores niveles de secreción de IL-22 ($p=0,039$ y $p=0,041$) en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 20 ng/mL de LPS del serotipo b (ATCC® 43718™) en comparación al (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente. Mayores niveles de secreción de IL-9 ($p=0,035$ y $p=0,042$) e IL-22 ($p=0,019$ y $p=0,022$) se detectaron en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 50 ng/mL de LPS del serotipo b (ATCC® 43718™) en comparación al (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente.

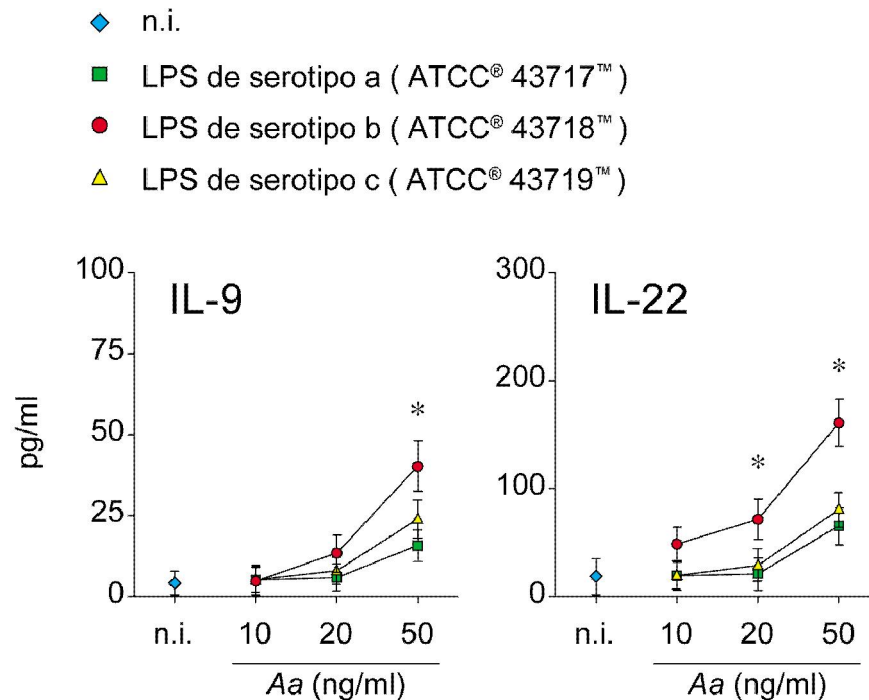


Figura 10. Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 6 experimentos independientes, la secreción las citoquinas IL-9 e IL-22 en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) fue determinada mediante ELISA. Como control negativo se utilizaron linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). * $p < 0,05$.

6.11 Expresión de factores de transcripción en linfocitos TCD4⁺ naïve activados

En linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) fueron cuantificados, mediante RT-PCR en tiempo real, los niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* (Figura 11). Los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) presentaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* ($p=0,042$ y $p=0,039$) y *AhR* ($p=0,045$ y $p=0,044$) en comparación a los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]), respectivamente. No hubo diferencias en los niveles de expresión de los factores de transcripción en los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a o c.

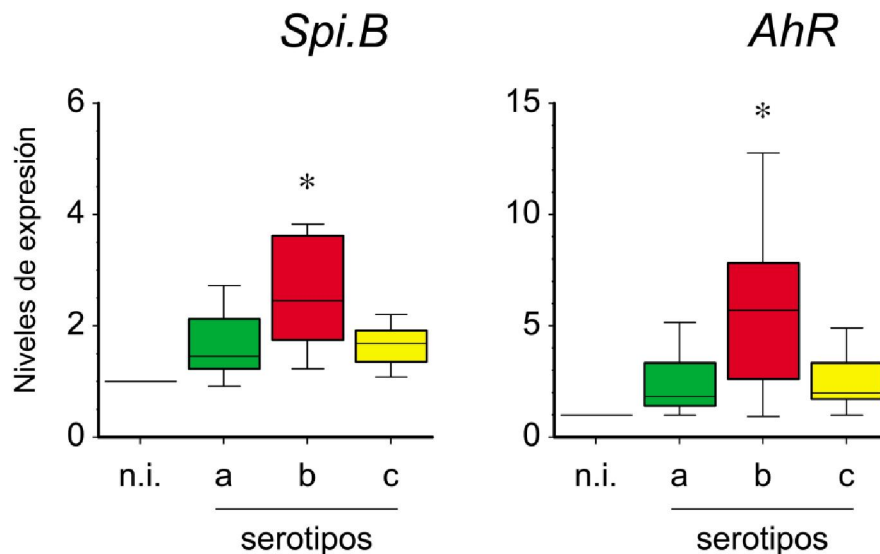


Figura 11. Niveles de expresión de los factores de transcripción en linfocitos TCD4⁺ naïve activados. A partir de 6 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real. Como control negativo se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). * $p < 0,05$.

6.12 Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción con los niveles de secreción de citoquinas

A partir de los resultados obtenidos en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2), se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) entre los niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* (Th9) y *AhR* (Th22) y los niveles secretados de las citoquinas IL 9 e IL22 (Tabla 2).

Para el perfil Th9, se detectó una correlación positiva entre *Spi.B* e IL-9 en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (*p*=0,042; 0,012; 0,007; respectivamente).

Para el perfil Th22, se detectó una correlación positiva entre *AhR* e IL-22 en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (*p*=0,035; 0,007; 0,037; respectivamente).

Cepas de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>							
		ATCC[®] 43717[™] (serotipo a)		ATCC[®] 43718[™] (serotipo b)		ATCC[®] 43719[™] (serotipo c)	
		<i>r</i>	<i>p</i> -value	<i>r</i>	<i>p</i> -value	<i>r</i>	<i>p</i> -value
<i>Spi.B</i>	IL-9	0,810	0,042	0,908	0,012	0,913	0,007
<i>AhR</i>	IL-22	0,833	0,035	0,914	0,007	0,830	0,037

Tabla 2. Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción y de secreción de las citoquinas. A partir de 6 experimentos independientes se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) entre los niveles de expresión de mRNA de los factores de transcripción *Spi.B* (Th9) y *AhR* (Th22) y los niveles de secreción de citoquinas asociadas a los linfocitos Th9 y Th22 en linfocitos TCD4⁺ *naïve* estimulados por las células dendríticas sensibilizadas con las cepas ATCC[®] 43717[™] (serotipo a), ATCC[®] 43718[™] (serotipo b) o ATCC[®] 43719[™] (serotipo c) de *A. actinomycetemcomitans* a una multiplicidad de infección (MOI) de 2.

7. DISCUSIÓN.

En este estudio, se evaluó la respuesta de las células dendríticas al ser estimuladas con los serotipos a (cepa ATCC[®] 43717[™]), b (cepas ATCC[®] 43718[™]) o c (cepas ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* o su LPS purificado. En células dendríticas estimuladas con el serotipo b, se detectaron mayores niveles de expresión y secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- α , que polarizan hacia el fenotipo Th22, en comparación a las células dendríticas estimuladas con los serotipos a o c. Luego, se analizó la activación de los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y se cuantificaron los niveles de expresión de los factores de transcripción y de producción de las citoquinas pertenecientes a los fenotipos Th9 y Th22. Ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detectaron mayores niveles de expresión del factor de transcripción *AhR* y de expresión y secreción de IL-22, característico de un patrón de respuesta inmune tipo Th22 (pro-inflamatorio y osteo-destructivo), en comparación a las mismas células estimuladas con los serotipos a o c.

Durante las periodontitis, la destrucción de los tejidos de inserción periodontal y la posterior 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 biopelícula patogénica subgingival (Dutzan y cols., 2009a, Dutzan y cols., 2009b, Hernandez y cols., 2011). En efecto, en biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica, se cuantificaron mayores niveles de citoquinas y factores de transcripción asociados a los linfocitos Th1 y Th17, y su detección se asoció con distintos niveles de severidad de la enfermedad (Dutzan y cols., 2009a, Dutzan y cols., 2009b, Hernandez y cols., 2011). En términos generales, en lesiones periodontales activas se expresan elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Th1) y osteo-destructoras (Th17) y bajos niveles de citoquinas inmuno-moduladoras (Th2) (Takeichi y cols., 2000; Ukai y cols., 2001; Vernal y cols., 2005; Gaffen & Hajishengallis, 2008; Dutzan y cols., 2009) y las bacterias

periodonto-patógenas, entre ellas *A. actinomycetemcomitans*, cumplen un rol central en la inducción de la respuesta pro-inflamatoria y osteo-destructiva.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es un patógeno-periodontal que coloniza tardíamente los sitios periodontales ubicándose en la superficie de la biopelícula y su LPS cumple diversos roles en los distintos serotipos y determina su virulencia, patogenicidad e inmunogenicidad (Perry y cols., 1996a; Perry y cols., 1996b; Kaplan y cols., 2010; Díaz-Zúñiga y cols., 2014a; Díaz-Zúñiga y cols., 2014b). En particular, la baja frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* en sitios periodontales es compensada por la inmunogenicidad del serotipo infectante y la mayor frecuencia de detección del serotipo b se asocia con el fenotipo clínico más severo de la enfermedad (Asikainen y cols., 1991; Lai y cols., 1981; Shimada y cols., 2008; Rossa y cols., 2008; Teixeira y cols., 2006; Roman-Torres y cols., 2010; Cortelli y cols., 2010). No obstante este es el factor de virulencia más importante, la respuesta inmune inducida en las células del hospedero ante ellas es el principal determinante de la destrucción e inflamación de los tejidos periodontales.

Recientemente se analizaron los niveles de producción de citoquinas pro-inflamatorias en células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ *naïve* estimulados con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* o su LPS purificado, detectándose que el serotipo b indujo mayores niveles de expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-12, IL-23 e IFN- γ en células dendríticas, y de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α y la molécula RANKL, en linfocitos Th, en comparación a los otros serotipos, en particular, un fenotipo tanto Th1 como Th17 se indujo en presencia del serotipo b (Díaz-Zúñiga y cols., 2014a; Díaz-Zúñiga y cols., 2014b). Además, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión y secreción de las distintas moléculas en presencia de los serotipos a o c, tanto con la bacteria *ad integrum* como su LPS purificado. En conjunto, estos datos nos permiten establecer que en pacientes con periodontitis las formas séricas más inmunogénicas de *A. actinomycetemcomitans* se asocian con la reabsorción del hueso alveolar al inducir *in vitro* mayores niveles de secreción de citoquinas Th1 y Th17.

Así, con el objetivo de determinar la diferenciación hacia los fenotipos efectores Th9 y Th22, linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos se activaron con células dendríticas autólogas estimuladas con las cepas o el LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. En concordancia con lo detectado previamente, en las células dendríticas, el serotipo b indujo mayores niveles de expresión y secreción de IL-6 y TNF- α y en linfocitos TCD4⁺ *naïve* se detectaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción determinantes de la diferenciación del fenotipo Th22, *AhR*. Además, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión y secreción de las distintas moléculas asociadas al fenotipo Th9 en presencia de los serotipos a, b o c, tanto con la bacteria *ad integrum* como su LPS purificado. Estos datos nos permiten proyectar el potencial rol del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en la definición del fenotipo Th22 que podría estar presente en las lesiones periodontales luego de la presentación antigénica y un potencial rol del fenotipo Th9 en la mantención de la salud periodontal.

Los linfocitos Th9 cumplen un rol pro-inflamatorio en enfermedades auto-inmunes y alérgicas y un rol inmuno-modulador en enfermedades neoplásicas (Lu y cols., 2012) y los linfocitos Th22 cumplen un rol pro-inflamatorio y osteo-destructivo en las artritis reumatoides (Goswami & Kaplan, 2011; Ma y cols., 2010; Kaplan, 2013; Ikeuchi y cols., 2005; Kim y cols., 2012). Mientras los linfocitos Th9 disminuyen la frecuencia de proliferación de los linfocitos T e inhiben la secreción de citoquinas asociadas a los fenotipos Th1 y Th17, pudiendo especular un potencial rol inmuno-modulador en las periodontitis (Aranha y cols., 2013), los linfocitos Th22 inducen la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y RANKL en fibroblastos sinoviales mediante la expresión y secreción de IL-22 activando la diferenciación de pre-osteoclastos y la maduración de osteoclastos, determinantes clave de la destrucción ósea, pudiendo especular un potencial rol osteo-destructor en las periodontitis (Goswami & Kaplan, 2011; Ma y cols., 2010; Kaplan, 2013; Ikeuchi y cols., 2005; Kim y cols., 2012). No obstante la evidencia sustenta nuestra hipótesis, en lesiones periapicales activas e inactivas se cuantificaron los niveles de expresión de citoquinas Th9 y Th22, determinando que existe un incremento significativo de IL-9 e IL-22 en las lesiones inactivas y asociadas a un potencial rol

inmuno-modulador de ambos fenotipos en lesiones de origen infeccioso en tejidos periodontales periapicales (Aranha y cols., 2013).

En términos generales, IL-9 es secretada por los linfocitos Th9, es una proteína altamente glicosilada reconocida por el receptor IL-9R presente en la superficie de linfocitos T, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, células epiteliales y células musculares lisas (Goswami & Kaplan, 2011). IL-9R es un heterodímero conformado por una subunidad específica IL-9R α y una cadena γ , común para IL-2, IL-4 e IL-17. La activación del receptor induce la activación y producción del factor nuclear kappa B (NF- κ B), la proliferación celular y la inhibición de la muerte por apoptosis (Renauld y cols., 1993a; Goswami & Kaplan, 2011; Kaplan, 2013). En efecto, IL-9R es expresado en células T efectoras, con altos niveles de expresión en linfocitos Th2 y Th17 (Nowak y cols., 2009), asociándose a un rol inmuno-modulador o pro-inflamatorio dependiendo del ambiente local pre-existente. Además, IL-22, secretada por los linfocitos Th22, es una proteína miembro de la familia de citoquinas IL-10 la cual es reconocida por el receptor IL-22R, presente exclusivamente en la superficie de células epiteliales de piel, páncreas, intestino, hígado, pulmón y riñón. El receptor de IL-22 es un heterodímero conformado por las subunidades IL-22R1, común para IL-20 e IL-24, e IL-10R2, común para IL-10, IL-26, IL28 e IL-29. La activación de IL-22R induce la secreción de enzimas proteolíticas y antimicrobianas, la proliferación celular y la angiogénesis, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y metaloproteinasas de la matriz, y la migración y degranulación de monocitos y neutrófilos (Akdis et al, 2012; Sugita et al, 2013; Michalak-estoma et al, 2013; Sabat et al, 2014), asociándose a un rol pro-inflamatorio.

Recientemente, la detección de linfocitos Th22 en pacientes con artritis reumatoide ha permitido asociar los niveles de IL-22 con la severidad de la enfermedad y en conjunto con los linfocitos Th1 y Th17 cumplen un rol central en su etiopatogenia, permitiendo especular que la destrucción de los tejidos articulares estaría definida por el incremento de los linfocitos Th1, Th17 y Th22 (Ikeuchi y cols., 2005; Kim y cols., 2012). Así, mientras en las fases inflamatorias de la enfermedad predominarían los linfocitos Th1, en las fases osteo-destructivas

predominarían los linfocitos Th17 y Th22 (Goswami & Kaplan, 2011; Ma y cols., 2010; Kaplan, 2013; Ikeuchi y cols., 2005; Kim y cols., 2012). Además, se ha detectado la presencia de linfocitos Th9 y elevados niveles de IL-9 en pacientes con artritis reumatoide en tratamiento, sugiriendo un potencial rol de estos linfocitos en la recuperación de la salud, mediante la inhibición o regulación de la diferenciación de los linfocitos Th1, Th17 y Th22 (Khan y cols., 2009). De este modo, la medición de citoquinas fenotipo-específicas ha permitido detectar la actividad y severidad de la enfermedad, permitiendo desarrollar nuevas terapias inmunológicas. En efecto, en un modelo murino de artritis reumatoide se bloqueó IL-22R, detectándose una disminución de los signos clínicos de inflamación y de destrucción ósea (Marijnisse y cols., 2011).

No obstante el rol de los linfocitos Th9 y Th22 en las periodontitis podría ser antagónico, donde los linfocitos Th9 modulen la diferenciación de los linfocitos Th22, nuestros resultados detectaron que ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se incrementan significativamente los niveles de expresión del factor determinante de la diferenciación de los linfocitos Th9, *Spi.B*, sin detectar diferencias en los niveles de expresión y secreción de IL-9. Según nuestros estudios previos, las elevadas concentraciones de INF- γ secretadas por células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* disminuirían la diferenciación de los linfocitos Th9 e inhibirían la producción de IL-9, mediante la regulación negativa de IL-4 (Murugaiyan y cols., 2012; Kaplan, 2013; Díaz-Zúñiga y cols., 2014a; Díaz-Zúñiga y cols., 2014b). Los niveles de expresión detectados del factor *Spi.B*, tendrían su explicación durante el proceso de diferenciación de los linfocitos Th9, Th17 y Treg, que dependen de los niveles de TGF- β 1 para activar sus factores de transcripción, mientras los linfocitos Th17 se diferencian en presencia de elevados niveles de IL-6 y bajos de TGF- β 1, los fenotipos Th9 y Treg requieren de una mayor concentración de TGF- β 1 y menor de IL-6 (Schmitt y cols., 1994; Vernal & García-Sanz, 2008; Dardalhon y cols., 2008; Chang y cols., 2010; Singh y cols., 2013). En efecto, nuestros estudios detectaron bajos niveles de expresión y secreción de TGF- β 1 en las células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

(Díaz-Zúñiga y cols., 2014a), condicionando un ambiente pro-inflamatorio local que facilitaría la polarización hacia los fenotipos Th1, Th17 y Th22.

El eje Th1/Th17/Th22 ha incrementado su importancia en el desarrollo de patologías osteo-destructivas y los estudios analizados permiten especular que estos fenotipos se encuentran asociados al inicio, progresión y severidad de las artritis reumatoides y, basándonos en nuestros resultados, podría tener una asociación similar con las periodontitis (Kim y cols., 2012). Del mismo modo, el eje Th2/Th9/Treg tendría importancia en la mantención y recuperación de la salud (Veldhoen y cols., 2008; Jabeen & Kaplan, 2012; Murugaiyan y cols., 2012; Kaplan, 2013). En efecto, se ha postulado que el fenotipo Th9 es un linfocito dimórfico y dependiendo del ambiente local pre-existente se comprometería con un rol modulador de la respuesta de los linfocitos Th1 y Th22, sinérgico de la función pro-inflamatoria de los linfocitos Th1 o, incluso, diferenciarse hacia o de los linfocitos Th2 (Veldhoen y cols., 2008; Jäger y cols., 2009; Elyaman y cols., 2009). Además, especulamos que los linfocitos Th9, debido a la vía de diferenciación común con los linfocitos Th17 y Treg, podrían pertenecer a un fenotipo intermedio durante el proceso de diferenciación Th17/Treg y, dependiendo de los niveles de concentración de las citoquinas IL-4, IL-6, TNF- α y TGF- β 1 podrían permanecer como un fenotipo Th9 y tener un comportamiento dimórfico según el medio o podrían inhibir o activar la diferenciación de linfocitos TCD4⁺ *naïve* hacia el perfil Th17 (Elyaman y cols., 2009; Nowak y cols., 2009; Goswami & Kaplan, 2011). Independiente de las especulaciones, el dimorfismo de los linfocitos Th9 aún continúa sin evidencia que lo sustente y nuestro estudio aporta, en alguna medida, nuevos antecedentes que permitirán a futuro identificar el rol de estos linfocitos en las enfermedades periodontales.

Finalmente, nuestros resultados permiten establecer que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* estaría asociado con la generación de un ambiente inflamatorio local que favorecería la diferenciación de los linfocitos Th22 y que los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* inducirían bajos niveles de linfocitos Th9, permitiendo establecer que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se relacionaría con las periodontitis a través de la

activación, maduración y diferenciación de los linfocitos Th1, Th17 y Th22 y la baja frecuencia de detección de los linfocitos Th2, Th9 y Treg se vincularía con la mantención o recuperación de la salud periodontal.

8. CONCLUSIONES.

1. Las células dendríticas humanas estimuladas con el serotipo b de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o su LPS purificado producen mayores niveles de expresión y secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- α , necesarias para la diferenciación de los linfocitos Th22 en comparación a las células estimuladas con los serotipos a o c.
2. Los linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos activados por células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* producen mayores niveles de expresión y secreción de IL-22 y mayores niveles de expresión del factor de transcripción AhR, asociados a los linfocitos Th22, en comparación a linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a o c de *A. actinomycetemcomitans*.
3. En los linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos activados por células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, el incremento en los niveles de secreción de las citoquinas IL-9 (Th9) e IL-22 (Th22) se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de los factores de transcripción asociados a cada fenotipo, *Spi.B* (Th9) y *AhR* (Th22).
4. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce predominantemente un patrón de respuesta linfocitario tipo Th22 y esta respuesta es de mayor intensidad a la inducida por los otros serotipos bacterianos, por lo tanto, su detección en la biopelícula patogénica subgingival contribuiría a explicar los eventos inmuno-inflamatorios y osteo-destructivos que caracterizan las periodontitis.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**,787-793.
- 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.
- Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R. I. & Lord, G. M. (2007) The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* **148**,32-46.
- Akdis, M., Palomares, O., van de Veen, W., van Splunter, M. & Akdis, C. A. (2012) Th17 and Th22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* **129**,1438-1449; quiz1450-1431.
- Appay, V., van Lier, R. A., Sallusto, F. & Roederer, M. (2008) Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* **73**,975-983.
- Aranha, A. M., Repeke, C. E., Garlet, T. P., Vieira, A. E., Campanelli, A. P., Trombone, A. P., Letra, A., Silva, R. M. & Garlet, G. P. (2013) Evidence supporting a protective role for Th9 and Th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *J Endod* **39**,83-87.
- 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.
- Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. & Kolls, J. K. (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* **14**,275-281.
- Azuma, M. (2006) Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res* **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. *Hum Immunol* **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. *Annu Rev Immunol* **18**,767-811.
- 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.
- Bhattacharyya, S., Borthakur, A., Dudeja, P. K. & Tobacman, J. K. (2010) Lipopolysaccharide-induced activation of NF- κ B non-canonical pathway requires BCL10 serine 138 and NIK phosphorylations. *Exp Cell Res* **316**,3317-3327.
- Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* **3**,253-257.
- 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.
- Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S. T., Otte, J. M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkühn, T., Göke, B., Auernhammer, C. J. & Dambacher, J. (2006) IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**,G827-838.
- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J. & Modlin, R. L. (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**,732-736.
- Caroff, M. & Karibian, D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* **338**,2431-2447.
- 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.
- Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S. & Annunziato, F. (2014) Th17 and non-classic Th1 cells in chronic inflammatory disorders: two sides of the same coin. *Int Arch Allergy Immunol* **164**,171-177.
- Chang, H. C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G. L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A. N., Han, L., Nguyen, E. T., Robertson, M. J., Perumal, N. B., Tepper, R. S., Nutt, S. L. & Kaplan, M. H. (2010) The transcription factor *PU.1* is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* **11**,527-534.

- 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.
- d'Empaire, G., Baer, M. T. & Gibson, F. C., 3rd. (2006) The K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infect Immun* **74**,6236-6243.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I. C., Khoury, S., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. (2008) IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* **9**,1347-1355.
- De Smedt, M., Verhasselt, B., Kerre, T., Vanhecke, D., Naessens, E., Leclercq, G., Renauld, J. C., Van Snick, J. & Plum, J. (2000) Signals from the IL-9 receptor are critical for the early stages of human intrathymic T cell development. *J Immunol* **164**,1761-1767.
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Álvarez, C., Monasterio, G., Benítez, A., Ciuchi, P., Díaz, C., Escobar, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2014a) T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent. *J Periodontal Res* **41**,451-459.
- Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernández, M., Sanz, M. & Vernal, R. (2014b) Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* **41**,242-251.
- Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A., Ciuchi, P., García, 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.
- Díaz, J., Yáñez, J., Melgar, S., Álvarez, C., Rojas, C. & Vernal, R. (2012) *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* **5**,40-45.
- Dugas, B., Renauld, J. C., Pène, J., Bonnefoy, J. Y., Peti-Frère, C., Braquet, P., Bousquet, J., Van Snick, J. & Mencia-Huerta, J. M. (1993) Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes. *Eur J Immunol* **23**,1687-1692.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2009) Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* **10**,857-863.

- 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.
- Ebersole, J. L., Kirakodu, S., Novak, M. J., Stromberg, A. J., Shen, S., Orraca, L., Gonzalez-Martinez, J., Burgos, A. & Gonzalez, O. A. (2014) Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. *J Clin Periodontol* **41**,853-861.
- Ertugrul, A. S., Sahin, H., Dikilitas, A., Alpaslan, N. & Bozoglan, A. (2013) Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* **48**,44-51.
- Feng, L. L., Gao, J. M., Li, P. P. & Wang, X. (2011) IL-9 contributes to immunosuppression mediated by regulatory T cells and mast cells in B-cell non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Immunol* **31**,1084-1094.
- Fujiki, H., Kimura, T., Minamiguchi, H., Harada, S., Wang, J., Nakao, M., Yokota, S., Urata, Y., Ueda, Y., Yamagishi, H. & Sonoda, Y. (2002) Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture. *Exp Hematol* **30**,1373-1380.
- Fujita, H., Nogralles, K. E., Kikuchi, T., Gonzalez, J., Carucci, J. A. & Krueger, J. G. (2009) Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**,21795-21800.
- Fujita, H. (2013) The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci* **72**,3-8.
- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A. & Gamonal, J. (2005) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* **76**,289-294.
- 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. P. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* **89**,1349-1363.

- Gasparini, C., Foxwell, B. M. & Feldmann, M. (2009) RelB/p50 regulates CCL19 production, but fails to promote human DC maturation. *Eur J Immunol* **39**,2215-2223.
- Genco, R. J., Christersson, L. A. & Zambon, J. J. (1986) Juvenile periodontitis. *Int Dent J* **36**,168-176.
- Gerlach, K., Hwang, Y., Nikolaev, A., Atreya, R., Dornhoff, H., Steiner, S., Lehr, H. A., Wirtz, S., Vieth, M., Waisman, A., Rosenbauer, F., McKenzie, A. N., Weigmann, B. & Neurath, M. F. (2014) Th9 cells that express the transcription factor *PU.1* drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat Immunol* **15**,676-686.
- Gmür, 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.
- Goswami, R. & Kaplan, M. H. (2011) A brief history of IL-9. *J Immunol* **186**,3283-3288.
- Goswami, R. & Kaplan, M. H. (2012) Gcn5 is required for *PU.1*-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *J Immunol* **189**,3026-3033.
- Hajishengallis, G., Sojar, H., Genco, R. J. & DeNardin, E. (2004) Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptors. *Immunol Invest* **33**,157-172.
- Harrington, L. E., Mangan, P. R. & Weaver, C. T. (2006) Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* **18**,349-356.
- Henderson, B., Ward, J. M. & Ready, D. (2010) *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol 2000* **54**,78-105.
- 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.
- Honda, K. (2012) IL-22 from T cells: better late than never. *Immunity* **37**,952-954.
- Hu, F., Li, Y., Zheng, L., Shi, L., Liu, H., Zhang, X., Zhu, H., Tang, S., Zhu, L., Xu, L., Yang, Y. & Li, Z. (2014) Toll-like receptors expressed by synovial fibroblasts perpetuate Th1 and th17 cell responses in rheumatoid arthritis. *PLoS One* **9**,e100266.
- Hu, Y., Li, H., Zhang, L., Shan, B., Xu, X., Liu, X., Xu, S., Yu, S., Ma, D., Peng, J. & Hou, M. (2012) Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Hum Immunol* **73**,629-635.

- Hyvärinen, K., Mäntylä, P., Buhlin, K., Paju, S., Nieminen, M. S., Sinisalo, J. & Pussinen, P. J. (2012) A common periodontal pathogen has an adverse association with both acute and stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* **223**,478-484.
- Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K. & Nojima, Y. (2005) Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* **52**,1037-1046.
- Jacobs-Helber, S. M., Wickrema, A., Birrer, M. J. & Sawyer, S. T. (1998) AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol Cell Biol* **18**,3699-3707.
- Jankovic, D., Liu, Z. & Gause, W. C. (2001) Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* **22**,450-457.
- Jentsch, H., Cachovan, G., Guentsch, A., Eickholz, P., Pfister, W. & Eick, S. (2012) Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. *Clinical oral investigations* **16**,1589-1597.
- Kachlany, S. C. (2010) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res* **89**,561-570.
- 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.
- Kaplan, M. H. (2013) Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev* **252**,104-115.
- Kara, E. E., Comerford, I., Bastow, C. R., Fenix, K. A., Litchfield, W., Handel, T. M. & McColl, S. R. (2013) Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. *J Immunol* **191**,1110-1117.
- Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**,240-246.
- Khan, I. H., Krishnan, V. V., Ziman, M., Janatpour, K., Wun, T., Luciw, P. A. & Tuscano, J. (2009) A comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients. *Cytometry B Clin Cytom* **76**,159-168.
- 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. *Microbiology and immunology* **56**,680-691.

- Kim, K. W., Kim, H. R., Park, J. Y., Park, J. S., Oh, H. J., Woo, Y. J., Park, M. K., Cho, M. L. & Lee, S. H. (2012) Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **64**,1015-1023.
- Kim, T. S., Frank, P., Eickholz, P., Eick, S. & Kim, C. K. (2009) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *J Periodontol* **80**,2020-2027.
- King, E. O. & Tatum, H. W. (1962) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Hemophilus aphrophilus*. *J Infect Dis* **111**,85-94.
- Kotenko, S. V., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R. P. & Pestka, S. (2001) Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* **276**,2725-2732.
- Kramer, J. M. & Gaffen, S. L. (2007) Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol* **78**,1083-1093.
- Lafaurie, G. I., Contreras, A., Baron, A., Botero, J., Mayorga-Fayad, I., Jaramillo, A., Giraldo, A., Gonzalez, F., Mantilla, S., Botero, A., Archila, L. H., Diaz, A., Chacon, T., Castillo, D. M., Betancourt, M., Del Rosario Aya, M. & Arce, R. (2007) Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J Periodontol* **78**,629-639.
- Lawrence, T. (2009) The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**,a001651.
- Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A. & Steinkasserer, A. (2002) Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* **129**,113-118.
- Leng, R. X., Pan, H. F., Ye, D. Q. & Xu, Y. (2012) Potential roles of IL-9 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Am J Clin Exp Immunol* **1**,28-32.
- Liang, S. C., Nickerson-Nutter, C., Pittman, D. D., Carrier, Y., Goodwin, D. G., Shields, K. M., Lambert, A. J., Schelling, S. H., Medley, Q. G., Ma, H. L., Collins, M., Dunussi-Joannopoulos, K. & Fouser, L. A. (2010) IL-22 induces an acute-phase response. *J Immunol* **185**,5531-5538.
- López, N. J., Smith, P. C. & Gutierrez, J. (2002) Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* **73**,911-924.

- López, N. J., Da Silva, I., Ipinza, J. & Gutiérrez, J. (2005) Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol* **76**,2144-2153.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Yang, J., Qian, J. & Yi, Q. (2012) Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest* **122**,4160-4171.
- Ma, C. S., Tangye, S. G. & Deenick, E. K. (2010) Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21. *Immunol Cell Biol* **88**,621-623.
- Marijnissen, R. J., Koenders, M. I., Smeets, R. L., Stappers, M. H., Nickerson-Nutter, C., Joosten, L. A., Boots, A. M. & van den Berg, W. B. (2011) Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation. *Arthritis Rheum* **63**,2939-2948.
- Michalak-Stoma, A., Bartosińska, J., Kowal, M., Juskiewicz-Borowiec, M., Gerkowicz, A. & Chodorowska, G. (2013) Serum levels of selected Th17 and Th22 cytokines in psoriatic patients. *Dis Markers* **35**,625-631.
- Missé, D., Yssel, H., Trabattoni, D., Oblet, C., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Pène, J., Gonzalez, J. P., Clerici, M. & Veas, F. (2007) IL-22 participates in an innate anti-HIV-1 host-resistance network through acute-phase protein induction. *J Immunol* **178**,407-415.
- Murphy, K. M. & Reiner, S. L. (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**,933-944.
- Niebuhr, M., Scharonow, H., Gathmann, M., Mamerow, D. & Werfel, T. (2010) Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **126**,1176-1183.e1174.
- Novak, M. J., Novak, K. F., Hodges, J. S., Kirakodu, S., Govindaswami, M., Diangelis, A., Buchanan, W., Papapanou, P. N. & Michalowicz, B. S. (2008) Periodontal bacterial profiles in pregnant women: response to treatment and associations with birth outcomes in the obstetrics and periodontal therapy (OPT) study. *J Periodontol* **79**,1870-1879.
- Nowak, E. C., Weaver, C. T., Turner, H., Begum-Haque, S., Becher, B., Schreiner, B., Coyle, A. J., Kasper, L. H. & Noelle, R. J. (2009) IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* **206**,1653-1660.
- 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.
- Nussbaum, G., Ben-Adi, S., Genzler, T., Sela, M. & Rosen, G. (2009) Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components. *Infect Immun* **77**,3939-3947.

- Offenbacher, S. (1996) Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* **1**,821-878.
- 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. *J Dent Res* **88**,633-638.
- 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.
- Palucka, K., Ueno, H., Roberts, L., Fay, J. & Banchereau, J. (2010) Dendritic cells: are they clinically relevant? *Cancer J* **16**,318-324.
- 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. *Eur J Biochem* **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. *Infect Immun* **64**,1215-1219.
- Reiner, S. L. (2007) Development in motion: helper T cells at work. *Cell* **129**,33-36.
- Renauld, J. C., Houssiau, F., Louahed, J., Vink, A., Van Snick, J. & Uyttenhove, C. (1993a) Interleukin-9. *Adv Immunol* **54**,79-97.
- Renauld, J. C., Houssiau, F., Uyttenhove, C., Vink, A. & Van Snick, J. (1993b) Interleukin-9: a T-cell growth factor with a potential oncogenic activity. *Cancer Invest* **11**,635-640.
- Reyes, R. E., Ramírez, H., Solís, C., Ortiz, M. & Coria, R. (2009) Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Rev Latinoam Microbiol* **51**,32-43.
- 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.

- Sa, S. M., Valdez, P. A., Wu, J., Jung, K., Zhong, F., Hall, L., Kasman, I., Winer, J., Modrusan, Z., Danilenko, D. M. & Ouyang, W. (2007) The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* **178**,2229-2240.
- Sabat, R., Ouyang, W. & Wolk, K. (2014) Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov* **13**,21-38.
- 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.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J. & Takayanagi, H. (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* **203**,2673-2682.
- Scriba, T. J., Kalsdorf, B., Abrahams, D. A., Isaacs, F., Hofmeister, J., Black, G., Hassan, H. Y., Wilkinson, R. J., Walzl, G., Gelderbloem, S. J., Mahomed, H., Hussey, G. D. & Hanekom, W. A. (2008) Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol* **180**,1962-1970.
- Schlapbach, C., Gehad, A., Yang, C., Watanabe, R., Guenova, E., Teague, J. E., Campbell, L., Yawalkar, N., Kupper, T. S. & Clark, R. A. (2014) Human Th9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Sci Transl Med* **6**,219ra218.
- Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kühn, R., Müller, W., Palm, N. & Rüdé, E. (1994) IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol* **153**,3989-3996.
- Seder, R. A. & Paul, W. E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* **12**,635-673.
- Shao, L. L., Zhang, L., Hou, Y., Yu, S., Liu, X. G., Huang, X. Y., Sun, Y. X., Tian, T., He, N., Ma, D. X., Peng, J. & Hou, M. (2012) Th22 cells as well as Th17 cells expand differentially in patients with early-stage and late-stage myelodysplastic syndrome. *PLoS One* **7**,e51339.
- 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.
- Singh, T. P., Schön, M. P., Wallbrecht, K., Gruber-Wackernagel, A., Wang, X. J. & Wolf, P. (2013) Involvement of IL-9 in Th17-associated inflammation and angiogenesis of psoriasis. *PLoS One* **8**,e51752.

- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**,134-144.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* **38**,135-187.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R. & Mantovani, A. (1998) Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* **161**,1083-1086.
- Steenwinckel, V., Louahed, J., Lemaire, M. M., Sommereyns, C., Warnier, G., McKenzie, A., Brombacher, F., Van Snick, J. & Renauld, J. C. (2009) IL-9 promotes IL-13-dependent paneth cell hyperplasia and up-regulation of innate immunity mediators in intestinal mucosa. *J Immunol* **182**,4737-4743.
- Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**,685-711.
- Stockinger, B. & Veldhoen, M. (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* **19**,281-286.
- Sugita, S., Kawazoe, Y., Imai, A., Kawaguchi, T., Horie, S., Keino, H., Takahashi, M. & Mochizuki, M. (2013) Role of IL-22- and TNF- α -producing Th22 cells in uveitis patients with Behcet's disease. *J Immunol* **190**,5799-5808.
- Sun, S. C. (2011) Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* **21**,71-85.
- Suzuki, N., Nakano, Y., Yoshida, Y., Ikeda, D. & Koga, T. (2001) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **39**,2002-2005.
- Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D. F. & Kitetsu, S. (2005) The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* **32**,369-374.
- Takahashi, T., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Shibuya, N., Moro, I. & Koga, T. (1991) Murine macrophage interleukin-1 release by capsularlike serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **59**,18-23.
- Takami, M., Love, R. B. & Iwashima, M. (2012) TGF- β converts apoptotic stimuli into the signal for Th9 differentiation. *J Immunol* **188**,4369-4375.
- Tang, G. & Mintz, K. P. (2010) Glycosylation of the collagen adhesin EmaA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is dependent upon the lipopolysaccharide biosynthetic pathway. *J Bacteriol* **192**,1395-1404.
- Taubman, M. A. & Kawai, T. (2001) Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**,125-135.

- Tete, S., Saggini, A., Maccauro, G., Rosati, M., Conti, F., Cianchetti, E., Tripodi, D., Toniato, E., Fulcheri, M., Salini, V., Caraffa, A., Antinolfi, P., Frydas, S., Pandolfi, F., Conti, P., Potalivo, G., Nicoletti, M. & Theoharides, T. C. (2012) Interleukin-9 and mast cells. *J Biol Regul Homeost Agents* **26**,319-326.
- Toh, M. L. & Miossec, P. (2007) The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol* **19**,284-288.
- Truchetet, M. E., Brembilla, N. C., Montanari, E., Allanore, Y. & Chizzolini, C. (2011) Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther* **13**,R166.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. & Stockinger, B. (2008) Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* **9**,1341-1346.
- Vernal, R., Chaparro, A., Graumann, R., Puente, J., Valenzuela, M. A. & Gamonal, J. (2004) Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* **75**,1586-1591.
- 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., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., García, L., Del Valle, I., Silva, A. & Gamonal, J. (2006) High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4⁺ T lymphocytes. *J Periodontol* **77**,1772-1780.
- 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. *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.
- Vernal, R., León, R., Silva, A., van Winkelhoff, A. J., Garcia-Sanz, J. A. & Sanz, M. (2009) Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol* **36**,823-829.
- Walsh, M. C. & Choi, Y. (2003) Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**,251-263.

- Wallet, M. A., Sen, P. & Tisch, R. (2005) Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* **3**,166-175.
- Weaver, C. T. & Hatton, R. D. (2009) Interplay between the Th17 and Treg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol* **9**,883-889.
- Wolk, K. & Sabat, R. (2006) Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**,367-380.
- Wolk, K., Haugen, H. S., Xu, W., Witte, E., Waggie, K., Anderson, M., Vom Baur, E., Witte, K., Warszawska, K., Philipp, S., Johnson-Leger, C., Volk, H. D., Sterry, W. & Sabat, R. (2009) IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl)* **87**,523-536.
- 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, X. Y., Wang, H. Y., Zhao, X. Y., Wang, L. J., Lv, Q. H. & Wang, Q. Q. (2013) Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* **33**,767-774.
- Zambon, J. J., Slots, J. & Genco, R. J. (1983) Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun* **41**,19-27.
- Zambon, J. J. (1996) Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* **1**,879-925.
- Zhang, T., Kurita-Ochiai, T., Hashizume, T., Du, Y., Oguchi, S. & Yamamoto, M. (2010) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**,143-151.
- Zhao, L., Jiang, Z., Jiang, Y., Ma, N., Zhang, Y., Feng, L. & Wang, K. (2013) IL-22⁺ CD4⁺ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *International journal of rheumatic diseases* **16**,518-526.
- Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., Abbas, A. R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F. J. & Ouyang, W. (2008) Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* **14**,282-289.
- Zhu, J. & Paul, W. E. (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**,1557-1569.

10. ANEXOS.

10.1 Consentimiento Informado

Página 1/4

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

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

Objetivo de la investigación:

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

Personas estudiadas:

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

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

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

Examen clínico y toma de la muestra:

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



Procedimiento de laboratorio y destino de las muestras de sangre:

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

En las muestras de sangre NO se realizarán estudios 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



10.2 Ficha Clínica

FICHA CLINICA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDAD DE CHILE

Clinica de Periodoncia
Año

MODULO 1		Ficha N°
Fotos o Diapos. Si o No <input type="checkbox"/>	Notas Médicas Especiales	
Ingreso: / /200		
Egreso: / /200		

Nombre del Alumno:	
Nombre del Docente:	código
PACIENTE:	
SEXO: Masc. <input type="checkbox"/> Fern. <input type="checkbox"/>	Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno
Dirección	Fono:
Fecha de Nacimiento: / /19	edad: Profesión u Ocupación:

Motivo de consulta:

MODULO 2	Anamnesis GENERAL	
Antecedentes Médicos	Tratamiento que sigue actualmente	
Anexo: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Cardiovasculares 0	Discrasias sanguíneas 0	
Diabetes 0	Enf. Infecto-contagiosos 0	
Gastrointestinales 0	Enf. Neurológicas 0	
Alergias 0		
Embarazo 0		
Descripción de la enfermedad y Otros	Nombre y Teléfono de Médico Tratante	
Anamnesis ODONTOLÓGICA		

Su última visita al dentista: (fecha y motivo)

Tratamientos dentales que ha recibido anteriormente

Mantenimiento Periodontal: Si No

¿Ha recibido antes anestesia? No Si ¿Qué Tipo?

OTROS DATOS DE LA ANAMNESIS:

HABITOS

Tipo de cepillo dental que usa actualmente:		Técnica:			
Usa OTROS elementos de Higiene:	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	cuáles?:			
	SI NO		SI NO		
Onicofagia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Respirador Bucal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Interposición lingual	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tabaquismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bruxismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Bebe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Succiona chupetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Interposición de Objetos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros Hábitos:					

Antecedentes de Enfermedad Periodontal

DOLOR	Dientes: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Encías: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>	Otros, Explique:
Sangramiento	Espontáneo <input type="checkbox"/>	Provocado <input type="checkbox"/>	Explique:
Movilidad Dentaria	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Se han superado <input type="checkbox"/> Se ha elongado <input type="checkbox"/>
Halitosis	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	
Antecedentes Familiares: Padre <input type="checkbox"/> Madre <input type="checkbox"/> Hermanos <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/>			

Otros Antecedentes:

MODULO 3	Examen Extra - Oral
Facies: (describe)	
Ganglios palpables: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> (Ubicación)	
Músculos de Cabeza y Cuello: Puntos y/o zonas Dolorosas No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> (ubicación)	
A.T.M. (articulación tèmpero-mandibular): Dolor: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> espontáneo <input type="checkbox"/> provocado <input type="checkbox"/> Ubicación de zonas de dolor: Ruidos: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> Explique:	

Otras observaciones del Examen Extra - Bucal

MODULO 4

Examen Intra - Bucal

TEJIDOS BANDOS	Tipo de Lesión	Descripción (tamaño, forma, color, etc.)
Labios - Comisuras		
Lengua		
Vestibulos		
Piso de la Boca		
Paladar		
Mucosa mejillas		
Región Faringoamigdaliana		
Otras		

Uso de Prótesis: No 0 Si 0 Tipo:

Ubicación y condiciones:

Anomalías Dento-Maxilares:	No 0	Si 0
Describe:		

Examen de Oclusión

Patología Muscular: Si 0 No 0 Patología Articular Si 0 No 0

Contactos Prematuros en Céntricas: Si 0 No 0 Dientes en contacto:
(Si no hay patología articular ni muscular)

Dinámica Mandibular

APERTURA BUCAL: Aumentada 0 Normal (4,2-4,4 cm.) 0 Disminuida 0

Movto. PROTUSIVO: No 0 Si 0 Guía incisal: Si 0 Contactos Post Si 0

Movto. De Lateralidad DERECHA: No 0 Si 0 aumentado 0 normal 0 disminuido 0

Guía canina: 0

Función de Grupo 0

Piezas en función:

Contacto en Balance: No 0 Si 0 Piezas en contacto:

Otras Guía 0

Piezas involucradas

Movto. De Lateralidad IZQUIERDA: no 0 Si 0 aumentado 0 normal 0 disminuido 0

Guía canina: 0

Función de Grupo 0

Piezas en función:

Contacto en Balance: No 0 Si 0 Piezas en contacto:

Otras Guía 0

Piezas involucradas

Otras Observaciones del Examen Intra - Bucal:

MODULO 5	Examen Periodontal	
----------	--------------------	--

Describe las características de la encía en cuanto a

- Color:
- Forma:
- Posición:
- Tamaño:
- Consistencia y superficie:

Índice gingival (G.I):
Løe & Silness 1963

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
VESTIBULAR																
MESIAL																
PALATINO																
DISTAL																
Índice Grupo I:						Índice Grupo II:						Índice Grupo III:				

Boca:

	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
VESTIBULAR																
MESIAL																
LINGUAL																
DISTAL																
Índice Grupo IV:						Índice Grupo V:						Índice Grupo VI:				

Anote en cada cara de cada diente en la boca las graduaciones 0, 1, 2 y 3 según corresponda. 0: encía normal, no inflamación ni cambio de color ni sangramiento. 1: leve inflamación y alteración de la superficie gingival. No hay sangramiento. 2: inflamación moderada, eritema y edema. Sangramiento al sondaje o bajo el efecto de la presión. 3: inflamación severa, eritema de importancia y edema. Tendencia al sangramiento espontáneo. Ulceración.

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
VESTIBULAR																
MESIAL																
PALATINO																
DISTAL																
Índice Grupo I:						Índice Grupo II:						Índice Grupo III:				

Boca: %	Boca: %	Boca: %	Boca: %
Fecha:	Fecha:	Fecha:	Fecha:

	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
VESTIBULAR																
MESIAL																
LINGUAL																
DISTAL																
Índice Grupo IV: %						Índice Grupo V: %						Índice Grupo VI: %				

Anote un signo + si la cara observada presenta tinción del revelador en contacto con la encía marginal y un signo - en caso de ausencia de coloración. Divida el número de superficies sin placa por el número de superficies examinadas y obtendrá el INDICE de HIGIENE

NOTA: Estos índices deben realizarse VARIAS veces durante el tratamiento y en CADA control por lo que deberá usar lápiz grafito. No olvide consignar los valores encontrados cada vez en la Hoja de Evolución.

C.P.I.T.N.=Índice de necesidades de tratamiento periodontal en comunidad

Códigos	0	1	2	3	4
Observaciones	SANO	Hemorragia al sondaje. No hay sacos ni cálculos. No hay hambros.	Sacos < 3mm. Se ve totalmente parte negra de la sonda. latrogenia ++, y tártaro	Parte negra de la sonda se ve parcialmente. Saco 4-5 mm. latrogenia ++	Parte negra de la sonda desaparece en un saco inflamado. Saco > 6mm.

Coloque en cada grupo el valor mas alto encontrado
Ej. Pieza 18:3 y
Pieza 15:2 valor
Grupo 1=3

Grupo I=					Grupo II=					Grupo III=				
18	17	16	15	14	13	12	11	21	23	24	25	26	27	28

Grupo IV=					Grupo V=					Grupo VI=				
18	17	16	15	14	13	12	11	21	23	24	25	26	27	28

FACTORES ETIOLÓGICOS LOCALES

Caries, cálculo, malposiciones, Odontología Restauradora defectuosa, etc.:

	Diente (s)	EFEECTO PROVOCADO

Alteraciones Mucó-Gingivales Si 0 No 0

Describa:

Disposición Psicológica: nervioso 0 indiferente 0 cooperador 0

Otra Observación

Examen Radiológico

Exámenes radiográficos solicitados

Diagnóstico Radiográfico:

Observaciones Radiológicas

MODULO 6

Diagnóstico y Evaluación

Elementos relevantes para el diagnóstico de los módulos 1 y 2:

Elementos relevantes para el diagnóstico de los módulos 3 y 4:

Elementos relevantes para el diagnóstico del módulo 5:

Trauma Oclusal I: Si 0 No 0

Piezas Involucradas:

Diagnóstico

Fundamentos del Diagnóstico

PRONOSTICO

GENERAL:PARTICULAR:Fundamentos del Pronóstico:

<i>Fecha</i>	Acciones clínicas realizadas, comentarios y observaciones	Firma del Docente

Primera Evaluación Post-Terapia Periodontal

FECHA:

Índice Periodontales	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
	G.I.					
H.I.						

Características de la Encía:

Otras Evaluaciones:

Programa de Mantenimiento Periodontal

10.3 Trabajos presentados en congresos nacionales

XXVI Reunión Anual IADR División Chile 2014

Rol de la respuesta linfocitaria tipo Th9 y Th22 durante las periodontitis

A. Benítez, C. Álvarez, G. Monasterio, M. García, S. Melgar-Rodríguez, J. Díaz-Zúñiga, R. Vernal. Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

OBJETIVOS: Durante las periodontitis, los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg secretan distintos patrones de citoquinas que determinan su función. Tanto en linfocitos T activados ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* como en biopsias de tejidos de pacientes afectados de periodontitis se detectan mayores niveles de producción de citoquinas y factores de transcripción asociados a una respuesta tipo Th1 y Th17. Recientemente, dos nuevos fenotipos linfocitarios fueron descritos, Th9 y Th2, y su rol en las periodontitis no se ha descrito. En esta investigación, se determinaron los niveles de expresión de los factores de transcripción y citoquinas asociadas a los fenotipos linfocitarios Th9 y Th22 en linfocitos TCD4+ y en biopsias de pacientes con periodontitis. **MÉTODO:** A partir de sangre periférica, se aislaron monocitos y linfocitos TCD4+ naïve. Los linfocitos TCD4+ fueron activados por células dendríticas-derivadas de monocitos estimuladas con los serotipos a-c de *A. actinomycetemcomitans*. Además, se obtuvieron biopsias de tejidos de individuos sanos y pacientes con periodontitis. Los niveles de producción de las citoquinas IL-9 e IL-22 y los factores de transcripción Spi.B y AhR fueron cuantificados mediante RT-PCR en tiempo real y ELISA. **RESULTADO:** Mayores niveles de producción de IL-22 y AhR fueron cuantificados en linfocitos TCD4+ posterior a la activación por el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* comparado con los otros serotipos. Además, mayores niveles de expresión de IL-22 y AhR fueron cuantificados en biopsias de lesiones de pacientes con periodontitis. **CONCLUSIONES:** Durante las periodontitis, se observa una respuesta linfocitaria tipo Th22 y esta respuesta está determinada al menos en parte por la capacidad inmunogénica del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*. Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1140904.

10.4 Resúmenes aceptados en congresos internacionales

93rd IADR General Session & Exhibition, Boston, Mass., USA, 2015

Th9, Th22 and C-reactive protein are detected in periodontitis patients

Benítez A., Álvarez C., Monasterio G., García M., Rojas C., Vega M., Melgar-Rodríguez S., Díaz-Zúñiga J., R. Vernal.

Periodontal Biology Laboratory, Dentistry Faculty, Universidad de Chile.

Introduction

Periodontitis are infectious diseases caused by the anaerobic gram-negative bacteria residing in the subgingival biofilm. These bacteria can cause direct destruction of periodontal tissues; however, their pathogenicity is mainly based on the activation of the immune response, in particular activation of T helper (Th) lymphocyte-associated responses. Recently, two new phenotypes of Th lymphocytes have been described, Th9 and Th22; however, their role in the pathogenesis of periodontitis have not yet been described. Th9 and Th22 lymphocytes could be associated with a pro-inflammatory response during periodontitis and, eventually, induce the expression of acute phase inflammation factors, such as C-reactive protein (CRP) and interleukin (IL)-6. This study was aimed to analyze whether the Th9 and Th22 lymphocytes play a role in the pathogenesis of the periodontitis.

Methodology

Gingival biopsies were taken from healthy subjects (n=5), gingivitis (n=3) and moderate/severe chronic periodontitis (n=5) patients. The expression levels of the cytokines IL-6, IL-9, IL-22, and CRP and the transcription factors *Spi.B* and *AhR*, master-switch genes associated with the Th9 and Th22 lymphocyte differentiation and activation, respectively, were quantified by real-time RT-PCR.

Results

Higher levels of IL-6, IL-22, CRP, and *AhR* mRNAs were expressed in periodontal tissues from periodontitis patients compared with either healthy or gingivitis subjects. Higher levels of IL-9 mRNAs were expressed in periodontitis patients compared with healthy subjects. The mRNA levels of IL-9 and *Spi.B* mRNAs were similar between periodontitis and gingivitis patients.

Conclusion

CRP and IL-6 have a potential pro-inflammatory role during the pathogenesis of the periodontitis and could be associated with systemic inflammatory responses. The Th9 and Th22 lymphocytes may participate in the pathogenic events described in periodontitis; however, additional studies are necessary to determine if they induce pro-inflammatory and/or bone-resorptive activities.

Key words: Th9; Th22; immune response; periodontitis; systemic diseases.

Supported by grant FONDECYT 1140904.