

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA CONSERVADORA

**VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS
HUMANAS ANTE DISTINTOS SEROTIPOS DE *AGGREGATIBACTER*
*ACTINOMYCETEMCOMITANS***

Juan Pablo Yáñez Figueroa

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

**TUTOR ASOCIADO
Dra. Marcela Hernández Ríos**

**Santiago - Chile
2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA CONSERVADORA**

**VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS
HUMANAS ANTE DISTINTOS SEROTIPOS DE *AGGREGATIBACTER*
*ACTINOMYCETEMCOMITANS***

Juan Pablo Yáñez Figueroa

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

**TUTOR ASOCIADO
Dra. Marcela Hernández Ríos**

**Santiago - Chile
2012**

Dedicatoria

Quiero dedicarle este trabajo de investigación a mis padres, que sin ellos, no habría sido capaz de llegar tan lejos, con todos los altos y bajos que nos ha tocado vivir.

A mi madre, por que fue ella quién me enseñó a estudiar, fue ella la que se sentaba conmigo a repasar la materia, fue ella quién dejó marcadas las palabras "esfuerzo", "responsabilidad" y "perseverancia". Por enseñarme que el ser estricto y riguroso en la vida, es una forma más de demostrarle a los que te rodean que los quieres.

A mi padre, por ser más que un padre, un compañero, por todos los consejos y conversaciones, por todas esas veces que con sólo una mirada, sabía qué pasaba, por todas esas veces que me recogiste y volviste a dejar de pie, por todo el esfuerzo que has hecho por sacarnos adelante.

Gracias por que yo no sería lo que hoy soy, sin ustedes.

Agradecimientos

Quiero agradecerle a mi tutor, el doctor Rolando Vernal, por todo el tiempo, dedicación y paciencia para llevar a cabo este trabajo de investigación, además de los consejos y recomendaciones que van más allá de la vida estudiantil.

A mis compañeros del laboratorio, Carla Álvarez, Jaime Díaz, Samanta Melgar, Camila Rojas, por las incontables horas que pasamos juntos entre experimentos, papers, comidas y demáses. Sin ustedes no sería lo mismo.

A mis amigos del colegio, Diego Álvarez, Pedro Cortez, Cristóbal Undurraga, y a los de la Universidad, Daniel Salinas y Daniel Negrete, por ser un apoyo constante y darme la motivación para seguir adelante y finalizar el ciclo por el cual todos pasamos.

A mi familia, por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas.

A todos los profesores y auxiliares de la Universidad por hacer de este capítulo de mi vida lo más importante, con muchos éxitos y también derrotas, pero que al final después de todo lo vivido me permite sentir seguro de lo que hago y debo hacer.

Índice

Resumen.....	8
1. Introducción.....	9
Respuesta inmune	9
Células presentadoras de antígenos: Células dendríticas	10
Respuesta inmune tipo Th1, Th2, Th17 y Treg	11
Moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86	13
Receptores de quimioquinas CCR5, CCR6 y CCR7	13
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	14
Planteamiento del problema.....	15
2. Hipótesis.....	18
3. Objetivo general	18
4. Objetivos específicos	18
5. Material y métodos	19
Cultivo y recuento de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	19
Selección de los sujetos y obtención de la muestra biológica	19
Purificación de monocitos.....	20
Diferenciación y estimulación de las células dendríticas.....	20
Análisis de fenotipo celular.....	21
Expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86.....	21
Aislamiento de mRNA citoplasmático total.....	21
Síntesis de la primera cadena de DNA	22
Expresión de citoquinas y quimioquinas mediante PCR	22
Secreción de citoquinas mediante ELISA	23

Análisis de los datos.....	24
6. Resultados	25
7. Discusión.....	31
8. Referencias bibliográficas	36
9. Anexos	45

Resumen

Las periodontitis son enfermedades infecciosas cuya causa es la interacción entre el biofilm patogénico que coloniza el microambiente subgingival y la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero. Esta interacción provoca la destrucción de los tejidos de soporte periodontal: cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar, y eventualmente puede llevar a la pérdida de los dientes.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria ampliamente asociada al inicio, progresión y severidad de las periodontitis. Sin embargo, aunque esta bacteria puede causar daño directo a los tejidos periodontales, es la respuesta inmune del hospedero inducida ante los periodontopatógenos el principal determinante del carácter destructivo de la enfermedad.

Sobre la base de la antigenicidad del polisacárido O componente del LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se describen 6 serotipos bacterianos distintos y entre ellos se ha especulado una virulencia variable y una distinta patogenicidad.

Con el objeto de establecer diferencias de inmunogenicidad que contribuirían a explicar esta variable virulencia y patogenicidad, en este trabajo de investigación se analizó la respuesta de las células dendríticas humanas al ser estimuladas *in vitro* con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, definiendo mediante PCR el tipo de receptores CCR expresado y mediante ELISA el patrón de citoquinas secretado.

Los datos obtenidos en este trabajo de investigación permiten establecer que los niveles de expresión de CCRs y de secreción de citoquinas son diferentes en las células dendríticas humanas cuando son estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, con mayores niveles de secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α cuando el microorganismo estimulante fue la cepa ATCC[®] 43718[™] (serotipo b). Por lo tanto, es factible especular que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induciría predominantemente un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y/o Th17 durante las periodontitis.

1. Introducción

Respuesta inmune

El sistema inmune está organizado en términos de células y moléculas que cumplen roles especializados para la defensa del hospedero durante las infecciones. La respuesta inmune innata y adaptativa son dos componentes fundamentales de la respuesta inmune y cumplen funciones particulares dependiendo del tipo de microorganismo infectante (1).

Durante la respuesta inmune innata, se produce tanto la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, metaloproteinasas de matriz y factores osteoactivos, como la activación y migración de células fagocíticas y citotóxicas hacia el foco infeccioso. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa implica la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T y B antígeno-específicos. Durante la presentación antigénica, las células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés: *antigen-presenting cells*) inducen la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T, cuyo receptor de célula T (TCR, del inglés: *T-cell receptor*) reconoce el antígeno, provocando la liberación de un patrón específico de citoquinas efectoras, supresoras o reguladoras dependiendo del tipo de linfocito T diferenciado. Los linfocitos B activados se diferencian a células plasmáticas con la capacidad de secretar inmunoglobulinas responsables de la eliminación de microorganismos extracelulares (1-3).

Los principales componentes de la respuesta inmune innata son: 1) las barreras físicas y químicas (saliva, fluido gingival crevicular y epitelios de piel y mucosas), 2) las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y los linfocitos citotóxicos naturales (NK, del inglés: *natural killer*), 3) las proteínas plasmáticas (factores del complemento y mediadores pro-inflamatorios), y 4) las citoquinas, las que inducen, regulan y coordinan la actividad de las células efectoras de la inmunidad innata. En términos generales, los mecanismos protectores de la inmunidad innata son inespecíficos, sin embargo, el reconocimiento de los microorganismos involucra cierto nivel de especificidad de los receptores de las

APCs (2, 4-6).

La respuesta inmune adaptativa en cambio se caracteriza por su alta especificidad, dependiendo de la naturaleza y tipo de antígeno presentado, e involucra una respuesta protectora particular dirigida al microorganismo infectante, incluso con la capacidad de generar memoria inmunológica que permite incrementar la capacidad de respuesta ante una nueva exposición (6-9).

Células presentadoras de antígenos: Células dendríticas

Las APCs son células cuya función es reconocer, fagocitar, procesar y presentar antígenos microbianos a los linfocitos T vírgenes y de memoria. Las células dendríticas son APCs que cumplen un rol fundamental durante la respuesta inmune innata y determinan el tipo de respuesta adaptativa, regulando ambos tipos de inmunidad (1, 10). Las células dendríticas se diferencian a partir de precursores de la línea de los monocitos provenientes de la médula ósea, se distribuyen a través de los vasos sanguíneos y linfáticos y se localizan principalmente en los órganos linfoides secundarios, el parénquima de los órganos no linfoides y las mucosas, por ejemplo, en el epitelio y tejido conectivo gingival (3, 11, 12). En estas localizaciones, las células dendríticas capturan los microorganismos reconociendo patrones moleculares altamente conservados expresados por los patógenos (PAMPs del inglés: *pathogen associated molecular patterns*) mediante receptores de superficie específicos, tal como los receptores tipo *toll* (TLRs, del inglés: *Toll-like receptors*) (13, 14).

Al capturar y fagocitar los microorganismos, las APCs procesan sus antígenos y los presentan, conjugados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés: *Major histocompatibility complex*), a los linfocitos T cuyo receptor TCR es específico para el antígeno presentado (3, 15). Los linfocitos T activados proliferan y adquieren la potencialidad de diferenciarse en los distintos fenotipos efectores: T colaboradores (Th, del inglés: *T-helper*) tipo Th1, Th2 y Th17, o T reguladores (Treg), dependiendo del tipo de antígeno presentado, de las moléculas co-estimuladoras expresadas por las APCs y del

patrón de citoquinas predominante en el sitio anatómico en donde ocurre la interacción celular (3, 16, 17).

Respuesta inmune tipo Th1, Th2, Th17 y Treg

La respuesta inmune del hospedero, en particular el fenotipo y función de los linfocitos Th, son determinantes de la susceptibilidad, inicio, severidad y progresión de las periodontitis, además de la respuesta al tratamiento periodontal (8, 18). En el contexto de la dicotomía Th1/Th2, tradicionalmente se ha establecido que el inicio y progresión de las periodontitis involucra predominantemente una respuesta de tipo Th1, con un perfil de citoquinas pro-inflamatorias particular: interleuquina (IL)-1 β , IL-12, interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral (TNF)- α (19). Por otro lado, una respuesta tipo Th2, con predominio de citoquinas relacionadas a una respuesta de tipo humoral e inmuno-moduladora: IL-4, IL-5 e IL-13 (16), se asocia a lesiones periodontales estables o en remisión (18, 20-27).

Aunque la dicotomía Th1/Th2 por muchos años ha contribuido a explicar la patogenia de las periodontitis, la evidencia actual ha establecido que, asociado a un patrón de respuesta tipo Th1, una respuesta tipo Th17, con un patrón de citoquinas específico: IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23 y RANKL, es determinante de la historia natural de la enfermedad periodontal, en particular la reabsorción del hueso alveolar característica de las periodontitis (28-35).

En este contexto, la identificación de RANKL (del inglés: *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) como un factor osteo-destructivo producido por los linfocitos Th17 capaz de inducir la diferenciación y activación de osteoclastos, permitió asociar la respuesta inmune inducida en los tejidos periodontales ante los periodonto-patógenos a la reabsorción ósea periodontal (28, 30, 36-38). En efecto, los linfocitos Th17 activos promueven la osteoclastogénesis mediante la producción de RANKL e IL-17. RANKL actúa directamente sobre los precursores de osteoclastos y los osteoclastos maduros e IL-17 promueve la producción de RANKL en forma indirecta, favoreciendo la inflamación local al inducir el reclutamiento y activación de macrófagos, los que a su vez sintetizan citoquinas pro-inflamatorias, tal

como IL-1 β y TNF- α , que finalmente promueven la expresión de RANKL en los osteoblastos periodontales (38-40).

Un incremento en los niveles de IL-17, tanto a nivel de mRNA como de proteína, fueron detectados en el fluido crevicular gingival y en biopsias de lesiones periodontales en pacientes con periodontitis crónica y estos mayores niveles se asociaron a la actividad de linfocitos Th17 (41-44). Además, una sobre-expresión en los niveles de RORC2, factor de transcripción que determina la diferenciación selectiva del fenotipo Th17, se ha detectado mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *polymerase chain reaction*) en tiempo-real en lesiones periodontales activas de pacientes con periodontitis progresiva (26). En conjunto, estos datos permiten establecer que, durante las periodontitis, los linfocitos Th17 representan el subtipo Th osteoclastogénico, induciendo la diferenciación y activación de osteoclastos y reabsorción ósea alveolar mediante la síntesis de IL-17 y RANKL.

Los linfocitos Treg se han descrito como un subtipo linfocitario protector que cumple un rol en la mantención de la salud periodontal (45-47). Su patrón de citoquinas incluye IL-10 y factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 (19, 48). Los linfocitos Treg regulan la activación, proliferación y función de los linfocitos Th efectoros activos, determinando el resultado en distintos escenarios inmunológicos, tales como enfermedades infecciosas (periodontitis) y enfermedades autoinmunes (49-52).

Se ha demostrado que los linfocitos Treg CD4⁺Foxp3⁺ migran hacia los tejidos periodontales durante la infección y su inhibición se asocia a una mayor inflamación tisular y reabsorción del hueso alveolar (53). Recientemente se ha propuesto que los linfocitos Treg son detectables en las lesiones periodontales activas en pacientes afectados de periodontitis; sin embargo, ellos no llevan a cabo su función reguladora al no producir TGF- β 1 e IL-10, favoreciendo un incremento de las citoquinas asociadas al fenotipo Th17: RANKL e IL-17 (26).

Moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86

Para que los linfocitos T vírgenes se activen, durante la presentación antigénica se requieren 2 señales inmunológicas aportadas por las células dendríticas (54). La primera señal es antígeno-específica e involucra el reconocimiento por el TLR de los linfocitos T del complejo MHC/antígeno expresado por las células dendríticas. La segunda señal, o señal co-estimuladora, involucra la expresión de moléculas co-estimuladoras que interactúan con receptores específicos en los linfocitos T vírgenes (55).

CD80 y CD86 son moléculas co-estimuladoras expresadas por las células dendríticas y se caracterizan por interactuar específicamente con el receptor CD28 constitutivamente expresado por los linfocitos T (56, 57). Los niveles de CD28 se sobre-expresan una vez activados los linfocitos T y la unión adicional de CD28 con CD80 y CD86 aumenta la proliferación celular y la secreción de citoquinas (55).

La señalización CD80/CD28 y CD86/CD28 involucra distintas vías de señalización intracelular. Estas incluyen las vías calcio-calcineurina, RAS y factor nuclear kappa-B (NFkB), esta última determinante de la síntesis de citoquinas, en particular de IL-2 que actúa como factor de supervivencia autocrino de los linfocitos T activos (58).

Receptores de quimioquinas CCR5, CCR6 y CCR7

Entre los distintos y complejos eventos de señalización celular que ocurren durante el proceso inflamatorio, las quimioquinas cumplen un rol preponderante en la regulación del tráfico de los leucocitos y definen el reclutamiento de las células dendríticas y los linfocitos T a los sitios anatómicos infectados (59).

Las quimioquinas son citoquinas quimio-atrayentes que inducen la migración a favor de un gradiente de concentración de las células que expresan sus receptores CCR (del inglés: *chemokine cell-receptor*) específicos.

La migración de las células dendríticas cumple un rol determinante en el desenlace de la enfermedad periodontal y la expresión coordinada de

quimioquinas inflamatorias y CCRs en los tejidos periodontales controla el flujo de ellas hacia el sitio infectado. En efecto, tanto alteraciones en la expresión de los receptores CCR, como un comportamiento quimiotáctico alterado de las células dendríticas, se asocian al inicio de periodontitis (60) y a las formas severas de enfermedad (61).

Recientemente, se ha propuesto que la expresión selectiva de CCRs en las células dendríticas contribuiría a determinar la diferenciación selectiva de los distintos fenotipos de linfocitos T colaboradores y, de esta forma, el tipo de respuesta inmune inducido. Así, un patrón de respuesta tipo Th1 se asociaría a la expresión de CCR2, CCR5 y CCR6 (62, 63) y un patrón de respuesta tipo Th2 a la expresión de CCR3, CCR4 y CCR8 (64). Por otro lado, un patrón de respuesta tipo Th17 se asociaría a la expresión de CCR4, CCR6 y CCR7 (65, 66), siendo CCR4 y CCR6 los receptores de quimioquinas que participarían en la activación y migración de linfocitos Th17 (67) y CCR7 el determinante de la maduración selectiva final mediada por IL-23 (68).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es un cocobacilo Gram negativo, pequeño, no mótil, anaerobio facultativo, microaerofílico y capnófilico (69, 70), miembro del género *Aggregatibacter* perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (71). En cultivo, las colonias tienen forma circular aplanada con borde festoneado, generalmente con una forma de estrella central (72, 73).

Varias líneas de investigación evidencian el rol etiológico de *A. actinomycetemcomitans* en la periodontitis agresiva y las formas sindrómicas de periodontitis (74-81). Además se ha relacionado con el desarrollo de trastornos cardíacos, endocarditis, aterosclerosis y neumonía (77, 82-85).

En los tejidos periodontales afectados, *A. actinomycetemcomitans* se adhiere e invade las células epiteliales gingivales, induce la sobre-expresión e incrementa el grado de fosforilación de las proteínas de señalización intracelular en los fibroblastos gingivales y estimula en ellos la producción de

metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés: *matrix metalloproteinases*), inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs, del inglés: *tissue inhibitor of metalloproteinases*) y activador del plasminógeno (t-PA, del inglés: *tissue plasminogen activator*). En particular, durante la periodontitis, el lipopolisacárido (LPS) de *A. actinomycetemcomitans* induce la secreción t-PA, MMP-2 y MMP-3, inhibe la proliferación y función de los osteoblastos e induce la diferenciación y activación de osteoclastos, alterando el metabolismo del tejido conectivo gingival y periodontal y contribuyendo a la reabsorción ósea alveolar (86-88).

Sobre la base de la antigenicidad del polisacárido O componente del LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se describen 6 serotipos bacterianos distintos, denominados a-f (89-91), siendo los serotipos a, b y c los detectados más frecuentemente en sujetos caucásicos, asiáticos y latinoamericanos y el serotipo b el más asociado a la etiología de la periodontitis agresiva (77-81, 92, 93). La predominancia del serotipo b en pacientes con periodontitis agresiva sugiere un alto potencial patogénico, aún no establecido (94). Se ha reportado que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* resiste la fagocitosis y evade la respuesta inmune de los macrófagos y neutrófilos (95), mientras que los serotipos a y c son capaces de inducir la síntesis de IL-1 β en macrófagos (96).

Planteamiento del problema

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades infecciosas caracterizadas por la inflamación crónica y destrucción de los tejidos periodontales y por constituir una causa importante de pérdida de dientes (8, 31, 97, 98). Las periodontitis son altamente frecuentes en la población chilena, donde dos tercios de los individuos entre 65 y 74 años y un tercio entre 35 y 44 años tiene pérdida severa (≥ 6 mm) de inserción dentaria (99). En términos generales, las periodontitis son un factor modificante de la salud sistémica de los individuos, asociándose a la presencia y severidad de la diabetes (100), aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares (101), trastornos pulmonares, parto prematuro y bajo peso del neonato (102, 103).

La biopelícula patogénica subgingival, constituida principalmente por bacterias

anaerobias Gram-negativas, es el factor etiológico determinante del inicio y progresión de las periodontitis (104-108). Sin embargo, aunque las bacterias patógenas pueden causar daño directo a los tejidos periodontales, su patogenicidad radica principalmente en la inducción de una respuesta inmuno-inflamatoria en el hospedero, principal responsable de la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes: ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar.

Las células dendríticas reciben señales específicas a través de los receptores reconocedores de patrón (PRRs, del inglés: *pattern recognition receptor*) distribuidos en su superficie celular, los que reconocen PAMPs expresados por las bacterias patógenas periodontales. Durante la presentación antigénica, las células dendríticas activan a los linfocitos T y determinan la diferenciación selectiva de los distintos fenotipos efectores Th (12). Por tanto, es razonable asumir que las bacterias pueden determinar el tipo de respuesta de las células dendríticas y los linfocitos T y, de esta forma, la secreción de un patrón de citoquinas patógeno-específico durante la infección (109, 110).

Estudios recientes han analizado la respuesta *in vitro* de las células dendríticas, generadas a partir de monocitos de sangre periférica humana, al ser estimuladas con *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* o los distintos serotipos capsulares (K1-K6) de *P. gingivalis*, demostrando que *A. actinomycetemcomitans* es inmunogénicamente más potente que *P. gingivalis* (111) y que existen diferencias cualitativas y cuantitativas en la síntesis de citoquinas ante los diferentes serotipos K de *P. gingivalis* (112). En este contexto, es factible especular que los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* podrían también inducir una respuesta diferencial en las células dendríticas y podrían determinar un tipo particular de respuesta Th.

Aunque *A. actinomycetemcomitans* se detecta frecuentemente en los sacos periodontales de pacientes afectados de periodontitis agresiva, también es identificable, aunque en menor proporción, en los sitios periodontales de sujetos sanos e individuos en terapia periodontal de soporte, post-tratamiento periodontal (106, 113-118). En este contexto, es factible especular una patogenicidad e inmunogenicidad variable entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*

y, por lo tanto, considerar que en individuos sanos y pacientes con periodontitis los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* presentes son distintos (115).

En este trabajo de investigación se analizará la respuesta de las células dendríticas humanas al ser estimuladas *in vitro* con los serotipos más frecuentemente detectados de *A. actinomycetemcomitans*.

2. Hipótesis

La respuesta de las células dendríticas es distinta cuando son estimuladas *in vitro* con los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

3. Objetivo general

Caracterizar el patrón de respuesta inmune *in vitro* de las células dendríticas humanas al ser estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

4. Objetivos específicos

- Cuantificar los niveles de expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

- Determinar la expresión de los receptores de quimioquinas CCR5, CCR6 o CCR7 en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

- Cuantificar los niveles de secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

5. Material y métodos

Cultivo y recuento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

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) y fueron incubadas a 37°C en condiciones de capnofilia (O₂ 8% y CO₂ 12%) usando generadores CampyGen[™] (Oxoid Ltd).

Para obtener número similar de microorganismos de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* para la estimulación celular, cada una de las cepas bacterianas se inoculó en 5 mL de caldo de cultivo infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd, Hampshire, England) hasta alcanzar un nivel McFarland de 5 (bioMérieux[®] SA, Marcy l`Etoile, France). Diluciones seriadas log₁₀ de -1 a -9 fueron realizadas con amortiguador fosfato salino (PBS) estéril y 100 µL de cada dilución fueron utilizados para la estimulación celular.

El número de microorganismos de cada punto de estimulación celular fue establecido sembrando 100 µL de las diluciones -4, -5 y -6 en placas con medio de cultivo agar infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd, Hampshire, England) incubadas en condiciones de capnofilia. Luego de 2 días, el número de UFC/mL de cada serotipo bacteriano fue establecido mediante recuento manual utilizando una lupa estereoscópica (STEMI 2000-C, Carl Zeiss Microscopy GMBH, Germany).

Selección de los sujetos y obtención de la muestra biológica

Muestras de sangre periférica se obtuvieron de 8 sujetos donantes sanos del Banco de sangre del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, seleccionados por el método no probabilístico por conveniencia. A partir de las leuco-reducciones obtenidas durante el proceso de plaquetoféresis, se purificaron los monocitos circulantes, los que posteriormente fueron diferenciados a células dendríticas *in vitro* (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).

Purificación de monocitos

A partir de las muestras de sangre obtenidas, se aislaron las células mononucleares (PBMCs) usando una gradiente de Ficoll® de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Los monocitos se purificaron desde las PBMCs mediante separación inmuno-magnética (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany). Brevemente, las PBMCs se lavaron 4 veces en PBS y luego se incubaron con un anticuerpo monoclonal (mAc) de ratón anti-CD14 humano conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 15 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron y se resuspendieron en 500 µL PBS frío y los monocitos se purificaron usando columnas de separación MS montadas en un campo electro-magnético. La fracción de células CD14⁺ separadas corresponden a los monocitos, los cuales se contabilizaron usando una cámara de Neubauer y su fenotipo se confirmó usando anticuerpos específicos mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

Diferenciación y estimulación de las células dendríticas

Los monocitos purificados se sometieron inmediatamente a un protocolo estandarizado de diferenciación a células dendríticas (111, 112). Los monocitos CD14⁺ se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células/mL en 3 mL de medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) y 20 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrofagos e IL-4 (R&D, Minneapolis, MN USA). Luego de 6 días, las células dendríticas diferenciadas se estimularon con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* a una multiplicidad infectante incremental (MOI) de 10^{-1} - 10^2 (razón bacterias/células dendríticas) durante 2 días. Como control positivo, células dendríticas se estimularon con 10 ng/mL del LPS de *Escherichia Coli* cepa 0111:B4 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland). Células dendríticas no

estimuladas se utilizaron como control negativo. La diferenciación y activación de las células dendríticas se evaluó con anticuerpos específicos mediante citometría de flujo.

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 cuantificó mediante citometría de flujo usando los siguientes mAc de ratón anti-humano conjugados con fluorocromos PE, FITC o PE/Cy5: anti-CD14 (monocitos), CD1a (células dendríticas inmaduras), y CD83 (células dendríticas maduras) (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA) y utilizando un equipo FACScan de citometría (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86

Con el objeto de comparar los niveles de activación de las células dendríticas ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, la expresión de las moléculas co-estimuladoras de la presentación antigénica CD80 y CD86 se evaluó mediante citometría de flujo usando mAc de ratón anti-humano conjugados con fluorocromos PE y FITC, respectivamente (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA).

Aislamiento de mRNA citoplasmático total

Luego de ser estimuladas, las células dendríticas se lavaron dos veces en PBS y se lisaron en 400 µL de solución de lisis compuesta de Igepal[®] CA-630 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 50 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂, suplementado con 10 mM del complejo vanadyl-ribonucleosido (VRC) usado como inhibidor de RNAsas (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La lisis celular completa se llevó a cabo resuspendiendo vigorosamente las células

dendríticas diez veces en la solución de lisis. El núcleo fue removido por centrifugación a 14.000 xg durante 10 seg y 400 µl del sobrenadante fueron sometidos a digestión con 25 µg/mL de proteinasa K (Roche Ltd, Basel, Switzerland), en presencia de sulfato de sodio dodecil (SDS) 1% y 15 mM de EDTA (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), por 30 min a 37°C. Posteriormente, el RNA citoplasmático total fue extraído con 400 µL de solución cloropan (fenol:cloroformo:isoamylalcohol, 25:24:1), centrifugado a 14.000 xg durante 10 min a temperatura ambiente (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El RNA presente en la solución acuosa se precipitó toda la noche a -20°C con 0,3 M de acetato de sodio, 1 mL de etanol 100% y 1 µL de glicógeno (20 µg/µL) (Roche Ltd, Basel, Switzerland), se recuperó por centrifugación a 14.000 xg durante 30 min y se resuspendió en 30 µL de agua libre de RNAsas. El RNA obtenido se evaluó utilizando un bioanalizador (Agilent 2100B; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) y se cuantificó usando un espectrofotómetro (Bio-Tek, Winooski, VT, USA), para almacenarlo a -80°C a una concentración final de 1 µg/µL.

Síntesis de la primera cadena de DNA

A partir de 5 µg de RNA total se procedió a la síntesis de la primera cadena de DNA complementario (cDNA) mediante transcripción reversa, utilizando el kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Brevemente, 5 µL de RNA fueron retrotranscritos en presencia de 1 µL de random hexamers primers, 1 µL de annealing buffer, 10 µL de First-Strand Reaction Mix, 2 µL de SuperScript[®] III Enzyme Mix y 5 µL de H₂O libre de RNAsas mediante incubación por 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C.

Expresión de citoquinas y quimioquinas mediante PCR

La expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN-γ y TNF-α, y de los receptores de quimioquinas CCR5, CCR6 y CCR7,

se analizó mediante PCR. Brevemente, 250 ng de cDNA fueron amplificados utilizando partidores específicos (Tabla 1) y el kit GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, WI, USA), siguiendo el siguiente protocolo: 95°C durante 2 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 min y 74°C durante 30 segundos, y una incubación final para la inactivación enzimática a 74°C durante 5 minutos. La amplificación se evaluó mediante electroforesis en gel agarosa 2% revelado con GelRed[™] (Biotium, Hayward, CA, USA) y fotografiado usando un fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro (Carestream Gel Logic, Rochester, NY, USA). Como control positivo, la expresión de los mRNA de las citoquinas fue analizada en linfocitos T Jurkat E61.2 estimulados en presencia de los anticuerpos anti-CD3 y CD28. Como control de amplificación, en cada una de las muestras se analizó la expresión de la subunidad 18S del RNA ribosomal.

Citoquinas/CCRs	Partidor Forward	Partidor Reverse
IL-1 β	ctgtcctgcgtgtgaaaga	ttgggtaatTTTTGGGatctaca
IL-5	ctctgaggattcctgttctctgt	cagtacccccctgcacagtt
IL-6	gccagctatgaactcctct	gaaggcagcaggcaacac
IL-10	tgggggagaacctgaagac	ccttgctctgttttcacagg
IL-12	cactcccaaacctgctgag	tctcttcagaagtgaagggt
IL-23	agcttcatgcctcctactg	ctgctgagtctcccagtggt
IFN- γ	ggcatttgaagaattggaaag	tttggatgctctggatctt
TNF- α	cagcctcttctcctctgat	gccagagggctgattagaga
CCR5	ctgggtgggtgctgtgt	gaccagccccaagatgacta
CCR6	actgtggctgttggttgtg	tcagccccttcagctcac
CCR7	ggctgataagctaaccagaca	ttggttaggggacaatagcc
18S rRNA	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

Tabla 1: Partidores utilizados para la amplificación de los mRNA de las citoquinas y receptores de quimioquinas (CCRs) mediante PCR. La expresión de la subunidad 18S del RNA ribosomal (18S rRNA) fue utilizada como control de amplificación.

Secreción de citoquinas mediante ELISA

Luego de la estimulación de las células dendríticas, se recuperó el sobrenadante del cultivo celular mediante centrifugación a 5.000 xg durante 10

min. A partir de 100 o 200 μ L del sobrenadante de cultivo celular se cuantificó la secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA) y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Análisis de los datos

Los datos de la citometría de flujo se analizaron con el software WinMDi 2.9 (The Scripps Research Inst., La Jolla, CA, USA), se presentaron como histogramas y se cuantificaron como porcentaje promedio \pm desviación estándar de células positivas. Los niveles de citoquinas evaluados mediante ELISA se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS 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 CD80 y CD86 se analizaron mediante la prueba χ^2 y los niveles de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α se analizaron utilizando las pruebas ANOVA y de Tukey o las pruebas de Kruskal-Wallis y de Dunn. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando *p-value* < 0,05.

6. Resultados

A partir de las PBMCs aisladas de sangre periférica, se obtuvo una población de monocitos de alta pureza, demostrado por los elevados niveles de expresión del marcador específico CD14 (>97%) (Figura 1). Un alto porcentaje de ellos (>98%) se diferenciaron 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).

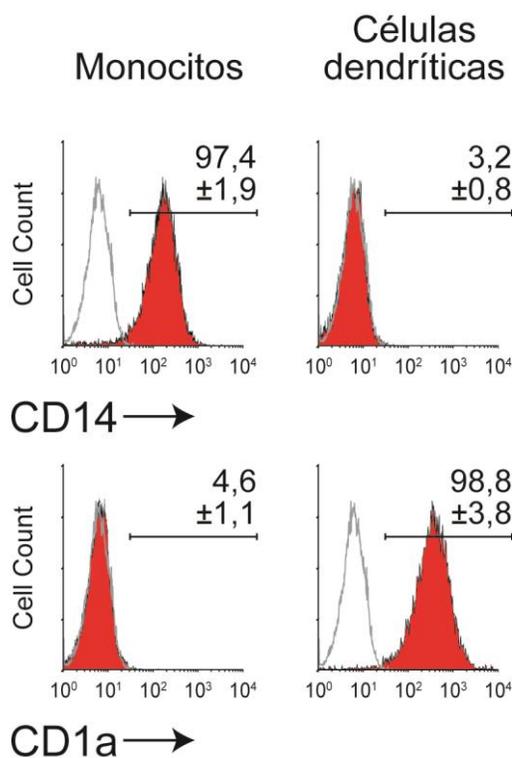


Figura 1. **Purificación de monocitos y diferenciación de células dendríticas.** Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de monocitos (células CD14⁺) a partir de las PBMCs y de su diferenciación a células dendríticas (células CD1a⁺) en presencia de GM-CSF e IL-4. Los histogramas mostrados son un experimento representativo y los valores de cada histograma representan el porcentaje (%) promedio \pm desviación estándar de células positivas de 4 experimentos independientes.

La Figura 2 muestra los niveles de activación de las células dendríticas ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Tal como se demuestra por los elevados niveles del marcador de células dendríticas maduras CD83 y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, los niveles de activación de las células dendríticas fueron altos (>95%), sin detectarse diferencias entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (CD83 $p=0,938$, CD80 $p=0,532$ y CD86 $p=0,933$).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

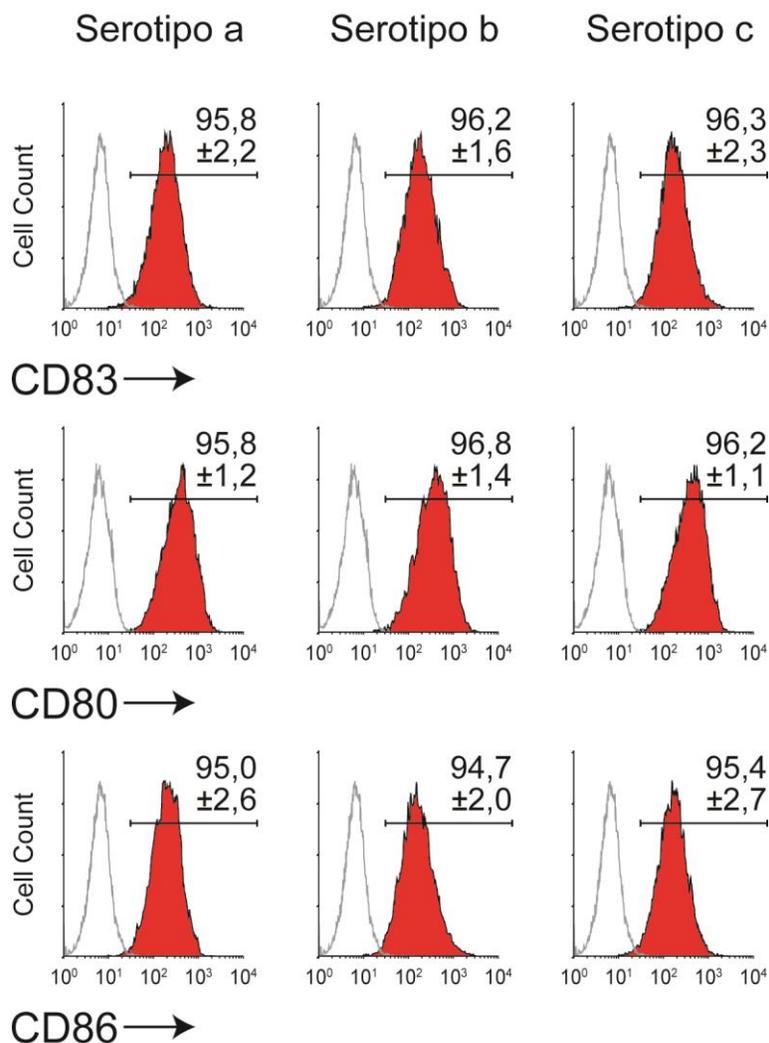


Figura 2. Activación de las células dendríticas ante los serotipos a, b y c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de expresión de CD83 (marcador de células dendríticas maduras), CD80 y CD86 (moléculas co-estimuladoras) que evidencian la activación de las células dendríticas luego de la estimulación durante 48 horas con las cepas ATCC[®] 43717[™] (serotipo a), ATCC[®] 43718[™] (serotipo b) y ATCC[®] 43719[™] (serotipo c) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Los histogramas mostrados son un experimento representativo y los valores de cada histograma representan el porcentaje (%) promedio \pm desviación estándar de células positivas de 4 experimentos independientes.

La expresión de los mRNA de los receptores de quimioquinas CCR5, CCR6 y CCR7 y las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α en células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se muestran en la Figura 3. Niveles variables de expresión de CCR5, CCR6 y CCR7 fueron detectados en las células dendríticas ante la estimulación microbiana, con mayor intensidad de expresión de CCR5 y sin detectarse diferencias ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. La expresión de citoquinas fue característica de un patrón de respuesta tipo Th1 y Th17 y fue concordante con los niveles secretados a nivel de proteínas. En efecto,

elevados niveles de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fueron detectados, con un efecto dosis-respuesta dependiente de la MOI de microorganismos estimulantes (Figura 4). Los niveles de secreción de IL-5 e IL-10 fueron marginales, no observándose producción dependiente de la dosis.

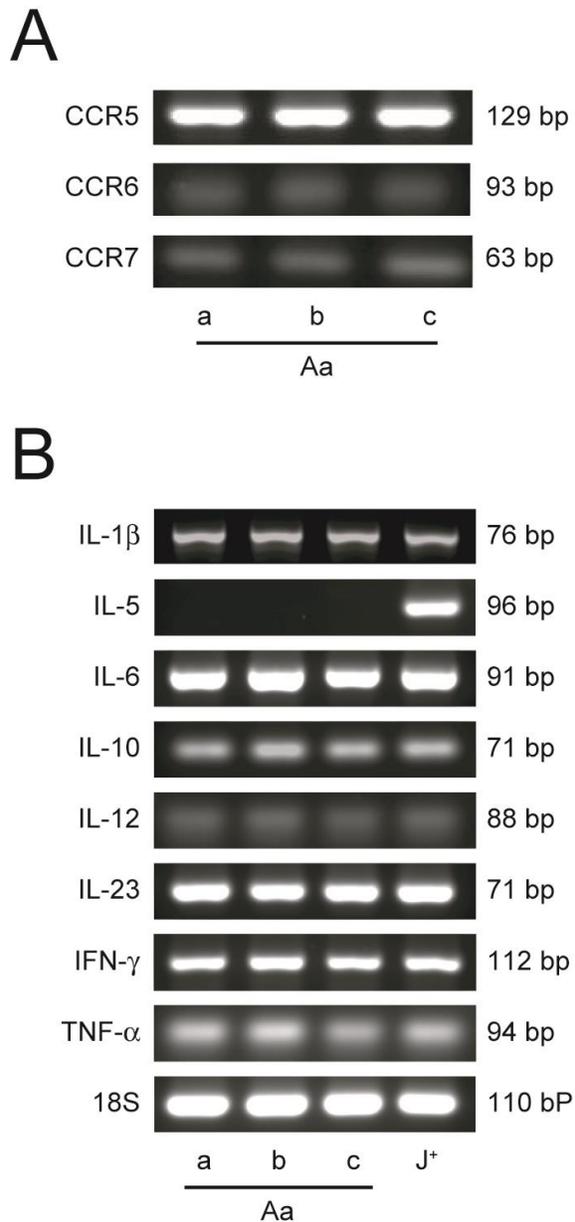


Figura 3. Expresión de receptores de quimioquinas y citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b y c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. La expresión de los mRNA de (A) los receptores de quimioquinas CCR5, CCR6 y CCR7 y (B) las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fue determinada mediante PCR en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con las cepas ATCC[®] 43717[™] (serotipo a), ATCC[®] 43718[™] (serotipo b) y ATCC[®] 43719[™] (serotipo c) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Como control positivo, la expresión de los mRNA de las citoquinas fue determinada en linfocitos T Jurkat E61.2 estimulados con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y CD28 (J⁺). Como control de técnica, se analizaron los niveles de expresión de la subunidad 18S de rRNA (18S). CCR: receptor de quimioquinas (del inglés: chemokine cell-receptor), IFN: interferón, IL: interleuquina, mRNA: RNA mensajero, MOI: multiplicidad infectante incremental (del inglés: multiplicity of infection), PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: polymerase chain reaction), rRNA: RNA ribosomal, TNF: factor de necrosis tumoral.

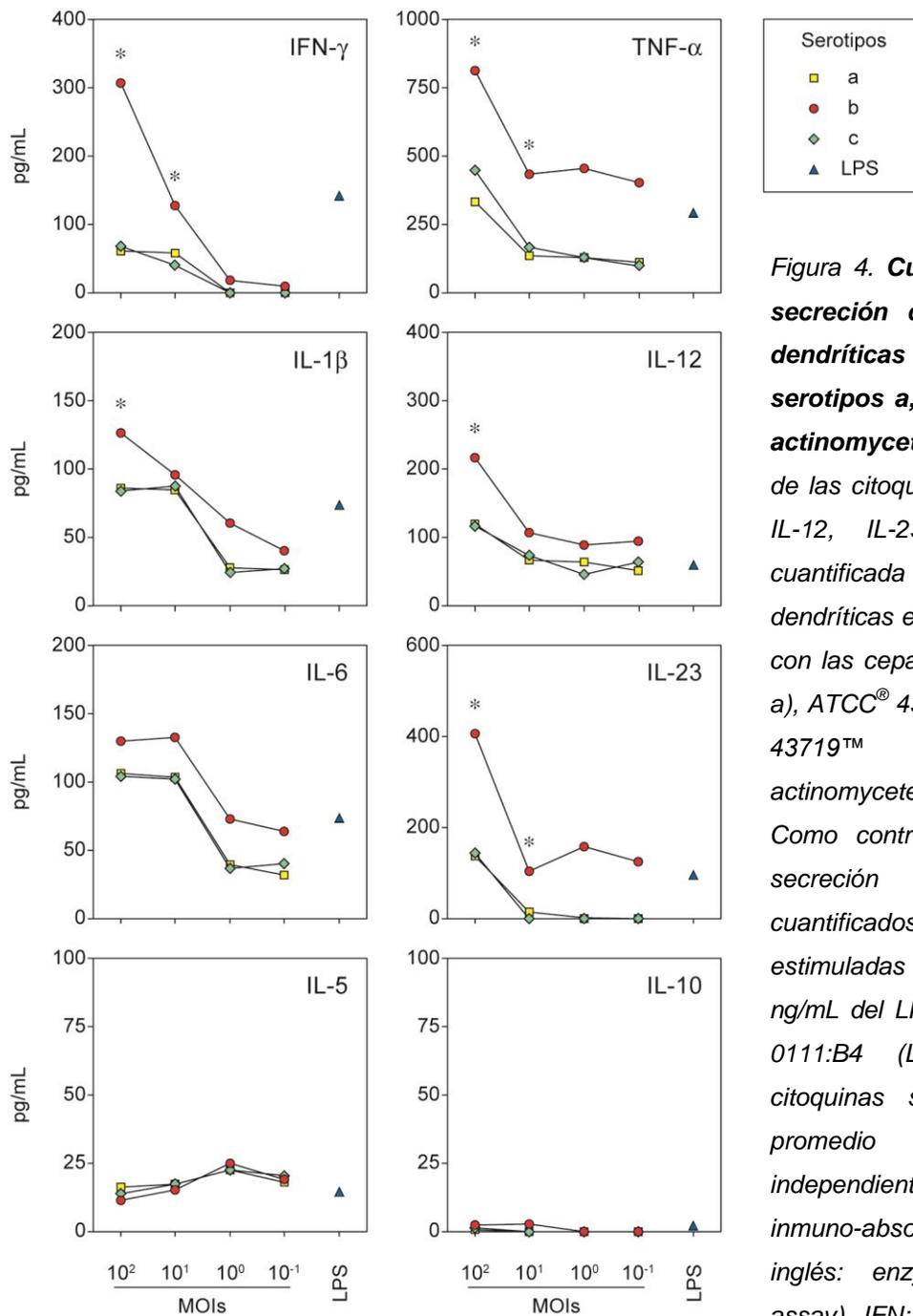


Figura 4. Curva dosis-respuesta de la secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b y c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. La secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fue cuantificada mediante ELISA en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con las cepas ATCC[®] 43717[™] (serotipo a), ATCC[®] 43718[™] (serotipo b) y ATCC[®] 43719[™] (serotipo c) de *A. actinomycetemcomitans* (MOIs=2 a -1). Como control positivo, los niveles de secreción de citoquinas fueron cuantificados en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con 10 ng/mL del LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4 (LPS). La secreción de citoquinas se expresa como niveles promedio de 8 experimentos independientes. ELISA: Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (del inglés: enzyme-linked immunosorbent assay), IFN: interferón, IL: interleuquina, LPS: lipopolisacárido, MOI: multiplicidad infectante incremental (del inglés: multiplicity of infection), TNF: factor de necrosis tumoral. *p<0,05.

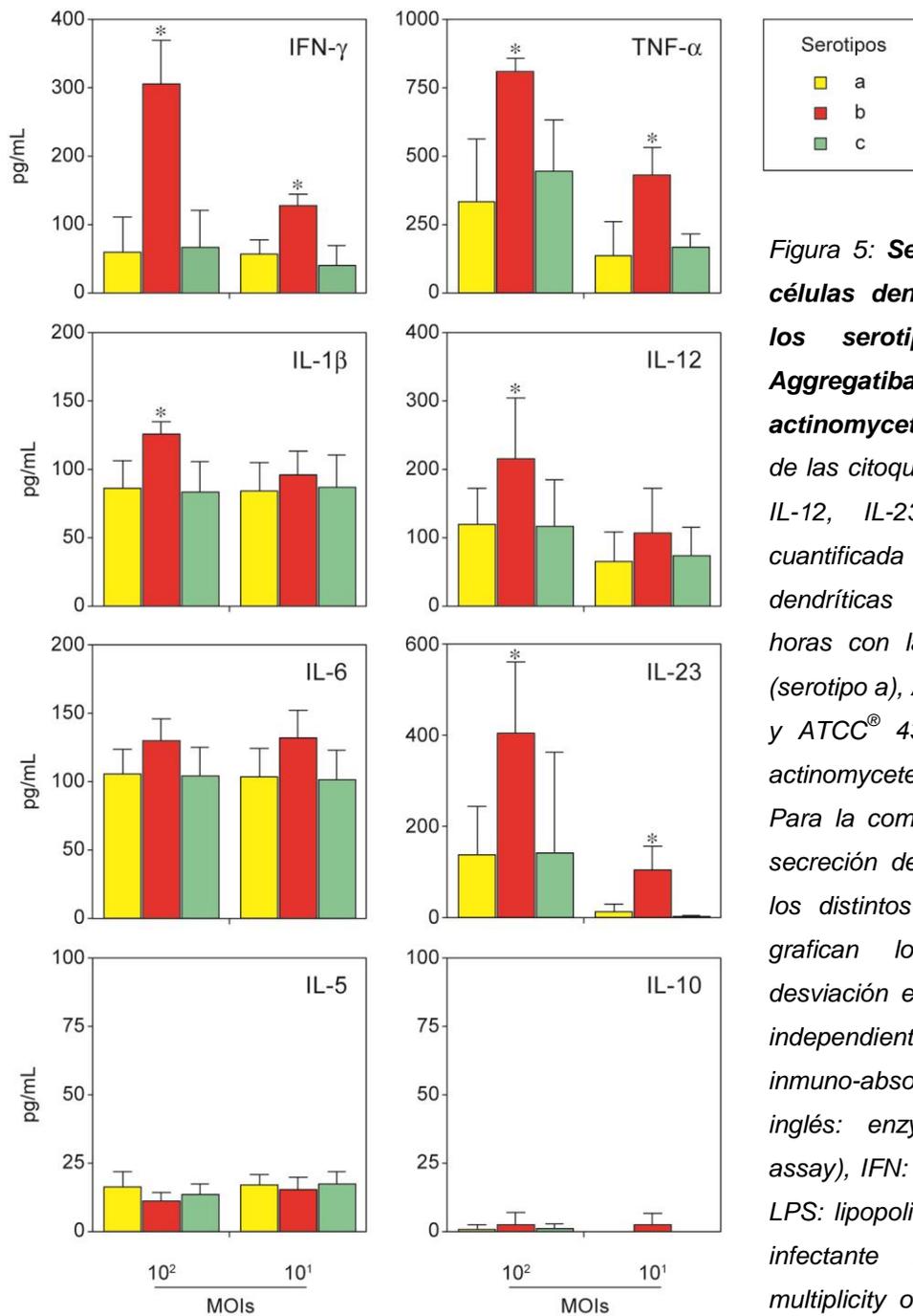


Figura 5: Secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b y c de *Aggregatibacter*

***actinomycetemcomitans*.** La secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fue cuantificada mediante ELISA en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con las cepas ATCC[®] 43717[™] (serotipo a), ATCC[®] 43718[™] (serotipo b) y ATCC[®] 43719[™] (serotipo c) de *A. actinomycetemcomitans* (MOIs=2 a -1). Para la comparación de los niveles de secreción de citoquinas inducidas ante los distintos serotipos bacterianos, se grafican los niveles promedio \pm desviación estándar de 8 experimentos independientes. ELISA: Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (del inglés: enzyme-linked immunosorbent assay), IFN: interferón, IL: interleuquina, LPS: lipopolisacárido, MOI: multiplicidad infectante incremental (del inglés: multiplicity of infection), TNF: factor de necrosis tumoral. * $p < 0,05$.

Mayores niveles de IL-1 β , IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fueron secretados por las células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en comparación a los otros serotipos bacterianos (Figura 5). Estas diferencias fueron detectadas a MOI=2 para las citoquinas tipo Th1 IL-1 β (p=0,048), IL-12 (p=0,042), IFN- γ (p<0,0001) y TNF- α (p<0,001), y para la citoquina tipo Th17 IL-23 (p=0,015), y a MOI=1 para las citoquinas tipo Th1: IFN- γ (p=0,003) y TNF- α (p=0,002), y la citoquina tipo Th17: IL-23 (p<0,001). Para las citoquinas tipo Th2: IL-5 y tipo Treg: IL-10 no se detectaron diferencias entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Además, no se observaron diferencias de secreción para ninguna citoquina entre los serotipos a y c de *A. actinomycetemcomitans*.

7. Discusión

A. actinomycetemcomitans es un microorganismo patógeno periodontal asociado a la etiología de las periodontitis crónica y agresiva (79). En efecto, la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* en las lesiones periodontales de pacientes afectados de la enfermedad es 90% en jóvenes y 50% en adultos (119). Sin embargo, aunque con menor frecuencia, es factible detectar la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en sujetos sanos (20% en jóvenes y 36% en adultos) y pacientes tratados con éxito de periodontitis (119).

Sobre la base de la antigenicidad del polisacárido O componente del LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se han descrito 6 serotipos bacterianos distintos: a-f (89-91), siendo los serotipos a, b y c los más frecuentemente detectados en humanos (77).

Las variaciones en la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* entre las distintas formas de periodontitis, la detección en sujetos sanos y la persistencia en el ambiente subgingival de sujetos sanos posterior al tratamiento periodontal exitoso podrían deberse a una distribución distinta de los distintos serotipos bacterianos dependiendo del estado clínico periodontal del sujeto (120, 121). En efecto, se ha establecido que el serotipo a fue detectado más frecuentemente en sujetos sanos (46%), el serotipo b en pacientes con periodontitis agresiva (46%) y el serotipo c en pacientes con periodontitis crónica (41%) (122).

Recientemente, utilizando nuevas técnicas de análisis microbiológico (PCR cuantitativa en tiempo real), se ha establecido que *A. actinomycetemcomitans* posee una mayor capacidad inmunogénica en comparación a *P. gingivalis*, induciendo una mayor expresión de citoquinas en células dendríticas humanas (112). Por otro lado, también se ha establecido que entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* existe una asociación variable a la enfermedad (123). Así, la mayor frecuencia de detección del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis agresiva podría asociarse a un mayor potencial patogénico del microorganismo, asociado a una mayor inmunogenicidad y virulencia (94). En este sentido, el serotipo b evade más eficazmente la fagocitosis

por macrófagos (77), inhibe con mayor intensidad la proliferación de macrófagos y neutrófilos (95), produce mayor cantidad de microvesículas citotóxicas (124) e induce un incremento en la secreción de IgG, IgM e IgA en linfocitos B activados (125). Sin embargo, el rol de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* en las células dendríticas y en los linfocitos TCD4⁺ aún no se ha descrito.

Los datos obtenidos en este trabajo de investigación nos permiten establecer que los niveles de expresión de CCRs y de secreción de citoquinas son diferentes en las células dendríticas humanas cuando son estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

En las infecciones en donde existe un predominio de una respuesta inmune tipo Th1, se observa una mayor expresión de CCR2, CCR5, CXCR3 y CCR1 en los linfocitos T activados (126). Nuestros resultados demuestran que en las células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* se detecta una mayor expresión de CCR5, la que participaría activamente en el control de la migración y la activación de linfocitos Th1 en los tejidos periodontales infectados (127). En efecto, su bloqueo selectivo provoca una disminución del infiltrado linfocitario periodontal y menores niveles de reabsorción ósea asociada a la periodontitis (128).

Los linfocitos Th17 son principalmente CCR6⁺ y expresan además CXCR3, CCR5, CCR7, CD62L, $\alpha 4\beta 7$, CCR4, CCR9, CXCR5 y CXCR6 (129, 130). En nuestro estudio, ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, se detectó una mayor expresión de CCR6 y CCR7. El receptor de quimioquinas CCR6 es inducido en los linfocitos Th17 ante la presencia de TGF- β , y, asociado a la señalización mediante CCR7, determinaría la activación y diferenciación selectiva vía IL-23 (67, 68). En conjunto, se podría especular que *A. actinomycetemcomitans* podría inducir una respuesta linfocitaria predominantemente Th1 al inducir en las células dendríticas la expresión de CCR5 durante la presentación antigénica, además de una respuesta tipo Th17 al inducir la expresión de CCR6 y CCR7.

Durante la respuesta inmune efectora tipo Th1, IFN- γ se ha detectado en elevados niveles en lesiones progresivas y/o severas (27) y estos elevados niveles

se han asociado a un incremento en la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 y a la pérdida de inserción conectiva y reabsorción ósea alveolar durante las periodontitis (131-134).

IL-1 β es una citoquina que media la inflamación y es conocida como un factor de activación de osteoclastos (135), mientras que IL-6 participa en el proceso de diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas, la diferenciación selectiva de linfocitos Th17, la liberación de proteínas de fase aguda, la activación de la cascada del complemento y la inhibición de la diferenciación de linfocitos Treg Foxp3⁺ (136, 137). Además, IL-1 β , TNF- α e IL-6 tienen particular importancia en la maduración y migración de las células dendríticas, en la interacción de ellas con los linfocitos T durante la presentación antigénica y en la definición del estado clínico de la enfermedad (138). En forma similar a IL-1 β e IL-6, un incremento en los niveles de IL-12 e IL-23 ha sido detectado en pacientes con periodontitis comparado con individuos sanos (139) y estos se han asociado a la actividad de las células dendríticas (112, 140). Además, en conjunto con IL-6 y TGF- β , son capaces de inducir la diferenciación selectiva de linfocitos Th17.

En este trabajo de investigación, un incremento en los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fue detectado en las células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos *A. actinomycetemcomitans*, con mayores niveles de secreción cuando el microorganismo estimulante fue la cepa ATCC[®] 43718[™] (serotipo b).

La variabilidad en la secreción de citoquinas durante las periodontitis podría explicarse por las diferencias de concentración de patógenos o antígenos microbianos presentes en los sitios infectados. En efecto, en el biofilm subgingival es posible detectar diferentes concentraciones de bacterias periodonto-patógenas, que dependen, por ejemplo, de las condiciones del ambiente local (141), y la concentración y composición del biofilm subgingival puede variar entre un individuo sano y un paciente con periodontitis y entre sitios sanos y lesiones periodontales en el mismo individuo (142), pudiendo relacionarse estas variaciones con la presencia de un serotipo o bacteria en particular.

En este estudio se evidenciaron los niveles de secreción de citoquinas y de

expresión de CCRs por las células dendríticas ante distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y se proyecta su potencial rol 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 en este trabajo podemos especular que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induciría una diferenciación predominantemente de linfocitos Th1 y/o Th17.

Esta especulación es concordante con datos previos obtenidos por nuestro grupo de investigación. En efecto, cuando las células dendríticas fueron estimuladas con distintos serotipos capsulares K de *P. gingivalis*, se detectó que los serotipos K1 y K2 indujeron una mayor expresión de citoquinas tipo Th1: IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , en comparación a los otros serotipos (112) y un patrón de respuesta tipo Th1 o Th17 en linfocitos T activados por los mismos serotipos, con mayores niveles de secreción de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , y expresión de los mRNAs de T-bet y RORC2, genes master-switch que determinan la diferenciación selectiva de linfocitos Th1 y Th17, respectivamente.

En conclusión, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce una respuesta inmune en las células dendríticas de mayor intensidad en comparación a la inducida ante los serotipos a y c, con un predominio de un patrón de respuesta tipo Th1 y Th17 sobre la base de la secreción de citoquinas y la expresión de CCRs. Así, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* potencialmente se asociaría a la inducción de una respuesta inmuno-inflamatoria y periodonto-destructiva durante la periodontitis y los serotipos a y c podrían asociarse a una ausencia de progresión de la enfermedad, a una remisión de la misma o a condiciones de salud periodontal. En este contexto, la variable virulencia entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* podría implicar un re-análisis de las estrategias actuales de identificación de patógenos periodontales y la determinación de su asociación a las periodontitis, recomendándose una definición que involucre la variabilidad serotípica definida en relación al factor de virulencia más importante del microorganismo estudiado, tal como es el LPS de *A. actinomycetemcomitans*.

8. Referencias bibliográficas

1. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res.* 2006 Oct;41(5):361-73.
2. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000 Feb;173:89-97.
3. Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2004;35:135-57.
4. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
5. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):298-300.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
7. Geginat J, Campagnaro S, Sallusto F, Lanzavecchia A. TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4+ T cell subsets induced by cytokines. *Adv Exp Med Biol.* 2002;512:107-12.
8. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000.* 2007;43:14-40.
9. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008 Dec 19;29(6):848-62.
10. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):782-7.
11. Jotwani R, Cutler CW. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *J Dent Res.* 2003 Sep;82(9):736-41.
12. Cutler CW, Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface. *J Dent Res.* 2006 Aug;85(8):678-89.
13. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001 Nov;1(2):135-45.
14. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 2000 Feb;12(1):13-9.
15. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood.* 2009 Feb 12;113(7):1399-407.
16. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2002 Dec;2(12):933-44.
17. Vernal R, Garcia-Sanz JA. Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infect Disord Drug Targets.* 2008 Dec;8(4):207-20.
18. Hourri-Haddad Y, Wilensky A, Shapira L. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007;45:67-75.
19. Reiner SL. Development in motion: helper T cells at work. *Cell.* 2007 Apr 6;129(1):33-6.
20. Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994 Jun;5:112-41.
21. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, et al.

Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res.* 1998 May;33(4):212-25.

22. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun.* 1999 Jun;67(6):2804-9.

23. Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Taubman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res.* 2000 Aug;79(8):1548-55.

24. Pradeep AR, Roopa Y, Swati PP. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2008 Dec;43(6):712-6.

25. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol.* 2008 Mar;35(3):206-14.

26. Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. 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.* 2009 May;36(5):396-403.

27. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, et al. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009 Feb;80(2):290-6.

28. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(2):125-35.

29. Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. *J Clin Periodontol.* 2007 May;34(5):367-9.

30. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999 Nov 18;402(6759):304-9.

31. Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):237-52.

32. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, Leon R, Chandia S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis.* 2006 May;12(3):283-9.

33. Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, Kobashigawa T, Mogi M, Kamatani N, et al. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *J Cell Biochem.* 2009 Nov 1;108(4):947-55.

34. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):281-6.

35. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* 2006 Jun;18(3):349-56.

36. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S,

- et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3597-602.
37. Vernal R, Dutzan N, Hernandez M, Chandia S, Puente J, Leon R, et al. High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol*. 2006 Oct;77(10):1772-80.
38. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2673-82.
39. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol*. 2006 Apr;6(4):329-33.
40. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006 Jun;24(6):677-88.
41. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005 Apr;32(4):369-74.
42. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol*. 2007 Jun;78(6):1083-93.
43. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Apr;32(4):383-9.
44. Ohya H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res*. 2009 Jul;88(7):633-8.
45. Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T, Ohsawa Y, Ito H, Seymour GJ, et al. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res*. 2005 Jul;84(7):639-43.
46. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Junior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol*. 2008 Jul;84(1):311-8.
47. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010 Dec;89(12):1349-63.
48. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol*. 2009 Dec;9(12):883-9.
49. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008 Nov;73(11):975-83.
50. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annu Rev Immunol*. 2009;27:551-89.
51. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2076-82.
52. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009 May;30(5):636-45.

53. Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol*. 2010 Jul;37(7):591-600.
54. Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 5;96(1):185-90.
55. Vincenti F, Luggen M. T cell costimulation: a rational target in the therapeutic armamentarium for autoimmune diseases and transplantation. *Annu Rev Med*. 2007;58:347-58.
56. Yamada A, Salama AD, Sayegh MH. The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Feb;13(2):559-75.
57. Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:191-212.
58. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 1998 Apr 10;280(5361):243-8.
59. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004 Oct 29;95(9):858-66.
60. Sigusch B, Eick S, Pfister W, Klinger G, Glockmann E. Altered chemotactic behavior of crevicular PMNs in different forms of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001 Feb;28(2):162-7.
61. Del Fabbro M, Francetti L, Pizzoni L, Weinstein RL. [Congenital neutrophil defects and periodontal diseases]. *Minerva Stomatol*. 2000 Jun;49(6):293-311.
62. Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L, et al. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest*. 2001 Nov;108(9):1331-9.
63. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*. 1998 Jan 5;187(1):129-34.
64. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol*. 1999 Jan;11(1):81-8.
65. Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):7525-9.
66. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007 Jun;8(6):639-46.
67. Jiang S. TH17 cells in health and disease. New York: Springer; 2011.
68. Kuwabara T, Ishikawa F, Yasuda T, Aritomi K, Nakano H, Tanaka Y, et al. CCR7 ligands are required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis through generating IL-23-dependent Th17 cells. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2513-21.
69. Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol*. 2002 Dec;51(12):1013-20.
70. Schacher B, Baron F, Ludwig B, Valesky E, Noack B, Eickholz P.

- Periodontal therapy in siblings with Papillon-Lefevre syndrome and tinea capitis: a report of two cases. *J Clin Periodontol.* 2006 Nov;33(11):829-36.
71. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006 Sep;56(Pt 9):2135-46.
72. Fine DH, Furgang D, Schreiner HC, Goncharoff P, Charlesworth J, Ghazwan G, et al. Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. *Microbiology.* 1999 Jun;145 (Pt 6):1335-47.
73. Alsina M, Olle E, Frias J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb;39(2):509-13.
74. Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontosis. *J Periodontol.* 1976 Jul;47(7):373-9.
75. Bragd L, Dahlen G, Wikstrom M, Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Periodontol.* 1987 Feb;14(2):95-9.
76. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996 Nov;1(1):879-925.
77. Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol.* 1991 Apr;6(2):115-8.
78. Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, et al. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 2000 Jun;71(6):912-22.
79. Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci.* 2005 Feb;113(1):28-33.
80. Teixeira RE, Mendes EN, Roque de Carvalho MA, Nicoli JR, Farias Lde M, Magalhaes PP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Can J Microbiol.* 2006 Mar;52(3):182-8.
81. van der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, van der Velden U, van Winkelhoff AJ. Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol.* 2008 Jun;35(6):487-92.
82. Zhang T, Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Du Y, Oguchi S, Yamamoto M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Jul 1;59(2):143-51.
83. Burgher LW, Loomis GW, Ware F. Systemic infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Am J Clin Pathol.* 1973 Sep;60(3):412-5.

84. Scannapieco FA, Genco RJ. Association of periodontal infections with atherosclerotic and pulmonary diseases. *J Periodontal Res.* 1999 Oct;34(7):340-5.
85. Zambon JJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1985 Jan;12(1):1-20.
86. Bodet C, Andrian E, Tanabe S, Grenier D. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol.* 2007 Jul;212(1):189-94.
87. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17 Suppl 2:68-81.
88. Henderson B. Periodontal medicine and systems biology. Chichester, United Kingdom ; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2009.
89. Page RC, Sims TJ, Engel LD, Moncla BJ, Bainbridge B, Stray J, et al. The immunodominant outer membrane antigen of Actinobacillus actinomycetemcomitans is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1991 Oct;59(10):3451-62.
90. Gmur R, McNabb H, van Steenberg TJ, Baehni P, Mombelli A, van Winkelhoff AJ, et al. Seroclassification of hitherto nontypeable Actinobacillus actinomycetemcomitans strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol Immunol.* 1993 Apr;8(2):116-20.
91. Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype f. *Infect Immun.* 2001 Sep;69(9):5375-84.
92. Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. Serology of oral Actinobacillus actinomycetemcomitans and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun.* 1983 Jul;41(1):19-27.
93. Zambon JJ, Umemoto T, De Nardin E, Nakazawa F, Christersson LA, Genco RJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of human periodontal disease. *Adv Dent Res.* 1988 Nov;2(2):269-74.
94. Shimada T, Sugano N, Nishihara R, Suzuki K, Tanaka H, Ito K. Differential effects of five Aggregatibacter actinomycetemcomitans strains on gingival epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Dec;23(6):455-8.
95. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T. Identification of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2001 May;39(5):2002-5.
96. Yamaguchi N, Kawasaki M, Yamashita Y, Nakashima K, Koga T. Role of the capsular polysaccharide-like serotype-specific antigen in resistance of Actinobacillus actinomycetemcomitans to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1995 Dec;63(12):4589-94.
97. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996 Nov;1(1):821-78.
98. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:108-29.
99. Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Munoz A, Urzua I, Aranda W, et al.

- Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol*. 2010 Oct;81(10):1403-10.
100. Pucher J, Stewart J. Periodontal disease and diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*. 2004 Feb;4(1):46-50.
101. Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2089-100.
102. Lopez NJ, Da Silva I, Ipinza J, Gutierrez J. Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2144-53.
103. Kwar N, Alrayyes S. Periodontitis in pregnancy: the risk of preterm labor and low birth weight. *Dis Mon*. 2011 Apr;57(4):192-202.
104. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*. 1994 Jun;5:7-25.
105. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001 Jun;183(12):3770-83.
106. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*. 2002 Nov;29(11):1023-8.
107. Curtis MA, Slaney JM, Aduse-Opoku J. Critical pathways in microbial virulence. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:28-38.
108. Tanner AC, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R, Jr., Van Dyke T, et al. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J Dent Res*. 2006 Apr;85(4):318-23.
109. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.
110. Woehrle T, Du W, Goetz A, Hsu HY, Joos TO, Weiss M, et al. Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during *Candida* sepsis in humans. *Cytokine*. 2008 Mar;41(3):322-9.
111. Vernal R, Leon R, Herrera D, Garcia-Sanz JA, Silva, Sanz M. Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*. 2008 Dec;43(6):689-97.
112. Vernal R, Leon R, Silva A, van Winkelhoff AJ, Garcia-Sanz JA, Sanz M. Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol*. 2009 Oct;36(10):823-9.
113. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol*. 1998 Nov;36(11):3239-42.
114. Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE. Intraoral persistence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontally healthy subjects following treatment of diseased family members. *J Clin Periodontol*. 1999 Sep;26(9):583-9.
115. Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and

- periodontal health status. *J Dent Res*. 2000 Sep;79(9):1664-8.
116. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. 2006 Jun;33(6):427-33.
117. Hyvarinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun*. 2009 Aug;15(4):195-204.
118. Meng S, Zhao L, Yang H, Wu Y, Ouyang Y. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults. *Quintessence Int*. 2009 Jan;40(1):53-60.
119. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun*. 1980 Sep;29(3):1013-20.
120. Asikainen S, Chen C, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol*. 1995 Apr;10(2):65-8.
121. Holtta P, Alaluusua S, Saarela M, Asikainen S. Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res*. 1994 Apr;102(2):113-9.
122. Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Roman-Torres CV, Franco GC, Gomez RS, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct 18.
123. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol* 2000. 2010 Oct;54(1):78-105.
124. Lai CH, Listgarten MA, Hammond BF. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*. 1981 Jul;16(4):379-89.
125. Ebersole JL, Sandoval MN, Steffen MJ, Cappelli D. Serum antibody in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-infected patients with periodontal disease. *Infect Immun*. 1991 May;59(5):1795-802.
126. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W, Jr., Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Oct;20(5):310-6.
127. Crane IJ, Xu H, Wallace C, Manivannan A, Mack M, Liversidge J, et al. Involvement of CCR5 in the passage of Th1-type cells across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis. *J Leukoc Biol*. 2006 Mar;79(3):435-43.
128. Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone*. 2010 Apr;46(4):1122-30.
129. Lim HW, Lee J, Hillsamer P, Kim CH. Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2008 Jan 1;180(1):122-9.
130. Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH. The roles of CCR6 in migration

of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol.* 2009 Mar;2(2):173-83.

131. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003 Mar;74(3):391-401.

132. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008 Feb;35(2):89-105.

133. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000 Aug;118(2):503-8.

134. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol.* 2007 Jan;147(1):128-38.

135. Wilton JM, Bampton JL, Griffiths GS, Curtis MA, Life JS, Johnson NW, et al. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross sectional study. *J Clin Periodontol.* 1992 Jan;19(1):53-7.

136. Revel M. Host defense against infections and inflammations: role of the multifunctional IL-6/IFN-beta 2 cytokine. *Experientia.* 1989 Jun 15;45(6):549-57.

137. Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, Awasthi A, Dardalhon VA, Galileos G, et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 25;105(47):18460-5.

138. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: rethinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res.* 2008 Sep;87(9):817-28.

139. Johnson RB, Serio FG. Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 2005 May;76(5):785-90.

140. Sasaki H, Suzuki N, Kent R, Jr., Kawashima N, Takeda J, Stashenko P. T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):6193-8.

141. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87.

142. Colombo AV, Silva CM, Haffajee A, Colombo AP. Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *J Med Microbiol.* 2006 May;55(Pt 5):609-15.

9. Anexos