



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA

“Niveles de IL-6, IL-10, IL-17, IL-21 y TGF- β ₁ asociados a la periodontitis crónica”

Financiado por proyecto FONDECYT 1090046

Catalina Andrea Rivas Mayorga

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

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Nicolás Dutzan Muñoz

TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dr. Jorge Gamonal Aravena
BQ. Jocelyn García Sesnich

Santiago-Chile

2011

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La periodontitis crónica es una enfermedad de origen infeccioso caracterizada por la interacción entre bacterias patógenas y mecanismos de defensa del hospedero. Se ha demostrado que las citoquinas IL-6, IL-21, y TGF- β_1 participan en la diferenciación de células Th17, mientras que TGF- β_1 , en ausencia de las otras mencionadas, induce la diferenciación de células Treg. Esto indica una fuerte relación entre células Th17 y Treg: si se favorece la producción de las primeras se fomenta la destrucción tisular, mientras que las Treg, se asocian a una respuesta protectora para los tejidos. El objetivo de este trabajo fue identificar IL-21 y cuantificar los niveles de IL-21, IL-17, IL-6, IL-10 y TGF- β_1 en fluido gingival crevicular (FGC) de sujetos con periodontitis crónica e individuos periodontalmente sanos.

METODOLOGÍA: Se seleccionaron 20 sujetos sin periodontitis y 20 con diagnóstico de periodontitis crónica según criterios de inclusión y exclusión. Se obtuvieron muestras de FGC usando tiras de papel en sacos ≥ 5 mm en enfermos, y en sitios sin signos clínicos de inflamación ni destrucción periodontal en el grupo control. La presencia de las citoquinas se determinó mediante Western-blot, y la cuantificación se realizó mediante test de ELISA. Los valores obtenidos fueron analizados con los test estadísticos correspondientes (Shapiro-Wilk y Mann-Whitney), considerando un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS: Al realizar el Western-blot fue posible identificar todos los mediadores inflamatorios mencionados. Los niveles detectados de IL-6 (1,27(1,70) pg/mL v/s 7,66(7,66) pg/mL), IL-21 (16,16(13,75) pg/mL v/s 11,38(3,21) pg/mL) e IL-10 (48,0(55,33) pg/mL v/s 4,67(7,33) pg/mL) fueron mayores en muestras de sujetos con periodontitis crónica, con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los sanos. IL-17 (156,52(164,35) pg/mL) y TGF- β_1 (6,92(9,63) pg/mL) fueron medibles en FGC de enfermos, pero indetectables en el de sujetos sanos.

CONCLUSIÓN: Los resultados obtenidos indican que existe un desbalance entre las citoquinas relacionadas con Treg y Th17 en el FGC de individuos enfermos, con respecto a sujetos periodontalmente sanos. Esto podría ser un indicio del posible desequilibrio de estas células en periodontitis crónica, con una tendencia a

la diferenciación de Th17 y, por ende, a la inflamación y destrucción tisular característica de esta patología.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica, es una enfermedad inflamatoria de origen infeccioso caracterizada por una constante interacción entre bacterias patógenas y mecanismos de defensa del hospedero, lo que conduce a una destrucción de tejido periodontal de inserción y, eventualmente, a la pérdida de los dientes (Seymour 1991, Page *et al* 1997, Reynolds & Meikle 1997, Gamonal *et al* 2003). Diferentes estudios han demostrado que la respuesta del hospedero es la principal mediadora del daño tisular que caracteriza la periodontitis (Baker 2000, Taubman *et al* 2005).

Dentro de las células involucradas en la respuesta inmune se encuentran las células T colaboradoras nativas (Th), las que pueden diferenciarse en al menos cuatro subtipos distintos dependiendo de: la estimulación, la concentración del antígeno, la coestimulación y las citoquinas presentes en su entorno (Constant & Bottomly 1997). Dentro de éstas se encuentran los linfocitos T reguladores (Treg), los que tienen la habilidad de inhibir la proliferación y producción de ciertas citoquinas, y a quienes se les ha otorgado un papel supresor de la acción inflamatoria, regulando la respuesta inmune (Li & Flavell 2008). Por otro lado se encuentran los linfocitos T colaboradores del subtipo 17 (Th17), quienes estarían involucrados en varias enfermedades inflamatorias, lo que sugiere un rol en el inicio y mantención de este tipo de respuesta (Jovanovic *et al* 1998). Ambas células (Treg y Th17) estarían íntimamente relacionadas, ya que su diferenciación y actividad estarían condicionadas –de manera mutuamente excluyente- por las citoquinas presentes en el medio, favoreciendo la de Treg o la de Th17 (Bettelli E *et al* 2007).

MARCO TEÓRICO

Generalidades de la Periodontitis Crónica

La periodontitis es una infección multifactorial, polimicrobiana, caracterizada por un proceso inflamatorio destructivo, que afecta a los tejidos de soporte del diente (Paster BJ *et al* 2001). Aunque dentro de la cavidad bucal existen más de 700 especies de bacterias, sólo unas pocas han sido identificadas como periodontopatógenas, las que si bien son esenciales para el inicio y progresión de la enfermedad, no dan cuenta de toda la destrucción que caracteriza a la periodontitis (Paster BJ *et al* 2001, Baker P 2000).

Dentro de las bacterias periodontopatógenas encontramos a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf) y *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Esta última -de alta prevalencia en Chile (López 2000)-, es una bacteria gram negativa anaeróbica que posee un amplio rango de factores de virulencia, incluyendo proteinasas de cisteína, lipopolisacáridos (LPS) y fimbrias, que contribuyen a la respuesta inflamatoria del hospedero (Amano *et al* 2004, Van der Ploeg 2004). Pg ha sido altamente estudiada debido a sus fuertes propiedades patógenas, a su correlación con la severidad de la enfermedad y por inducir la producción de altos niveles de mediadores inflamatorios (como citoquinas) por parte de leucocitos (Genco & Slots 1984, Mayrand & Holt 1988, Okuda & Takazoe 1988, Bodet, Chandad & Grenier 2005). La susceptibilidad del paciente es de gran importancia en el curso de la enfermedad, y las diferencias en la respuesta del hospedero a Pg pueden estar relacionadas a las variaciones en la regulación de la misma (Seymour *et al* 1996).

Generalidades de la Respuesta Inmune

La respuesta inmune del organismo es posible dividirla en: sistema inmune innato -primera línea defensiva- y sistema inmune adquirido. El primero actúa de manera rápida, es poco específico y no tiene capacidad de memoria frente a

antígenos (Bangert C *et al* 2011). Este sistema inmune innato está compuesto por barreras físicas y químicas (piel, pH, etc.), proteínas sanguíneas (interferón, lisozimas, complemento, etc.), y células fagocíticas (polimorfonucleares, macrófagos, células NK). La respuesta inmune adquirida, por otro lado, es mucho más especializada, y elabora productos específicos (células o moléculas) frente a un antígeno, generando una respuesta inmune (aunque necesita tiempo para desarrollarla), y además, es capaz de crear una memoria inmunológica frente a un mismo agente que ya haya atacado previamente (Abbas *et al* 1999, Folch *et al* 2002). Es así como ambas respuestas se influyen mutuamente, y de hecho actualmente se sabe que la magnitud y tipo de respuesta innata gobierna, y muchas veces determina la calidad y cantidad de la adquirida (Bangert C *et al* 2011).

La respuesta inmune adquirida, a su vez, es posible subdividirla en: respuesta inmune humoral, que está mediada por anticuerpos, y la respuesta inmune celular, mediada por linfocitos específicos.

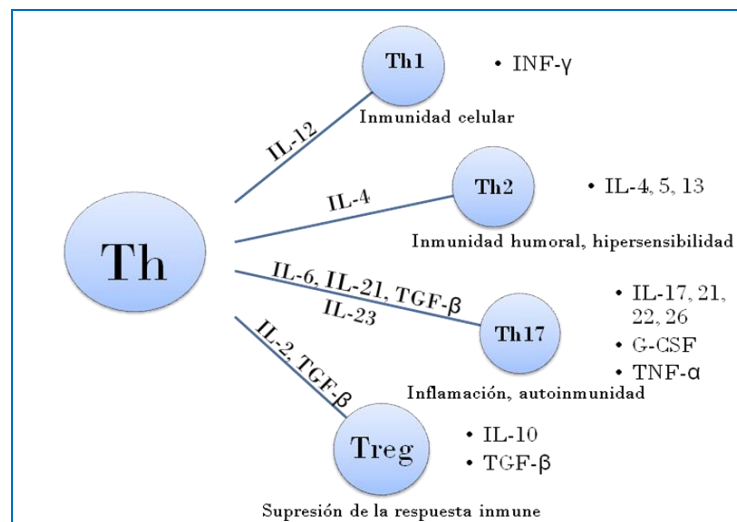
La respuesta inmune celular ocurre a través de células efectoras (o linfocitos), los cuales se clasifican en linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y linfocitos T colaboradores (CD4⁺), de acuerdo a sus marcadores de superficie (Folch *et al* 2002). Estos linfocitos colaboradores sintetizan y secretan citoquinas, proteínas que actúan como un sistema de señales entre las células, permitiendo una respuesta inmune coordinada e integrada. A través de su unión a receptores específicos presentes en la superficie de las células blanco, las citoquinas regulan importantes funciones biológicas, tales como proliferación, activación, supervivencia, muerte y diferenciación celular (Palomo *et al* 2000).

Linfocitos T colaboradores

Las células T nativas pueden diferenciarse en al menos cuatro subtipos distintos dependiendo de: la estimulación, la concentración del antígeno, la coestimulación y las citoquinas presentes en su entorno (Constant & Bottomly

1997). El modelo actual propone que interleuquina (IL)-12 induce la diferenciación a Th1, los cuales sintetizarán Interferón-gamma (IFN γ); IL-4 hará lo mismo para Th2, que se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. En el caso de que la célula T nativa se encuentre en presencia de IL-6, IL-1 β (inductor más efectivo en humanos), IL-21 y Factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), ésta se diferenciará a Th17, la que luego será capaz de sintetizar IL-17, IL-21, IL-22, IL-26, Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y Factor de necrosis tumoral (TNF) α . Además, IL-23 es necesaria para la expansión, supervivencia y patogenicidad de Th17 (Ghilardi & Ouyang, 2007). Por otro lado, las células inmunosupresoras T reguladoras (Treg) se desarrollan de manera mutuamente exclusiva con respecto a Th17 (Bettelli E *et al* 2006, Mangan PR 2006), y responden a la acción de TGF- β 1 en ausencia de IL-6 y/o IL-21, sintetizando a su vez, TGF- β 1 e IL-10. IL-2 es importante en la expansión de Treg, mientras que también inhibe el desarrollo de Th17 (Laurence *et al* 2007) (Fig. 1).

Figura 1: Diferenciación de las células Th (Gaffen & Hajishengallis 2008)



Pese a lo anterior, hasta hace poco, al intentar explicar la patogénesis de la periodontitis, se tenía un esquema de respuesta inmune asociada a linfocitos T colaboradores (Th) con dos subtipos: Th1 y Th2, donde Th1 era el principal

responsable de la respuesta frente a patógenos exógenos y de la autoinmunidad, mientras que Th2 mediaba la respuesta inmune humoral y activaba la respuesta de hipersensibilidad. Sin embargo, producto de la diversidad de estudios realizados, se volvió evidente que este modelo Th1/Th2 no explicaba adecuadamente una serie de fenómenos de la respuesta inmune mediada por células T. En efecto, las variadas discrepancias al respecto llevaron a definir un posible rol a otro tipo de linfocitos, los Th17, caracterizados principalmente por la secreción de IL-17. (Gor *et al.*, 2003, Gaffen & Hajishengallis 2008).

Distintos estudios clínicos indican que Th17 -e IL-17- estaría involucrada en varias enfermedades inflamatorias, lo que sugiere un rol en el inicio y mantención de este tipo de respuesta (Jovanovic *et al* 1998). Es así como Th17 se ha definido como la célula T dominante en las patologías inflamatorias autoinmunes, y se ha asociado a IL-17 a enfermedades tales como: artritis reumatoidea (Kotake S *et al* 1999), esclerosis múltiple (Tzartos JS *et al* 2008), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (Fujino S *et al* 2003, Duerr RH *et al* 2006), y psoriasis (Zaba *et al* 2007). Sin embargo, también tiene un importante rol en la respuesta inmune frente a patógenos extra e intracelulares, y en la respuesta inflamatoria, tanto aguda como crónica: IL-17 induce la producción de quimioquinas, citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α), metaloproteinasas de matriz (MMPs), y factor estimulador de colonias (CSF), lo que ayuda al reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y otras células mieloides al sitio infectado (Aujla SJ *et al* 2007, Kolls JK & Linden A 2004).

Por otro lado, los linfocitos Treg tienen la habilidad de inhibir la proliferación y producción de ciertas citoquinas, lo que se traduce en un gran número de funciones tales como: prevención de enfermedades autoinmunes (Baecher-Allan & Hafler 2006), control de enfermedades alérgicas (Umetsu & DeKruyff 2006) y regulación de la respuesta a patógenos microbianos (Rouse BT *et al* 2006, Belkaid Y 2006), entre otras. TGF- β_1 e IL-10 son citoquinas producidas por estas células de vital importancia en el control de la inflamación: TGF- β_1 actuaría directamente sobre las células T y las células dendríticas para controlar la respuesta

autoinmune, mientras que IL-10 regula la magnitud de la respuesta inmune frente a antígenos microbianos (Li & Flavell 2008).

Las células Treg estarían íntimamente relacionadas con Th17, ya que cuando la respuesta inmune no ha sido activada, TGF- β_1 por si sola induce la diferenciación desde células T nativas a células Treg (Chen *et al* 2003), mientras que, si las mismas se encuentra en presencia de TGF- β_1 e IL-6 y/o IL-21, se estimula la formación de Th17 (Veldhoen *et al* 2006, Korn *et al* 2007). Así, la diferenciación de la célula precursora en Th17 o Treg depende de las citoquinas presentes en el medio, de modo tal que predominen las células Treg y su actividad supresora, o Th17 y su acción patológica, condicionando el pronóstico de la enfermedad (Bettelli E *et al* 2007). Además, IL-6 inhibe la diferenciación de Treg, al mismo tiempo que estimula la de Th17 (Awasthi & Kuchroo 2009).

Citoquinas Th17-Treg

IL-17 es una familia de citoquinas compuesta por 5 proteínas: IL-17A a IL-17F, las que comparten distintos niveles de homología en su secuencia de aminoácidos. De ellas, quienes poseen más alta similitud son la IL-17A e IL-17F, ambas secretadas por linfocitos Th17 (Akimzhanov *et al* 2007). Sin embargo, aunque IL-17F media señales similares y es sintetizada en mayor cantidad que IL-17A, esta última posee una mayor afinidad por sus receptores y su señal es mucho más potente (Kuestner *et al* 2007). Ambas proteínas pueden formar heterodímeros, los que tendrían una potencia intermedia, y se ha propuesto que la síntesis de IL-17F sería una forma de mitigar la respuesta inflamatoria dada por IL-17 (Chang and Dong 2007).

IL-17A (o IL-17) es una proteína de 17,5 KDa sintetizada principalmente por linfocitos T activados (Th17) y secretada en forma homodimérica, donde cada subunidad está constituida por 155 aminoácidos (Miossec 2003, Li *et al* 2000). Esta proteína posee actividad biológica pleiotrópica sobre distintos tipos celulares, tales como fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y epiteliales, a las cuales

estimula a producir otras citoquinas inflamatorias (Rouvier *et al* 1993, Yao *et al* 1995, Vernal *et al* 2005) como TNF- α e IL-1 β en macrófagos (Jovanovic *et al* 1998); IL-6, IL-8 y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) en fibroblastos (Yao *et al* 1995, Fossiez *et al* 1996); y G-CSF y prostaglandina E₂ (PGE₂) en sinoviocitos (Fossiez *et al* 1996).

En el caso de la enfermedad periodontal, se ha determinado que la cantidad de IL-17 presente en el fluido gingival crevicular (FGC) y en el sobrenadante de cultivos gingivales, es mayor en pacientes con periodontitis crónica que en sujetos periodontalmente sanos (Vernal *et al* 2005). Además, se ha descubierto que la proteína de membrana externa de *Pg* induce un aumento en la producción de IL-17 en pacientes con periodontitis crónica al estimular muestras sanguíneas de individuos enfermos. (Oda *et al* 2003).

En cuanto a sus efectos en la enfermedad periodontal, IL-17 estaría involucrada en la reabsorción ósea mediante el siguiente mecanismo: IL-17 se uniría al receptor de membrana del osteoblasto, lo que provoca por un lado un efecto directo en la producción del Ligando del receptor activador del factor nuclear κ (RANK-L), y por otro, un aumento de PGE₂, que de igual modo, induciría un aumento en la síntesis de RANK-L, el cual estimularía la maduración de progenitores osteoclásticos a osteoclastos maduros, y la activación de estas células (Kotake *et al* 1999, Udagawa *et al* 2002)

La familia de IL-10 consiste en 9 interleuquinas, dentro de las cuales se encuentra IL-10. La IL-10 humana es una proteína de 18,5 KDa que funciona como un homodímero (Delves *et al* 1998). Esta citoquina es clave en la respuesta inmune, tanto en la innata, como en la adaptativa y es producida por un serie de células tales como: macrófagos activados (Mantovani *et al* 2004), células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, células NK, células B y por todos los subtipos de células T (Ouyang W, *et al* 2011, Mills KH 2004, O`Garra *et al* 2004). IL-10 es una citoquina supresora, que inhibe la respuesta inflamatoria, siendo clave en la resolución de la inflamación. Sin embargo, ciertos patógenos

han sabido abusar de esta característica de IL-10, estableciéndose estados crónicos de infección (Ouyang W, *et al* 2011).

Dentro de las funciones de esta proteína, se puede mencionar que mientras por un lado inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de neutrófilos y macrófagos (autoregulación) (Moore *et al* 2001), presentando una acción antiinflamatoria, por otro aumenta el reclutamiento y la activación de células B (Grutz G 2005). Incluso, se ha encontrado una mayor cantidad de células B activadas por IL-10 en individuos con patologías como el síndrome de Sjögren, artritis reumatoidea y lupus eritematoso sistémico (Llorente L *et al* 1994). En cuanto a linfocitos T, IL-10 inhibe la producción de IL-12 (Moore *et al* 2001) y la de IL-23 (Yen D *et al* 2006), disminuyendo así la respuesta de Th1 y la de Th17, por lo que IL-10 podría ser crítica en el control del balance entre Th1 y Th2, y entre Th17 y Treg. IL-10 sería la única de la familia en ser sintetizada por los Treg, y es necesaria para cumplir su función caracterizada por limitar o suprimir la respuesta inmune (Ouyang W, *et al* 2011).

Aunque IL-10 tendría un efecto positivo en enfermedades inflamatorias crónicas gracias a su acción inmunosupresora, de la misma manera estaría envuelta en la persistencia de la bacteria y en la mantención de la infección. Es así como IL-10 es relevante en la inmunopatogenia de patologías inflamatorias crónicas como la enfermedad periodontal (Gemmell E *et al* 1997, Okada & Murakami 1998) demostrándose, por ejemplo, una importante relación entre el genotipo de IL-10 y la progresión de esta patología (Cullinan MP *et al* 2008).

IL-6 es una proteína de 185 aminoácidos y 26 KDa (Tarkowski E *et al* 1999), secretada como monómero, que al unirse con su receptor forman un heterodímero (Somers W *et al* 1997). Es una proteína multifuncional, perteneciente a una familia de mediadores envueltos en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune, además de tener un importante rol en la hematopoyesis, regeneración neuronal, desarrollo embrional, entre otros (Heinrich P *et al* 2003). Una alteración en la regulación de su síntesis o función ha sido

asociada a varias enfermedades sistémicas, tales como artritis crónica juvenil, artritis reumatoidea, osteoporosis, enfermedad de Paget, y varios tipos de cáncer (Ishihara & Hirano 2002). IL-6 es secretada por monocitos/macrófagos, células T y B, fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos, células tumorales y neuronas (Van Snick 1990), y dentro de sus funciones están: diferenciación final de células B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, activación y diferenciación de células T y diferenciación de macrófagos (Van Snick 1990). También se ha visto un efecto inhibitorio en la proliferación de fibroblastos sinoviales (en relación a la artritis reumatoidea) (Nishimoto N *et al* 2000), así como también una acción sobre fibroblastos gingivales, donde en presencia de su receptor (IL-6R) podrían alterar su morfología (Naruishi K *et al* 1999, 2001).

En cuanto a la enfermedad periodontal, IL-6 se ha podido identificar en células endoteliales, fibroblastos y macrófagos de sujetos enfermos, mientras que no se observa en las mismas de individuos sanos (Takahashi K *et al* 1994), y es una de las citoquinas con mayor aumento en tejido gingival inflamado (Guillot JL *et al* 1990). Además, IL-6 es un importante estimulador de la diferenciación de osteoclastos y de la reabsorción ósea (Hughes *et al* 2006), importante en el desarrollo de la patología periodontal. También se ha sugerido que variaciones en el gen de IL-6 sería relevante en la susceptibilidad individual a la infección con bacterias periodontopatógenas (Nibali L *et al* 2008).

TGF- β_1 es una proteína de 25 KDa, compuesto por dos subunidades de 12,5 KDa cada una, unidas por puentes disulfuro (Assoian *et al* 1983). Esta citoquina ubicua es sintetizada por variados grupos celulares como linfocitos, plaquetas, neutrófilos, monocitos (Wahl *et al* 1993), y células óseas (osteoblastos y osteoclastos) (Robey PG *et al* 1987) y tiene efectos tanto proinflamatorios (quimioatrayente para neutrófilos, monocitos, mastocitos, linfocitos, y además induce la liberación de citoquinas proinflamatorias), como antiinflamatorios (supresión de la respuesta mediada por células y la respuesta humoral) (Marek A *et al* 2002), siendo clave en la regulación, limitación y resolución de la inflamación. Sus efectos en la proliferación y diferenciación celular sugieren un mayor rol en la

curación de heridas y remodelación y regeneración de tejidos (Laiho M & Keski-Oja J 1989, Whal SM *et al* 2004, 2005). Además, aumentaría la producción de componentes de la matriz del tejido conectivo como el colágeno, y tendría un rol en el metabolismo de éste, tanto en condiciones normales como patológicas (por ejemplo, enfermedad periodontal), ya que mediaría el equilibrio entre las proteasas y sus inhibidores (Overall CM *et al* 1989). Por otro lado, esta proteína está implicada en la remodelación ósea, induciendo la formación de hueso, aunque hay estudios que demuestran que cuando aumenta la cantidad de TGF- β_1 en condiciones de inflamación crónica, ésta induce una reducción en la mineralización ósea (Ehnert S *et al* 2010). Finalmente, dado el potencial que tiene TGF- β_1 para aumentar la velocidad de curación de las heridas (Lee PY *et al* 2004) y acelerar la remodelación del tejido conectivo (Komarcevic A 2000) y la angiogénesis (Merwin JR *et al* 1990), se ha sugerido que una alta cantidad de esta proteína constituye un factor protector en la periodontitis, aunque no hay que descartar su efecto proinflamatorio mencionado anteriormente, lo que también podría jugar un papel en la progresión de la enfermedad.

IL-21 es una citoquina producida por linfocitos T activados como un polipéptido de 133 aminoácidos con un peso molecular de 15,5 KDa (Parrish-Novak J *et al* 2000). Esta proteína es secretada por Th17, células T CD4⁺ activadas y células NKT (Nurieva R *et al* 2007, Coquet JM *et al* 2007, Harada M *et al* 2006, Chtanova T *et al* 2004), y tiene actividad pleiotrópica en la respuesta inmune, tanto en la innata como en la adaptativa. Dentro de sus acciones se encuentran: aumento en la proliferación de linfocitos y acción autocrina en éstos, aumento en la citotoxicidad de células T CD8⁺ y NK, diferenciación de células B en células plasmáticas y producción de anticuerpos (aunque sin la coestimulación adecuada induce su apoptosis) (Konforte *et al* 2009), y además es un regulador crítico para el desarrollo de Th17. Por otro lado, tiene efectos inhibitorios en las células dendríticas como presentador de antígeno, manteniéndolas en un estado inmaduro, induce la apoptosis de células B sin la coestimulación adecuada (Konforte *et al* 2009), e inhibe la proliferación y aumenta la apoptosis de células NK (Spolski & Leonard 2008). IL-21, además de regular el normal desarrollo y

función linfocitaria, tiene un importante rol en la respuesta inflamatoria, alergias, autoinmunidad y presenta acción antitumoral (Spolski & Leonard 2008). Es así como se han hecho numerosos estudios acerca de IL-21 y su acción antitumoral, así como también en cuanto a su rol en inmunopatologías como artritis reumatoidea y lupus eritematoso sistémico, obteniendo resultados prometedores, aunque aún incompletos para su aplicación clínica. Sin embargo, pese a la amplia investigación en torno a IL-21, hasta la fecha, no hay información específica sobre esta interleuquina en relación a la enfermedad periodontal.

En vista de la evidencia presentada, en relación a las interleuquinas IL-17, IL-6, IL-10, TGF- β_1 e IL-21 (Vernal *et al* 2005, Oda *et al* 2003, Kotake *et al* 1999, Udagawa *et al* 2002, Cullinan MP *et al* 2008, Gemmell E *et al* 1997, Okada & Murakami 1998, Takahashi K *et al* 1994, Nibali L *et al* 2008, Li & Flavell 2008, Chen *et al* 2003, Nurieva R *et al* 2007, Spolski & Leonard 2008), a las células Treg y Th17 como moduladores de la respuesta inmune (Baecher-Allan & Hafler 2006, Rouse BT *et al* 2006, Belkaid Y 2006, Li & Flavell 2008) y a la relación entre ambas (Bettelli E *et al* 2007, Veldhoen *et al* 2006, Korn *et al* 2007), es que proponemos en este estudio analizar a las células Th 17 y Treg en la enfermedad periodontal, mediante el estudio de citoquinas claves en la función de ambas. Además, prestaremos especial atención a IL-21, la cual no ha sido estudiada en esta patología.

PROBLEMA

¿Existen diferencias entre los niveles de las principales citoquinas relacionadas con las células Th17 (IL-17, IL-6, IL-21) y Treg (IL-10 y TGF- β_1) en el FGC de pacientes con periodontitis crónica, con respecto a sujetos periodontalmente sanos?

HIPÓTESIS

Existen diferencias entre los niveles de las principales citoquinas relacionadas con Th17 (IL-17, IL-6, IL-21) y Treg (IL-10 y TGF- β_1) presentes en el FGC de pacientes con periodontitis crónica, con respecto a sujetos periodontalmente sanos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar a IL-21, y establecer si existen diferencias entre los niveles de IL-21, IL-17, IL-6, IL-10 y TGF- β_1 en FGC de pacientes con periodontitis crónica, con respecto a sujetos periodontalmente sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia de IL-21 en FGC de pacientes con periodontitis crónica y sujetos periodontalmente sanos.
2. Determinar los niveles de IL-21, IL-17, IL-6, IL-10 y TGF- β_1 en FGC pacientes con periodontitis crónica.
3. Determinar los niveles de IL-21, IL-17, IL-6, IL-10 y TGF- β_1 en FGC de sujetos periodontalmente sanos.
4. Comparar los niveles de IL-21, IL-17, IL-6, IL-10 y TGF- β_1 en FGC de pacientes con periodontitis crónica y sujetos periodontalmente sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de pacientes

Se seleccionaron 20 pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica moderada y/o severa, mayores de 35 años, atendidos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile o en el CDT de Odontología del Complejo Hospitalario San José (SSMN).

Criterios de inclusión (Dezerega *et al* 2010) :

- Al menos 14 piezas dentarias naturales en boca, sin contabilizar los terceros molares, de los cuales al menos 10 son posteriores.
- Presentar como mínimo 5 dientes con una profundidad al sondaje mayor a 5 mm, con una pérdida de inserción clínica mayor a 3 mm y evidencia radiográfica de destrucción ósea alveolar.

Criterios de exclusión (Dezerega *et al* 2010):

- Haber recibido pulido y alisado radicular.
- Condiciones médicas que requieran premedicación con antibióticos
- Administración de medicamentos tales como antibióticos, anti-inflamatorios esteroidales y no esteroidales 6 meses previos al comienzo del estudio.
- Embarazo, o tener intenciones de quedar embarazada en el periodo de un año.
- Tener afecciones sistémicas que pudieran afectar el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Los pacientes fumadores fueron incluidos en el estudio, los cuales se homogenizaron tanto para el grupo experimental, como para el grupo control. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado (Anexo), aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, previo al ingreso al estudio. Y todos ellos recibieron terapia periodontal posterior al ingreso.

Utilizando los criterios de inclusión y exclusión ya señalados, se seleccionaron como grupo control individuos periodontalmente sanos, determinado

por la ausencia de pérdida de inserción clínica asociada a infección y de sacos periodontales, y sin signos clínicos de inflamación.

Evaluación clínica

Todos los pacientes recibieron, previo al examen clínico, una profilaxis supragingival para facilitar el uso de los instrumentos de medición.

Para el examen clínico, un investigador calibrado tomó mediciones de la profundidad de los sacos periodontales y del nivel de inserción clínica, y mediciones de índice de placa supragingival y sangramiento al sondaje, en 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual, mesiolingual). Se utilizó una sonda periodontal manual milimetrada de primera generación (Carolina del Norte, Hu-friedy, USA).

Para tomar muestras de FGC en individuos con periodontitis crónica, se seleccionó 1 sitio periodontal afectado, el que debía presentar una profundidad de sondaje mayor a 5 mm y una pérdida de inserción clínica asociada a la infección mayor a 3 mm. De preferencia, el sitio seleccionado fue el con mayor profundidad al sondaje y nivel de inserción clínica de los dientes posteriores afectados. Por otro lado, se tomaron muestras de FGC en individuos periodontalmente sanos donde los sitios seleccionados presentaban encía sin signos de enfermedad periodontal.

Toma de muestra de FGC

Primero, el diente se aisló con algodón para remover la placa supragingival con cureta (Hu Friedy, Chicago, IL, USA). Posteriormente el sitio fue secado con aire usando jeringa triple en dirección paralela al eje mayor del diente, hacia la superficie oclusal de éste. La muestra de FGC fue tomada con tiras de papel absorbente (Periopaper™, Smithtown, NY, USA), utilizando 6 tiras por sitio, las cuales se introdujeron de a una en el saco o surco hasta sentir una resistencia suave, manteniéndose en el lugar por 30 segundos. Las tiras contaminadas con saliva o sangre fueron descartadas del estudio. Las muestras colectadas se guardaron en microtubos y se almacenaron a -80°C hasta ser procesadas.

Elución de FGC

El FGC fue extraído mediante elución desde las tiras de papel. Se agregaron 85 μL por tira de NaCl 0,9% con inhibidores de proteasas (Cocktail inhibidor de proteasas libre de EDTA, marca Roche). Luego las muestras fueron agitadas en Vortex a velocidad máxima e incubadas a 4°C por 30 minutos, para posteriormente ser centrifugadas a 12500 rpm por 5 minutos a 4°C utilizando centrifuga marca HETTICH modelo Universal 320R. El eluido fue traspasado a un segundo microtubo, repitiendo el procedimiento descrito y colectándose al finalizar ambos eluidos en el mismo tubo. Se descartaron las tiras de papel y las muestras fueron guardadas a -80°C para futuros análisis.

Preparación de las muestras para el Western blot

1. La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método del Ácido Bicinchonínico (BCA). Este método depende principalmente de que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu^{++} . Los iones Cu^+ producidos, se unen a dos moléculas del BCA y al hacerlo, les cambian la estructura electrónica de tal manera que el compuesto absorbe luz a 562 nm y se torna de color púrpura. En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteínas totales presente en la muestra.

Para establecer la relación entre la concentración de proteínas presentes en las muestras y la absorbancia, se preparó una curva de calibración que consistió en una serie de diluciones seriadas preparadas a partir de una solución stock de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteniendo soluciones de concentración conocida. El ensayo se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante, utilizando 2 μl de muestra en un volumen final de 500 μl (Micro BCATM Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A partir de las absorbancias medidas a 562 nm se construyó un grafica donde en el eje de las X se localizó la concentración en y en el eje de las Y la absorbancia. Los valores de absorbancia de las muestras fueron interpolados en la curva obteniendo así su concentración. El valor obtenido se

multiplicó por el factor de dilución de las muestras para obtener la concentración final.

2. Para liofilización de las muestras se tomó el volumen correspondiente a 10µg de proteínas totales, según la determinación anterior para ser liofilizadas a -50°C. Luego, la muestra liofilizada fue resuspendida en 10µL de agua destilada y 2µL de buffer de carga desnaturante 6x para realizar la técnica de Western Blot.

Identificación mediante Western blot

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) se hizo siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli UK 1970). Se utilizaron geles en placa (8 x 7,3cm y 0,75mm de espesor) con un gel separador al 15%. Las muestras fueron preparadas utilizando buffer de carga desnaturante (con β-mercapto etanol), por lo que previo a cargarse debían ser hervidas por 15 minutos. Luego las muestras fueron cargadas, donde el volumen estaba determinado por el número de bolsillos utilizados, y se realizó la electroforesis a 160V durante 1 hora (o hasta que caiga el frente). Posteriormente se electrotransfirió -a 75mA por 3 horas- a una membrana de PVDF: se recortó del tamaño necesario (en relación al gel), se embebió en metanol y se equilibró en tampón de transferencia -así como también los geles- previo a la transferencia misma. Entonces el gel fue colocado sobre papel de filtro y sobre este se ubicó la membrana del mismo tamaño del gel eliminando cuidadosamente todas las burbujas de aire entre el gel y la membrana. Sobre la membrana se colocó nuevamente papel de filtro y el “sandwich” resultante se aprisionó entre dos placas de acrílico cubiertas con esponjas en sus dos caras interiores asegurándose que el gel quede hacia el cátodo y la membrana hacia el ánodo, de modo que las proteínas cargadas negativamente se transfieran a la membrana.

Finalizada la transferencia la membrana se retiró, se secó a 37°C por 15-20 minutos, fue bloqueada en 10ml de Albúmina al 3% (TBS-T 0,1%), y luego lavada 4 veces, por 15 minutos cada vez, con TBS-T 0,1%. Luego, se volvió a secar la membrana -de la misma manera- y se incubó durante toda la noche con 5mL de anticuerpo primario (anti IL-21). Al día siguiente, la membrana se lavó 3

veces, por 10 minutos cada vez, con TBS-T 0,1%, se secó, y se incubó con 5mL de anticuerpo secundario (goat anti mouse (GAMPO)). Posteriormente se incubó con luminol por 5 minutos en oscuridad, y la membrana se expuso a la película por periodos de tiempo variables. Entonces, las películas fueron reveladas, fijadas y fotografiadas para evaluar la presencia o ausencia de IL-21.

Determinación de los niveles de las interleuquinas

Para determinar los niveles de las interleuquinas en estudio presentes en el FGC, se hizo una cuantificación mediante ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Este ensayo se basa en la detección de un antígeno inmovilizado (la proteína a cuantificar) mediante un anticuerpo específico (anticuerpo primario). Posteriormente un conjugado anticuerpo-enzima se une al anticuerpo primario, el que es capaz de catalizar un sustrato para formar un producto coloreado, cuya densidad óptica se lee a una determinada longitud de onda. La intensidad del color medida en el espectrofotómetro permite determinar indirectamente la concentración del antígeno.

Para determinar el nivel de IL-17, IL-10, IL-6, IL-21 y TGF- β_1 se utilizó un Kit específico de ELISA para cada citoquina, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los kit utilizados fueron los siguientes:

- Human TGF- β_1 quantikine ELISA cód. db100b, R&D systems®, Min, USA, cuyo límite de detección es 4,61pg/mL de proteína.
- Human IL-17 quantikine ELISA kit cód. d1700, R&D systems®, Min, USA, cuyo límite de detección es 15pg/mL de proteína.
- Human IL-10 quantikine ELISA cód. d1000b, R&D systems®, Min, USA, cuyo límite de detección es 2pg/ml de proteína.
- Human interleukin-6 ELISA cód. EH2IL6, Pierce, Thermo Scientific®, Rockford, IL, USA, cuyo límite de detección es <1pg/mL de proteína.
- Human interlukin-21 ELISA cat. no. 433804 (5 plates), BioLegend®, San Diego, CA, cuyo límite de detección es 16pg/mL de proteína.

El resultado de cada reacción fue evaluado y cuantificado mediante un lector de ELISA a 450 nm (Universal Microplate Reader, ELX800, Biotek® Instruments, Vermont, USA).

Análisis de resultados

Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico GraphPadPrism 4.03 (GraphPad Software, Inc., California, USA)

Para determinar si los resultados obtenidos tenían una distribución normal se utilizó el test Shapiro-Wilk, y de ser así, éstos fueron analizados mediante la prueba estadística Test-t no pareado.

En el caso de que los resultados tuvieran una distribución no paramétrica, se usó la prueba de Mann-Whitney.

Se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo, y un poder estadístico fue de 80%.

RESULTADOS

Características clínicas de los individuos

El grupo con periodontitis crónica quedó constituido por 20 sujetos, de los cuales un 75% eran de género femenino (15 mujeres y 5 hombres), cuya edad promedio fue de $41,67 \pm 18,55$ años. En el caso del grupo control, éste quedó formado también por 20 individuos y un 75% de mujeres, con una edad promedio de $32,25 \pm 6,16$ años. No hay diferencia significativa entre los grupos en cuanto a la edad o género.

Las características clínicas de ambos grupos se muestran en la Tabla 1. La profundidad al sondaje en los individuos enfermos fue de $3,30 \pm 1,02$ mm, mientras en sanos fue de $1,20 \pm 0,45$ mm. En el caso del nivel de inserción clínica, su valor fue de $4,10 \pm 1,80$ mm en enfermos, y de $1,85 \pm 0,90$ mm en sanos. El porcentaje de sangramiento al sondaje y de piezas dentarias con placa bacteriana fue de 59,92% y 84,48% en enfermos, y de 2,2% y 25,5% en sanos, respectivamente.

Tabla 1: Características clínicas de los pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos periodontalmente (Promedio \pm desviación estándar).

	Periodontitis (n=20)	Sanos (n=20)
Edad (años)	41,67 \pm 18,55	32,25 \pm 6,16
Mujeres (%)	75	75
Profundidad al sondaje (mm)	3,30 \pm 1,02	1,20 \pm 0,45*
Nivel de inserción clínica (mm)	4,10 \pm 1,80	1,85 \pm 0,90**
Sangrado (%)	59,92	2,20***
Índice de placa (%)	84,98	25,50****

*Profundidad al sondaje de sujetos con periodontitis v/s control: $p=0,001$.

** Nivel de inserción clínico de sujetos con periodontitis v/s control: $p=0,0001$.

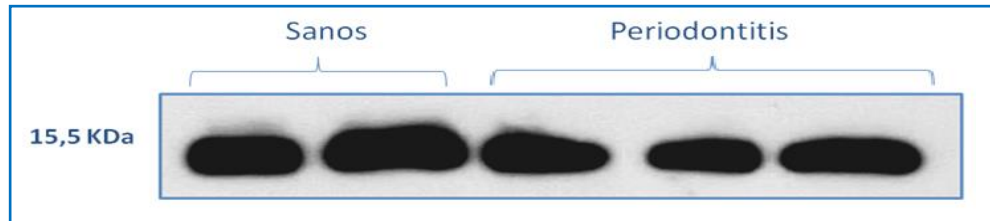
*** Índice de Placa de sujetos con periodontitis v/s control: $p=0,001$.

**** Sangrado al sondaje de sujetos con periodontitis v/s control: $p=0,001$.

Identificación mediante Western Blot

A. IL-21: Al realizar el Western blot, fue posible identificar la presencia de una banda de 15,5KDa correspondiente a IL-21 en las muestras de FGC tanto en individuos sanos como enfermos (Figura 3).

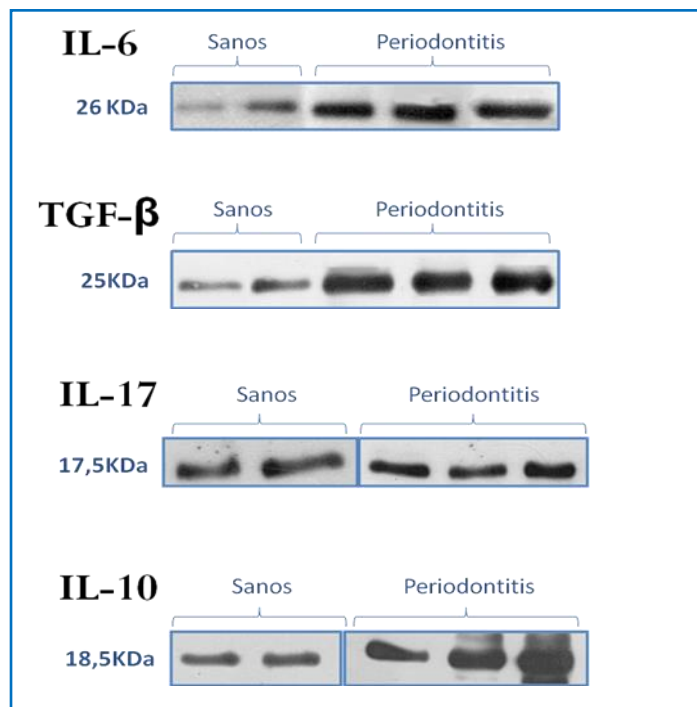
Figura 3: Western blot IL-21



Anti-IL-21 1µg/mL. Anticuerpo secundario GAMPO 0,001µg/mL. 5 minutos de exposición.

B. Previo a medir los niveles de cada Interleuquina mediante ELISA, se identificaron también por Western blot a modo de control, para cerciorarse que las proteínas estaban presente en el FGC (Figura 4).

Figura 4: Western blot IL-6, IL-17, TGFβ₁, IL-10



Anti IL-6 2µg/mL. Anti TGFβ₁ 0,5µg/mL. Anti IL-17 0,04µg/mL.
Anti IL-10 2µg/mL. Anticuerpo secundario GAMPO 0,001µg/mL.
5 minutos de exposición.

Niveles de citoquinas determinados mediante ELISA

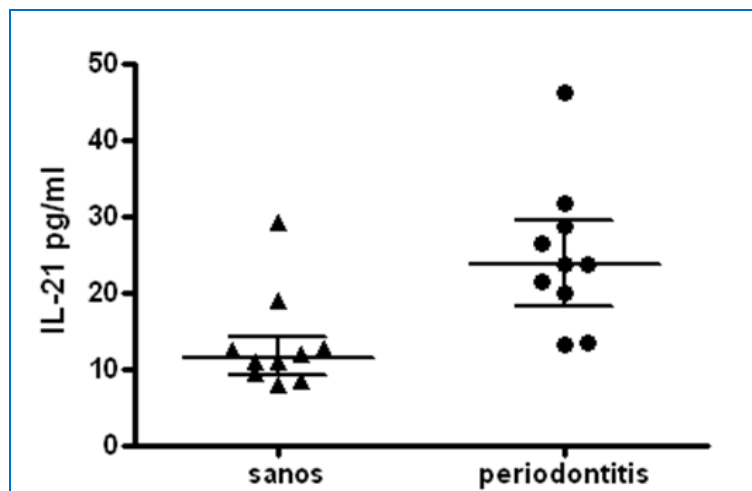
Los resultados fueron representados por la mediana y el rango intercuartil, ya que todos tuvieron una distribución no paramétrica.

a) Niveles de IL-21

En el caso de IL-21, se encontraron niveles detectables en el 100% de las muestras de FGC tanto de individuos sanos como enfermos.

La cantidad total encontrada en individuos con periodontitis crónica fue de 16,16(13,75) pg/mL, mientras que en el grupo control fue de 11,38(3,21) pg/mL, mostrando una mayor concentración en individuos enfermos que en sanos. Diferencia que además es estadísticamente significativa ($p=0,0015$, test de Mann Whitney) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Concentración de IL-21 en FGC (pg/mL) de individuos con periodontitis crónica v/s sanos.



b) Niveles de IL-17

IL-17 fue detectada en el 95% de individuos enfermos. En individuos sanos, por el contrario, el 100% de los sujetos presentaban niveles indetectables.

La cantidad total encontrada en individuos con periodontitis crónica fue de 156,52(164,35) pg/mL, mientras que en el grupo control el nivel estaba por debajo

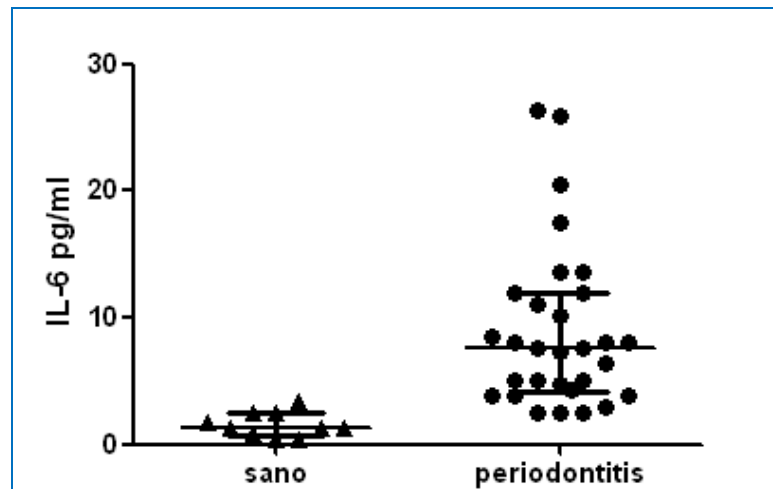
del límite de detección del kit de ELISA (Quantikine[®], R&D systems, Min, USA). Debido a que el kit detecta como mínimo 15 pg/mL, se podría considerar que la diferencia entre sanos y enfermos es estadísticamente significativa.

c) Niveles de IL-6

En este caso, también se detectó la proteína en el 100% de las muestras, de individuos sanos y enfermos.

La cantidad total encontrada en individuos con periodontitis crónica fue de 7,66 (7,66) pg/mL, mientras que en el grupo control fue de 1,277 (1,70) pg/mL, mostrando una mayor concentración en individuos enfermos que en sanos, diferencia que además es estadísticamente significativa ($p=0,0185$, test de Mann Whitney) (Gráfico 3).

Gráfico 3: concentración de IL-6 en FGC (pg/mL) de individuos con periodontitis crónica v/s sanos.



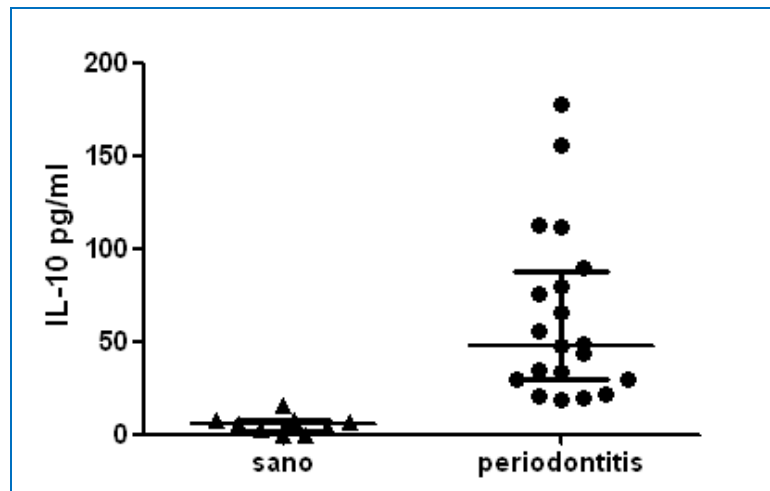
c) Niveles de IL-10

IL-10 fue detectada en el 100% de las muestras de individuos enfermos, y en el 90% de sanos.

Los niveles de IL-10 detectada en individuos con periodontitis crónica fue de 48,0(55,33) pg/mL mientras que en el grupo control fue de 4,67(7,33) pg/mL,

mostrando una mayor concentración en individuos enfermos que en sanos, diferencia que además es estadísticamente significativa (<0.0001 , test de Mann Whitney).

Gráfico 4: concentración de IL-10 en FGC (pg/mL) de individuos con periodontitis crónica v/s sanos



d) Niveles de TGF- β_1

En este caso, se encontraron niveles detectables en el 100% de las muestras de FGC de enfermos, no así en el grupo control, donde se obtuvieron niveles indetectables.

La cantidad total encontrada en individuos con periodontitis crónica fue de 6,92(9,63) pg/mL, mientras que en el grupo control el nivel estuvo por debajo del límite de detección del kit de ELISA (Quantikine[®], R&D systems, Min, USA).

DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que efectivamente existe un desbalance entre las interleuquinas relacionadas con Th17 y Treg presentes en FGC de individuos con periodontitis crónica, con respecto a sujetos periodontalmente sanos, observándose un aumento de todas las citoquinas estudiadas en el FGC de individuos con periodontitis crónica. Sin embargo, mientras que los niveles detectados de IL-6 (1,27(1,70) pg/mL v/s 7,66 (7,66) pg/mL), IL-21 (16,16(13,75) pg/mL v/s 11,38(3,21) pg/mL) e IL-10 (48,0(55,33) pg/mL v/s 4,67(7,33) pg/mL) fueron mayores en muestras de periodontitis crónica con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los sanos, en el caso de IL-17 y TGF- β_1 (156,52(164,35) pg/mL y 6,92(9,63) pg/mL, respectivamente) fueron medibles solo en FGC de pacientes con periodontitis crónica, siendo indetectables en FGC de sujetos sanos.

La periodontitis crónica es una patología de origen infeccioso, en donde los periodontopatógenos son capaces de activar la respuesta inmune del hospedero, generando una inflamación crónica de los tejidos de soporte del diente (Seymour 1991, Page *et al* 1997, Reynolds & Meikle 1997, Gamonal *et al* 2003). Dentro de las células envueltas en esta respuesta inmune se encuentran los linfocitos T colaboradores, los que, entre otras, pueden diferenciarse en linfocitos Th17, caracterizadas por una acción proinflamatoria (Jovanovic *et al* 1998), y en Treg, los que son capaces de suprimir la respuesta inflamatoria, regulando la respuesta inmune (Li & Flavell 2008).

Th17 ha sido asociada a la progresión de enfermedades inflamatorias y autoinmunes debido a su antagonismo con las células Treg y, por ende, a su rol en la amplificación de la respuesta inmune (Bettelli E *et al* 2006). Distintos estudios han mostrado una mayor cantidad de IL-17 en distintas patologías inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoidea, psoriasis y esclerosis múltiple, entre otras (Kotake S *et al* 1999, Tzartos JS *et al* 2008), lo que sugiere un rol en la progresión de éstas. En este estudio se encontró una mayor cantidad de IL-17 en individuos con periodontitis crónica que en sujetos sanos, resultado

que coincide con el ya publicado por Vernal *et al* en el 2005, donde ya se había sugerido que IL-17 estaría envuelta en el desarrollo y progresión de la enfermedad periodontal. En el caso de fibroblastos gingivales, se ha demostrado que induce un aumento en la secreción de IL-8, envuelta en la activación y reclutamiento de neutrófilos en la inflamación, y ya asociada a la enfermedad periodontal (Kobayashi 2006, Wang *et al* 2003). Por otro lado, tendría un efecto sinérgico con INF- γ en la síntesis de IL-6 y la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 (Mahanonda R *et al* 2008), lo que sería otro indicio de su efecto en la mantención de la reacción inflamatoria en la enfermedad periodontal. IL-17 también induce la producción de G-CSF, lo que aumenta el reclutamiento de neutrófilos en la zona de la lesión (Yu & Gaffen 2008), poniendo a IL-17 como un regulador crítico en la homeostasis y reclutamiento de estas células. Los neutrófilos son parte de la primera línea de defensa, lo que podría darles un rol protector en la enfermedad periodontal (Lakshman R & Finn A 2001, Genco RJ 1996). Sin embargo, al ser persistente en el sitio de infección debido al constante estímulo y a la falta de apoptosis (por las citoquinas circulantes), libera componentes tóxicos al medio celular, lo que contribuye a la destrucción tisular (Nathan C 2006). En el caso de los macrófagos, IL-17 es capaz de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de éstos, tales como IL-1 β fuertemente asociado a la severidad y progresión de la enfermedad periodontal (Valderrama G *et al* 2005).

La angiogénesis es un proceso esencial en el desarrollo de una patología inflamatoria crónica, ya que permite la llegada de nutrientes, y de células y mediadores inflamatorios al sitio enfermo (Guner P *et al* 2004). IL-17 es capaz de inducir la producción de mediadores angiogénicos como VEGF (Wang L *et al* 2009, Numasaki M *et al* 2004, Ryu S *et al* 2006), el cual se ha visto está en mayor cantidad en FGC de individuos con periodontitis crónica que en sujetos sanos (Prapulla DV *et al* 2007). Esto podría indicar que IL-17 está involucrada en la angiogénesis de la enfermedad periodontal, y por ende en la cronicidad y patogénesis de esta patología.

Recapitulando lo ya expuesto acerca de los efectos de IL-17 en múltiples tipos celulares, tenemos que aumenta la producción de interleuquinas proinflamatorias por parte de fibroblastos gingivales, macrófagos, y células endoteliales, induce la angiogénesis (lo cual sería clave en el reclutamiento de células inflamatorias), participa en la homeostasis y reclutamiento de neutrófilos, y además tiene un rol clave en la diferenciación de osteoclastos, mediante la producción de RANK-L, PGE₂, e IL-6. Así, considerando todo lo mencionado, junto con los resultados obtenidos en este estudio (los cuales coinciden con los anteriormente descritos) donde encontramos mayores niveles de IL-17 en el FGC de individuos con periodontitis crónica en relación a sujetos sanos, es posible concluir que esta proteína tendría un importante rol en la patología de la periodontitis crónica.

Al medir los niveles de IL-21 en el FGC, se encontró una cantidad significativamente mayor en individuos con periodontitis crónica que en sujetos sin esta patología, lo que puede sugerir un rol de esta proteína en la respuesta inflamatoria que caracteriza a esta enfermedad. IL-21 ha sido ampliamente estudiada por su rol en patologías inflamatorias, autoinmunes y en cáncer (Spolski & Leonard 2008), debido a su importancia en la diferenciación y función de células Th17. Es así como, por ejemplo, se ha visto una mayor cantidad de IL-21 (y su receptor) en artritis reumatoidea (Li J *et al* 2006), donde además hay un aumento de Th17, reconocido por una mayor cantidad de IL-17.

IL-21, además de su efecto sobre Th17, es un regulador crítico en la respuesta de células B (Konforte *et al* 2009), y en la función de células T CD8⁺ (Ettinger R *et al* 2008). Tanto Th17, como los linfocitos B y las células T CD8⁺ han sido encontradas en mayor cantidad en sitios con enfermedad periodontal (Kim YC *et al* 2010), lo que sumado a lo encontrado en este estudio en cuanto a IL-21, podría sugerir un importante rol de esta citoquina en el desarrollo y progresión de esta patología, lo cual deberá ser clarificado con estudios futuros en cuanto a la real magnitud de dicho rol.

En este estudio se encontró una cantidad significativamente mayor de IL-6 en FGC de sujetos con periodontitis crónica que en individuos periodontalmente sanos, lo cual concuerda con estudios previos (Guillot JL *et al* 1990). IL-6 es sintetizada por múltiples tipos celulares, como macrófagos, células T, fibroblastos, entre otras (Van Snick 1990), y tiene un importante efecto proinflamatorio (diferenciación de células B a células plasmáticas, activación de células T, liberación de proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos y activación de la cascada del complemento) (Revel M 1989). Induce la diferenciación de Th17, que a su vez sintetiza IL-17 (la cual induce la síntesis de IL-6), y paralelamente inhibe la generación de células Treg (Bettelli E *et al* 2007). Además, como ya se había mencionado, IL-6 induce la activación de osteoclastos, y así la reabsorción ósea, característico de la enfermedad periodontal. IL-6 ha sido ampliamente estudiada en cuanto a la enfermedad periodontal, observándose una mayor cantidad en sitios enfermos, la cual disminuye después del tratamiento periodontal (Loos BG 2005), y se ha asociado a la continua destrucción del tejido gingival presente en la enfermedad, además de ser capaz de modificar la microbiota subgingival y aumentar la susceptibilidad del sitio para ser colonizado por bacterias periodontopatógenas (Cooke GS & Hill AV 2001). En cuanto a su correlación con características clínicas, los estudios son contradictorios, habiendo algunos que sí encuentran asociación (Geivelis M *et al* 1993), mientras que otros no (Bozkurt FY *et al* 2000), sugiriendo que los mediadores inflamatorios varían de un sitio a otro y de paciente a paciente, viéndose afectada por las características propias del huésped. Por ende, los resultados de este estudio coinciden con estudios previos, involucrando a IL-6 en la patogenia de la enfermedad periodontal, aunque sin asociarse a las características clínicas de los sitios estudiados.

IL-10 es una citoquina producida por varios tipos celulares, tanto de la respuesta inmune innata como la adaptativa, dentro de las cuales se encuentran los linfocitos T CD4⁺ (Ouyang W, *et al* 2011). Los linfocitos Treg se caracterizan por suprimir a otras células de la respuesta inmune y así limitar la respuesta, y la IL-10, sintetizada por ellos, es esencial para cumplir esta función. Es así como IL-

10 es considerada esencial para la resolución de la inflamación. En la respuesta innata es capaz de interferir con la producción de mediadores inflamatorios de neutrófilos, monocitos y macrófagos, mientras que a su vez aumenta la expresión de moléculas que aumentan su propio efecto antiinflamatorio (Moore KW *et al* 2001). En la respuesta adaptativa, su acción es sobre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T. IL-10 inhibe la síntesis de IL-12 (clave para la diferenciación de Th1), IL-2, TNF e IL-23 (clave en la función de Th17) (Sundstedt A *et al* 1997, Yen D *et al* 2006, Moore *et al* 2001).

Sin embargo, aunque por un lado IL-10 inhibe una respuesta inmune exagerada, previniendo así una lesión inmunopatológica, por otro promueve la persistencia de bacterias o virus en el sitio de infección al inhibir la respuesta inmune protectora. Así es como algunos patógenos han evolucionado, explotando de cierta manera las funciones de esta interleuquina para así establecer inflamaciones crónicas. Muchas bacterias, parásitos, virus y sus productos son capaces de inducir la producción de IL-10, e incluso hay virus con su propia versión de IL-10 que es usada como señuelo para evadir la respuesta inmune (Mege JL *et al* 2006, Filippi CM & Von Herrath MG 2008). De hecho, una mayor cantidad de IL-10 se ha asociado a la permanencia del agente patógeno en patologías producidas por *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (Mege JL *et al* 2006).

En este estudio se encontró una mayor cantidad de IL-10 en el FGC de individuos enfermos en relación a sujetos periodontalmente sanos, lo que coincide con lo descrito por Gamonal *et al*. Esto sugiere un rol de esta citoquina en la enfermedad periodontal, lo que ya había sido propuesto en otros estudios (Gemmell E *et al* 1997, Okada & Murakami 1998). Según lo ya mencionado, IL-10 sería esencial en la cronicidad de la patología periodontal, facilitando la permanencia del agente peridontopatógeno en el sitio de infección.

TGF- β_1 es una citoquina con propiedades tanto anti como proinflamatorias. Está envuelta en la angiogénesis, en la supresión de la respuesta inmune y en la

síntesis de la matriz extracelular (Prime SS *et al* 2004). Mientras por un lado es capaz de inducir la síntesis de interleuquinas proinflamatorias como IL-1 e IL-6, por otro inhibe la respuesta inmune, tanto celular como humoral (Marek A *et al* 2002). TGF- β_1 también está involucrada en la remodelación ósea, que en condiciones fisiológicas es capaz de inducir la formación de hueso. Sin embargo, en condiciones patológicas, como en una inflamación crónica, el aumento de esta interleuquina induce una reducción en la mineralización ósea (Ehnert S *et al* 2010). Aunque se ha sugerido un rol protector de esta interleuquina en la enfermedad periodontal dado sus propiedades en la curación de heridas y remodelación de tejido (Babel N *et al* 2006), por otro, estaría involucrada en la evolución de la patología dado sus características proinflamatorias.

En este estudio se encontró una mayor cantidad de TGF- β_1 en individuos enfermos, aunque no fue posible evaluar si existe diferencia significativa con sujetos periodontalmente sanos debido a que en este último grupo los niveles de interleuquinas no fueron detectables para el kit de ELISA utilizado. Sin embargo, en otros estudios fue posible encontrar una mayor cantidad de TGF- β_1 en FGC de enfermos (Gürkan A *et al* 2006), lo que coincidiría con la tendencia de nuestros resultados. Esto propondría un rol de esta proteína en la patología periodontal, aunque el hecho de que aumente en sitios enfermos, sugiere un papel más proinflamatorio de sus funciones.

En relación a la hipótesis planteada en este estudio, podemos decir que si se cumplió, existiendo un desbalance entre las citoquinas relacionadas con Th17 y Treg en el FGC de individuos con periodontitis crónica, en relación a sujetos periodontalmente sanos. En vista de lo planteado en cada citoquina estudiada, se puede decir que la patología periodontal involucra un sistema complejo que lleva a la cronicidad de la enfermedad y a la destrucción de tejidos de soporte del diente. Solo en relación a las interleuquinas estudiadas podemos decir: mientras IL-21 e IL-6, junto con TGF- β_1 , inducen la diferenciación de Th17 promoviendo la síntesis de IL-17 y todas las características inflamatorias que esto conlleva, TGF- β_1 también induce la formación de Treg, quien sintetiza IL-10, la que como ya se

comentó, tendría un importante rol en la mantención del patógeno periodontal en el sitio de infección. Esto sin mencionar todas las otras implicancias ya descritas para estas interleuquinas, y sin contar otras citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-8), u otras células (linfocitos B) importantes, también envueltas en esta patología.

CONCLUSIONES

1. IL-21 está presente en el FGC de individuos con Periodontitis crónica.
2. IL-21 se encuentra en una cantidad significativamente mayor en el FGC de individuos con periodontitis crónica en relación a sujetos periodontalmente sanos ($p=0,0015$).
3. IL-10 se encuentra en una cantidad significativamente mayor en el FGC de individuos con periodontitis crónica en relación a sujetos periodontalmente sanos (<0.0001).
4. IL-6 se encuentra en una cantidad significativamente mayor en el FGC de individuos con periodontitis crónica en relación a sujetos periodontalmente sanos ($p=0,0185$).
5. En el caso de IL-17 y TGF- β_1 los niveles de proteínas en el grupo control estuvieron bajo el nivel de detección del kit de ELISA utilizado, por lo que no fue posible determinar si existía diferencia significativa entre ambos grupos, aunque si fueron encontradas en mayor cantidad en el FGC de individuos con periodontitis crónica en relación a sujetos periodontalmente sanos.
6. No se encontró una correlación entre los niveles de interleuquinas encontrados y las características clínicas de los sujetos con periodontitis crónica (profundidad al sondaje periodontal, nivel de inserción clínico, porcentaje de placa y sangramiento al sondaje).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J. "Inmunología Celular y Molecular". Tercera Ed. Mc Graw-Hill/Interamericana; 1999: 3-15. Cap. 1.
2. Akimzhanov AM, Yang XO, Dong C. Chromatin remodeling at IL-17-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J Biol Chem.* 2007; 282: 5969-72.
3. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res.* 2004; 39: 136-42.
4. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol.* 2007; 19: 377-82.
5. Assoian RK, Komoriva A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification and characterization. *J Biol Chem.* 1983; 258(11): 7155-60.
6. Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol.* 2009; 21: 489-98.
7. Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk HD, and Reinke P. Analysis of Tumor Necrosis Factor- α , Transforming Growth Factor- β , Interleukin-10, IL-6, and Interferon- γ Gene Polymorphisms in Patients With Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 2006; 77: 1978-83.
8. Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006; 212: 203–16.
9. Baker P. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microb and infect.* 2000; 2: 1181-91.
10. Bangert C, Brunner PM, Stingl G. Immune functions of the skin. *Clin. Dermatol.* 2011; 29(4): 360-76.
11. Belkaid Y, Blank RB, Suffia I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev.* 2006; 212: 287–300
12. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006; 441: 235–8.
13. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunology.* 2007; 8(4): 345-50.
14. Blaque S, James I. RANKL (ReceptorActivator of NF κ B Ligand). In: *The Cytokine Handbook.* Thomson AW, Lotze MT, editors. 2003. Academic Press, pp.871-883

15. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Porphyromonas gingivalis-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005; 143: 50-57.
16. Bozkurt FY, Berker E, Akkus S, Bulut S. Relationship between IL-6 levels in gingival crevicular fluid and periodontal status in patients with rheumatoid arthritis and adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000; 71: 1756-60.
17. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res*. 2007; 17: 435-40.
18. Chen W et al. Conversion of peripheral CD4+CD25+ naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-B induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003; 198:1875-86.
19. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Franf N, Hodge MR, Rolph MS, et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*. 2004; 173: 68-78.
20. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat. Rev. Genet*. 2001; 2: 967-77.
21. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15: 297–322.
22. Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ, et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J Immunol*. 2007; 178: 2827-34.
23. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Seymour GJ, et al. Progression of periodontal disease and Interleukin-10 gene polymorphism. *J Periodontal Res*. 2008; 43: 328-33.
24. Delves P, Roitt I. *Encyclopedia of immunology*. 2nd Ed. San Diego: Academic Press; 1998.
25. Dezerega A, Pozo P, Hernández M, Oyarzún A, Rivera O, Dutzan N, et al. Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal Lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010; 81(2):267-76
26. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006; 314: 1461-3.
27. Ehnert S, Baur J, Schmitt A, Neumaier M, Lucke M, Dooley S, et al. TGF- β 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One*. 2010; 5: e14073.

28. Filippi CM, von Herrath MG. IL-10 and the resolution of infections. *J Pathol.* 2008; 214: 224-30.
29. Folch H, Esquivel P, Astorquiza MI, Leyán V. *Fundamentos generales de la inmunología.* Universidad Austral de Chile. Segunda Ed., 2002: 2-39.
30. Fossiez F, Djossou O, Chromarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996; 183: 2593-2603.
31. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003; 51: 65-70.
32. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res.* 2008; 87(9): 817-28.
33. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* 2000;71: 1535-45.
34. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, et al. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 616-23.
35. Geivelis M, Turner CW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of IL-6 in gingival crevicular fluid from patients with destructive periodontal disease. *J Periodontol.* 1993; 64: 980-3.
36. Genco RJ, Slots J. Host responses in periodontal disease. *J Dent Res.* 1984; 63: 441-51.
37. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996; 67: 1041-9.
38. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997; 14: 112-43.
39. Ghilardi N, Ouyang W. Targeting the development and effector functions of Th 17 cells. *Semin Immunol.* 2007; 19: 383-93.
40. Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol.* 2003; 4: 503-5.
41. Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol.* 2005; 77: 3-15.

42. Guillot JL, Pollock SM, Johnson RB. Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *J Periodontol.* 1990; 66: 667-72.
43. Guneri P, Unlu F, Yesilbek B, et al. Vascular endothelial growth factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. *J Periodontol.* 2004; 75: 91-7.
44. Gürkan A, Emingil G, Cinarcik S, Berdeli A. Gingival crevicular fluid transforming growth factor-beta1 in several forms of periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 906-12.
45. Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, et al. IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med.* 2006; 203: 2929-37.
46. Heinrich P, Behrmann I, Haan S, Hermanns H, Uller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 2003; 374: 1-20.
47. Hughes, F.J., Turner, W., Belibasakis, G., Martuscelli, G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology* 2000. 2006; 41: 48-72.
48. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13: 357-68.
49. Jovanovic D, Di Battista J, Martel-Pelletier J, Jolicoeur F, He Y, Zhang M, et al. IL-17 Stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages. *J Immunol.* 1998; 160: 3513-21.
50. Kim YC, Ko Y, Hong SD, Kim KY, Lee YH, Chae C, Choi Y. Presence of *Porphyromonas gingivalis* and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral Dis.* 2010; 16: 375-81.
51. Kobayashi Y. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol.* 2006; 26: 307-16.
52. Kolls JK, Kisten A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004; 21: 467-76.
53. Komarcevic A. The modern approach to wound treatment. *Med Pregl.* 2000; 53: 363-8.
54. Konforte D, Simard N, Paige CJ. IL-21: an executor of B cell fate. *J Immunol.* 2009; 182: 1781-7.
55. Korn T, Betteli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007; 448: 484-7.

56. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1345-52.
57. Kuestner R, Taft D, Haran A, Brandt C, Brender T, Lum K, et al. Identification of the IL-17 receptor related molecule, IL-17C, as the receptor for IL-17F. *J Immunol.* 2007; 179: 5462-73.
58. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-5.
59. Laiho M, Keski-Oja J. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res.* 1989; 49: 2533–2553.
60. Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol.* 2001 Jan; 54(1):7-19.
61. Lee PY, Chesnov S, Huang L. Electroporatic delivery of TGF-beta1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healing in db/db mice. *J Invest Dermatol.* 2004; 123: 191-8.
62. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *PNAS.* 2000; 97: 773-8.
63. Li J, Shen W, Kong K, Liu Z. Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 2006; 64: 515-22.
64. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity.* 2008; 28(4): 468-76.
65. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R et al. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 1647-55.
66. Lopez N. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in Progressive Adult Periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71(6): 948-54.
67. Loos, BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J. Periodontol.* 2005 76: 2106-15.
68. Mahanonda R, Jitprasertwong, Sa-Ard-Iam N, Rerkyen P, Charatkulangkun O, Jansisanont P, et al. Effects of IL-17 on human gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2008; 87: 267-72.
69. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T (H) 17 lineage. *Nature.* 2006; 441: 231–4.

70. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation. *Trends Immunol.* 2004; 25: 677-86.
71. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF- β (transforming growth factor- β) in chronic inflammatory conditions—a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit.* 2002; 8: 145—51.
72. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic *Bacteroides* species. *Microbiol Rev.* 1988; Jul-Aug; 17(4): 264-8.
73. Mege JL, Meghari S, Honstettre A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6: 557-69.
74. Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1990; 142: 117-28.
75. Mills KH. Regulatory T cells: Friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 841-55.
76. Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(3): 594-601.
77. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O`Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 683-765.
78. Naruishi K, Takashiba S, Nishimura F, Chou H-H, Arai H, Yamada H, Murayama Y. Impairment of Gingival Fibroblast Adherence by IL-6/sIL-6R. *J Dent Res.* 2001; 80:1421-4.
79. Naruishi K, Takashiba S, Chou H-H, Arai H, Nishimura F, Murayama Y. Role of soluble interleukin-6 receptor in inflamed gingival for binding of interleukin-6 to gingival fibroblasts. *J Periodon Res.* 1999; 34: 296-300.
80. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology.* 2006; 6: 173–82
81. Nibali L, Tonetti M, Ready D, Parkar M, Brett P, Donos N, et al. Interleukin-6 polymorphisms are associated with pathogenic bacteria in subjects with periodontitis. *J periodontal.* 2008; 79(4): 677-83.
82. Nishimoto N, Ito A, Ono M, Tagoh H, Matsumoto T, Tomita T, et al. IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor. *Int Immunol.* 2000; 12:187-93.

83. Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor-alpha-induced elaboration of proangiogenic factors from fibroblasts. *Immunology Letters* 2004; 93: 39-43.
84. Nurieva R, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cell. *Nature*. 2007; 448: 480-3.
85. Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF- κ B ligand in-vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18: 30-6.
86. O`Garra A, Vieira PL, Vieira P, Golfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest*. 2004; 114: 1372-8.
87. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9: 248-66.
88. Okuda K, Takazoe I. The role of Bacteroides gingivalis in periodontal disease. *Adv Dent Res*. 1988; 2: 260-8.
89. Ouyang W, Rutz S, Crellin N, Valdez P, Hymowitz S. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 71-109.
90. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase 72-kDa progelatinase and metalloproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J Biol Chem*. 1989; 264: 1860-9.
91. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ & Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology*. 2000 1997; 14: 216-48.
92. Palomo J, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblatt M, Vergara U. "Fundamentos de inmunología básica y clínica". Universidad de Talca; 2000: 211-223. Cap.11.
93. Paster BJ, Boches S, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001; 183: 3770-83.
94. Parrish-Novak J, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 2000; 408(6808): 57-63.
95. Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol*. 2007; 78: 1783-7.

96. Prime SS, Pring M, Davies M, Paterson IC. TGF- β signal transduction in orofacial health and non-malignant disease (Part I). *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 324–36.
97. Revel M. Host defense against infections and inflammations: role of the multifunctional IL-6/IFN- β 2 cytokine. *Experientia* 1989; 45: 549-57.
98. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000. 1997; 14: 144-57.
99. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, et al. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol.* 1987; 105:457–63.
100. Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev.* 2006; 212: 272–86.
101. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 1993; 15(150): 5445-56.
102. Ryu S, Lee JH, Kim SI. IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin Rheumatol.* 2006; 25:16-20.
103. Seymour GJ. Importance of the host response in the periodontium. *J of Clin Periodontol.* 1991; 18: 421-6.
104. Seymour GJ, Gemmel E, Kjeldsen M, Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Cellular immunity and hypersensitivity as components of periodontal destruction. *Oral diseases.* 1996; 2: 96-101.
105. Somers W, Stahl M, Seehra J. 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *The EMBO Journal.* 1997; 16: 989 – 97.
106. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21 biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2008; 26: 57-79.
107. Spolski R, Leonard WJ. The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Current Opinion in Immunology.* 2008; 20:295-301.
108. Sundstedt A, Hoiden I, Rosendahl A, Kalland T, van Rooijen N, Dohlsten M. Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol.* 1997; 158: 180–86.
109. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 1994; 65: 147-53.

110. Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A. Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol*. 1999; 19(4): 223-30.
111. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kaway T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005; 76 (suppl 11): 2033S-2041S.
112. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2008; 172: 146-55.
113. Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*. 2002; 4: 281-9.
114. Umetsu DT, DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. *Immunol Rev*. 2006; 212: 238–55.
115. Valderrama G, Vijande F, Escribano JM, Garrido-Pertierra A, Bascones A. El polimorfismo de la IL-1 y su eventual asociación con la enfermedad periodontal crónica. Una revisión de la literatura (II). *Av Periodon*. 2005; 17: 157-163.
116. Van der Ploeg JR, Giertsen E, Ludin B, Morgeli C, Zinkernagel AS, Gmur R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in dental plaque. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 232: 31-7.
117. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Ann Rev Immunol*. 1990; 8: 253-78.
118. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF-B in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006; 24: 179-86.
119. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Valenzuela MA, 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; 32: 383-9.
120. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleric U, Mangan DF. Role of transforming growth factor beta in pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol*. 1993; 64: 450-5.
121. Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D. M. Pardoll, D. Zeng, H. Yu. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med*. 2009; 206: 1457–64.

122. Wahl SM, Swisher J, McCartney-Francis N, Chen W. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 15–24.
123. Wahl SM, Chen W. Transforming growth factor-beta-induced regulatory T cells referee inflammatory and autoimmune diseases *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 62–68.
124. Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, et al. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305: 970-3.
125. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol.* 1995; 155: 5483-6.
126. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, et al. IL-23 is essential for T cell mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Investig.* 2006; 116: 1310–16.
127. Yu, J. J. & Gaffen, S. L. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Frontiers in Bioscience.* 2008; 13: 170–7.
128. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med.* 2007; 204: 3183-94.

ANEXO: Consentimientos informados



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Odontología - Departamento de Odontología Conservadora

Facultad de Odontología
Universidad de ChileProyecto de Investigación
Académico Responsable: Jorge GamonalConsentimiento Informado-Paciente con PeriodontitisAntecedentes Generales

La periodontitis es una infección producida por el acumulo de placa bacteriana entre la encía y el diente, que produce en sus estados iniciales el aumento de volumen, el cambio de color y el sangrado de la encía, y luego si no es tratada oportunamente ocasiona la pérdida de los dientes, enfermedad denominada periodontitis.

El tratamiento de la enfermedad periodontal permite eliminar la infección y además permite detener la destrucción del hueso alveolar al cual se haya unido el diente.

El propósito del presente estudio es determinar que factores locales y generales, pueden estar asociados con la periodontitis, que pueden contribuir a la destrucción del tejido de inserción del diente y pérdida de los dientes. El rol de los factores locales, lo determinaremos tomando y luego comparando, unas muestras biológicas en sujetos con periodontitis crónica, agresiva y sujetos sin periodontitis.

En general, hay un tipo de periodontitis que afecta a los sujetos mayores de 35 años, y que se denomina periodontitis crónica y otra que afecta a individuos más jóvenes, entre 25 y 34 años, que se denomina periodontitis agresiva. El diagnóstico de la periodontitis se hace luego del examen clínico.

Los sujetos sanos, son aquellos que no tienen periodontitis.

Procedimiento toma de las muestras

A los pacientes con periodontitis y sujetos sin periodontitis, seleccionados para el presente estudio se les efectuara un examen clínico completo, en el que se determina la severidad y la extensión de la infección periodontal. Este es un examen de rutina que se hace a todos los pacientes con periodontitis, participen como de un estudio de investigación.

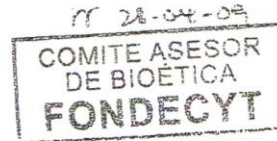
A los pacientes que participen del estudio se les tomara 3 tipos de muestras:

1.- Una biopsia de encía, que se toma cuando se indica tratamiento quirúrgico de la infección periodontal. Esta biopsia se tomará, como parte del tratamiento de cirugía periodontal que normalmente se hace a los pacientes con periodontitis crónica severa generalizada y que no tiene inconvenientes para el paciente. Esta biopsia se toma realizando una incisión con hoja de bisturí N° 15. Esta biopsia se usará para aislar células que participan en la respuesta inflamatoria del paciente frente a la infección periodontal.

2.- Una muestra de fluido gingival crevicular (líquido que normalmente fluye entre la encía y el diente y que esta presente en todos los sujetos), que se toma con una tira de papel y que no tiene ningún inconveniente para el paciente

3.- Una muestra de sangre periférica, tomada por una enfermera que trabaja en la Facultad de Odontología. La muestra se toma en el brazo, la cantidad es de 15 ml, y el inconveniente puede ser un hematoma en el brazo, en algunas oportunidades.

Jorge Gamonal



Las muestras de sangre periférica y de fluido gingival crevicular, normalmente no se toman a los pacientes que se someten a tratamiento periodontal, pero la información que estos exámenes pueden entregar son de mucha utilidad, para conocer la biología la infección periodontal.

Los sujetos sin periodontitis, son voluntarios, a los cuales producto de la extracción de los terceros molares, se les procederá a tomar una muestra de tejido gingival, y de fluido gingival crevicular.

Todos los procedimientos de toma de muestras son sin costo para los pacientes y sin costo para los sujetos sanos, sin periodontitis

Para el éxito del tratamiento periodontal es necesario hacer controles periódicos, con el objetivo de controlar la placa supragingival, de tal manera que se harán controles a los 3, 6 y 12 meses después del tratamiento periodontal.

Todas las muestras se almacenarán en un congelador menso 80 grados, hasta realizar los análisis correspondientes.

Todas las muestras biológicas tomadas en el presente estudio (biopsia, fluido gingival crevicular) solo se usarán en el presente estudio. Lo usual es que la cantidad de muestras tomadas solo alcanza para hacer los análisis correspondientes, siendo imposible poder guardar algo de material biológico.

Ventajas de participar en el estudio

Como ventaja de participar en el presente estudio, a todos los pacientes participantes del mismo se les hará entrega de todos los elementos necesarios para el higiene bucal (cepillo dentario, cepillo interproximal, seda y enjuagatorios).

Otra ventaja es que se les dará a conocer y se consignara en su ficha clínica los resultados de los análisis que resultan de las muestras biológicas tomadas a los pacientes.

En relación con el tratamiento periodontal, en el tratamiento realizado por el suscrito, se hará una rebaja de un 50% del arancel que la Facultad tiene dispuesto cobrar para tales efectos.

A los pacientes sanos, se les regalará un set de higiene bucal.

Desventajas de participar el estudio

La desventaja de participar en el presente estudio, es que los pacientes seleccionados serán sometidos a la toma de una biopsia (realizada durante la misma sesión del tratamiento y por tanto se hace con anestesia), de fluido gingival crevicular (que no requiere anestesia, y es inocua para el paciente) y una muestra de sangre periférica tomada por una enfermera que trabaja en la Facultad de Odontología.

En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable: Jorge Gamonal, son: 9781839, 9781838, y 2324232

Declaro

Heber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he plantado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mi entregados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el

[Handwritten signature]

Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Dr. Omar Campos, en el fono: 9781702.

Además se me ha aclarado, que en caso de no dar mi consentimiento, el profesional procederá de todas maneras a realizar el mencionado tratamiento periodontal.

Identificación Paciente

Nombre:

Rut:

Fono:

Identificación Dentista

Nombre:

Rut:

Fono:

Firma

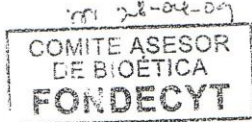
Firma

Fecha:

Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 1903.

93
L
Jueves

1090046-



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Odontología - Departamento de Odontología Conservadora

Facultad de Odontología
Universidad de ChileProyecto de Investigación
Académico Responsable: Jorge Gamonal**Consentimiento Informado - Sujetos Sin Periodontitis****Antecedentes Generales**

El propósito del presente estudio es determinar que factores locales y generales, pueden estar asociados con la periodontitis, que pueden contribuir a la destrucción del tejido de inserción del diente y pérdida de los dientes. El rol de los factores locales, lo determinaremos tomando y luego comparando, unas muestras biológicas en sujetos con periodontitis crónica, agresiva y sujetos sin periodontitis.

En general, hay un tipo de periodontitis que afecta a los sujetos mayores de 35 años, y que se denomina periodontitis crónica y otra que afecta a individuos más jóvenes, entre 25 y 34 años, que se denomina periodontitis agresiva. El diagnóstico de la periodontitis se hace luego del examen clínico.

Los sujetos sanos, son aquellos que no tienen periodontitis.

Procedimiento toma de las muestras

A los sujetos sin periodontitis, sanos o sin enfermedad periodontal, seleccionados para el presente estudio se les efectuara un examen clínico completo. Este es un examen de rutina que se hace a todos los pacientes y en este caso es para descartar la presencia de periodontitis.

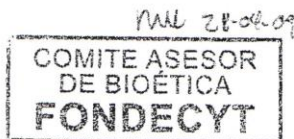
A los sujetos que participen del estudio se les tomara 3 tipos de muestras:

- 1.- Una biopsia de encía, que se toma cuando se indica la extracción de un tercer molar. Esta biopsia se toma realizando una incisión con hoja de bisturí N° 15. Esta biopsia se usará para aislar células que participan en la respuesta inflamatoria del paciente frente a la infección periodontal.
- 2.- Una muestra de fluido gingival crevicular (líquido que normalmente fluye entre la encía y el diente y que esta presente en todos los sujetos), que se toma con una tira de papel y que no tiene ningún inconveniente para el sujeto
- 3.- Una muestra de sangre periférica, tomada por una enfermera que trabaja en la Facultad de Odontología. La muestra se toma en el brazo, la cantidad es de 15 ml. y el inconveniente puede ser un hematoma en el brazo, en algunas oportunidades.

Todos los procedimientos de toma de muestras son sin costo para los pacientes y sin costo para los sujetos sanos, sin periodontitis.

Todas las muestras se almacenarán en un congelador menso 80 grados, hasta realizar los análisis correspondientes.

Todas las muestras biológicas tomadas en el presente estudio (biopsia, fluido gingival crevicular) solo se usarán en el presente estudio. Lo usual es que la cantidad de muestras tomadas solo alcanza para hacer los análisis correspondientes, siendo imposible poder guardar algo de material biológico.



Ventajas de participar en el estudio

Como ventaja de participar en el presente estudio, a todos los pacientes sanos, se les regalará un set de higiene bucal.

Desventajas de participar el estudio

La desventaja de participar en el presente estudio, es que los sujetos seleccionados serán sometidos a la toma de una biopsia (realizada durante la misma sesión de la extracción del tercer molar), de fluido gingival crevicular (que no requiere anestesia, y es inocua para el paciente) y una muestra de sangre periférica tomada por una enfermera que trabaja en la Facultad de Odontología.

En caso de alguna dificultad, los teléfonos de contacto del investigador responsable: Jorge Gamonal, son: 9781839, 9781838, y 2324232

Declaro

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado, señalándome además que habrá absoluta confidencialidad en los datos por mí entregados.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Dr. Omar Campos, en el fono: 9781702.

Identificación Paciente

Nombre:

Rut:

Fono:

Identificación Dentista

Nombre:

Rut:

Fono:

Firma

Firma

Fecha:

Dpto. de Odontología Conservadora/Olivos N°943, Independencia ☎: 9781839/Casilla 1903.

TB^D

21-04-09