



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

**EXPRESIÓN DE LAS QUIMIOQUINAS CCL19 Y CCL21 Y SU ASOCIACIÓN CON
LA SALUD O ENFERMEDAD PERIODONTAL**

Marcela Victoria Muñoz Bustamante

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Samanta Melgar Rodríguez

Dr. Jaime Díaz Zúñiga

FINANCIADO POR PROYECTOS FONDECYT 11100298 Y 1140904

Santiago – Chile

2014

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.1 Periodontitis | 2 |
| 1.2 Quimioquinas y receptores de quimioquinas | 4 |
| 1.3 Quimioquinas y receptores de quimioquinas en las periodontitis | 6 |
| 1.4 Planteamiento del problema | 9 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 10 |
| 3. OBJETIVO GENERAL | 11 |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 11 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 12 |
| 5.1 Selección de los sujetos | 12 |
| 5.2 Obtención de las muestras biológicas | 13 |
| 5.3 Extracción del RNA citoplasmático total | 13 |
| 5.4 Síntesis de la primera cadena de cDNA | 14 |
| 5.5 Expresión de CCLs mediante RT-PCR convencional y en tiempo real..... | 14 |
| 5.6 Análisis de los datos | 15 |
| 6. RESULTADOS..... | 16 |
| 6.1 Niveles de expresión de CCL19 y CCL21..... | 16 |
| 6.2 Ciclo umbral (Ct) de CCL19 y CCL21 y Δ Ct entre CCL19, CCL21 y 18S..... | 16 |
| 7. DISCUSIÓN | 18 |
| 8. CONCLUSIONES | 21 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 22 |
| 10. ANEXO | 30 |
| 10.1 Consentimiento informado | 30 |

RESUMEN

Durante las periodontitis, la respuesta inmune del hospedero involucra la producción de citoquinas, metaloproteinasas de la matriz, quimioquinas y receptores de quimioquinas que determinan la constitución de un ambiente inflamatorio local y la estimulación de la destrucción de tejidos periodontales, pudiendo derivar en la pérdida de los dientes. Las quimioquinas (CCLs) son citoquinas quimiotácticas que cumplen un rol fundamental en la regulación de la migración de células del sistema inmune. La interacción de las quimioquinas CCL19 y CCL21 con su receptor CCR7 en las células inmunes, incrementa la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y activa la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th17. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar los niveles de expresión de las quimioquinas CCL19 y CCL21 en biopsias gingivales de pacientes afectados de periodontitis crónica. Los resultados demuestran los elevados niveles de expresión de las quimioquinas CCL19 y CCL21 en biopsias de pacientes afectados con periodontitis en comparación a los sujetos sanos y sugieren un rol pro-inflamatorio en la regulación del sistema inmune y el desarrollo de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Periodontitis

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa cuya causa principal son las bacterias periodonto-patógenas que forman parte de la biopelícula subgingival que coloniza el surco gingivodentario (Darveau, 2010; Page y Kornman, 1997). Aunque estas bacterias pueden provocar daño directo a los tejidos de inserción de los dientes: cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar, la principal causa de la destrucción tisular es la respuesta inmune del hospedero que se induce ante ellas (Armitage, 1999; Kinane y Lappin, 2001; Teng, 2003). En efecto, las periodontitis son las patologías óseas de mayor prevalencia a nivel mundial (Gamonal y cols., 2010) y son consideradas un factor modificante de la salud general de los individuos, asociándose con diabetes (Pucher y Stewart, 2004), aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares (Beck y Offenbacher, 2005), trastornos pulmonares, parto prematuro y bajo peso del neonato (Kawar y Alrayyes, 2011; Lopez y cols., 2005).

La biopelícula subgingival está compuesta por distintas comunidades microbianas y la composición y cantidad de las distintas especies de bacterias periodonto-patógenas que las constituyen depende del micro-ambiente local (Socransky y Haffajee, 2005) y puede variar entre los pacientes afectados de periodontitis, entre un individuo sano y un paciente enfermo e, incluso, entre sitios periodontales afectados de pérdida de inserción y sitios sin pérdida de inserción periodontal en un sujeto con periodontitis (Colombo y cols., 2006; Gajardo y cols., 2005).

Durante las periodontitis, las células dendríticas reconocen las bacterias periodonto-patógenas de la biopelícula subgingival principalmente por medio de los receptores tipo *Toll* (del inglés *Toll like receptor*, TLR) TLR2 y TLR4, las fagocitan, destruyen y conjugan sus antígenos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII). Durante este proceso, las células dendríticas se activan y expresan receptores de quimioquinas, quimioquinas, moléculas co-

estimuladoras CD80 y CD86 (Gouwy y cols., 2013) y el complejo MHCII-antígeno, para presentarlo a los linfocitos TCD4⁺ e iniciar la respuesta inmune adaptativa del hospedero (Garlet, 2010; Kikkert y cols., 2007; Nussbaum y cols., 2009).

Los linfocitos TCD4⁺ han sido ampliamente asociados con el inicio, progresión y severidad de las periodontitis (Gaffen y Hajishengallis, 2008; Taubman y Kawai, 2001; Vernal y cols., 2006). Luego de la presentación antigénica, los linfocitos TCD4⁺ se activan, proliferan y adquieren la potencialidad de diferenciarse en distintos fenotipos efectores: los linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th) tipo 1 (Th1) que se diferencian en presencia de interleuquina (IL)-12 y requiere el factor de transcripción específico *T-bet*, los linfocitos Th2 en presencia de IL-4 y del factor de transcripción *GATA-3*, los linfocitos T reguladores (Treg) en presencia del factor de crecimiento transformante (del inglés *Transforming growth factor*, TGF)- β 1 y del factor de transcripción *Foxp3*, y los linfocitos Th17 en presencia de IL-6, TGF- β 1 e IL-23 y del factor de transcripción *RORC2* (Duhon y cols., 2009; Zhao y cols., 2011).

Durante las periodontitis, los linfocitos Th1 producen IL-1 β , IL-2, IL-12, factor de necrosis tumoral (del inglés, *Tumor necrosis factor*, TNF)- α e interferón (INF)- γ que cumplen un rol pro-inflamatorio (Jankovic y cols., 2001); los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13 y poseen un rol inmuno-modulador de la respuesta inmune (Zappa y cols., 1991) y los linfocitos Th17 se caracterizan por secretar IL-6, IL-17, IL-21, IL-23 y RANKL (Nakashima y cols., 2000) y cumplir un rol pro-inflamatorio y osteo-destructor (Ohyama y cols., 2009; Schenkein y cols., 2010).

Diversos estudios han demostrado la presencia de los linfocitos Th1 y sus citoquinas en lesiones periodontales de pacientes con periodontitis y baja detección de linfocitos Th2 (Aoyagi y cols., 1995; Behfarnia y cols., 2010; Dutzan y cols., 2009; Gaffen y Hajishengallis, 2008; Garlet y cols., 2003; Lappin y cols., 2001; Manhart y cols., 1994; Takeichi y cols., 2000; Ukai y cols., 2001). Además, se ha reportado una mayor expresión de IL-17 en fluido gingival crevicular y biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica en comparación a individuos sanos (Behfarnia y cols., 2010; Vernal y cols., 2005).

Los linfocitos T son determinantes clave de la respuesta inmune inducida en el hospedero durante las periodontitis. Luego de su activación, la migración de los distintos fenotipos efectoros de linfocitos T desde los linfonodos regionales hacia los sitios periodontales infectados depende del tipo y concentración de quimioquinas producidos localmente y del tipo y cantidad de receptores específicos que los linfocitos T expresen en su superficie.

1.2 Quimioquinas y receptores de quimioquinas

Las quimioquinas son proteínas de pequeño peso molecular cuyo rol principal es inducir la quimiotaxis en las células que expresan sus receptores específicos (Fernandez y Lolis, 2002). Se dividen en 4 subgrupos de acuerdo a la estructura de los residuos de cisteína cercanos al extremo N-amino terminal y dependiendo si las cisteínas poseen o no aminoácidos intercalados, siendo estos: CXC, CX3C, CC y C. Los receptores se nombran de acuerdo a la familia de sus ligandos, donde las dos principales familias de receptores se designan CCRs y CXCRs (Silva y cols., 2007).

Los ligandos cisteína-cisteína (del inglés *Cysteine-Cysteine ligand*, CCL) son sintetizados por diversos tipos de células, tales como, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, células dendríticas y linfocitos T y se expresan tanto de forma constitutiva como se sobre-expresan en condiciones inflamatorias (Garlet y cols., 2003). Los CCLs activan a integrinas de membrana facilitando la adhesión celular, inducen la haptotaxis (migración inducida por cambios en la concentración de moléculas), facilitan la separación de las uniones de las células endoteliales para la diapédesis de los linfocitos, inducen la liberación de gránulos enzimáticos y producción de radicales superóxido y en linfocitos T inducen su activación, proliferación y diferenciación.

En las células del sistema inmune se ha observado que la presencia de antígenos, factores de crecimiento y citoquinas pro-inflamatorias induce un incremento en los niveles de expresión de los CCLs y provoca, mediante el reconocimiento por sus CCRs específicos, la migración de células efectoras hacia el sitio periodontal infectado (Garlet y cols., 2003; Silva y cols., 2007). En efecto, la

migración de las células dendríticas hacia el linfonodo para realizar la presentación antigénica y la posterior migración de los distintos fenotipos de linfocitos T activados desde el linfonodo hacia el sitio infectado para realizar su función inmune es mediada por los CCLs reconocidos por los receptores cisteína-cisteína (del inglés *Cysteine-Cysteine receptor*, CCR) que las células dendríticas y los linfocitos T expresen en su membrana.

Los CCRs presentan 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G en el extremo C-terminal para permitir la señalización intracelular después de su activación (Comerford y cols., 2013). Los CCRs son sintetizados por diversos tipos de células, tales como, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, células dendríticas y linfocitos T y se expresa constitutivamente o se inducen en condiciones inflamatorias (Murphy y cols., 2000). La activación de los CCRs induce la fosforilación de la proteína G, activando las vías del factor nuclear *kappaB* (NF- κ B), Akt/PKB, Ras y cJun/cFos y PKC, factores que inician la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias, inhiben la muerte por apoptosis, facilitan la diferenciación e incrementan la proliferación en la célula que exprese el CCRs específico para cada CCLs (Price y cols., 2013; Tan y cols., 2013).

Estudios recientes en células dendríticas han detectado que un incremento en los niveles de secreción de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ modula la expresión de los CCRs y regula la migración de los linfocitos TCD4⁺ (Darveau y cols., 1998; Hosokawa y cols., 2002; Lloyd y cols., 1995). En efecto, células dendríticas estimuladas con el serotipo K1 de *Porphyromonas gingivalis* y el serotipo b de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* expresan mayores niveles de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , lo que permite especular que los CCRs podrían tener cambios cuantitativos en estas células y participar en la migración de los linfocitos efectores Th durante las periodontitis (Darveau y cols., 1998; Hosokawa y cols., 2002; Silva y cols., 2007).

1.3 Quimioquinas y receptores de quimioquinas en las periodontitis

Entre los distintos eventos de señalización celular durante el proceso inflamatorio, los CCLs cumplen un rol fundamental en la regulación de la quimiotaxis en células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ (Charo y Taubman, 2004). La quimiotaxis es un fenómeno inmunológico que permite la adhesión y migración celular (Garlet y cols., 2003). Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos descritas como los iniciadores de la respuesta inmune adaptativa y su migración es un determinante clave de las enfermedades periodontales, controlado por la expresión de CCLs y CCRs. En efecto, tanto variaciones en la expresión de los CCRs como un comportamiento quimiotáctico modificado de las células dendríticas se asocian al inicio de las periodontitis y a las formas severas de la enfermedad (Sigusch y cols., 2001). Las células dendríticas inmaduras actúan como centinelas y presentan altos niveles de CCR1 y CCR5 (Gouwy y cols., 2013). Posterior a su activación y maduración, las células dendríticas incrementan la expresión de CCR7 y disminuyen los niveles de CCR1 y CCR5 (Gouwy y cols., 2013).

Recientemente, en células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* se evaluaron los niveles de expresión de CCRs y se proyectó su potencial rol en la definición del fenotipo linfocitario predominante en las lesiones periodontales. Se detectó que el serotipo b induce mayores niveles de expresión de CCR5, CCR6 y CCR7 en comparación a los serotipos a y c, asociado con un patrón de respuesta predominantemente Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteo-destructivo) (Datos aún no publicados).

Se ha propuesto que la expresión selectiva de CCRs en las células dendríticas contribuiría a determinar la proliferación, diferenciación y activación de los distintos fenotipos de linfocitos Th y, de esta forma, el tipo de respuesta inmune inducido. En efecto, una respuesta Th1 se caracteriza por la expresión en su superficie de CCR2 y CCR5 y tener un rol pro-inflamatorio (Garlet y cols., 2003; Papadakis, 2004), una respuesta Th2 se caracteriza por la expresión de CCR3, CCR4 y CCR8 y una función inmuno-moduladora (Garlet y cols., 2003; Papadakis,

2004) y, finalmente, una respuesta de linfocitos Th17 se asocia a la expresión de CCR4, CCR6 y CCR7 (Lim y cols., 2008).

Los CCR5 y CCR6 estimulan la actividad osteoclastogénica y determinan la activación, diferenciación y migración de los linfocitos Th1 y Th17, respectivamente (Crane y cols., 2006; Repeke y cols., 2010; Silva y cols., 2007; Wang y cols., 2009). CCR7 regula la maduración de células dendríticas, induce la secreción de IL-12 e IL-23 que participa en la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th17 e induce la migración de los linfocitos TCD4⁺ (Comerford y cols., 2013; Marsland y cols., 2005). La función de CCR5, CCR6 y CCR7 es modulada por la presencia de IL-4 e IL-10, citoquinas Th2 y Treg, respectivamente y CCR4, receptor de los linfocitos Th2 (Garlet y cols., 2004).

En las periodontitis, se han detectado elevados niveles de CCL3, CCL4 y CCL5, quimioquinas reconocidas por CCR5 (Gamonal y cols., 2010; Garlet y cols., 2003). En biopsias de lesiones periodontales se caracterizaron los patrones de CCLs y CCRs, donde la expresión de CCL3 y CCR5 fue mayor en pacientes con periodontitis agresiva, mientras que la expresión de CCL2 y CCR4 fue mayor en pacientes con periodontitis crónica, permitiendo especular que mayores niveles de CCLs y CCRs asociados a un fenotipo Th1 se vinculan con los estados más severos de la enfermedad. Además, en estudios experimentales de periodontitis, se detectaron elevados niveles de CCL3, CCL4 y CCL5 y, luego del inicio de la enfermedad, elevados niveles de CCL1, sugiriendo una participación de los linfocitos Th1 (Garlet y cols., 2005). En biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis se detectaron elevados niveles de CCR6 y CCL20, demostrando la presencia del fenotipo Th17 (Hosokawa y cols., 2002; Wang y cols., 2009). Además, se ha identificado a los linfocitos Th2 en lesiones periodontales y se especula que IL-4 inhibe la producción de IFN- γ y con ello disminuye la polarización del fenotipo Th1 (pro-inflamatorio) e inhibe la producción de metaloproteinasas y RANKL, factores involucrados con la destrucción de tejidos. No obstante, la concentración de quimioquinas quimio-atrayentes asociadas al fenotipo Th2 es menor y, por tanto, no cumpliría el efecto inmunomodulador necesario para detener la progresión de la enfermedad (Eastcott y cols., 1994; Giannopoulou y cols., 2003; Ihn y cols., 2002; Pradeep y cols., 2008;

Zhang y cols., 2009). En efecto, los niveles de IL-4 y el factor de transcripción *GATA-3* aumentan en muestras de fluido gingival luego del tratamiento periodontal (Garlet, 2010; Zhao y cols., 2011).

CCL19 y CCL21 son los únicos ligandos conocidos para CCR7. La principal función de la vía CCL19/CCL21/CCR7 es regular la migración de células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ *naïve*, estableciendo un microambiente anatómico específico en los órganos linfoides secundarios para que ocurra una interacción y presentación antigénica óptimas y se active el sistema inmune adaptativo. Sin embargo, el rol de las quimioquinas CCL19 y CCL21 durante las periodontitis no se ha descrito.

1.4 Planteamiento del problema

Los linfocitos Th1 y Th17 son los principales fenotipos efectores involucrados en el inicio, progresión y severidad de las periodontitis, mediante la producción de citoquinas que determinan la mantención de un ambiente inflamatorio local en el sitio infectado y la estimulación osteoclastogénica que determina la reabsorción ósea (Gaffen y Hajishengallis, 2008; Garlet, 2010; Yucel-Lindberg y Båge, 2013).

Durante las periodontitis se detectan elevados niveles de expresión de CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6 y esta sobre-expresión se asocia con una función quimiotáctica de diversas células del sistema inmune, en particular, de linfocitos Th1 y Th17 (Gamonal y cols., 2010; Garlet y cols., 2003; Kabashima y cols., 2002; Noda y cols., 2007; Silva y cols., 2007). En este contexto, la activación del receptor CCR7 en las células dendríticas incrementa la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y activa la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th17 (Comerford y cols., 2013; Marsland y cols., 2005). Además, se ha demostrado que elevados niveles de IL-1 β y TNF- α determinan una mayor expresión de CCL21 (Martín-Fontecha y cols., 2003).

Posterior a la identificación y caracterización de CCR7, CCL19 y CCL21, numerosas investigaciones se han realizado para determinar su rol en la patogenia de la aterosclerosis, cáncer, enfermedades autoinmunes y encefalomiелitis autoinmune experimental, enfermedades caracterizadas por un predominio en el patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17 (Corsiero y cols., 2012; Kuwabara y cols., 2009; Schieffer y Luchtefeld, 2011; Smallridge y cols., 2013). Las periodontitis se caracterizan por un predominio de respuesta linfocitaria tipo Th1 y Th17 en los sitios periodontales con activa destrucción tisular; sin embargo, no existen estudios que asocien la expresión de CCL19 y CCL21 a la periodontitis.

2. HIPÓTESIS

Las células dendríticas son determinantes del tipo de respuesta inmune desarrollada ante los periodonto-patógenos que residen en la biopelícula subgingival y, luego de la presentación antigénica, determinan la activación y diferenciación de linfocitos TCD4⁺. La expresión de CCLs y sus receptores CCRs en las células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ inducen su migración hacia los tejidos periodontales infectados y determinan la presencia de los linfocitos Th1 y Th17 en los sitios periodontales activos, asociados a la destrucción periodontal. Las quimioquinas CCL19 y CCL21 se asocian a la migración selectiva de linfocitos Th1 y Th17, por lo tanto, en este estudio planteamos la siguiente hipótesis: En los tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica se expresan mayores niveles de CCL19 y CCL21 en comparación a individuos con salud periodontal.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de las quimioquinas CCL19 y CCL21 en pacientes afectados de periodontitis crónica y compararlos con los detectados en sujetos sanos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1 Cuantificar los niveles de expresión de las quimioquinas CCL19 y CCL21 en biopsias de lesiones periodontales de pacientes afectados con periodontitis crónica y en tejidos sanos de sujetos sin enfermedad periodontal.
- 4.2 Asociar los niveles de expresión de CCL19 y CCL21 con los estados de salud o enfermedad periodontal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Selección de los sujetos

Pacientes afectados por periodontitis crónica moderada o severa fueron seleccionados mediante el método no probabilístico de casos consecutivos entre los asistentes a la clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. A cada uno se le realizó un examen periodontal por un único operador, que registró la profundidad al sondaje (PS), el nivel de inserción clínico (NIC), la presencia de biopelícula y el sangrado al sondaje en 6 sitios por diente, excluyendo los cuatro terceros molares. El diagnóstico de periodontitis crónica moderada o severa se realizó cuando el paciente poseía al menos 2 sitios periodontales inflamados con una PS mayor o igual a 4 mm y un NIC mayor o igual a 3 mm (Armitage, 1999). Como criterios de inclusión, los individuos no deben haber recibido tratamiento periodontal durante los 6 meses previos a la selección para el estudio, no deben estar afectados de una enfermedad distinta a la periodontitis, tal como diabetes, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, SIDA, psoriasis cáncer o enfermedades cardiovasculares, no haber recibido tratamiento sobre la base de anti-inflamatorios o antibióticos durante los 3 meses previos a la selección y, en caso de ser mujer, no estar embarazada.

El protocolo de investigación se explicó a todos los participantes del estudio, quienes, luego de aceptar su participación, firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y de CONICYT (Anexo).

5.2 Obtención de las muestras biológicas

Según los requerimientos terapéuticos, se tomaron biopsias de tejido gingival de 1 mm³ y se sumergieron inmediatamente en RNA Safer[®] (Omega Biotek Inc., GA, USA) para almacenarlas a -80°C hasta la extracción de RNA (en detalle más adelante). Bajo el mismo protocolo, como controles se utilizaron biopsias de encía de individuos sanos sometidos a extracción de terceros molares o a procedimientos de alargamiento coronario. El procedimiento se desarrolló bajo anestesia local.

5.3 Extracción del RNA citoplasmático total

Para la extracción del RNA citoplasmático total, las muestras biológicas se descongelaron y centrifugaron durante 10 segundos a 10.000 $\times g$ para la eliminación del exceso de RNA Safer y luego se homogenizaron mecánicamente en 1 mL de TRIzol[®] (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hasta la disgregación total e incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de incorporar 200 μ L de cloroformo (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y agitar durante 15 segundos, se incubó nuevamente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la centrifugación a 12.000 $\times g$ durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo Eppendorf libre de RNAsas y se adicionaron 100 μ L de isopropanol (Fluka Sigma-Aldrich), se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar a 12.000 $\times g$ durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de etanol al 75%. Luego se centrifugó a 7.500 $\times g$ durante 5 minutos a 4°C, se aspiró el etanol y se resuspendió el pellet en 30 μ L de agua milliQ 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 μ g/ μ L.

5.4 Síntesis de la primera cadena de cDNA

A partir de 2 µg de RNA citoplasmático total se procedió a la síntesis de la primera cadena de cDNA mediante transcripción reversa, utilizando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). El cDNA obtenido se almacenó a -80°C a una concentración de 50 ng/µL.

5.5 Expresión de CCLs mediante RT-PCR convencional y en tiempo real

Para analizar la expresión de los mRNAs de CCL19 y CCL21, 50 ng de cDNA se analizaron mediante RT-PCR convencional y en tiempo real. La amplificación por RT-PCR convencional se realizó 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 minuto y 74°C durante 30 segundos, y una incubación final para la activación enzimática a 74°C durante 5 minutos. El producto final de amplificación se evaluó mediante electroforesis en gel agarosa 2% revelado con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) y fotografiado usando un fotodocumentador Gel Logia 2200 Pro (Carestream Gel Logia, Rochester, NY, USA). La amplificación mediante RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando partidores específicos y un reactivo específico (KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix Universal, KAPA Biosystems, Boston, MA, USA) y la amplificación se realizó en un termociclador en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA) utilizando el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos. Como control, se cuantificaron los niveles de expresión de la subunidad RNA ribosomal 18S.

| | Partidor → 3' | Partidor → 5' |
|-------|-----------------------|----------------------|
| CCL19 | gcctgctggttctctggac | ggatggggttctgggtcac |
| CCL21 | caccctctaccacagacatgg | gggccagaaccaggataagg |
| 18S | ctcaacacgggaaacctcac | cgctccaccaactaagaacg |

Tabla 1: Partidores utilizados para la detección de las quimioquinas mediante RT-PCR en tiempo. La expresión de la subunidad RNA ribosomal 18S se utilizó como control.

5.6 Análisis de los datos

Los niveles de expresión de CCL19 y CCL21 se determinaron usando el programa StepOne v2.2.2 (Applied Biosystems), normalizando la expresión de los mRNA de CCL19 y CCL21 a los niveles de expresión de 18S rRNA usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, y se expresaron como promedio \pm desviación estándar de la expresión relativa. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). La normalidad de la distribución de los datos se determinó usando la prueba de Shapiro-Wilk y las comparaciones se analizaron con la prueba t de Student o de Wilcoxon. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p\text{-value} \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Niveles de expresión de CCL19 y CCL21

Los niveles de expresión de los CCL19 y CCL21 en biopsias de pacientes con periodontitis y sujetos sanos se cuantificaron mediante RT-PCR en tiempo real. Mayores niveles de expresión en CCL19 y CCL21 se detectaron en pacientes con periodontitis en comparación a los sujetos sanos (CCL19 $p < 0,001$ y CCL21 $p < 0,001$) (Figura 1a y 1b). Las muestras amplificadas fueron sometidas a electroforesis, identificándose la presencia de CCL19, CCL21 y el control biológico positivo 18S tanto en sujetos sanos como en pacientes con periodontitis (Figura 2).

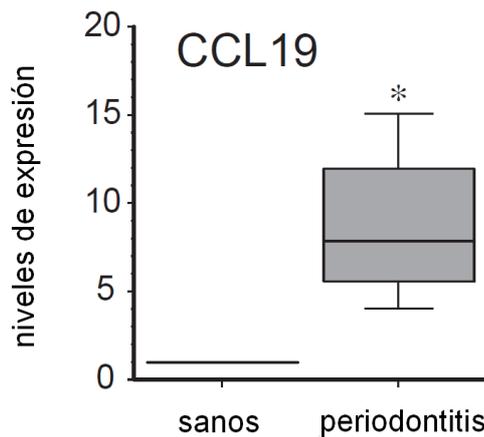


Figura 1a: Niveles de expresión relativos de CCL19 en pacientes con periodontitis y sujetos sanos.

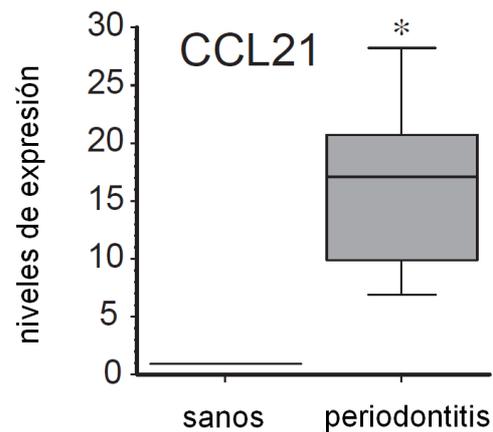


Figura 1b: Niveles de expresión relativos de CCL21 en pacientes con periodontitis y sujetos sanos.

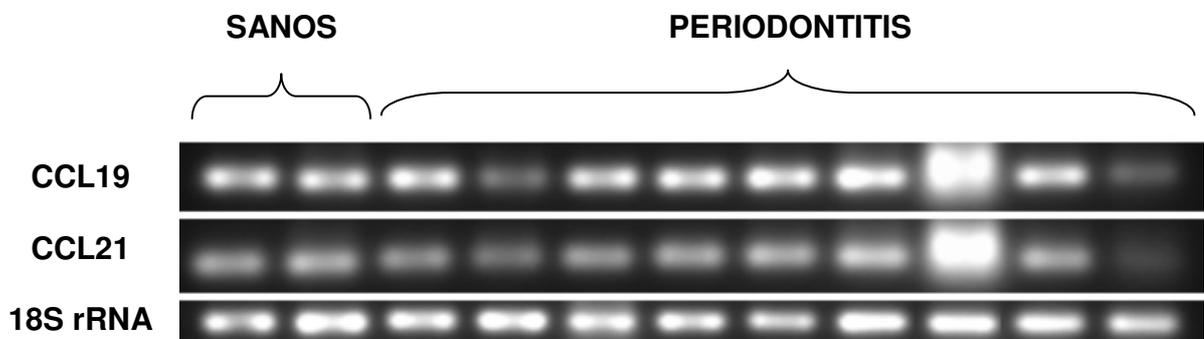


Figura 2: Identificación de la expresión de CCL19, CCL21 y 18S en pacientes con periodontitis y sujetos sanos.

6.2 Ciclo umbral (Ct) de CCL19 y CCL21 y Δ Ct entre CCL19, CCL21 y 18S.

Al analizar el ciclo umbral (Ct) y Δ Ct de CCL19 y CCL21 se detectó que los valores fueron menores significativamente en los pacientes con periodontitis en comparación con los sujetos sanos y la cuantificación relativa (RQ) fue significativamente más alta (Tabla 1 y 2). En la RQ de CCL19 y CCL21 se produjo un aumento en la expresión de $8,6 \pm 4,03$ veces (Tabla 1) y $16,1 \pm 6,93$ veces (Tabla 2), respectivamente, de biopsias obtenidas de pacientes con periodontitis y sujetos sanos.

| CCL19 | Sanos | Periodontitis | pLevene | pValue |
|-------------|-----------------|-----------------|-------------|------------|
| Ct | $31,7 \pm 0,06$ | $28,6 \pm 0,62$ | $p = 0,057$ | $p = 0,01$ |
| Δ Ct | $10,6 \pm 0,03$ | $7,63 \pm 0,67$ | $p = 0,053$ | $p < 0,01$ |
| RQ | 1 | $8,6 \pm 4,03$ | | |

Tabla 1: Ct de CCL19 y Δ Ct entre CCL19 y 18S de pacientes con periodontitis y sujetos sanos.

| CCL21 | Sanos | Periodontitis | pLevene | pValue |
|-------------|------------------|-----------------|-------------|------------|
| Ct | $30,07 \pm 0,03$ | $26,7 \pm 0,71$ | $p = 0,022$ | $p = 0,01$ |
| Δ Ct | $9,6 \pm 0,07$ | $5,7 \pm 0,67$ | $p = 0,037$ | $p < 0,01$ |
| RQ | 1 | $16,1 \pm 6,93$ | | |

Tabla 2: Ct de CCL21 y Δ Ct entre CCL21 y 18S de pacientes con periodontitis y sujetos sanos.

7. DISCUSIÓN

Entre los distintos eventos de señalización celular durante el proceso inflamatorio, las CCLs cumplen un rol fundamental en la regulación de la quimiotaxis en células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ (Charo y Taubman, 2004). La quimiotaxis es un fenómeno inmunológico que permite la adhesión y migración celular y se ha asociado a un incremento en la severidad de las periodontitis (Garlet y cols., 2003). La migración de las células dendríticas es determinante en el inicio y progresión de las enfermedades periodontales y es controlada por la expresión de CCLs y su interacción con los CCRs. En efecto, tanto alteraciones en la expresión de los receptores de CCRs, como un comportamiento quimiotáctico alterado de las células dendríticas, se asocian al inicio de las periodontitis (Sigusch y cols., 2001) y a las formas severas de la enfermedad (Fabbro y cols., 2000). En este contexto, un incremento en la expresión de CCL2 y CCL3 además de sus receptores específicos CCR4 y CCR5, se ha detectado en pacientes con periodontitis (Hosokawa y cols., 2009) y estos mayores niveles se han asociado con la activación y diferenciación de linfocitos Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteodestructivo) (Cutler y Jotwani, 2004).

Los linfocitos Th17 expresan principalmente CCR6 y CCR7 (Silva y cols., 2007; Wang y cols., 2009). La presencia de CCR6, ha sido descrita en lesiones periodontales activas y se asocia con la migración de linfocitos TCD4⁺ (Silva y cols., 2007) y es importante para inducir la expresión y secreción de IL-23 y su expresión está determinada por la presencia de TGF-β1, mientras que CCR7 regula la maduración de células dendríticas y la migración de linfocitos TCD4⁺ de memoria. Ambos receptores determinan la activación, diferenciación y migración de los linfocitos Th17 hacia los tejidos inflamados (Gerard y Rollins, 2001; Wang y cols., 2009).

El receptor de quimioquinas CCR7 y sus respectivos ligandos CCL19 y CCL21 son quimioquinas homeostáticas que son esenciales para la quimiotaxis, adhesión y proliferación de las células del sistema inmune (Comerford y cols., 2013). CCL19 y CCL21 son secretadas por células de los órganos linfáticos

primarios y secundarios y por células dendríticas activadas, para controlar la quimiotaxis, adhesión, migración y proliferación en condiciones de inflamatorias (Comerford y cols., 2013; Forster y cols., 2008).

Estudios previos determinaron que CCL19 y CCL21 están presentes en enfermedades autoinmunes, como por ejemplo en esclerosis múltiple, aterosclerosis, artritis reumatoide, encefalomiелitis y fibrosis pulmonar idiopática (Kuwabara y cols., 2009; Pickens y cols., 2011; Pierce y cols., 2007). En ratones knock out para CCR7 se les indujo artritis reumatoide, demostrando una alteración en el desarrollo y organización del tejido linfoide, estos resultados indican la importancia de CCR7 y sus ligandos para la neogénesis linfoide (Pickens y cols., 2011). Recientemente, se menciona que ratones knock out para CCL19/CCL21 y su receptor CCR7 fueron resistentes a encefalomiелitis autoinmune experimental, debido a la disminución de células Th1 y Th17 (Kuwabara y cols., 2009).

En periodontitis, estudios evidencian que en biopsias de tejido gingival con periodontitis crónica hay un incremento en la producción de CCL2, debido al aumento en la proporción de células inmune en el sitio de la inflamación (Gemmell y cols., 2001). Además, el incremento en la secreción de CCL5 y la expresión de CCR5 induce el reclutamiento de linfocitos y células dendríticas inmaduras hacia el sitio afectados con enfermedad (Lim y cols., 2008; Silva y cols., 2007). En efecto, CCL19 induce un incremento en la quimiotaxis en células dendríticas y linfocitos T y estimula la proliferación celular en el sitio inflamado (Bardi y cols., 2001; Pierce y cols., 2007), mientras que CCL21 inhibe el proceso de apoptosis celular, sugiriendo que el aumento de CCL19 y CCL21 podría inducir la respuesta inmune en tejidos periodontales, llevando a la progresión y mayor severidad de la enfermedad.

En este trabajo de investigación, se evaluó los niveles de expresión de CCL19 y CCL21 en biopsias de tejidos con periodontitis crónica y se puede proyectar su potencial rol en el inicio, progresión y severidad de la periodontitis crónica. Así, sobre la base de los datos presentados se puede especular que el incremento de los niveles de secreción de CCL19 y CCL21 induciría un aumento en el reclutamiento de linfocitos T y células dendríticas, quimiotaxis de células

inmunes hacia el sitio de inflamación y mayores de niveles de proliferación celular, promoviendo una respuesta inmune aumentada.

8. CONCLUSIONES

1. Elevados niveles de expresión de CCL19 y CCL21 se detectaron en pacientes con periodontitis en comparación a sujetos sanos.
2. Los niveles de expresión de CCL19 fue de $8,6 \pm 4,03$ veces más elevados en pacientes con periodontitis en comparación a los sujetos sanos.
3. Los niveles de expresión de CCL21 fue de $16,1 \pm 6,93$ veces más elevados en pacientes con periodontitis en comparación a los sujetos sanos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aoyagi T, Sugawara-Aoyagi M, Yamazaki K and Hara K (1995). Interleukin 4 (IL-4) and IL-6-producing memory T-cells in peripheral blood and gingival tissue in periodontitis patients with high serum antibody titers to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 10(5): 304-310.
- Armitage GC (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4(1): 1-6.
- Bardi G, Lipp M, Baggiolini M and Loetscher P (2001). The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur J Immunol* 31(11): 3291-3297.
- Beck JD and Offenbacher S (2005). Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 76(11 Suppl): 2089-2100.
- Behfarnia P, Birang R, Andalib A and Asadi S (2010). Comparative evaluation of IFN γ , IL4 and IL17 cytokines in healthy gingiva and moderate to advanced chronic periodontitis. *Dent Res J (Isfahan)* 7(2): 45–50.
- Colombo AV, Silva CM, Haffajee A and Colombo AP (2006). Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *J Med Microbiol* 55(5): 609-615.
- Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE and McColl SR (2013). A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 24(3): 269-283.
- Corsiero E, Bombardieri M, Manzo A, Bugatti S, Uguccioni M and Pitzalis C (2012). Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunol Lett* 145(1-2): 62-67.

- Crane IJ, Xu H, Wallace C, Manivannan A, Mack M, Liversidge J and cols. (2006). Involvement of CCR5 in the passage of Th1-type cells across the blood-retina barrier in experimental autoimmune uveitis. *J Leukoc Biol* 79(3): 435-443.
- Cutler CW and Jotwani R (2004). Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol* 2000 35: 135-157.
- Charo IF and Taubman MB (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 95(9): 858-866.
- Darveau RP (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 8(7): 481-490.
- Darveau RP, Belton CM, Reife RA and Lamont RJ (1998). Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 66(4): 1660-1665.
- Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A and Sallusto F (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunol* 10(8): 857-863.
- Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N and cols. (2009). Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 80(2): 290-296.
- Eastcott JW, Yamashita K, Taubman MA, Harada Y and Smith DJ (1994). Adoptive transfer of cloned T helper cells ameliorates periodontal disease in nude rats. *Oral Microbiol Immunol* 9(5): 284-289.
- Fabbro D, Ruetz S, Bodis S, Pruschy M, Csermak K, Man A and cols. (2000). PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anticancer Drug Des* 15(1): 17-28.
- Fernandez EJ and Lolis E (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469-499.
- Forster R, Davalos-Misslitz AC and Rot A (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8(5): 362-371.

- Gaffen SL and Hajishengallis G (2008). 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* 87(9): 817-828.
- Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras A and cols. (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 76(2): 289-294.
- Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Munoz A, Urzua I, Aranda W and cols. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol* 81(10): 1403-1410.
- Garlet GP (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 89(12): 1349-1363.
- Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR and Silva JS (2005). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect* 7(4): 738-747.
- Garlet GP, Martins W, Fonseca BAL, Ferreira BR and Silva JS (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 31(8): 671-679.
- Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM and Silva JS (2003). Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 38(2): 210-217.
- Gemmell E, Carter CL and Seymour GJ (2001). Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol* 125(1): 134-141.
- Gerard C and Rollins BJ (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2(2): 108-115.
- Giannopoulou C, Kamma JJ and Mombelli A (2003). Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol* 30(2): 145-153.
- Gouwy M, Struyf S, Leutenez L, Pörtner N, Sozzani S and Van Damme J (2013). Chemokines and other GPCR ligands synergize in receptor-mediated

migration of monocyte-derived immature and mature dendritic cells. *Immunobiology*.

- Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H and Matsuo T (2009). Cytokines differentially regulate CXCL10 production by interferon- γ -stimulated or tumor necrosis factor- α -stimulated human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 44(2): 225-231.
- Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguchi D, Takahashi K, Yumoto H, Ozaki K and cols. (2002). Macrophage inflammatory protein 3 α -CC chemokine receptor 6 interactions play an important role in CD4⁺ T-cell accumulation in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol* 128(3): 548-554.
- Ihn H, Yamane K, Asano Y, Kubo M and Tamaki K (2002). IL-4 up-regulates the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in dermal fibroblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase dependent pathway. *J Immunol* 168(4): 1895-1902.
- Jankovic D, Liu Z and Gause W (2001). Th1 and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* (22): 450-454.
- Kabashima H, Yoneda M, Nagata K, Hirofuji T and Maeda K (2002). The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. *Cytokine* 20(2): 70-77.
- Kawar N and Alrayyes S (2011). Periodontitis in pregnancy: the risk of preterm labor and low birth weight. *Dis Mon* 57(4): 192-202.
- Kikkert R, Laine ML, Aarden LA and van Winkelhoff AJ (2007). Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 22(3): 145-151.
- Kinane DF and Lappin DF (2001). Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 59(3): 154-160.
- Kuwabara T, Ishikawa F, Yasuda T, Aritomi K, Nakano H, Tanaka Y and cols. (2009). CCR 7 ligands are required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis through generating IL-23-dependent Th17 cells. *The Journal of Immunology* 183(4): 2513-2521.

- Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T and Kinane DF (2001). Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol* 123(2): 294-300.
- Lim H, Lee J, Hillsamer P and Kim C (2008). Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 180(1): 122-129.
- Lopez NJ, Da Silva I, Ipinza J and Gutierrez J (2005). Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol* 76(11 Suppl): 2144-2153.
- Lloyd AR, Biragyn A, Johnston JA, Taub DD, Xu L, Michiel D and cols. (1995). Granulocyte-colony stimulating factor and lipopolysaccharide regulate the expression of interleukin 8 receptors on polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 270(47): 28188-28192.
- Manhart SS, Reinhardt RA, Payne JB, Seymour GJ, Gemmell E, Dyer JK and cols. (1994). Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 65(9): 807-813.
- Marsland BJ, Battig P, Bauer M, Ruedl C, Lassing U, Beerli RR and cols. (2005). CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* 22(4): 493-505.
- Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A and cols. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 198(4): 615-621.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K and cols. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52(1): 145-176.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H and cols. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 275(3): 768-775.

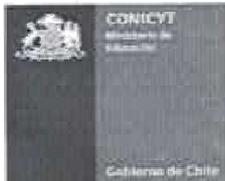
- Noda D, Hamachi T, Inoue K and Maeda K (2007). Relationship between the presence of periodontopathic bacteria and the expression of chemokine receptor mRNA in inflamed gingival tissues. *J Periodontal Res* 42(6): 566-571.
- Nussbaum G, Ben-Adi S, Genzler T, Sela M and Rosen G (2009). Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components. *Infect Immun* 77(9): 3939-3947.
- Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K and cols. (2009). The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res* 88(7): 633-638.
- Page RC and Kornman KS (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 14: 9-11.
- Papadakis KA (2004). Chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 4(1): 83-89.
- Pickens SR, Chamberlain ND, Volin MV, Pope RM, Mandelin AM, 2nd and Shahrara S (2011). Characterization of CCL19 and CCL21 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 63(4): 914-922.
- Pierce EM, Carpenter K, Jakubzick C, Kunkel SL, Evanoff H, Flaherty KR and cols. (2007). Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts migrate and proliferate to CC chemokine ligand 21. *Eur Respir J* 29(6): 1082-1093.
- Pradeep AR, Roopa Y and Swati PP (2008). Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodontal Res* 43(6): 712-716.
- Price JC, Bromfield JJ and Sheldon IM (2013). Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. *Endocrinol* 154(9): 3377-3386.
- Pucher J and Stewart J (2004). Periodontal disease and diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 4(1): 46-50.
- Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ and cols. (2010). Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1⁺ and CCR5⁺ in RANKL⁺ cell

- migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone* 46(4): 1122-1130.
- Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE and Tew JG (2010). IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res* 89(9): 943-947.
- Schieffer B and Luchtefeld M (2011). Emerging role of chemokine receptor 7 in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 21(8): 211-216.
- Sigusch B, Eick S, Pfister W, Klinger G and Glockmann E (2001). Altered chemotactic behavior of crevicular PMNs in different forms of periodontitis. *J Clin Periodontol* 28(2): 162-167.
- Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS and Cunha FQ (2007). Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 86(4): 306-319.
- Smallridge RC, Chindris AM, Asmann YW, Casler JD, Serie DJ, Reddi HV and cols. (2014). RNA sequencing identifies multiple fusion transcripts, differentially expressed genes, and reduced expression of immune function genes in BRAF (V600E) mutant vs BRAF wild-type papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 99(2): E338-347.
- Socransky SS and Haffajee AD (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 38: 135-187.
- Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I and Taubman MA (2000). Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res* 79(8): 1548-1555.
- Tan X, Alrashdan YA, Alkhouri H, Oliver BG, Armour CL and Hughes JM (2013). Airway smooth muscle CXCR3 ligand production: regulation by JAK-STAT1 and intracellular Ca²⁺(+). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304(11): L790-802.
- Taubman MA and Kawai T (2001). Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 12(2): 125-135.
- Teng YTA (2003). The Role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med* 14(4): 237-252.

- Ukai T, Mori Y, Onoyama M and Hara Y (2001). Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol* 46(10): 901-908.
- Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M and Gamonal J (2005). Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 32(4): 383-389.
- Vernal R, Dutzan N, Hernández M, Chandía S, Puente J, León R and cols. (2006). High Expression Levels of Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand Associated With Human Chronic Periodontitis Are Mainly Secreted by CD4⁺ T Lymphocytes. *J Periodontol* 77(10): 1772-1780.
- Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z and Kim CH (2009). The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2(2): 173-183.
- Yucel-Lindberg T and Båge T (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Exp Rev Mol Med* 15: e7.
- Zappa U, Reinking-Zappa M, Graf H and Espeland M (1991). Cell populations and episodic periodontal attachment loss in humans. *J Clin Periodontol* 18: 508-515.
- Zhang T, Hashizume T, Kurita-Ochiai T and Yamamoto M (2009). Sublingual vaccination with outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and Flt3 ligand elicits protective immunity in the oral cavity. *Biochem Biophys Res Commun* 390(3): 937-941.
- Zhao L, Zhou Y, Xu Y, Sun Y, Li L and Chen W (2011). Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 38: 509-516.

10. ANEXO

10.1 Consentimiento informado



Comisión Nacional de Investigación
Científica y Tecnológica - CONICYT

Nº018/FONDECYT/ Medicina G1/0069

Santiago, 23 ENE 2012

Señor
Rolando Vernal Astudillo
Investigador Responsable Proyecto FONDECYT Nº11100298
Universidad de Chile
Facultad de Odontología
Depto. Odontología Conservadora
Sergio Livingstone 943
Santiago

Estimado Sr. Vernal:

Me dirijo a Ud. a fin de confirmarle que el Comité Asesor de Bioética de FONDECYT revisó los antecedentes enviados y consideró que se dio una adecuada respuesta a las observaciones planteadas previamente y se adjuntaron los consentimientos informados modificados.

Estos antecedentes pasaron a formar parte de su proyecto. Se envía copia del consentimiento informado visado por nuestro comité.

Saluda atentamente a Ud.,

MARIO HAMUY WACKENHUT
Presidente
Consejo Superior de Ciencia
Programa FONDECYT

SNV/pap



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

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

Objetivo de la investigación:

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

Personas estudiadas:

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

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

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

Examen clínico y toma de la muestra:

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



Procedimiento de laboratorio y destino de las muestras de sangre:

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

En las muestras de sangre NO se realizarán estudios genéticos.

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

El procedimiento de toma de muestra de sangre es inocuo y estándar. Aún así, en algunos casos puede ocurrir una leve molestia durante la punción con la aguja, desvanecimiento o la aparición de un hematoma o moretón en la zona de punción pasado algunos minutos. Todas estas complicaciones no implicarán riesgo, daño ni detrimento alguno en la salud o en la integridad física y/o síquica de las personas participantes.

Duración de la participación de las personas en el estudio:

Después de realizado el examen dental y tomada la muestra de sangre, si es necesario, al paciente se le realizará el tratamiento dental indicado en un plazo no superior a 2 semanas de realizado el diagnóstico. Una vez tomada la muestra de sangre, el paciente terminará su participación en el estudio.

Beneficios por participar en el estudio:

Los pacientes NO recibirán beneficios directos por participar en el estudio.

El estudio contribuirá a ampliar el conocimiento sobre las defensas de las personas cuando existen infecciones de las encías y los dientes (gingivitis y periodontitis). Esto implica beneficios para el investigador y eventualmente para la odontología clínica.

Aunque los resultados del estudio no implicarán un cambio en el tratamiento dental que los pacientes podrán recibir, los participantes pueden solicitar, si lo desean, información de los resultados del análisis individual y de todo el estudio.



Confidencialidad de los datos:

Todos los datos del paciente serán reservados y sólo se registrarán en la ficha clínica del paciente, manteniendo la confidencialidad tal como lo establece la normativa vigente.

Responsable del Proyecto de Investigación:

El responsable del Proyecto de Investigación es el Profesor Dr. Rolando Vernal Astudillo, quien trabaja en el Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile y que para tal efecto se domicilia en la calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.

Los pacientes pueden contactar al investigador cuando lo deseen para plantear cualquier duda que deseen aclarar.

Institución patrocinante:

La institución patrocinante del Responsable del Proyecto de Investigación es la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Comité Ético Científico:

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Este Comité es presidido por el Prof. Dr. Juan Cortés Araya, quien se domicilia en la calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.

Este Comité es independiente de los investigadores y no tiene conflictos de interés con la industria farmacéutica, cosmética y/o alimentaria.

El paciente que acepte participar en el presente estudio puede solicitar una copia del certificado de aprobación del Proyecto emitido por el Comité.



FORMULARIO
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaración del paciente:

He comprendido las explicaciones que se me han dado, en un lenguaje claro y sencillo, y el investigador me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado.

He comprendido que en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que presto ahora y abandonar la investigación.

Acepto voluntariamente tomar parte en el estudio.

| <u>Identificación del Paciente:</u> | <u>Identificación del Investigador Responsable:</u> |
|--|---|
| Nombre: | Nombre: Rolando Vernal Astudillo |
| Rut: | Rut: 11.635.874-3 |
| Fono: | Fono: +56-3-9781815 |
| ----- | ----- |
| Firma | Firma |
| <u>Fecha de la firma del paciente:</u> | |

Edición del Formulario de Consentimiento Informado: Diciembre de 2010

