

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA

Variabilidad de la respuesta de los linfocitos TCD4⁺ activados con distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Jaime Andrés Díaz Zúñiga

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

Tutor: Rolando Vernal Astudillo.

Financiado por Proyecto FONDECYT 11100298

Santiago, Chile

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
MENCION PERIODONTOLOGÍA

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato

Jaime Andrés Díaz Zúñiga

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Periodontología en examen rendido el viernes 01 de agosto de 2014.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Rodrigo Giacaman

Prof. Dr. Diego Catalán

Prof. Dr. Javier Puente

*Lo que comprendo y lo que canto
lo aprendí de hombres y mujeres:
no sé cómo pero sé cuánto
aprendí de todos los seres.
Cuando al derecho y al revés
me cubrió la sabiduría
empecé a aprender otra vez...*

Pablo Neruda

DEDICATORIA

Al finalizar este ciclo en el cual he logrado un nuevo objetivo en mi vida, quiero darles las gracias de forma especial a quienes me apoyaron para que superara todos los obstáculos para lograrlo, con todo respeto y amor, dedico este triunfo:

A mi mamá:

Con todo mi cariño y mi amor para quien hizo todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba. Por siempre estarás en mi corazón, en mi vida y mi eterno agradecimiento por la que será mi deuda eterna contigo, imposible de pagar. Adelantaste tu camino, pero te alcanzaré.

A mis abuelos:

Al mayor tesoro de la familia, contadores de cuentos e historias, desde la niñez me cobijaron en sus brazos y formaron mi carácter. Por ustedes hice mi primera gran investigación, que hoy concreto dando un paso importante en esta vida. A ustedes, maravillosos padres con muchos años de práctica.

A mi Sammy:

A la paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que pudiera cumplir con el mío. Por tu bondad y sacrificio con el cual me inspiraste a ser mejor, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de tí. Comenzamos un capítulo juntos que pronto cerraremos para abrir nuestro propio capítulo de vida.

A Rolando:

Por tu esfuerzo y dedicación, por tus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación, lograste que pudiera finalizar este trabajo de investigación. Por tu visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por tu rectitud y consejos, que me ayudan día a día a formarme mejor como persona, académico e investigador. La vida a veces nos enseña cuán frágiles somos, creo que ambos nos sentimos un poco más humanos y un poco más vivos cada día.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a Juan Pablo, Carla, Álvaro, Gustavo y Pía y a los que vienen en camino... he perdido la cuenta de cuántos son. En distintas etapas han aportado con lo necesario para el desarrollo de esta tesis. En ocasiones, han ido más allá de lo exigido y se han integrado, permitiendo la formación de un gran equipo. Durante este tiempo, hemos disfrutado de experimentos y experiencias acertadas y fallidas, de celebraciones, de salidas, de congresos, de premios. Este tiempo les ha permitido conocer de cerca la investigación y espero que les quede integrado el gusto por aprender cada día más. Muchachos, sin ustedes esta tesis no hubiera sido posible.

A Camila y Andrea, que contra viento y marea, con trabajos, ensayos, experimentos, días y noches, lograron hacer crecer a nuestra bacteria, alma central de esta investigación.

A toda la gente del Laboratorio de Biología Periodontal: Pablo, Les y Jo. Desde el comienzo abrieron las puertas de la convivencia y me establecieron las normas con las cuales todo fue más ameno. Gracias por los tiempos compartidos.

Al Prof. Dr. Jorge Gamonal por confiar en mí desde mis comienzos en la investigación, desde la IADR Junior en el año 2008 cuando siendo estudiante de perorado me instó a continuar la investigación formalmente y, posteriormente, con la beca decanato 2012 que permitió mantenerme durante mis estudios. Del mismo modo, a laboratorios DENTAID, por sus becas otorgadas los años 2011 y 2013 y su apoyo incondicional a la investigación y a quienes desean aprenderla.

A mis amigos, por todos los buenos momentos que hemos vivido y por los que vendrán. Me ayudaron a sobrellevar muchas cargas en momentos muy difíciles de mi vida, me brindaron su apoyo y siempre fueron incondicionales.

A mi familia, aquella que creyó en mí y ha sido incondicional en mi vida y en los momentos más duros de ella.

Y, finalmente, a mis revisores de tesis. Gracias por sus críticas que permitieron mejorar sustancialmente este trabajo de investigación.

ÍNDICE

1. ABREVIACIONES	9
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	10
3. RESUMEN	11
4. INTRODUCCIÓN	13
<i>4.1 Células dendríticas</i>	<i>14</i>
<i>4.2 Linfocitos Th1/Th2/Th17 y Treg</i>	<i>16</i>
<i>4.3 Reabsorción ósea</i>	<i>17</i>
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
6. HIPÓTESIS	20
7. OBJETIVO GENERAL	21
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
9. MATERIAL Y MÉTODOS	22
<i>9.1 Cultivo de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i></i>	<i>22</i>
<i>9.2 Curvas de crecimiento bacteriano</i>	<i>22</i>
<i>9.3 Purificación de LPS bacteriano</i>	<i>22</i>
<i>9.4 Selección de los sujetos y obtención de la muestra biológica</i>	<i>23</i>
<i>9.5 Purificación de monocitos</i>	<i>23</i>
<i>9.6 Purificación de linfocitos TCD4+ naïve</i>	<i>24</i>
<i>9.7 Diferenciación de los monocitos a células dendríticas</i>	<i>24</i>
<i>9.8 Estimulación de las células dendríticas</i>	<i>24</i>
<i>9.9 Activación de los linfocitos TCD4+ naïve</i>	<i>25</i>
<i>9.10 Análisis de fenotipo celular</i>	<i>25</i>
<i>9.11 Expresión de CD80, CD83 y CD86</i>	<i>25</i>
<i>9.12 Expresión de CD25α</i>	<i>26</i>
<i>9.13 Purificación del RNA citoplasmático total</i>	<i>26</i>
<i>9.14 Síntesis de la primera cadena de cDNA</i>	<i>26</i>
<i>9.15 Expresión de factores de transcripción y citoquinas mediante PCR</i>	<i>27</i>
<i>9.16 Secreción de citoquinas mediante ELISA</i>	<i>28</i>

9.17 <i>Análisis de los datos</i>	28
10. RESULTADOS	30
10.1 <i>Purificación de monocitos</i>	30
10.2 <i>Purificación de linfocitos TCD4+ naïve</i>	31
10.3 <i>Activación de las células dendríticas</i>	31
10.4 <i>Activación de linfocitos TCD4+ naïve</i>	32
10.5 <i>Secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de A. actinomycetemcomitans</i>	32
10.6 <i>Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de A. actinomycetemcomitans</i>	35
10.7 <i>Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b o c de A. actinomycetemcomitans</i>	35
10.8 <i>Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a, b o c de A. actinomycetemcomitans</i>	37
10.9 <i>Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4+ naïve activados</i>	39
10.10 <i>Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4+ naïve activados por células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b o c de A. actinomycetemcomitans</i>	39
10.11 <i>Expresión de citoquinas en linfocitos TCD4+ naïve activados</i>	40
10.12 <i>Expresión de factores de transcripción en linfocitos TCD4+ naïve activados</i>	43
10.13 <i>Niveles de expresión y secreción de RANKL en linfocitos TCD4+ naïve activados</i>	44
10.14 <i>Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción con los niveles de secreción de citoquinas</i>	45
10.15 <i>Correlación entre los niveles de expresión de RANKL y los factores de transcripción</i>	47
11. DISCUSIÓN	49
12. CONCLUSIONES	58
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
14. ANEXOS	68
14.1 <i>Consentimiento Informado</i>	68
14.2 <i>Publicaciones Scielo o ISI</i>	72
14.3 <i>Manuscritos aceptados para su publicación (ISI)</i>	76

<i>14.4 Resúmenes de trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales</i>	77
<i>14.5 Resúmenes de trabajos enviados a congresos nacionales e internacionales</i>	78
<i>14.6 Distinciones</i>	79

1. ABREVIACIONES

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

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

NF-kB: Factor nuclear kappa beta (**N**uclear **F**actor **k**appa **B**).

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

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

IFN: Interferón (**I**nterferon).

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

TCD4⁺: Linfocito TCD4⁺. (**CD**4⁺ T lymphocyte).

Th: linfocito T colaborador (**T** helper).

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

RANKL: Ligando del receptor nuclear *kappa beta* (**R**eceptor **A**ctivador of Nuclear Factor **k**appa B **L**igand).

OPG: Osteoprotegerina (**O**steoprotegerin)

Treg: linfocito T regulador (**T** regulatory).

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

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

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

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

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (**P**olymerase **C**hain **R**eaction).

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

2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1</i>	30
<i>Figura 2</i>	31
<i>Figura 3</i>	32
<i>Figura 4</i>	33
<i>Figura 5</i>	34
<i>Figura 6</i>	36
<i>Figura 7</i>	37
<i>Figura 8</i>	38
<i>Figura 9</i>	41
<i>Figura 10</i>	42
<i>Figura 11</i>	43
<i>Figura 12</i>	44
<i>Figura 13</i>	45
<i>Figura 14</i>	48
<i>Tabla 1</i>	27
<i>Tabla 2</i>	47

3. RESUMEN

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

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

En este estudio, se evaluó la respuesta de células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. Ante el serotipo b se detectaron mayores niveles de expresión y secreción de IL-1 β , IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α en comparación a las células dendríticas estimuladas con los serotipos a o c. Adicionalmente, se analizó la activación de los linfocitos TCD4⁺ *naïve* ante células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* y se cuantificaron los niveles de expresión de los factores de transcripción y de expresión y secreción de las citoquinas fenotipo-específicas. En los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detectaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* y *RORC2* y de producción de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- γ , TNF- α y RANKL, característicos de un patrón de respuesta inmune tipo Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteodestructivo), en comparación a las mismas células estimuladas con los serotipos a o c.

En conjunto, estos datos permiten establecer un mayor potencial inmuno-estimulador del

serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en las células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ naïve. Los mayores niveles de secreción de citoquinas propias de un patrón de respuesta tipo Th1 y Th17 se correlacionaron positivamente con la expresión de *T-bet* y *RORC2*, factores de transcripción determinantes de los fenotipos linfocitarios Th1 y Th17, respectivamente. Estos resultados nos permiten especular una asociación entre la mayor frecuencia de detección del serotipo b en lesiones periodontales de pacientes con periodontitis y la mayor respuesta inducida en las células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ naïve establecida en este estudio, con una mayor patogenicidad del microorganismo, en particular, con un fenotipo de enfermedad pro-inflamatorio y osteo-destructivo.

4. INTRODUCCIÓN

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es un cocobacilo *Gram*-negativo, capnofílico, no móvil, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Suzuki et al., 2001). Clínicamente, se ha asociado tanto a la etiología de las periodontitis crónicas y agresivas (Genco et al., 1986; Asikainen et al., 1991) como al desarrollo de trastornos cardiovasculares, aterosclerosis, neumonías, parto prematuro y bajo peso al nacer (Asikainen et al., 1991; Lopez et al., 2002; Lopez et al., 2005; Novak et al., 2008; Zhang et al., 2010; Hyvärinen et al., 2012).

A. actinomycetemcomitans expresa diversos factores de virulencia, entre ellos, lipopolisacárido (LPS), determinante clave del tipo de inmunidad inducida en los tejidos infectados del hospedero (Perry et al., 1996a; Perry et al., 1996b; Kaplan et al., 2001; Díaz et al., 2012). El LPS es una molécula presente en la membrana externa de bacterias *Gram*-negativas, cubre cerca del 75% de su superficie y, en el caso de *A. actinomycetemcomitans*, es esencial para la mantención de la integridad bacteriana y el anclaje a proteínas de adhesión (Perry et al., 1996a; Perry et al., 1996b; Kaplan et al., 2001). Está conformado por el lípido A, un esqueleto central de oligosacáridos y un O-polisacárido, principal antígeno que estimula la respuesta inmune (Caroff and Karibian, 2003). Sobre la base de la antigenicidad del O-polisacárido del LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se distinguen 6 serotipos bacterianos, denominados: a, b, c, d, e y f. Se ha postulado que entre ellos existen diferencias de inmunogenicidad que pueden reflejarse en una variable patogenicidad (King and Tatum, 1962; Zambon et al., 1983a; Zambon et al., 1983b; Gmür et al., 1993; Kaplan et al., 2001).

En europeos, latino-americanos, africanos y asiáticos, los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans* son los detectados más frecuentemente (Kim et al., 2009; Chen et al., 2010; Roman-Torres et al., 2010; Sakellari et al., 2011; Cortelli et al., 2012), con variaciones de prevalencia dependiendo del estado clínico periodontal del sujeto. En efecto, el aislado más frecuente en lesiones periodontales en pacientes afectados de periodontitis crónica y agresiva es el serotipo b (Paju et al., 2000; Roman-Torres et al., 2010; Cortelli et al., 2012).

Los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* difieren en su capacidad para co-agregarse con *Fusobacterium nucleatum*. En este sentido, mientras que el LPS purificado del serotipo b (cepa Y4) de *A. actinomycetemcomitans* interfiere en la unión de *A. actinomycetemcomitans* con *F.*

nucleatum, el LPS purificado del serotipo a (cepa ATCC® 29523™) no interfiere en esta unión (Rosen et al., 2006). Además, los distintos serotipos inducen niveles variables de proliferación celular y producción de citoquinas pro-inflamatorias en distintas células del hospedero. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* (ATCC® 29522™) inhibe la proliferación de células epiteliales gingivales e incrementa los niveles de expresión de IL-8 e ICAM-1 en comparación con los serotipos a y c (Shimada et al., 2008). Además, el LPS del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce mayores niveles de secreción de IL-1 β en macrófagos murinos (Takahashi et al., 1991) y una mayor resistencia a la fagocitosis y destrucción por neutrófilos (Yamaguchi et al., 1995) en comparación al LPS de los otros serotipos bacterianos. Estos estudios demuestran una variable inmunogenicidad en distintas células del hospedero entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y estas variaciones podrían determinar diferencias en su rol etiológico en las periodontitis; sin embargo, los mecanismos asociados a esta potencial variable patogenicidad aún no se han descrito (Zambon et al., 1983b; Kaplan et al., 2001; Shimada et al., 2008; Henderson et al., 2010; Díaz-Zúñiga et al., 2013).

4.1 Células dendríticas

Las células dendríticas reconocen las bacterias a través de los receptores tipo *Toll* (del inglés *Toll-like receptor*, TLR), las que identifican estructuras microbianas altamente conservadas, tal como el LPS (Perry et al., 1996a; Perry et al., 1996b; Kaplan et al., 2001; Bhattacharyya et al., 2010; Kachlany, 2010; Shao-Cong, 2011). Las células dendríticas reconocen el LPS de *A. actinomycetemcomitans* mediante TLR2 y TLR4 (Kikkert et al., 2007) y su vía de señalización activa los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, asociados a la producción de citoquinas y quimioquinas (Banchereau et al., 2000; Wallet et al., 2005; Kikkert et al., 2007; Zhu and Paul, 2008; Nussbaum et al., 2009; Bhattacharyya et al., 2010; Palucka et al., 2010; Shao-Cong, 2011). Al ser estimuladas con LPS, las células dendríticas incrementan los niveles de expresión y secreción de las citoquinas interleuquina (IL)-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interferón (IFN)- γ y de las moléculas co-estimuladoras de la presentación antigénica CD80 y CD86 (Karin et al., 1997; Jacobs-Helber et al., 1998; Brightbill et al., 1999; Banchereau et al., 2000; Gasparini et al., 2009; Lawrence, 2009; Shao-Cong, 2011).

La activación de CD80 induce la expresión y secreción de IFN- γ , la activación de CD86 induce

la expresión y secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 y TNF- α (Bhattacharyya et al., 2010; Shao-Cong, 2011) y la activación de CD83 es regulada por CD80 y CD86 (Lechmann et al., 2002). En un estudio *in vitro* se analizaron los niveles de activación de las células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos capsulares de *Porphyromonas gingivalis*, observándose un incremento en los niveles de expresión de CD80, CD83 y CD86 y un incremento en los niveles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias, dependiente del serotipo bacteriano infectante (Vernal et al., 2009). Además, la cepa *P. gingivalis* 381 mostró un efecto inductor potente de secreción de IL-12 en células dendríticas (Cutler and Jowatni, 2004), en cambio, ante la cepa *P. gingivalis* O55:B5, se detectaron bajos niveles de secreción de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (Kanaya et al., 2004). Finalmente, la cepa *P. gingivalis* 381 con fimbria fue más eficaz que la cepa mutante *P. gingivalis* DPG3 carente de fimbria en invadir las células dendríticas, inducir la expresión de CD80, CD83 y CD86 y la secreción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α (Cutler and Jowatni, 2004).

Las células dendríticas maduras secretan IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18 (Brightbill et al., 1999), las que, durante la presentación antigénica, cumplen un rol fundamental en la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4⁺. Así, la diferenciación a los distintos fenotipos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th) dependerá: (1) de la naturaleza del antígeno presentado y asociado a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, (2) del tipo y concentración de moléculas co-estimuladoras expresadas por las células dendríticas y (3) del patrón de citoquinas que predomina en el territorio anatómico donde ocurre la interacción celular, muchas de ellas producidas por las células dendríticas (Galy et al., 1995).

Ante un predominio de IL-12 se expresará el factor de transcripción *T-bet* que determinará la diferenciación selectiva hacia el fenotipo Th1, en presencia de IL-4 se expresará *GATA-3* que determinará el fenotipo Th2, ante TGF- β 1 se expresará el factor de transcripción *Foxp3*, determinando el fenotipo T regulador (Treg) y en presencia de TGF- β 1 e IL-6 se expresará *RORC2* que determinará el fenotipo Th17 (Sozzani et al., 1998; Banchereau et al., 2000; Steinman et al., 2003; Azuma, 2006; Veldhoen et al., 2008; Bluestone et al., 2009).

4.2 Linfocitos Th1/Th2/Th17 y Treg

Los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg secretan distintos patrones de citoquinas que determinan su función durante las periodontitis. El fenotipo Th1 se caracteriza por la secreción de IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , responsables de una respuesta pro-inflamatoria, el fenotipo Th2 secreta IL-4, IL-5 e IL-13, asociados a una respuesta moduladora de la inflamación (Seder and Paul, 1994; Abbas et al., 1996; Jankovic et al., 2001; Murphy and Reiner, 2002; Reiner, 2007), el fenotipo Th17 se caracteriza por la secreción de IL-6, IL-17, IL-21, IL-23 y RANKL, considerándose un fenotipo pro-inflamatorio y osteo-destructivo al estimular la diferenciación de los osteoclastos y la reabsorción del hueso alveolar (Harrington et al., 2006; Stockinger and Veldhoen, 2007), y el fenotipo Treg se caracteriza por la expresión de IL-10 y TGF- β 1, que cumplen un rol inmuno-supresor (Bluestone and Abbas, 2003; Reiner, 2007; Vernal et al., 2008; Appay et al., 2008; Weaver and Hatton, 2009).

Durante las periodontitis, los linfocitos Th1 participan en la activación de la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos y estimulación de la secreción de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias (Appay et al., 2008), asociándose a la inflamación y osteo-destrucción local (Baker et al., 1999; Garlet, 2010). En efecto, IFN- γ induce *in vivo* la sobre-expresión de IL-1 β , TNF- α y RANKL (Garlet, 2010), la formación de osteoclastos y la reabsorción del hueso alveolar (Repeke et al., 2010) y se ha detectado tanto en lesiones periodontales progresivas como severas (Garlet et al., 2003).

Los linfocitos Th2 secretan principalmente IL-4 y poseen una función inmuno-moduladora al inhibir la producción de IFN- γ (Appay et al., 2008; Bluestone et al., 2009) y RANKL (Ihn et al., 2002; Giannopoulou et al., 2003) y en pacientes con periodontitis crónica y agresiva los bajos niveles de IL-4 se asocian con un incremento en los niveles de IFN- γ (Garlet et al., 2004).

Los linfocitos Th17 se han asociado con enfermedades osteo-destructivas de carácter crónico, tal como las periodontitis (Vernal et al., 2006; Vernal et al., 2008; Cardoso et al., 2009), y se ha correlacionado la producción de sus citoquinas fenotipo-específicas con la progresión de las lesiones periodontales activas (Takahashi et al., 2005; Vernal et al., 2005; Vernal et al., 2006; Sato et al., 2006; Vernal et al., 2008; Dutzan et al., 2009; Ohyama et al., 2009; Tanaka, 2013; Caetano-Lopes et al., 2013). RANKL cumple un rol fundamental en la modulación fisiológica y patológica de la

reabsorción ósea (Walsh and Choi, 2003; Takahashi et al., 2005) y se ha establecido que los linfocitos Th17 inducen la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea alveolar mediante su secreción (Taubman and Kawai, 2001; Takahashi et al., 2005; Vernal et al., 2005; Vernal et al., 2006; Cardoso et al., 2009; Di Benedetto et al., 2013).

Los linfocitos Treg regulan la función de los linfocitos Th1, Th2 y Th17 mediante la secreción de TGF- β 1 e IL-10, inhibiendo la expresión y secreción de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α y RANKL (Garlet et al., 2004; Zhang and Teng, 2006; Claudino et al., 2008; Dutzan et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Naundorf et al., 2009; Rossato et al., 2012).

Recientemente, se han descrito 2 nuevos fenotipos linfocitarios: Th9 y Th22. Los linfocitos Th9 se diferencian en presencia de TGF- β 1 e IL-4, que activan al factor de transcripción *Spi.B*, se caracterizan por secretar IL-9 y tener una función pro-inflamatoria e inmuno-supresora, dependiendo de la patología descrita (Chang et al., 2010; Takami et al., 2012; Leng et al., 2012; Goswami and Kaplan, 2012; Baba et al., 2012). Los linfocitos Th22 se diferencian en presencia de TNF- α e IL-6, que activan al factor de transcripción *AhR*, se caracterizan por secretar IL-22 y tener una función osteo-destructora (Ikeuchi et al., 2005; Honda, 2012; Kim et al., 2012; Baba et al., 2012). No obstante, el rol de los linfocitos Th9 y Th22 no ha sido establecido claramente en la etiopatogenia de las periodontitis.

4.3 Reabsorción ósea

Las periodontitis se caracterizan por la destrucción del hueso alveolar que rodea a los dientes y esta destrucción se asocia a incrementos en la producción de RANKL, IL-6, IL-17 y el factor de transcripción *RORC2*, característicos de un fenotipo linfocitario Th17 (Vernal et al., 2006). En efecto, se han observado incrementos en los niveles de RANKL e IL-17 en pacientes con periodontitis tanto crónicas como agresivas (Vernal et al., 2005; Kikuchi et al., 2005; Vernal et al., 2006; Vernal et al., 2008; Ohyama et al., 2009; Garlet, 2010; Hernández et al., 2011).

RANKL es un regulador clave del metabolismo óseo y es esencial en la diferenciación y activación de osteoclastos durante la reabsorción ósea patológica. Diferentes estudios han analizado los niveles de RANKL y osteoprotegerina (OPG), su inhibidor biológico, en los tejidos periodontales

de pacientes con periodontitis y sujetos sanos. En general, existe un aumento en la razón RANKL/OPG en periodontitis en comparación a salud periodontal y una disminución luego de la terapia periodontal (Taubman and Kawai, 2001; Takeichi et al., 2000; Vernal et al., 2005; Vernal et al., 2006; Sakellari et al., 2008; Buduneli and Kinane, 2011). Entre las células que expresan y secretan RANKL se describen los osteoblastos, fibroblastos y linfocitos Th17. Los osteoblastos reconocen el LPS bacteriano mediante TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 y activan NF-κB incrementando los niveles de expresión de RANKL (Matsumoto et al., 2012). Los fibroblastos expresan bajas concentraciones de RANKL en condiciones fisiológicas e incrementan su secreción luego del reconocimiento de *A. actinomycetemcomitans* en condiciones patológicas. (Takahashi et al., 2005; Vernal et al., 2006; Vernal et al., 2008; Cochran, 2008). Los linfocitos Th17 promueven la osteoclastogénesis en forma directa mediante la producción de RANKL y en forma indirecta mediante la producción de citoquinas que inducen la síntesis de RANKL en osteoblastos y fibroblastos (Vernal et al., 2006; Vernal et al., 2008; Vernal and Garcia-Sanz, 2008).

IL-17 es una citoquina secretada por los linfocitos Th17 y es esencial en la diferenciación y activación de los osteoclastos. Diferentes estudios han analizado los niveles de IL-17 en los tejidos periodontales de pacientes con periodontitis (Boyle et al., 2003; Vernal et al., 2005; Sato et al., 2006; Cardoso et al., 2009). En general, IL-17 induce la expresión y secreción de RANKL en osteoblastos y linfocitos Th17 y contribuye al reclutamiento de células que secretan citoquinas pro-inflamatorias, como los linfocitos Th1 (Di Benedetto et al., 2013).

En términos generales, los linfocitos Th1 condicionarán un ambiente inflamatorio local y los linfocitos Th17 determinarán la reabsorción ósea durante las periodontitis (Taubman and Kawai, 2001; Walsh and Choi, 2003; Brand et al., 2005; Vernal et al., 2005; Takahashi et al., 2005; Ikeuchi et al., 2005; Vernal et al., 2006; Sato et al., 2006; Kramer and Gaffen, 2007; Sa et al., 2007; Ohyama et al., 2009), así, durante las periodontitis, microorganismos patógenos periodontales con mayor inmunogenicidad Th1 y Th17 potencialmente serían más patogénicos.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria patógena que se asocia ampliamente a la etiología de las periodontitis (Zambon, 1996; Socransky et al., 1998; Socransky and Haffajee, 2005; Gajardo et al., 2005; d'Empaire et al., 2006; Lafaurie et al., 2007). Expresa distintos factores de virulencia que permiten su adhesión a las células del hospedero, la invasión tisular, la evasión de la fagocitosis y la destrucción tisular (Henderson et al., 2003; Ruiz et al., 2006; Tang and Mintz, 2010; Kachlany, 2010; Henderson et al., 2010; Díaz et al., 2012). Entre los factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans*, el LPS cumple un rol importante en su patogenicidad y sobre la base del O-polisacárido que lo compone distintos serotipos son descritos (King and Tatum, 1962; Zambon et al., 1983b; Gmür et al., 1993; Kaplan et al., 2001).

Cuando células dendríticas humanas diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica fueron estimuladas con los distintos serotipos capsulares (K) de *P. gingivalis*, se detectó que los serotipos K1 y K2 indujeron mayor expresión de citoquinas en comparación a los otros serotipos (Vernal et al., 2009). Usando el mismo modelo experimental, una respuesta Th distinta fue descrita en linfocitos T estimulados. En particular un fenotipo tanto Th1 como Th17 se indujo en presencia de los serotipos K1 y K2, un fenotipo Th2 en presencia de los serotipos K3, K4 y K5 y un fenotipo Treg ante la estimulación con la cepa K⁻ carente de cápsula extracelular (Vernal et al., 2014a).

El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detecta con mayor frecuencia en las lesiones periodontales de pacientes con periodontitis e induce una respuesta más potente en distintas células de la inmunidad innata del hospedero, lo que sugiere un mayor potencial patogénico que podría asociarse a una mayor inmunogenicidad en células dendríticas y linfocitos TCD4⁺, tal como la descrita para los serotipos K1 y K2 de *P. gingivalis*. En este contexto, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* podría tener un mayor efecto inmuno-estimulador que los serotipos a o c y podría inducir predominantemente un patrón de respuesta tipo Th1 (pro-inflamatorio) y/o Th17 (osteo-destructivo) durante la infección periodontal.

6. HIPÓTESIS

Los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* poseen una inmunogenicidad diferente e inducen en los linfocitos TCD4⁺ naïve un patrón de respuesta distinto. Particularmente, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce mayores niveles de producción de citoquinas en comparación a los otros serotipos bacterianos y principalmente un patrón de respuesta asociado a los fenotipos Th1 y Th17.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de los factores de transcripción y de expresión y secreción de citoquinas asociadas a los fenotipos Th1, Th2, Th17 y Treg en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* más frecuentemente detectados en la cavidad oral en humanos: a, b y c.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles de expresión y secreción de IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α y TGF- β 1 en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

2. Cuantificar los niveles de expresión y secreción de RANKL producidos por los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

3. Cuantificar los niveles de expresión de *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3*, factores de transcripción asociados a los fenotipos Th1, Th2, Th17 y Treg, respectivamente, en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

4. Asociar los niveles de secreción de IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α y TGF- β 1 con los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* producidos por los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

5. Asociar los niveles de secreción de RANKL con los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* producidos por los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Cultivo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC® 29523™ (serotipo a), ATCC® 43717™ (serotipo a), ATCC® 29522™ (serotipo b), ATCC® 43718™ (serotipo b), ATCC® 29524™ (serotipo b), ATCC® 33384™ (serotipo c) y ATCC® 43719™ (serotipo c) se sembraron en medio de cultivo agar infusión cerebro corazón (Oxoid LTD, Hampshire, England) e incubaron a 37°C en condiciones de capnofilia (O₂ 8% y CO₂ 12%) usando generadores CampyGen™ (Oxoid Ltd). Para obtener un número similar de microorganismos de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* para la estimulación celular se realizaron curvas de crecimiento bacteriano.

9.2 Curvas de crecimiento bacteriano

Cada una de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* se inoculó en 10 mL de caldo de cultivo tripticasa de soya suplementado con extracto de levadura 2,5% hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,05 medida en espectrofotómetro a un longitud de onda de 560 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). Lecturas de espectrofotómetro adicionales se midieron en distintos tiempos hasta que el microorganismo alcanzó la fase de crecimiento estacionario. Con cada medición de DO se tomó una muestra de 100 µL, que se diluyó de forma seriada (log₁₀) en amortiguador fosfato salino (PBS) y 100 µL de cada dilución se sembró en medio de cultivo agar tripticasa de soya suplementado con extracto de levadura 2,5%. Luego de 5-7 días, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y se contrastó con las DO correspondientes. Se graficaron las curvas DO *versus* tiempo y DO *versus* UFC para obtener un número conocido de UFC/mL en fase de crecimiento exponencial para realizar la estimulación de las células dendríticas.

9.3 Purificación de LPS bacteriano

De cada cepa de *A. actinomycetemcomitans*, 10⁹ bacterias/mL se cultivaron en 200 mL de caldo tripticasa de soya suplementado con extracto de levadura 2,5% para obtener LPS puro siguiendo un

protocolo descrito previamente (Marolda et al., 2006). Las bacterias se lisaron en un amortiguador que contiene dodecyl sulfato de sodio (SDS) 2%, β -mercaptoetanol (2-ME) 4% y 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8) y se procedió con la digestión y eliminación de las proteínas con 20 μ g/mL de proteinasa K y una solución de fenol 90%, 2-ME 0,1% y 8-hidroxiquinolona 0,2%. Finalmente, se removieron los residuos de fenol con etil-éter saturado en 10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA (pH 8,0) y el LPS obtenido se almacenó a -20°C hasta la estimulación celular. El LPS se visualizó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 14% y SDS y Tris-glicina sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelado con tinción de ácido peryódico de plata. El LPS se cuantificó utilizando la reacción ácida de malondialdehído tiobarbitúrico.

9.4 Selección de los sujetos y obtención de la muestra biológica

Muestras de sangre periférica se obtuvieron de 18 sujetos donantes sanos seleccionados por el método no probabilístico de casos consecutivos en los bancos de sangre de los Hospitales Dr. Luis Calvo Mackenna y del Salvador, pertenecientes al Servicio de Salud Metropolitano Oriente. A partir de las leuco-reducciones obtenidas durante el proceso de plaquetoféresis, se purificaron los monocitos y linfocitos TCD4⁺ *naïve* circulantes periféricos tal como se describe en detalle más adelante. El protocolo de investigación se explicó a todos los participantes del estudio, quienes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y de CONICYT (Anexo 1).

9.5 Purificación de monocitos

Las células periféricas mononucleares (del inglés *peripheral blood monocytes cells*, PBMCs) se aislaron usando una gradiente de Ficoll®, siguiendo las instrucciones del fabricante (Ficoll-Paque Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Los monocitos se purificaron desde una fracción de las PBMCs mediante separación inmuno-magnética (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany), según el siguiente protocolo: las PBMCs se lavaron 2 veces en PBS y posteriormente se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD14 humano conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 15 min a 4°C. Luego de ser lavadas, las células se resuspendieron en PBS y los

monocitos se aislaron usando columnas de separación MS montadas en un campo magnético. La fracción de células CD14⁺ separadas corresponden a los monocitos, los que se contaron utilizando una cámara de Neubauer[®]. Su fenotipo se confirmó usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.6 Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve

Posteriormente, se purificaron los linfocitos TCD4⁺ naïve utilizando un *kit* de depleción celular específico y de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MACS; Miltenyi Biotec). Para esto, una fracción de las PBMCs se incubó con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD45RO, CD56, CD123, TCR γ/δ , HLA-DR y CD235a humanos conjugados con biotina durante 20 min a 4°C y posteriormente con anticuerpo anti-biotina conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 15 min a 4°C. Luego de ser lavadas, las células se resuspendieron en PBS y los linfocitos TCD4⁺ naïve se aislaron usando columnas de depleción LD montadas en un campo magnético. La fracción de células CD4⁺ separadas corresponden a los linfocitos TCD4⁺ naïve, los que se contaron utilizando una cámara de Neubauer[®]. El fenotipo celular se confirmó usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.7 Diferenciación de los monocitos a células dendríticas

Los monocitos purificados se sometieron inmediatamente a un protocolo estandarizado de diferenciación a células dendríticas (Vernal et al., 2008; Vernal et al., 2009; Díaz-Zúñiga et al., 2013). Los monocitos CD14⁺ se cultivaron durante 6 días a una concentración de 0,7x10⁶ células/mL en 3mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) y 20 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CFS) y la citoquina IL-4 (R&D, Minneapolis, MN USA) a 37°C y 5% de CO₂.

9.8 Estimulación de las células dendríticas

Las células dendríticas diferenciadas se estimularon durante 2 días con los distintos serotipos de *A.*

actinomycescomitans a una multiplicidad infectante incremental (del inglés *multiplicity of infection*, MOI) de -1 a 2 (razón bacterias/células dendríticas) o con LPS de *A. actinomycescomitans* a concentraciones de 10, 20 y 50 ng/mL. Como control positivo, células dendríticas se estimularon con 10 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland) y, como control negativo, se utilizaron células dendríticas no estimuladas. La diferenciación y estimulación de las células dendríticas fue evaluada con anticuerpos específicos mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.9 Activación de los linfocitos TCD4⁺ naïve

Las células dendríticas estimuladas se lavaron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina y se co-cultivaron con linfocitos TCD4⁺ naïve autólogos a una razón de 1:10 durante 6 días a 37°C y 5% CO₂. Para cada individuo, el experimento fue realizado de forma independiente.

9.10 Análisis de fenotipo celular

La purificación de los monocitos y su diferenciación a células dendríticas se evaluó mediante citometría de flujo usando los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugados con fluorocromos PE, FITC o PE/Cy5: anti-CD14 (monocitos) y anti-CD1a (células dendríticas inmaduras) (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA), utilizando un equipo FACScan de citometría de flujo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). La purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve se evaluó usando los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugado con fluorocromos PE o FITC: anti-CD4 (linfocitos TCD4⁺) y anti-CD14 (monocitos) (BD Biosciences Pharmigen).

9.11 Expresión de CD80, CD83 y CD86

Con el objetivo de comparar los niveles de activación de las células dendríticas ante los distintos serotipos de *A. actinomycescomitans*, la expresión de la molécula CD83 (marcador de maduración de células dendríticas) y CD80 y CD86 (moléculas co-estimuladoras de la presentación

antigénica a los linfocitos T) se evaluó mediante citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugados con fluorocromos PE y FITC, respectivamente (BD Biosciences Pharmingen).

9.12 Expresión de CD25 α

Con el objetivo de comparar los niveles de activación de los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, la expresión de la molécula CD25 α (marcador de activación de linfocitos T) se evaluó mediante PCR en tiempo real según el protocolo descrito más adelante.

9.13 Purificación del RNA citoplasmático total

Luego de la estimulación celular, mediante centrifugación a 5.000 xg durante 10 min, se obtuvieron las células para la extracción del RNA citoplasmático total. Las células se lavaron dos veces en PBS y se lisaron en 400 μ L de amortiguador de lisis conteniendo Igepal[®] CA-630 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 10 mM del vanadyl-ribonucleosidos (VRC) (Gibco Invitrogen, Carlsbad). Luego de centrifugar a 14.000 xg durante 10 seg, el sobrenadante fue digerido con 25 μ g/mL de proteinasa K (Roche Ltd, Basel, Switzerland), SDS 1% y 15 mM de EDTA (Fluka Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C. El RNA citoplasmático total fue extraído con 400 μ L de solución fenol:cloroformo:isoamilalcohol 25:24:1 (Fluka Sigma-Aldrich), precipitado a -20°C con 0,3 M de acetato de sodio, 1 mL de etanol 100% y 1 μ L de glicógeno (20 μ g/ μ L) (Roche Ltd), recuperado por centrifugación a 14.000 xg durante 30 min y resuspendido 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.

9.14 Síntesis de la primera cadena de cDNA

A partir de 2 μ g de RNA se procedió a la síntesis de la primera cadena de cDNA mediante

transcripción reversa, utilizando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

9.15 Expresión de factores de transcripción y citoquinas mediante PCR

La expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1 y RANKL y de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* se analizaron a partir de 50 ng de cDNA mediante PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos (Tabla 1) y un *kit* KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems, MA, USA). Utilizando un termociclador en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA) se realizó el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60° durante 30 segundos. Como control de amplificación se analizaron los niveles de expresión de la subunidad de RNA ribosomal 18S.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación mediante PCR.

Citoquinas y factores de transcripción	Partidor→3'	Partidor→5'
IL-1 β	ctgtcctgcgtgtgaaaga	ttgggtaattttgggatctaca
IL-4	caccgagttgaccgtaacag	gccctgcagaagggttcc
IL-5	ctctgaggattcctgttctctgt	cagtacccccttcacagtt
IL-6	gcccagctatgaactcctct	gaaggcagcaggcaacac
IL-10	tgggggagaacctgaagac	ccttgcctctgtttcacagg
IL-12	cactcccaaacctgctgag	tctcttcagaagtgaaggta
IL-17	tgggaagacctcattggtgt	ggatttcgtgggattgtgat
IL-23	agcttcatgcctccctactg	ctgctgagtctcccagtgg
TNF- α	cagcctcttctccttctgat	gccagagggtgattagaga
IFN- γ	ggcatttgaagaattgaaag	ttggatgctctggtcatctt
TGF- β 1	cacgtggagctgtaccagaa	cagccggtgctgaggta
RANKL	tgattcatgtaggagaattaaacagg	gatgtgctgtgatccaacga

CD25 α	caagcgagccttcagatt	ggccactgctacctggact
<i>T-bet</i>	tccaagttaatcagcaccaga	tgacaggaatgggaacatcc
<i>GATA-3</i>	ctcattaagcccaagcgaag	tctgacagtgcacaggac
<i>RORC2</i>	agaaggacagggagccaag	caagggatcacttcaattgtg
<i>Foxp3</i>	acctacgccacgctcatc	tcattgagtgtccgctgct
18S rRNA	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

9.16 Secreción de citoquinas mediante ELISA

A partir de 100 ó 200 μ L del sobrenadante de los cultivos celulares, se cuantificó la secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans* y los niveles de secreción de RANKL en linfocitos TCD4⁺ *naïve* expuestos a células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans* mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, USA) y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un espectrofotómetro de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

9.17 Análisis de los datos

Los datos de citometría de flujo se representaron como histogramas usando el software WinMDi 2.9 (The Scripps Research Inst., La Jolla, CA, USA) y se expresaron como porcentaje promedio \pm desviación estándar de células positivas sobre el total de células analizadas en cada condición experimental. Los niveles de citoquinas y factores de transcripción evaluados mediante ELISA y PCR en tiempo real se expresaron como concentración (pg/ml) o niveles relativos de expresión, respectivamente. 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 Kolgomorov-Smirnov. Las diferencias en la expresión de los marcadores de superficie CD80, CD83 y CD86 se analizaron mediante la prueba χ^2 y los niveles de expresión de los factores de transcripción y de expresión y secreción de las citoquinas se analizaron

utilizando las pruebas ANOVA y de Tukey (gráficas de barra o puntos, mostrando promedio \pm desviación estándar) o de Kruskal Wallis y de Dunn (gráficas de cajas y clavijas, mostrando mediana, recorrido intercuartílico Q_1 - Q_3 e interpercentílico P_{10} - P_{90}). La asociación entre la secreción de las citoquinas o RANKL con la expresión de los factores de transcripción estudiados se analizó usando la prueba de correlación de Pearson o Spearman. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p\text{-value} < 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1 Purificación de monocitos

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

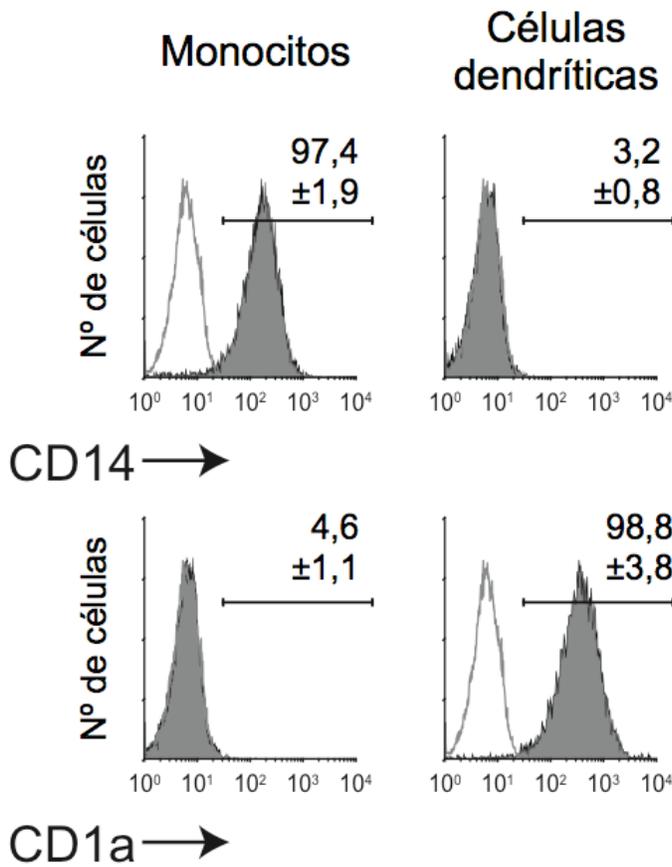


Figura 1. Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas.

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

10.2 Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve

La purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve fue evaluada mediante citometría de flujo (Figura 2). A partir de las PBMCs aisladas de sangre periférica, se obtuvo una población de linfocitos de alta pureza, demostrado por los elevados niveles de expresión del marcador específico CD4 (> 98%) y bajos niveles de expresión del marcador CD14 de monocitos (< 0,12%).

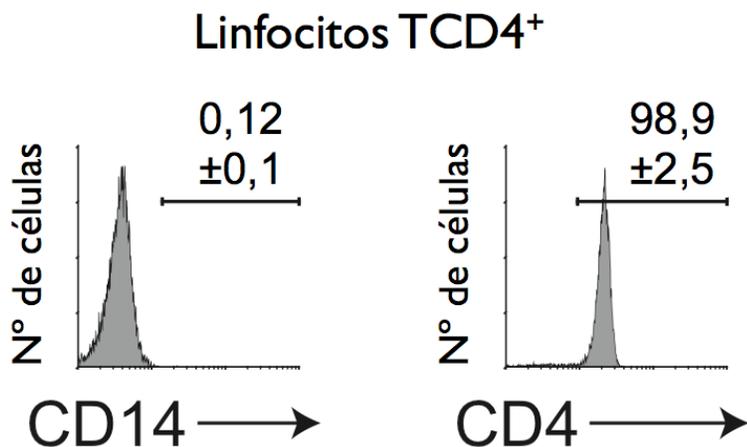


Figura 2. Purificación de linfocitos TCD4⁺ naïve.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de linfocitos (células CD4⁺) a partir de las PBMCs.

10.3 Activación de las células dendríticas

Los niveles de activación de las células dendríticas fue evaluada analizando los niveles de expresión de CD80, CD83 y CD86 mediante citometría de flujo (Figura 3). Un alto porcentaje de células dendríticas activas se observó posterior a la estimulación con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*, tal como se demuestra por el incremento de los marcadores CD80 (> 95%), CD83 (> 95%) y CD86 (> 94%). No se observaron diferencias estadísticas en los niveles de activación de las células dendríticas ante la estimulación con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (CD83 p=0,938, CD80 p=0,532 y CD86 p=0,933).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

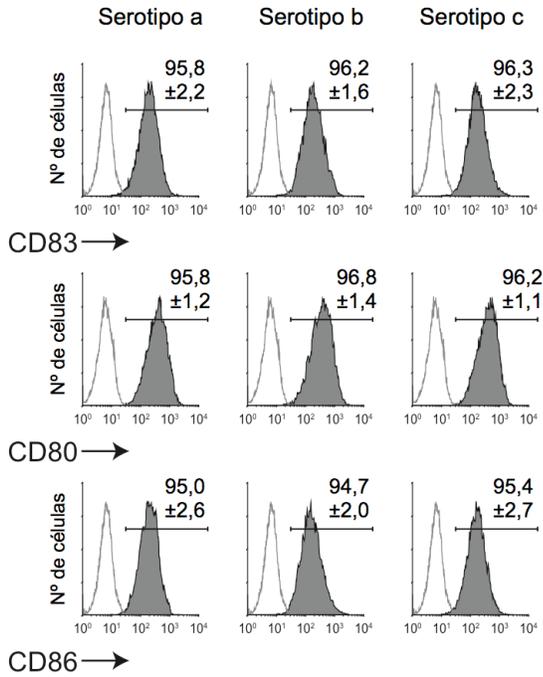


Figura 3. Activación de las células dendríticas ante los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

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

10.4 Activación de linfocitos TCD4⁺ naïve

Los niveles de activación de los linfocitos TCD4⁺ naïve fue evaluada analizando los niveles de expresión de CD25α mediante PCR en tiempo real (Figura 4). Elevados niveles de expresión de CD25α se observaron posterior a la estimulación con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans*, en comparación a linfocitos TCD4⁺ naïve no inducidos (p<0,05). No se observaron diferencias estadísticas en los niveles de expresión de CD25α entre los linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (Figura 4).

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

En las células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se determinaron los niveles de secreción (pg/mL) de las citoquinas IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN y TNF, mediante ELISA (Figura 5). Las células dendríticas presentaron un efecto dosis respuesta entre los niveles de secreción

de las citoquinas (MOIs=-1 a 2). Mayores niveles de secreción de IL-1 β , IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α se detectaron en las células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans*, en comparación a los otros serotipos bacterianos. Estas diferencias fueron detectadas para IL-1 β (p=0,048), IL-12 (p=0,042), IL-23 (p=0,015), IFN- γ (p<0,0001) y TNF- α (p<0,001) a MOI=2 y para IFN- γ (p=0,003) y TNF- α (p=0,002) e IL-23 (p<0,001) a MOI=1. Para las citoquinas IL-5 e IL-10 no se detectaron diferencias entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Además, no se detectaron diferencias de secreción para ninguna citoquina entre los serotipos a o c de *A. actinomycetemcomitans*.

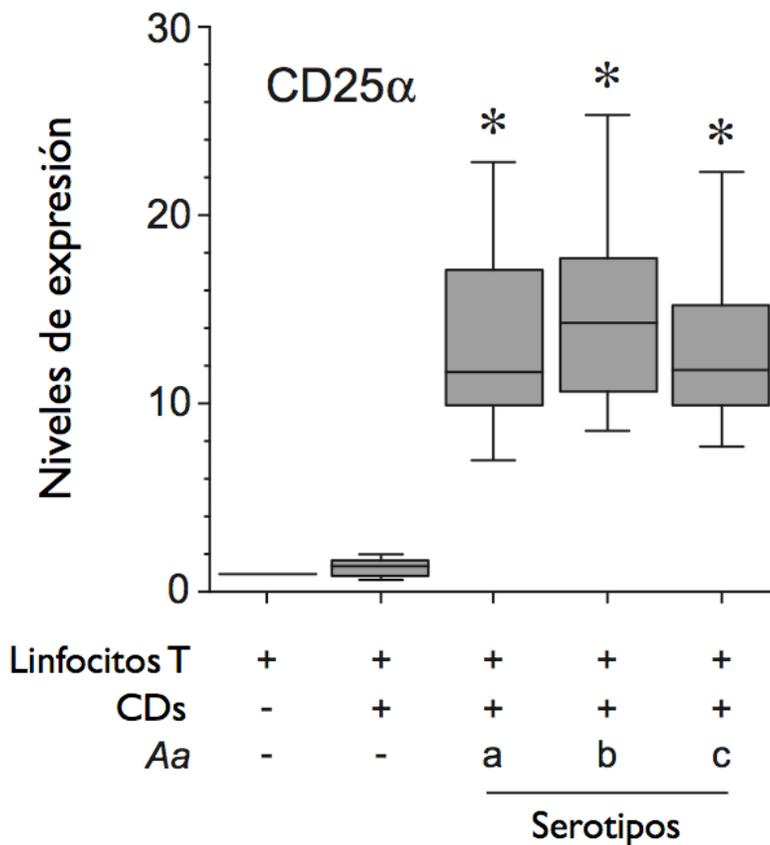


Figura 4. Linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas por los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans*.

Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de CD25 α que evidencian la activación de los linfocitos TCD4⁺ naïve luego de 6 días de activación por células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). *p<0,05.

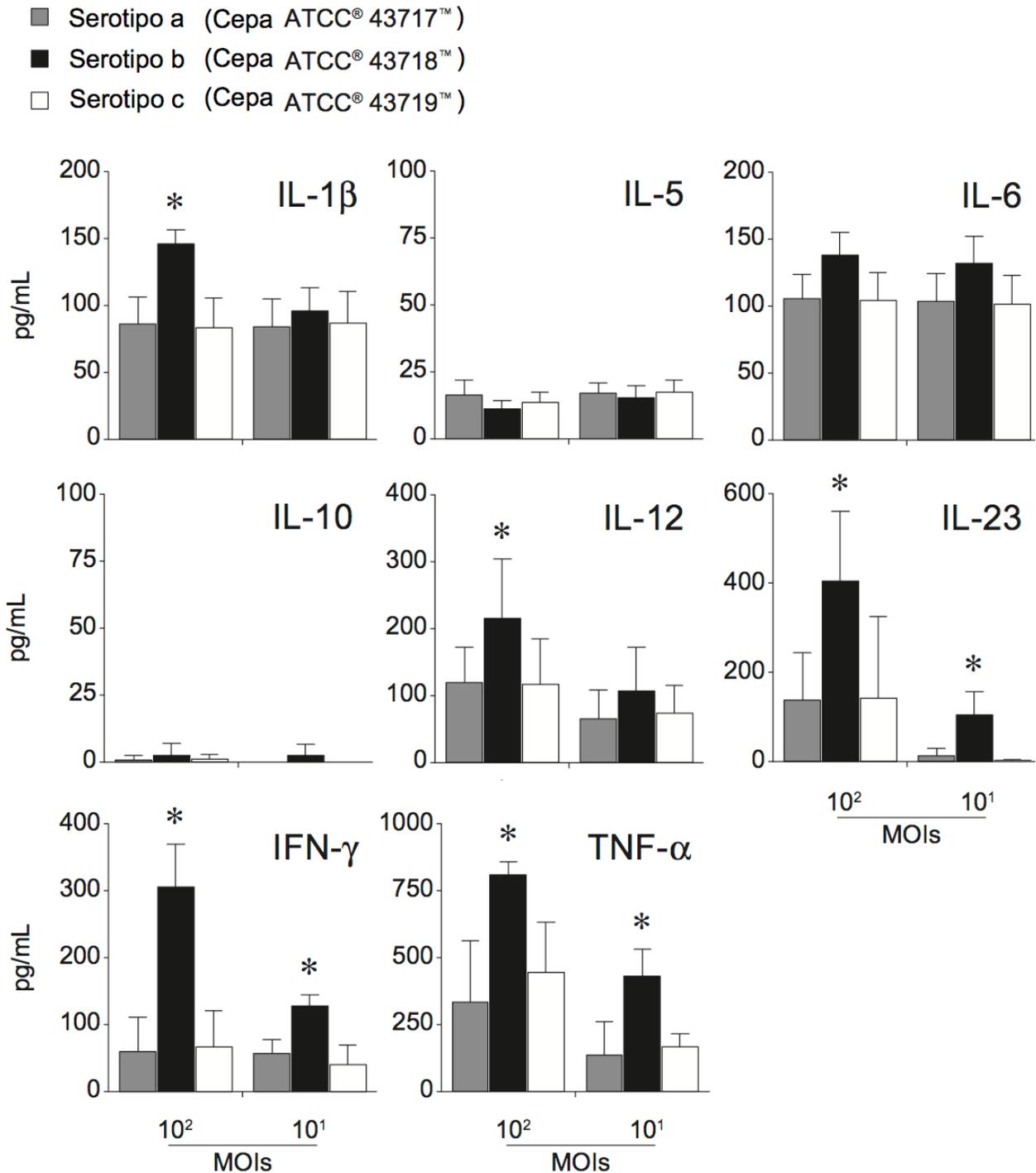


Figura 5. Secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 10 experimentos independientes, la secreción de las citoquinas IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN-γ y TNF-α fue cuantificada mediante ELISA en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOIs=1 a 2). Como control positivo, los niveles de secreción de citoquinas fueron cuantificados en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con 10 ng/mL del LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4 (LPS). * $p < 0,05$.

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

El patrón de citoquinas Th1/Th17 secretadas en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* fue confirmado, mediante la cuantificación de los niveles de expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α por PCR en tiempo real (Figura 6). Las células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC® 43718™) expresaron mayores niveles de IFN- γ (p=0,031 y p=0,02), TNF- α (p=0,006 y p=0,007), IL-1 β (p=0,003 y p=0,01), IL-12 (p=0,004 y p=0,001) e IL-23 (p=0,009 y p=0,009) en comparación a células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente. Además, el serotipo b indujo mayor nivel de expresión de IL-6 en comparación al serotipo a (p=0,01), pero no en comparación al serotipo c (p=0,28). No hubo diferencias en los niveles de expresión de las citoquinas entre los serotipos a y c.

La expresión de citoquinas ante el serotipo b fue característica de un patrón de respuesta tipo Th1 demostrado por los elevados niveles de expresión de IL-1 β , IL-12, IFN- γ y TNF- α y de un patrón Th17 con elevados niveles de expresión de IL-6 e IL-23.

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

En las células dendríticas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante PCR en tiempo real, los niveles de expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α (Figura 7). Se detectaron mayores niveles de expresión de IFN- γ (p=0,025 y p=0,04), TNF- α (p=0,021 y p=0,012), IL-1 β (p=0,012 y p=0,018), IL-6 (p=0,003 y p=0,004), IL-12 (p=0,025 y p=0,022) e IL-23 (p=0,014 y p=0,003) en células dendríticas estimuladas con 50 ng/mL de LPS del serotipo b, en comparación a las células dendríticas estimuladas con el LPS de los serotipos a o c, respectivamente. En células dendríticas estimuladas con 20 ng/mL de LPS, se

detectó un incremento en los niveles de expresión de IL-1 β (p=0,032 y p=0,039) e IL-23 (p=0,045 y p=0,026) al ser estimuladas con el serotipo b en comparación a los serotipos a o c, respectivamente.

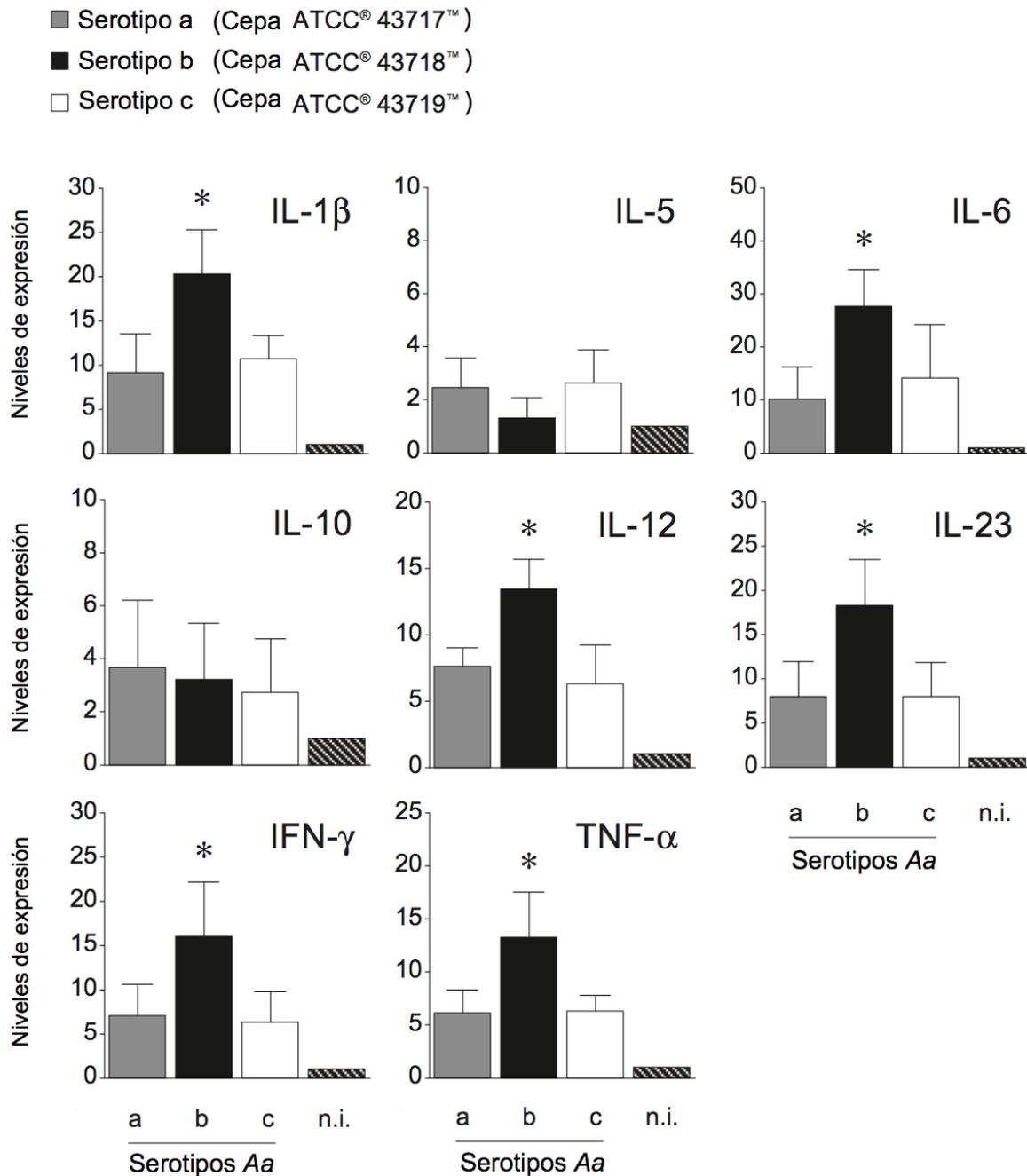


Figura 6. Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 10 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fue determinada mediante PCR cuantitativo en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Como control negativo, se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). *p<0,05.

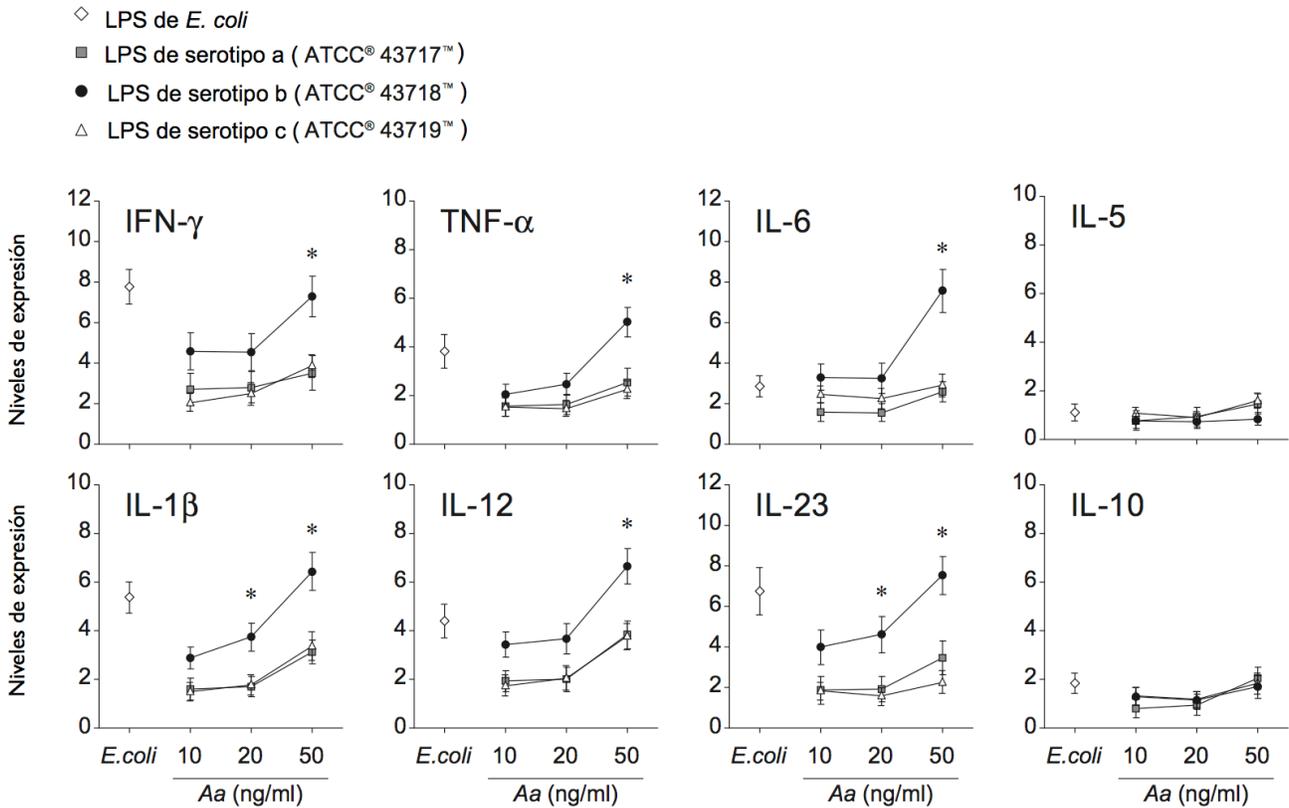


Figura 7. Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

A partir de 8 experimentos independientes, La expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fue determinada mediante PCR cuantitativa en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con el LPS purificado del serotipo a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) y c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* a una concentración de 10, 20 y 50 ng/mL. Como control positivo células dendríticas fueron estimuladas con 10 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4. * $p < 0,05$.

10.8 Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En células dendríticas estimuladas con 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC® 43717™ y ATCC® 29523™), b (ATCC® 43718™, ATCC® 29522™ y ATCC® 29524™) y c (ATCC® 43719™ y ATCC® 33384™), se cuantificaron, mediante PCR en tiempo real, los niveles de expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α (Figura 8). No se detectaron diferencias en los niveles de expresión entre las cepas del serotipo a (ATCC® 43717™ y ATCC® 29523™), entre las cepas del serotipo b (ATCC® 43718™, ATCC® 29522™ y ATCC® 29524™) o entre las cepas del

serotipo c (ATCC® 43719™ y ATCC® 33384™). Mayores niveles de expresión de las citoquinas IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, IFN-γ y TNF-α se detectaron en las células dendríticas estimuladas con todas las cepas bacterianas pertenecientes al serotipo b (cepas ATCC® 43718™, ATCC® 29522™ y ATCC® 29524™) (p<0,05), en comparación a las cepas pertenecientes a los serotipos a o c.

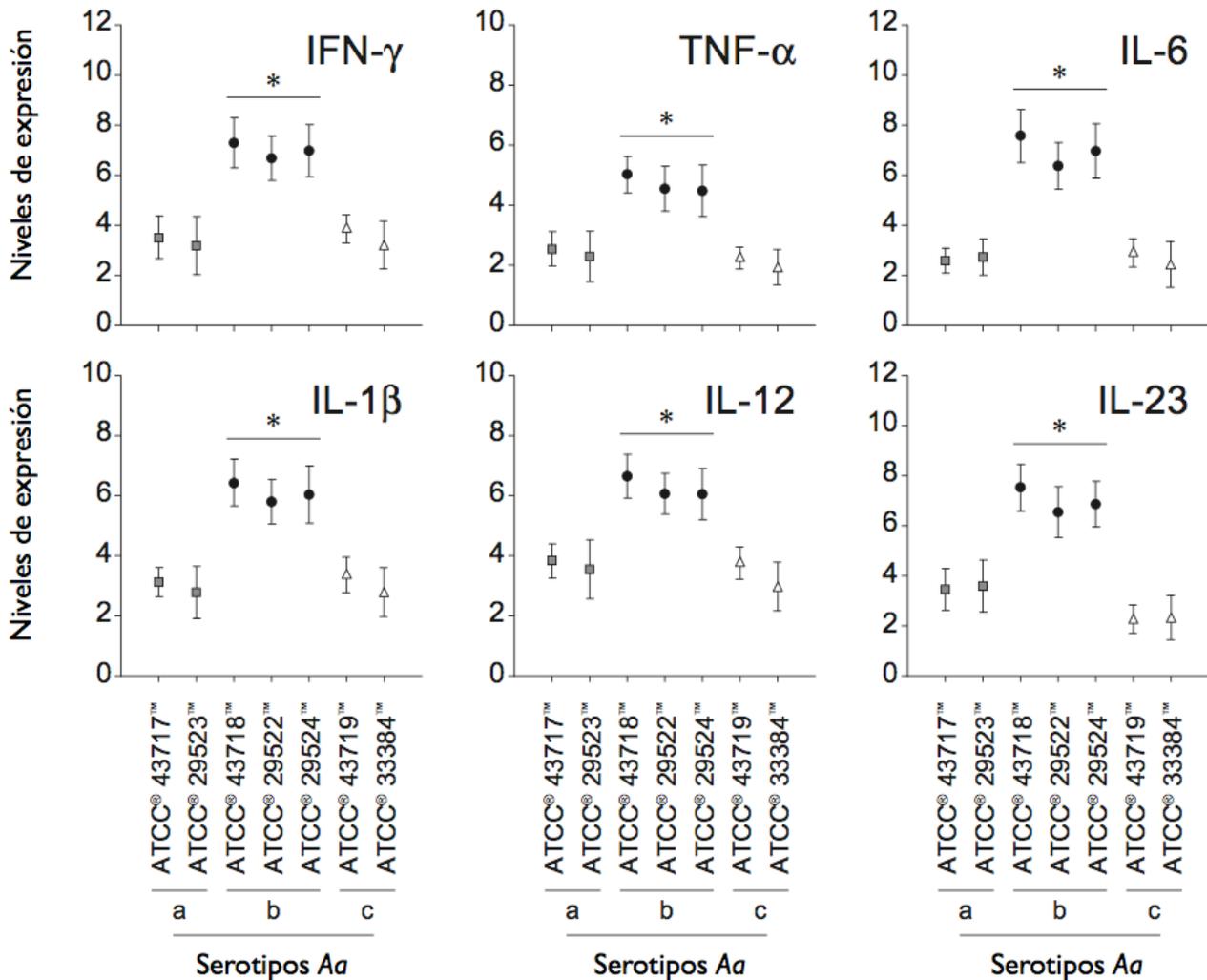


Figura 8. Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

A partir de 5 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, IFN-γ y TNF-α fue determinada mediante PCR en tiempo real en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con el LPS purificado de los serotipos a (ATCC® 43717™ y ATCC® 29523™), serotipos b (ATCC® 43718™, ATCC® 29522™ y ATCC® 29524™) o serotipos c (ATCC® 43719™ y ATCC® 33384™) de *A. actinomycetemcomitans* a una concentración de 50 ng/mL. Como control positivo células dendríticas fueron estimuladas con 10 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4. *p<0,05.

10.9 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ naïve activados

Para evaluar el patrón de citoquinas secretadas por los linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* se cuantificaron los niveles de secreción (pg/mL) de IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α , TNF- β y TGF- β 1 mediante ELISA (Figura 9). Mayores niveles de secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α y TNF- β se detectaron en los linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans*, en comparación a los otros serotipos bacterianos. Estas diferencias fueron detectadas para IL-1 β (p=0,0001 y p=0,0001), IL-6 (p=0,005 y p=0,037), IL-12p40 (p=0,003 y p=0,001), IL-12p70 (p=0,008 y p=0,002), IL-17 (p=0,003 y p=0,017), IL-21 (p=0,004 y p=0,023), IL-23 (p=0,028 y p=0,041), IFN- γ (p=0,008 y p=0,014), TNF- α (p=0,003 y p=0,001) y TNF- β (p=0,018 y p=0,006) en comparación a linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) respectivamente, para MOI=2. Para las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y TGF- β 1 no se detectaron diferencias entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Además, no se detectaron diferencias de secreción para ninguna citoquina entre los serotipos a o c de *A. actinomycetemcomitans*.

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

En linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 10, 20 y 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante ELISA, los niveles de secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α , TNF- β y TGF- β 1 (Figura 10). Se detectaron mayores niveles de secreción de IL-1 β (p=0,015 y p=0,002), IL-12p40 (p=0,018 y p=0,005), IL-12p70 (p=0,013 y p=0,004) e IL-23 (p=0,006 y p=0,01) en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 10 ng/mL de LPS del serotipo b en comparación al a o c, respectivamente. Mayores niveles de secreción de IL-1 β (p=0,002 y p=0,001), IL-6 (p=0,001 y p=0,023), IL-12p40 (p=0,009 y p=0,002),

IL-12p70 ($p=0,043$ y $p=0,011$), IL-23 ($p=0,024$ y $p=0,029$) y TNF- α ($p=0,016$ y $p=0,012$) se detectaron en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 20 ng/mL de LPS del serotipo b en comparación al a o c, respectivamente. Además, mayores niveles de secreción de IL-1 β ($p=0,0001$ y $p=0,0001$), IL-6 ($p=0,002$ y $p=0,009$), IL-12p40 ($p=0,012$ y $p=0,002$), IL-12p70 ($p=0,006$ y $p=0,007$), IL-17 ($p=0,011$ y $p=0,039$), IL-23 ($p=0,029$ y $p=0,031$), IFN- γ ($p=0,001$ y $p=0,003$), TNF- α ($p=0,002$ y $p=0,001$) y TNF- β ($p=0,001$ y $p=0,0001$) se detectaron en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 50 ng/mL de LPS del serotipo b en comparación al a o c, respectivamente. Para las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-21 y TGF- β 1 no se detectaron diferencias entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Además, no se detectaron diferencias de secreción para ninguna citoquina entre los serotipos a o c de *A. actinomycetemcomitans*.

10.11 Expresión de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados

En linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante PCR en tiempo real, los niveles de expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α y TGF- β 1 (Figura 11). Los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b (ATCC® 43718™) presentaron mayores niveles de expresión de IL-1 β ($p=0,0001$ y $p=0,0001$), IL-6 ($p=0,003$ y $p=0,014$), IL-12 ($p=0,0001$ y $p=0,001$), IL-17 ($p=0,0001$ y $p=0,0001$), IL-21 ($p<0,001$ y $p<0,001$), IL-23 ($p=0,001$ y $p=0,006$), IFN- γ ($p=0,0001$ y $p=0,001$) y TNF- α ($p=0,0001$ y $p=0,0001$) en comparación a los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente.

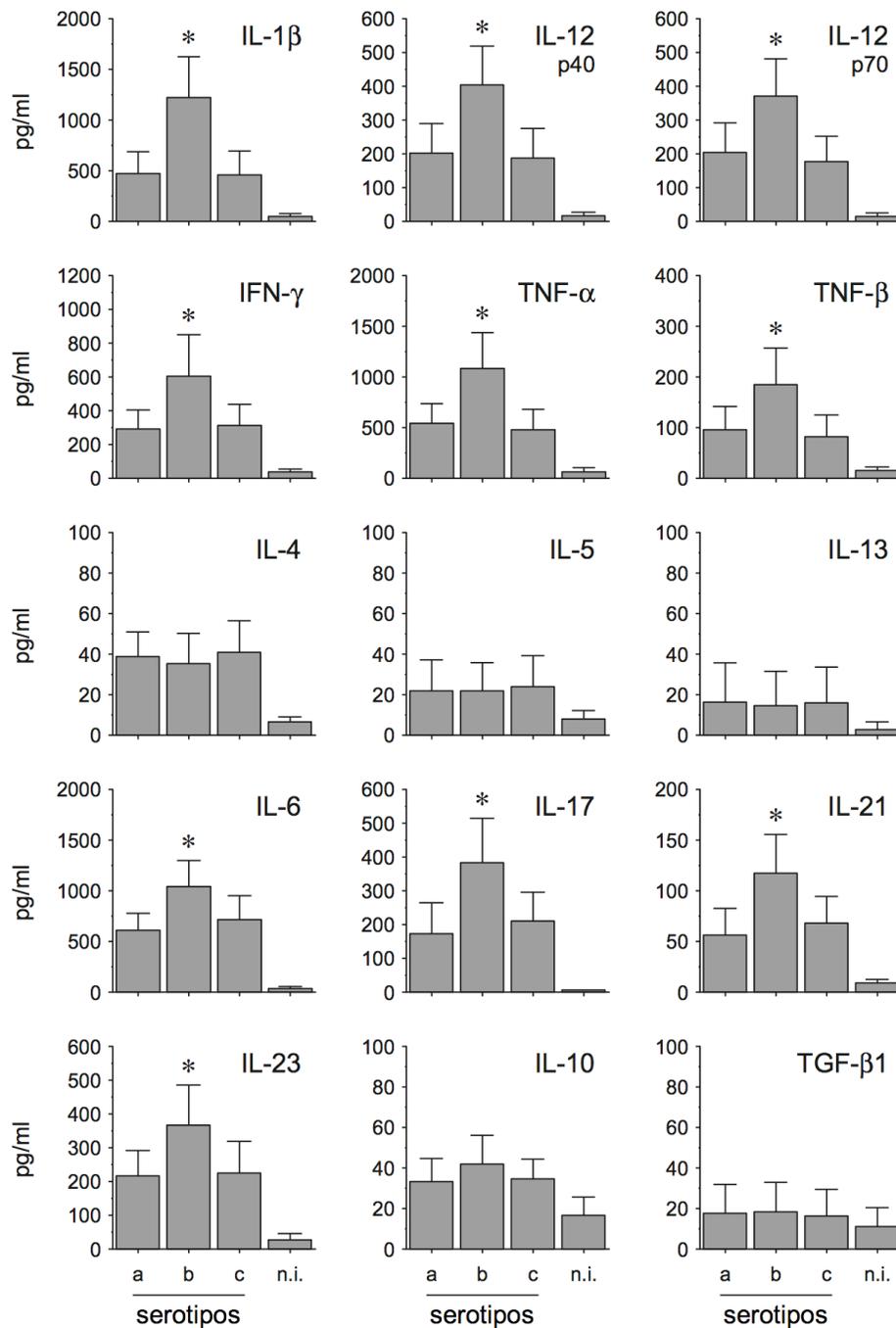


Figura 9. Secreción de citoquinas linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

A partir de 8 experimentos independientes, la secreción de las citoquinas IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, IFN-γ, TNF-α, TNF-β y TGF-β1 fue cuantificada mediante ELISA en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Como control positivo, los niveles de secreción de citoquinas fueron cuantificados en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). *p<0,05.

- ▲ Linfocitos T no inducidos
- LPS de Aa, cepa ATCC® 43717™ serotipo a
- LPS de Aa, cepa ATCC® 43718™ serotipo b
- ◆ LPS de Aa, cepa ATCC® 43719™ serotipo c

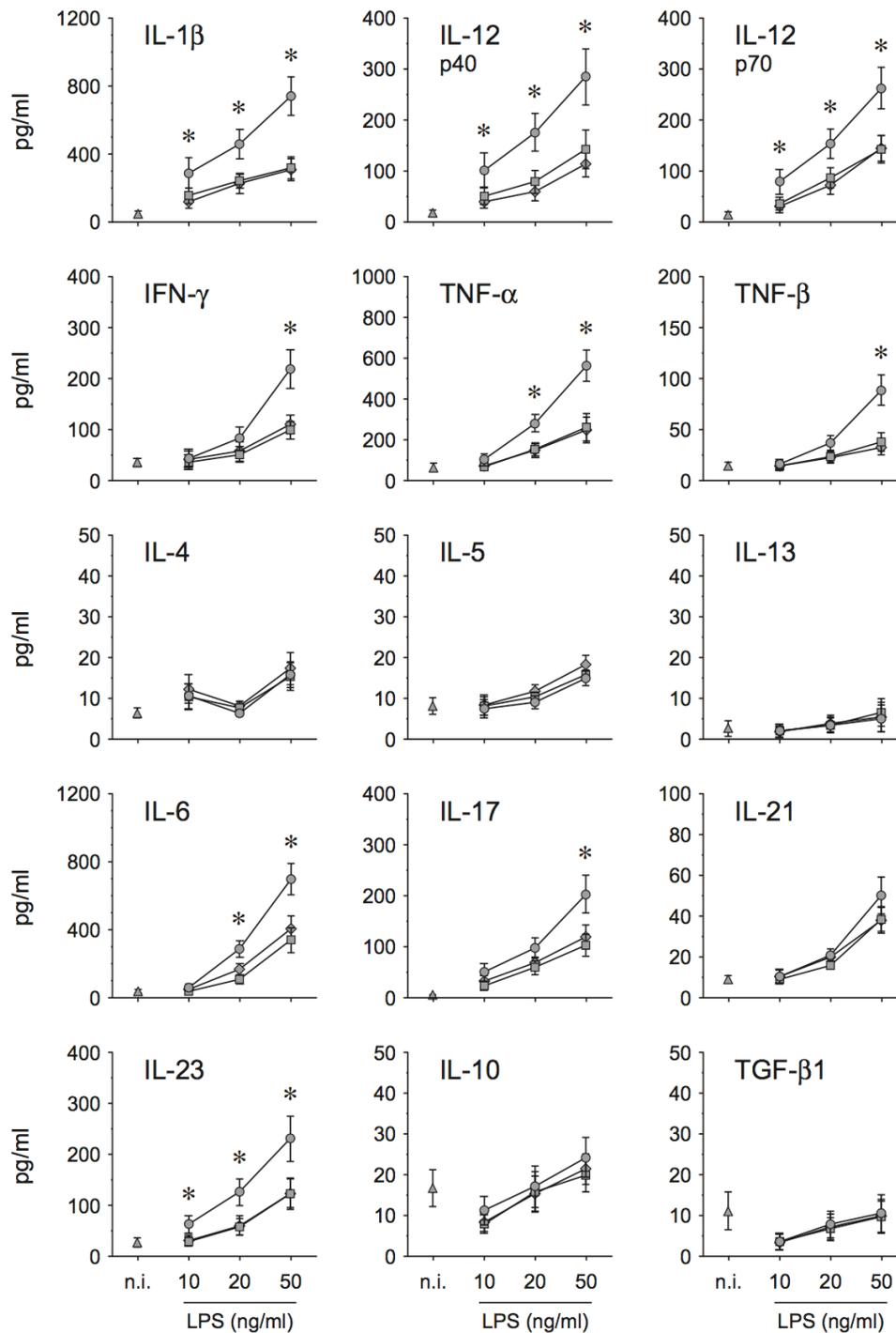


Figura 10. Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.

A partir de 8 experimentos independientes, la secreción de las citoquinas IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, IFN-γ, TNF-α, TNF-β y TGF-β1 en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 10, 20 y 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) fue determinada mediante ELISA. Como control negativo se utilizaron linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). *p < 0,05.

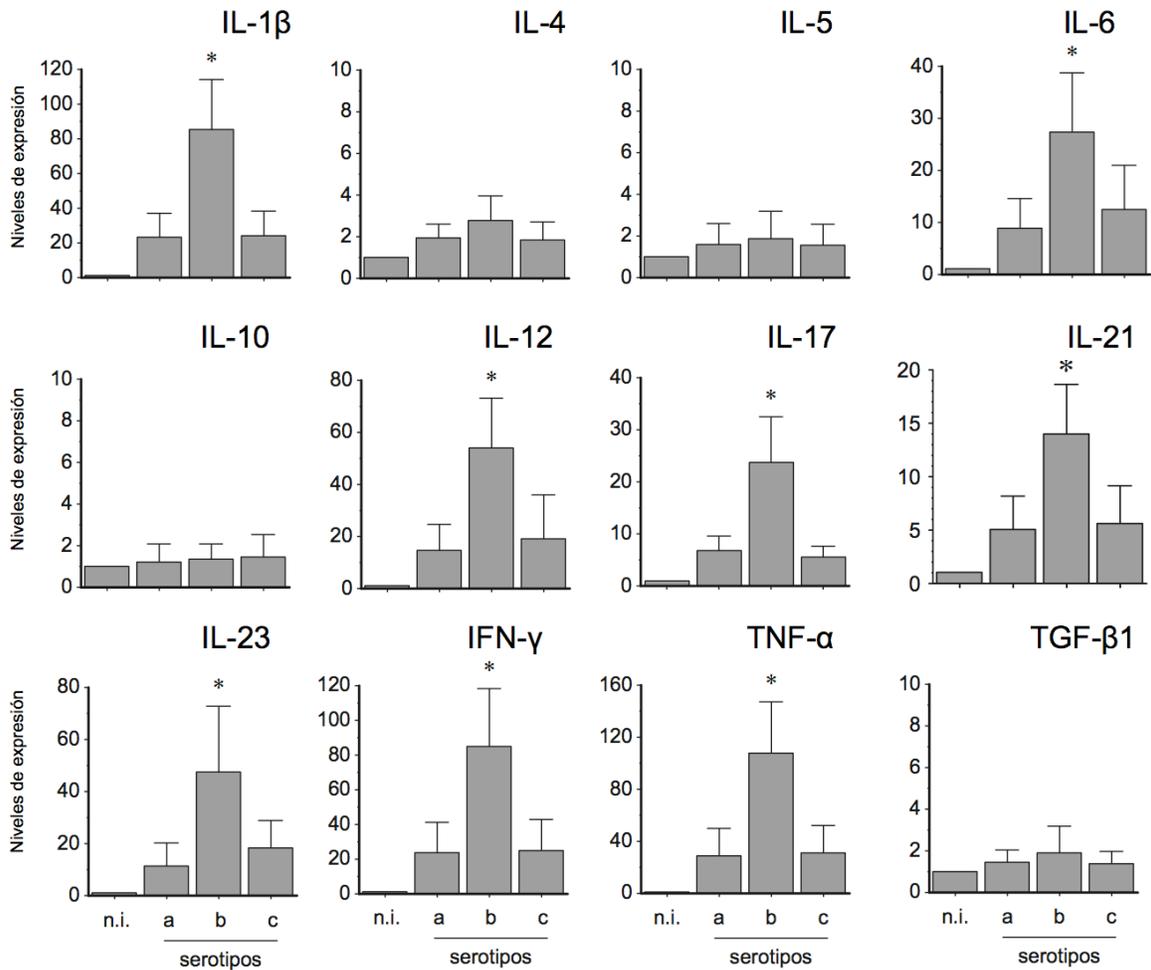


Figura 11. Niveles de expresión de citoquinas en linfocitos TCD4⁺ naïve activados.

A partir de 8 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, IFN-γ, TNF-α y TGF-β1 en linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2), fue determinada mediante PCR cuantitativa. Como control negativo se utilizaron linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). *p<0,05.

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

En linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante PCR en tiempo real, los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* (Figura 12). Los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) presentaron mayores

niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* ($p=0,0001$ y $p=0,0001$) y *RORC2* ($p=0,0001$ y $p=0,001$) en comparación a los linfocitos $TCD4^+$ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente. No hubo diferencias en los niveles de expresión de los factores de transcripción en los linfocitos $TCD4^+$ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a o c.

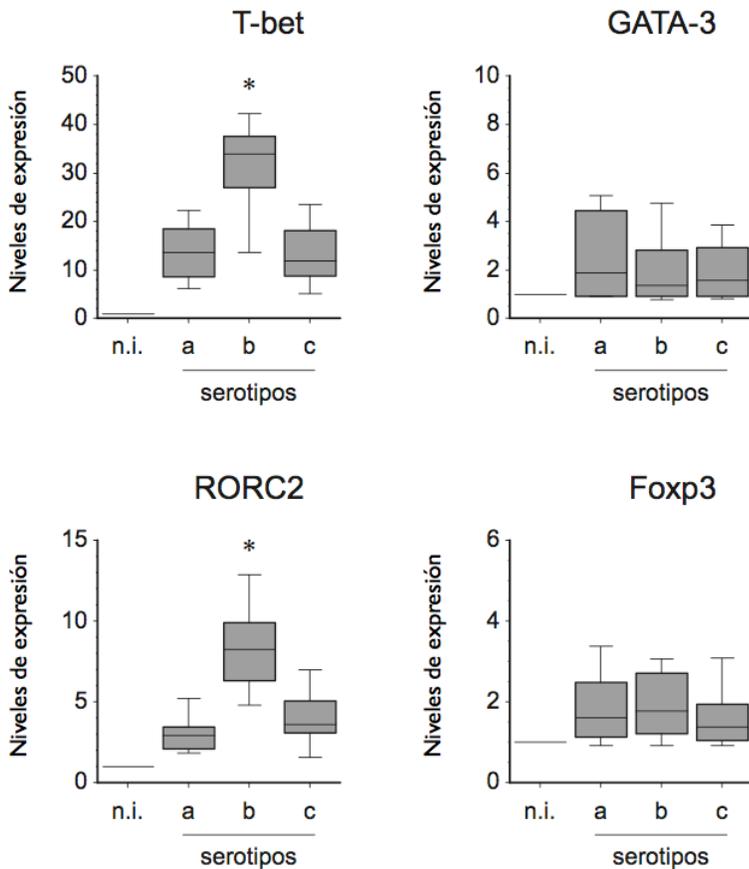


Figura 12. Niveles de expresión de los factores de transcripción en linfocitos $TCD4^+$ naïve activados.

A partir de 8 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de los factores de transcripción *T-bet*, *GATA-3*, *RORC2* y *Foxp3* en linfocitos $TCD4^+$ activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) fue determinada mediante PCR cuantitativa. Como control negativo se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). * $p<0,05$.

10.13 Niveles de expresión y secreción de RANKL en linfocitos $TCD4^+$ naïve activados

En linfocitos $TCD4^+$ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron los niveles de expresión y secreción de RANKL, mediante PCR en tiempo real y ELISA, respectivamente (Figura 13). Los linfocitos $TCD4^+$ naïve activados con células dendríticas

estimuladas con el serotipo b (ATCC® 43718™) presentaron mayores niveles de expresión y secreción ($p < 0,05$) de RANKL en comparación a los linfocitos TCD4⁺ naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™).

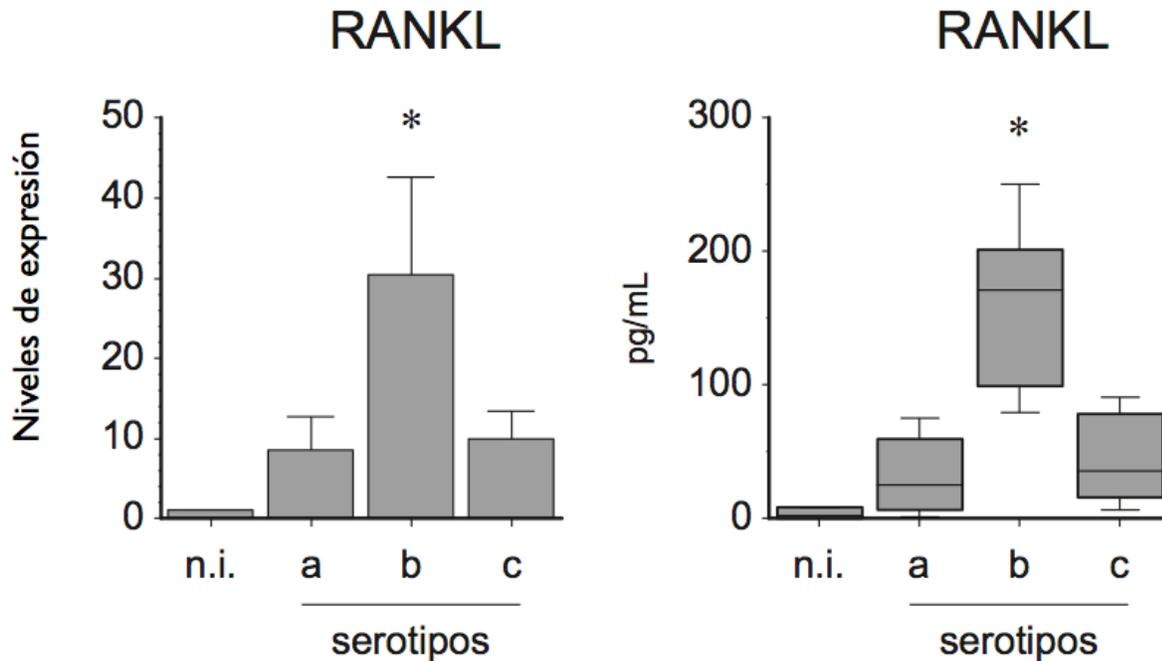


Figura 13. Niveles de expresión y secreción de RANKL en linfocitos TCD4⁺ naïve activados.

A partir de 8 experimentos independientes, la expresión del mRNA de RANKL en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) fue determinada mediante PCR en tiempo real. La secreción de RANKL en linfocitos TCD4⁺ activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOIs=1 a 2) fue determinada mediante ELISA. Como control negativo se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). * $p < 0,05$.

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

A partir de los resultados obtenidos en los linfocitos TCD4⁺ naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2), se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* (Th1), *GATA-3* (Th2), *RORC2*

(Th17) y *Foxp3* (Treg) y los niveles secretados de las citoquinas IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α , TNF- β y TFG- β 1 (Tabla 2).

Para el perfil Th1, se detectó una correlación positiva entre *T-bet* e IL-1 β , IL-12p70, TNF- α y TNF- β en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a (ATCC[®] 43717[™]) de *A. actinomycetemcomitans*, una correlación positiva entre *T-bet* e IL-1 β , IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ y TNF- α en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans* y una correlación positiva entre *T-bet* e IL-12p40, IL-12p70 e IFN- γ en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans*.

Para el perfil Th2, se detectó una correlación positiva entre *GATA-3* e IL-4 en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a (ATCC[®] 43717[™]) o b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans* y una correlación positiva entre *GATA-3* e IL-4 e IL-5 en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans*.

Para el perfil Th17, se detectó una correlación positiva entre *RORC2* e IL-6, IL-21 e IL-23 en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* y una correlación positiva entre *RORC2* e IL-17A en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a (ATCC[®] 43717[™]) o b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans*.

Finalmente, para el perfil Treg, se detectó una correlación positiva entre *Foxp3* e IL-10 en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a (ATCC[®] 43717[™]) de *A. actinomycetemcomitans* y una correlación positiva entre *Foxp3* e IL-17A e IL-21 en los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC[®] 43718[™]) de *A. actinomycetemcomitans*.

		Cepas de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>					
		ATCC (serotipo a)		ATCC (serotipo b)		ATCC (serotipo c)	
		r	p-value	r	p-value	r	p-value
<i>T-bet</i>	IL-1 β	0,883*	0,02	0,859*	0,028	0,793	0,06
	IL-12p40	0,791	0,061	0,843*	0,035	0,826*	0,043
	IL-12p70	0,909*	0,012	0,818*	0,047	0,959*	0,002
	IFN- γ	0,714	0,111	0,892*	0,02	0,873*	0,023
	TNF- α	0,884*	0,019	0,852*	0,031	0,798	0,057
	TNF- β	0,835*	0,039	0,645	0,167	0,763	0,077
<i>GATA-3</i>	IL-4	0,967*	0,002	0,908*	0,012	0,865*	0,026
	IL-5	0,754	0,083	0,794	0,059	0,932*	0,007
	IL-13	0,553	0,255	0,447	0,374	0,525	0,285
<i>RORC2</i>	IL-6	0,853*	0,031	0,867*	0,025	0,846*	0,034
	IL-17A	0,875*	0,022	0,886*	0,019	0,787	0,063
	IL-21	0,891*	0,017	0,898*	0,015	0,817*	0,047
	IL-23	0,911*	0,012	0,887*	0,018	0,841*	0,036
<i>Foxp3</i>	IL-10	0,916*	0,01	0,772	0,072	0,73	0,099
	TGF- β 1	0,193	0,714	0,03	0,956	0,367	0,474
<i>Foxp3</i>	IL-17A	0,275	0,597	0,830*	0,041	0,024	0,964
	IL-21	0,082	0,878	0,903*	0,14	0,375	0,464

Tabla 2. Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción y de secreción de las citoquinas.

A partir de 8 experimentos independientes se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) entre los niveles de expresión de mRNA de los factores de transcripción *T-bet* (*Th1*), *GATA-3* (*Th2*), *RORC2* (*Th17*) y *Foxp3* (*Treg*) y los niveles de secreción de citoquinas asociadas a los linfocitos *Th1*, *Th2*, *Th17* y *Treg* en linfocitos *TCD4⁺* naïve estimulados por las células dendríticas sensibilizadas con las cepas ATCC® 43717™ (serotipo a), ATCC® 43718™ (serotipo b) o ATCC® 43719™ (serotipo c) de *A. actinomycetemcomitans* a una multiplicidad de infección (MOI) de 2. * *p* < 0,05.

10.15 Correlación entre los niveles de expresión de *RANKL* y los factores de transcripción

A partir de los resultados obtenidos en los linfocitos *TCD4⁺* naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2), se calculó el coeficiente de correlación de Pearson

(r) entre los niveles de expresión de RANKL y los niveles de expresión de los factores de transcripción *T-bet* (Th1), *GATA-3* (Th2), *RORC2* (Th17) y *Foxp3* (Treg) (Figura 14).

Para el perfil Th1, se detectó una coeficiente de correlación positivo ante los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™), sin observarse diferencias significativas. Para el perfil Th17, una correlación positiva con RANKL para los serotipos a (ATCC® 43717™, p=0,008), b (ATCC® 43718™, p=0,003) y c (ATCC® 43718™, p=0,003) de *A. actinomycetemcomitans*. Para los perfiles Th2 y Treg, no hubo correlación entre RANKL y los factores de transcripción *GATA-3* y *Foxp3*, respectivamente.

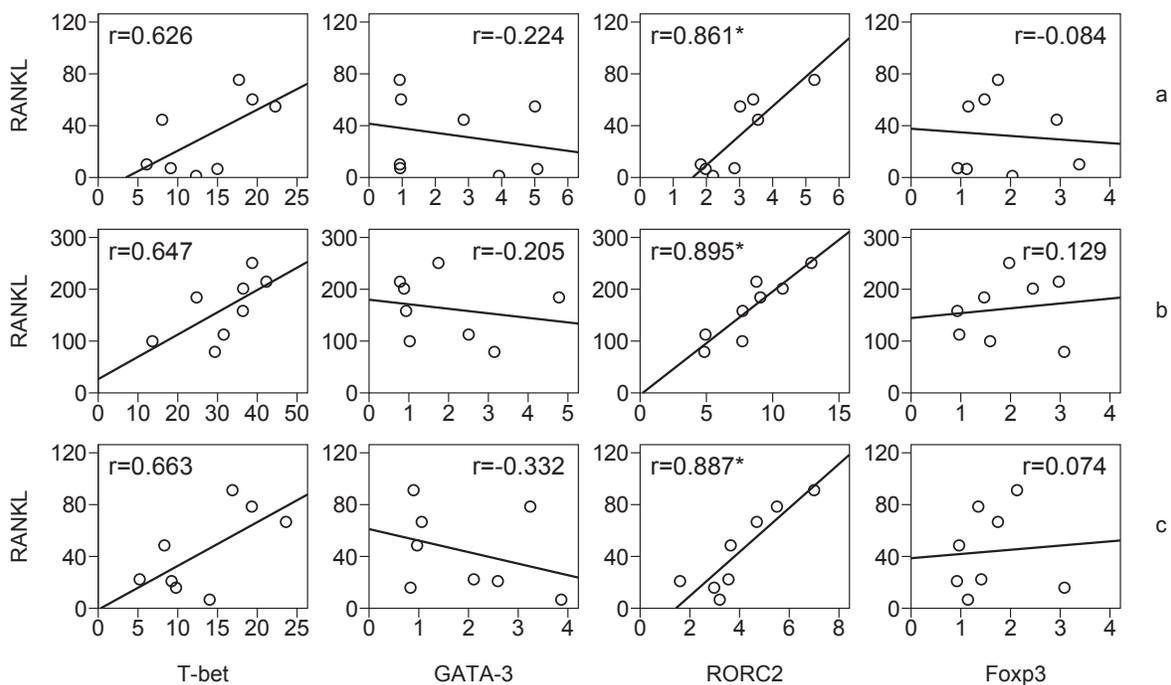


Figura 14. Correlación entre los niveles de expresión de RANKL y los factores de transcripción.

A partir de 8 experimentos independientes se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los niveles de expresión de mRNA de los factores de transcripción *T-bet* (Th1), *GATA-3* (Th2), *RORC2* (Th17) y *Foxp3* (Treg) y los niveles de expresión de RANKL en linfocitos $TCDA^+$ naïve activados por células dendríticas estimuladas con las cepas ATCC® 43717™ (serotipo a), ATCC® 43718™ (serotipo b), y ATCC® 43719™ (serotipo c) de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a una multiplicidad de infección (MOI) de 2. * $p < 0,05$.

11. DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó la respuesta de las células dendríticas al ser estimuladas con los serotipos a (cepas ATCC® 43717™ y ATCC® 29523™), b (cepas ATCC® 43718™, ATCC® 29522™ y ATCC® 29524™) o c (cepas ATCC® 43719™ y ATCC® 33384™) de *A. actinomycetemcomitans* y su LPS purificado. En células dendríticas estimuladas con el serotipo b, se detectaron mayores niveles de expresión y secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α en comparación a las células dendríticas estimuladas con los serotipos a o c. Luego, se analizó la activación de los linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y se cuantificaron los niveles de expresión de los factores de transcripción y de producción de las citoquinas fenotipo-específicas. Ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detectaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción *Tbet* y *RORC2* y de expresión y secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- γ y TNF- α y la molécula RANKL, característicos de un patrón de respuesta inmune tipo Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteo-destructivo), en comparación a las mismas células estimuladas con los serotipos a o c.

Dependiendo de la profundidad de los sacos periodontales que caracterizan la lesión periodontal, existen variaciones en la cantidad y composición microbiana de la biopelícula patógena subgingival (Socransky et al., 1998). La concentración parcial de oxígeno disminuye a medida que se incrementa la profundidad del saco periodontal permitiendo el crecimiento de bacterias en anaerobiosis o capnofilia y, por lo tanto, la aparición de bacterias más virulentas, asociadas a la destrucción periodontal (Holt et al., 1980; Dzink et al., 1985; Dzink et al., 1988; Haffajee and Socransky, 1994; Socransky et al., 1998; Socransky and Haffajee, 2002; Socransky and Haffajee, 2005). El tipo de sustrato, la disponibilidad de nutrientes, la respuesta inmune del hospedero y la terapia antibiótica cumplen un rol clave en la limitación del crecimiento de la biopelícula durante una infección crónica (Socransky and Haffajee, 2005; Bjarnsholt et al., 2013). La cantidad y composición de la biopelícula subgingival no sólo varía entre un individuo sano y un paciente con periodontitis, sino que también entre sitios sanos y lesiones periodontales en un mismo individuo (Gajardo et al., 2005; Colombo et al., 2006; Herrera et al., 2008). En términos generales, el comportamiento *in vivo* de las bacterias que componen esta biopelícula se puede inferir sobre la base de los estudios *in vitro* que analicen sus

factores de virulencia y su rol inmunogénico en las células inmunes del hospedero (van Winkelhoff et al., 1993; Choi et al., 2001; Jowatni and Cutler, 2004; Holt and Ebersole, 2005; Shimada et al., 2008; Hajishengallis, 2009; Pinheiro et al., 2011; Kelk et al., 2011; Kunnen et al., 2012).

A. actinomycetemcomitans es una bacteria capnofílica componente de la biopelícula subgingival como un colonizador tardío (Asikainen and Chen, 1999; Favari et al., 2009). Los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* se asocian con distintos fenotipos clínicos de la enfermedad, así, el serotipo a se asocia con salud periodontal, el serotipo b con periodontitis agresiva y el serotipo c, tanto con salud periodontal como periodontitis crónica (Roman-Torres et al., 2010; Cortelli et al., 2012). Sin embargo, en norteamericanos, el serotipo a se asocia a periodontitis crónica y, en europeos, el serotipo c con salud periodontal (Zambon et al., 1983a; Asikainen et al., 1991). Los serotipos d, e y f difieren en su frecuencia de detección, mientras los serotipos d y f no son detectables en pacientes con periodontitis o individuos sanos, el serotipo e se detecta en el 1,8% de los pacientes con periodontitis crónica, proporción que incrementa al 28% en presencia de algún otro serotipo de *A. actinomycetemcomitans* (Teixeira et al., 2006; Roman-Torres et al., 2010).

Generalmente, el 98% de los individuos son colonizados por un solo serotipo de *A. actinomycetemcomitans*, con excepción de la población japonesa donde la proporción de infección por 2 ó 3 serotipos aumenta al 33% (Rylev and Kilian, 2008). La infección por 2 ó 3 serotipos ha sido descrita en una proporción cercana al 15% en poblaciones norteamericanas y menor al 2% en población brasilera (Chen et al., 2010; Cortelli et al., 2012). Recientemente, con el objetivo de cuantificar la frecuencia de detección de los serotipos a, b o c en pacientes con periodontitis crónica o agresiva, se tomaron muestras microbiológicas a 25 pacientes que asistieron a la clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, detectándose la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en 4 pacientes con periodontitis agresiva, siendo 3 de ellos positivos para el serotipo b. Estos resultados preliminares avalan la importancia de nuestro estudio que busca determinar el potencial rol del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en la inducción de una respuesta inmune más patogénica. Así, sobre la base de la baja frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* en contraste con la elevada frecuencia de detección del serotipo b y su mayor asociación con la enfermedad podemos especular que posee un mayor potencial inmunogénico (Haubek et al., 2007; Haubek et al., 2008; Xynogala et al., 2009; Claesson et al., 2011; Pinheiro et al., 2011).

El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* es capaz de inducir distintas respuestas en las células del hospedero, a diferencia de los serotipos a o c. El serotipo b tiene la capacidad de evadir más eficazmente la fagocitosis por macrófagos (Asikainen et al., 1991), inhibir la proliferación de neutrófilos (Suzuki et al., 2001) e incrementar la secreción de IgG, IgM e IgA por plasmocitos (Ebersole et al., 1991). En células epiteliales gingivales, el serotipo b induce mayores niveles de secreción de microvesículas citotóxicas, altera la función protectora ante la invasión bacteriana y disminuye la producción de quimioquinas (Lai et al., 1981; Shimada et al., 2008). En fibroblastos de ligamento periodontal humano induce mayores niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias, en osteoblastos inhibe su proliferación (Rossa et al., 2008) y en macrófagos induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Ueda et al., 1995; Yamamoto et al., 1999).

La producción de leucotoxina se considera uno de los factores de virulencia más importante de *A. actinomycetemcomitans* y, todas las cepas, independientemente de su serotipo, secretan esta toxina, permitiéndole a las bacterias evadir la respuesta inmune del hospedero mediante la inducción de la muerte por apoptosis de los leucocitos (Kachlany, 2010). Un clon altamente leucotóxico de *A. actinomycetemcomitans* fue aislado por primera vez a principios de 1980, de un menor de 8 años de edad con periodontitis agresiva localizada (Tsai et al., 1984). Este clon se caracterizó como JP2 y ha sido asociado a la patogénesis de la periodontitis agresiva (Haubek et al., 2007; Haubek et al., 2008; Sakellari et al., 2011; Pinheiro et al., 2011; Claesson et al., 2011). En efecto, el clon JP2 se caracteriza por secretar mayores cantidades de leucotoxinas, toxina distensora citoletal y proteína de adhesión a matriz extracelular y estos factores, dependen del LPS bacteriano (Haubek et al., 2007; Haubek et al., 2008; Sakellari et al., 2011; Pinheiro et al., 2011; Claesson et al., 2011; Tang et al., 2011). No obstante, el O-polisacárido es el determinante de la serotipificación de *A. actinomycetemcomitans*, sus componentes estructurales le otorgan la identidad a cada uno de los serotipos. El lípido A posee la misma conformación estructural en todos los serotipos y es capaz de activar a los receptores TLR4 (Raetz and Whitfield, 2002). Recientemente, se cuantificaron los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 en células dendríticas estimuladas con las cepas o su LPS purificado de los serotipos a, b o c y se detectó que el serotipo b induce mayores niveles de expresión de TLR2 en comparación a los serotipos a o c y, que ante TLR4 no hubo diferencias entre los distintos serotipos (datos no publicados). En efecto, el O-polisacárido es el regulador del sistema de transporte vesicular, facilitando la secreción de leucotoxina, de toxina distensora citoletal y de la proteína de adhesión a matriz extracelular (Tang et

al., 2011).

En conjunto, los datos obtenidos en este trabajo y los analizados en esta discusión permiten concluir que la baja frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* en sitios periodontales es compensada por la inmunogenicidad del serotipo infectante y que la mayor frecuencia de detección del serotipo b se asocia con el fenotipo clínico más severo de la enfermedad. *A. actinomycetemcomitans* es un patógeno-periodontal que coloniza tardíamente los sitios periodontales ubicándose en la superficie de la biopelícula y su LPS cumple diversos roles en los distintos serotipos y determina su virulencia, patogenicidad e inmunogenicidad. No obstante este es el factor de virulencia más importante, es la respuesta inmune inducida en células del hospedero ante ellas, el principal determinante de la destrucción e inflamación de los tejidos periodontales del hospedero.

Inicialmente, en un modelo experimental se describió la existencia de 3 grupos de antígenos de *A. actinomycetemcomitans* capaces de inducir 3 respuestas séricas distintas y se nombraron serotipos, de acuerdo al *International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses* y la nomenclatura serológica del grupo *Haemophilus*. Así, se designaron a, b y c de acuerdo al orden de su identificación (Zambon et al., 1983b). Posteriormente, se describió la estructura bioquímica de los O-polisacáridos del LPS de cada serotipo, identificando que los serotipos a y c son enantiómeros, compuestos por disacáridos de talosa, y que el O-polisacárido del serotipo b es un complejo de tricarácidos conformado por un esqueleto central de fucosa y ramnosa y una cadena lateral de β -N-acetilgalactosamina (Perry et al., 1996a; Perry et al., 1996b; Kaplan et al., 2001). La variable estructural entre estos serotipos le otorga al serotipo b una mayor virulencia e inmunogenicidad y, al bloquear la enzima que cataliza la unión de la cadena lateral a la ramnosa, pierde sus factores de virulencia comportándose como un serotipo b sin O-antígeno (Li et al., 2006; Tang and Mintz, 2010; Tang et al., 2012).

La variable inducción de la respuesta inmune determinada en este estudio en células dendríticas y linfocitos T ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* estaría definida sobre la base de los cambios estructurales de su O-polisacárido. No obstante el O-polisacárido es un determinante clave en la inducción de la respuesta inmune, no se puede descartar que la leucotoxina, la toxina distensora citoletal u otro factor de virulencia tengan algún efecto sobre las células del hospedero cuando se utiliza la bacteria *ad integrum*, tal como se utilizó en este estudio. Así, con el objetivo de

analizar la respuesta inducida en las células dendríticas ante los serotipos a, b o c, se estimularon no sólo con las distintas cepas bacterianas *ad integrum*, con todo su potencial inmunogénico, sino que además con su LPS purificado, aislando el factor de virulencia determinante de su patogenicidad. Tanto el serotipo b *ad integrum* (ATCC® 43718™) como el LPS purificado de todas las cepas bacterianas pertenecientes al serotipo b (ATCC® 43718™, ATCC® 29522™ y ATCC® 29524™) indujeron una respuesta inmune similar, lo que nos permitió concluir que el O-polisacárido componente del LPS es el factor determinante de la inmunogenicidad del serotipo b y, la quiralidad descrita en la estructura del O-polisacárido de los serotipos a y c determina que compartan, al menos en parte, las mismas propiedades físicas y por tanto, una capacidad similar para inducir una respuesta inmune en las células del hospedero. Por lo tanto, la variabilidad detectada en la respuesta inmune inducida en las células dendríticas y en los linfocitos T se explica por la diferencia estructural del O-antígeno, siendo así un potencial objetivo terapéutico mediante el desarrollo de terapias microbiológicas, con modificaciones en la cadena lateral del serotipo b para transformarlo en un serotipo b sin O-antígeno, eliminando el O-polisacárido en los serotipos b que colonicen la biopelícula subgingival o transformando genéticamente el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en un serotipo “b-like-a” o un serotipo “b-like-c”.

El perfil de citoquinas expresadas y secretadas en las células dendríticas, en particular ante el serotipo b, son determinantes clave de la inducción de una respuesta inmuno-inflamatoria polarizada Th1 o Th17 en los linfocitos TCD4⁺ *naïve*. En particular, IL-1β es una citoquina que media la inflamación y es conocida como un factor de activación de osteoclastos (Wilton et al., 1992), IL-6 participa en la diferenciación selectiva de linfocitos Th17 (Baker et al., 1999; Cardoso et al., 2008) y la inhibición de la diferenciación de linfocitos Treg *Foxp3*⁺ (Korn et al., 2008; Gaffen and Hajishengallis, 2008). Además, IL-1β, IL-6 y TNF-α tienen particular importancia en la maduración y migración de las células dendríticas, en la interacción de ellas con los linfocitos T durante la presentación antigénica y en la definición del estado clínico de la enfermedad (Gaffen and Hajishengallis, 2008). Además, un incremento en los niveles de IL-12 e IL-23 ha sido detectado en pacientes con periodontitis comparado con individuos sanos (Johnson and Serio, 2005) y estos se han asociado a la actividad de las células dendríticas (Sasaki et al., 2008; Vernal et al., 2009) y, en conjunto con IL-6 y TGF-β1, son capaces de inducir la diferenciación selectiva de linfocitos Th17.

Así, con el objetivo de determinar la diferenciación hacia los distintos fenotipos efectores Th, linfocitos TCD4⁺ *naïve* humanos se activaron con células dendríticas autólogas estimuladas con las cepas o el LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. En concordancia con lo detectado en las células dendríticas, el serotipo b indujo mayores niveles de expresión y secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- γ y TNF- α y la molécula RANKL, además de mayores niveles de expresión de los factores de transcripción determinantes de la diferenciación de los fenotipos Th1 y Th17, *T-bet* y *RORC2* respectivamente. Además, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión y secreción de las distintas moléculas en presencia de los serotipos a o c, tanto con la bacteria *ad integrum* como su LPS purificado. Estos datos nos permiten proyectar el potencial rol del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en la definición del tipo de linfocito Th predominante en las lesiones periodontales luego de la presentación antigénica. Así, sobre la base de los datos presentados en este trabajo podemos especular que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce la diferenciación predominantemente de linfocitos Th1 y Th17. Esta especulación es concordante con datos obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación. En efecto, cuando las células dendríticas fueron estimuladas con distintos serotipos capsulares K de *P. gingivalis*, se detectó que los serotipos K1 y K2 indujeron una mayor expresión de citoquinas tipo Th1: IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , en comparación a los otros serotipos (Vernal et al., 2009) y un patrón de respuesta tipo Th1 o Th17 en linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por los mismos serotipos, con mayores niveles de secreción de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , y expresión de los mRNAs de *T-bet* y *RORC2* (Vernal et al., 2014a).

IL-17 es una citoquina pro-inflamatoria y osteo-destructiva que estimula la producción de RANKL en osteoclastos, fibroblastos y linfocitos Th17 (Sato et al., 2006; Vernal et al., 2008; Hernández et al., 2011). IL-23 es una citoquina que se asocia con enfermedades osteo-destructivas y, en particular, se ha detectado en lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica (Ohya et al., 2009). Las citoquinas IL-6, IL-17 e IL-23 inducen la producción de RANKL en fibroblastos, osteoblastos y pre-osteoclastos (Suda et al., 1999; Taubman and Kawai, 2001; Walsh and Choi, 2003; Takahashi et al., 2005; Vernal et al., 2006; Kramer and Gaffen, 2007) y RANKL induce la diferenciación de pre-osteoclastos, maduración de osteoclastos y su presencia se asocia con actividad osteo-destructiva en las periodontitis. Los osteoclastos son las células responsables de la reabsorción ósea y la presencia de RANKL, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23, TNF- α e IFN- γ es un determinante clave

de su diferenciación y activación (Vernal et al., 2005; Vernal et al., 2006; Kawai et al., 2006). En términos generales, en lesiones periodontales activas se expresan elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Th1) y osteo-destructoras (Th17) y bajos niveles de citoquinas inmuno-moduladoras (Th2) (Takeichi et al., 2000; Ukai et al., 2001; Vernal et al., 2005; Gaffen and Hajishengallis, 2008; Dutzan et al., 2009) y las bacterias periodonto-patógenas, entre ellas *A. actinomycetemcomitans*, cumplen un rol central en la inducción de la respuesta pro-inflamatoria y osteo-destructiva, en particular, la inducida ante el serotipo b. En conjunto, nuestros datos nos permiten establecer que en pacientes con periodontitis agresiva las formas séricas más inmunogénicas de *A. actinomycetemcomitans* se asocian con la reabsorción del hueso alveolar al inducir *in vitro* mayores niveles de secreción de citoquinas Th1 y Th17.

La reabsorción ósea es uno de los eventos patológicos característicos de las periodontitis y determina, en las formas más severas de la enfermedad, la pérdida de los dientes (Tonetti et al., 2005; Cochran, 2008). Los osteoclastos son las células responsables de la reabsorción ósea activa y durante las periodontitis, se ha detectado un incremento en los osteoclastos TRAP⁺ junto a un incremento en los niveles de secreción de RANKL (Jin et al., 2007; Han et al., 2013). Recientemente, se evaluó el efecto de la estimulación de pre-osteoclastos con linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados por células dendríticas expuestos ante los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* detectándose un incremento en el número de osteoclastos TRAP⁺ y de los niveles de expresión y secreción de RANKL en presencia de los serotipos K1 (W83) y K2 (HG184) en comparación a los otros serotipos bacterianos (Vernal et al., 2014b).

RANKL es el ligando del receptor RANK, proteína transmembrana ubicada en los osteoblastos, pre-osteoclastos y osteoclastos. La unión entre el receptor y el ligando activa, mediante la proteína TRAF6, a NF- κ B que trasloca al núcleo y activa al factor de transcripción citoplasmático de células T activadas (NFATc1), modificando la expresión génica de la célula y comprometiéndola con la diferenciación a osteoclasto (Theill et al., 2002; Walsh and Choi, 2003; Jin et al., 2007; Datta et al., 2008). La activación de NFATc1 es dependiente de la interacción RANKL-RANK que induce un incremento en los niveles de calcio intracelular y de calcineurina activa (Theill et al., 2002; Walsh and Choi, 2003; Jin et al., 2007; Datta et al., 2008). Una diferenciación eficiente estará determinada por un incremento del calcio intracelular, la activación de calcineurina y la traslocación al núcleo de

NFATc1 y NF- κ B, además de la presencia de elevados niveles extracelulares de RANKL y bajos de OPG. La razón RANKL/OPG regula el metabolismo óseo y los procesos de remodelación ósea, un equilibrio entre RANKL y OPG mantiene la homeostasis del tejido óseo y el desequilibrio, caracterizado por ejemplo por un incremento de RANKL, induce la reabsorción ósea patológica (Lacey et al., 1998; Boyle et al., 2003; Takahashi et al., 2005; Datta et al., 2008). Las citoquinas secretadas por los linfocitos Th2 y Treg inhiben la expresión y secreción de las citoquinas de los perfiles Th1 y Th17 y, en particular, las citoquinas IL-10 y TGF- β 1 inhiben la secreción de RANKL e incrementan los niveles de expresión y secreción de OPG (Garlet et al., 2004; Vernal and Garcia-Sanz, 2008; Garlet, 2010; Hernández et al., 2011). Recientemente, se describió que los linfocitos Treg pueden diferenciarse a linfocitos Th17 en condiciones inflamatorias. En efecto, células CD4⁺ *Foxp3*⁺ regulan negativamente la expresión de *Foxp3* en presencia de IL-17 e IFN- γ y modifican su función de inmuno-reguladora a pro-inflamatoria (Zhou et al., 2009a; Zhou et al., 2009b; Gong et al., 2009; Bovenschen et al., 2011; Liu et al., 2013).

En términos generales, la razón RANKL/OPG disminuye en salud periodontal y en lesiones periodontales aumenta según la severidad (Sakellari et al., 2008; Buduneli and Kinane, 2011). Además, se detecta un incremento en los niveles de RANKL en lesiones periodontales activas en comparación a lesiones inactivas (Dutzan et al., 2009) y se correlaciona con la detección local de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (Garlet et al., 2006; Wara-Aswapati et al., 2007; Sakellari et al., 2008). En respuesta a los periodonto-patógenos *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, en lesiones periodontales activas se han identificado poblaciones de linfocitos TCD4⁺ infiltrantes secretores de RANKL (Hernández et al., 2011). En este contexto, en modelos animales el LPS de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* induce, en linfocitos T, la expresión de RANKL, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , citoquinas pro-inflamatorias y osteo- destructoras (Ohnishi et al., 2010; Han et al., 2013), de forma similar a lo detectado en este trabajo de investigación.

Recientemente, se han desarrollado investigaciones que han permitido proyectar el desarrollo de nuevas terapias microbiológicas y farmacológicas para el tratamiento de las periodontitis. En el área microbiológica se identificaron las enzimas que permiten sintetizar y secretar el O-polisacárido de *A. actinomycetemcomitans* y su depleción genera clones no virulentos, carentes de LPS y por tanto,

carentes de todos los factores de virulencia asociados al serotipo (Li et al., 2006; Tang and Mintz, 2010) y, en modelos de biopelícula, se ha logrado reemplazar a las bacterias periodonto-patógenas por microorganismos beneficiosos para el hospedero con el objetivo de evitar que se induzca una respuesta inmune pro-inflamatoria u osteo-destructiva (Caglar et al., 2005). En el área farmacológica, mediante inyección de *P. gingivalis* se inducen periodontitis experimentales y se tratan con fármacos, tales como el ácido trans-retinoico (ATRA), detectándose un incremento en los linfocitos Treg y una disminución de Th17, permitiendo la regulación de la respuesta inmune por células del hospedero (Wang et al., 2013). Así, el desarrollo de modelos experimentales de periodontitis, inducidas por *A. actinomycetemcomitans*, permitirían evaluar el uso de probióticos con el objetivo de modificar la composición de la biopelícula, el uso de fármacos con el objetivo de modificar la expresión de genes en una cepa específica o la respuesta inmune del hospedero o el uso de bacterias que compitan por el mismo nicho o que, mediante el *quorum sensing*, sean capaces de depletar los genes de las enzimas que sintetizan el O-polisacárido.

La variable inmunogenicidad detectada en este estudio entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y, recientemente, los distintos serotipos de *P. gingivalis* (Vernal et al., 2009; Vernal et al., 2014a) podría implicar un re-análisis de las estrategias actuales de identificación de patógenos periodontales y su asociación a la etiología y progresión de las periodontitis. Así, en vez de describir la biopelícula periodonto-patógena en una lesión periodontal en función de las especies bacterianas que la componen, debiera de identificarse el tipo de serotipo bacteriano infectante para una especie bacteriana. Además, podrían proyectarse nuevos enfoques terapéuticos centrados en la modulación de la respuesta inmune del hospedero ante los serotipos bacterianos más inmunogénicos y complementar la eliminación local de la biopelícula patogénica para asegurar una terapia periodontal más exitosa y estable en el tiempo.

12. CONCLUSIONES

1. En linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, el serotipo b induce mayores niveles de secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , citoquinas asociadas a un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17, en comparación a los serotipos a y c.
2. En linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con LPS purificado de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, el LPS purificado del serotipo b induce mayores niveles de secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-17, IL-23, IFN- γ , TNF- α y TNF- β , citoquinas asociadas a un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y Th17, en comparación al LPS de los serotipos a y c.
3. En linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, el serotipo b induce mayores niveles de expresión y secreción de RANKL, factor que induce la diferenciación y maduración de osteoclastos responsables de la reabsorción ósea, en comparación a los serotipos a y c.
4. En linfocitos TCD4⁺ *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, el serotipo b induce mayores niveles de expresión de los factores *master-switch* *T-bet* y *RORC2*, determinantes de la diferenciación selectiva de los fenotipos linfocitarios Th1 y Th17, en comparación a los serotipos a y c.
5. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce predominantemente un patrón de respuesta linfocitario tipo Th1 y Th17 y esta respuesta es de mayor intensidad a la inducida por los otros serotipos bacterianos, por lo tanto, su detección en la biopelícula patogénica subgingival contribuiría a explicar los eventos inmuno-inflamatorios y osteo-destructivos que caracterizan las periodontitis.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Murphy, K. & Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793.
- Appay, V., Lier, R. v., Sallusto, F. & Roederer, M. (2008) Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry* **73**, 975-983.
- Asikainen, S. & Chen, C. (1999) Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000* **20**, 65-81.
- Asikainen, S., Lai, C., Alaluusua, S. & Slots, J. (1991) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiology and Immunology* **6**, 115-118.
- Azuma, M. (2006) Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *Journal of Periodontal Research* **41**, 361-373.
- Baba, N., Rubio, M., Kenins, L., Regairaz, C., Woisetschlager, M., Carballido, J. M. & Sarfati, M. (2012) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAK347 selectively acts on monocytes and naïve CD4+ Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells. *Human Immunology* **73**, 795-800.
- Baker, P., Dixon, M., Evans, R., Dufour, L., Johnson, E. & Roopenian, D. (1999) CD4+T Cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infection & Immunity* **67**, 2804-2809.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **18**, 767-811.
- Bhattacharyya, S., Borthakur, A., Dudeja, P. K. & Tobacman, J. K. (2010) Lipopolysaccharide-induced activation of NF-kB non-canonical pathway requires BCL10 serine 138 and NIK phosphorylations. *Experimental Cell Research* **316**, 3317-3327.
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sorensen, S., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P. & Hoiby, N. (2013) The *in vivo* biofilm. *Trends in Microbiology* **21**, 466-474.
- Bluestone, J. & Abbas, A. (2003) Natural versus adaptative regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* **3**, 253-257.
- Bluestone, J., Mackay, C., O'Shea, J. & Stockinger, B. (2009) The functional plasticity of T cell substes. *Nature Reviews Immunology* **9**, 811-816.
- Bovenschen, H., van der Kerkhof, C., van Erp, P., Woestenenk, R., Joosten, I. & Koenen, H. (2011) Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *Journal of Investigative Dermatology* **131**, 1853-1860.
- Boyle, W., Simonet, W. & Lacey, D. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342.
- Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K.-., eichhorst, S. T., Otte, J. M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkühn, T., Göke, B.-., Auernhammer, C. J. & Dambacher, J. (2005) IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, 827-838.
- Brightbill, H., Libraty, D., Krutzik, S., Yang, R., Belisle, J., Bleharski, J., Maitland, M., Norgard, M., Plevy, S., Smale, S., Brennan, P., Bloom, B., Godowski, P. & Modlin, R. (1999) Host defense mechanism triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**.
- Buduneli, N. & Kinane, D. F. (2011) Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 85-105.
- Caetano-Lopes, J., Rodrigues, A., Lopes, A., Vale, A. C., Pitts-Kiefer, M. A., Vidal, B., Perpétuo, I. P., Monteiro, J., Kontinen, Y. T., Vaz, M.-F.-., Nazarian, A., Canhao, H. & Fonseca, J. E. (2013) Rheumatoid arthritis bone fragility is associated with upregulation of IL17 and DKK1 gene expression. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **44**, 1-8 online.
- Caglar, E., Sandalli, N., Twetman, S., Kavaloglu, S., Ergeneli, S. & Selvi, S. (2005) Effect of yogurt with Bifidobacterium DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontologica Scandinavica* **63**, 317-320.
- Cardoso, C., Garlet, G., Crippa, G., Rosa, A., Júnior, W., Rossi, M. & Silva, J. (2009) Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiology and Immunology* **24**, 1-6.
- Cardoso, C., Garlet, G., Moreira, A., Júnior, W., Rossi, M. & Silva, J. (2008) Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *Journal of Leukocyte Biology* **84**, 311-318.

- Caroff, M. & Karibian, D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* **338**, 2431-2447.
- Chang, H. C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G. L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A. N., Han, L., Nguyen, E. T., Robertson, M. J., Perumal, N. B., Tepper, R. S., Nutt, S. L. & Kaplan, M. H. (2010) The transcription factor PU.1 is required for the development of interleukin 9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature Immunology* **11**, 527-534.
- Chen, C., Wang, T. & Chen, W. (2010) Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Molecular and Oral Microbiology* **25**, 207-214.
- Choi, J., Borrello, M., Smith, E., Cutler, C., Sojar, H. & Zauderer, M. (2001) Prior exposure of mice to *Fusobacterium nucleatum* modulates host response to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology* **16**, 338-344.
- Claesson, R., Lagervall, M., Höglund-Aberg, C., Johansson, A. & Haubek, D. (2011) Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a caucasian family living in Sweden. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 115-121.
- Claudino, M., Trombone, A., Cardoso, C., Ferreira, S., Martins, W., Assis, G., Santos, C., Trevilatto, P., Campanelli, A., Silva, J. & Garlet, G. (2008) The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *Journal of Leukocyte Biology* **84**, 1565-1573.
- Cochran, D. L. (2008) Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of Periodontology* **79**, 1569-1576.
- Colombo, A., Silva, C., Haffajee, A. & Colombo, A. (2006) Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *Journal of Medical Microbiology* **55**, 609-615.
- Cortelli, J., Aquino, D., Cortelli, S., Roman-Torres, C., Franco, G., Gomez, R., Batista, L. & Costa, F. (2012) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease* **31**, 1311-1318.
- Cutler, C. & Jowatni, R. (2004) Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontology 2000* **35**, 135-157.
- d'Empaire, G., Baer, M. & Gibson, F. (2006) The K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infection & Immunity* **74**, 6236-6243.
- Datta, H., Ng, W., Walker, J., Tuck, S. & Varanasi, S. (2008) The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* **61**, 577-587.
- Di Benedetto, A., Gigante, I., Colucci, S. & Grano, M. (2013) Periodontal Disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical and Developmental Immunology* **Article ID 503754**, 7 pages.
- Díaz, J., Yáñez, J., Melgar, S., Álvarez, C., Rojas, C. & Vernal, R. (2012) Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* **5**, 40-45.
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Yáñez, J. P., Álvarez, C., Rojas, C., Benítez, A., Ciuchi, P., Monasterio, G. & Vernal, R. (2013) Variabilidad de la síntesis de citoquinas por células dendríticas humanas estimuladas con los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* **6**, 57-62.
- Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., Aguillon, J., Puente, J., Pozo, P. & Gamonal, J. (2009) Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**, 290-296.
- Dzink, J. L., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1988) The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* **15**, 316-323.
- Dzink, J. L., Tanner, A. C., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1985) Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *Journal of Clinical Periodontology* **12**, 648-659.
- Ebersole, J., Sandoval, M., Steffen, M. & Cappelli, D. (1991) Serum antibody in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-infected patients with periodontal disease. *Infection & Immunity* **59**, 1795-1802.
- Faveri, M., Figueiredo, L., Duarte, P., Mestnik, M., Pinto Alves Mayer, M. & Feres, M. (2009) Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 739-749.
- Gaffen, S. & 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. *Journal of Dental Research* **87**, 817-826.

- Gajardo, M., Silva, N., Gómez, L., León, R., Parra, B., Contreras, A. & Gamonal, J. (2005) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *Journal of Periodontology* **76**, 289-294.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D. & Chen, B. (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**, 459-473.
- Garlet, G. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research* **89**, 1349-1363.
- Garlet, G., Cardoso, C., Silva, T., Ferreira, B., Avila-Campos, M., Cunha, F. & Silva, J. (2006) Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiology and Immunology* **21**, 12-20.
- Garlet, G., Martins, J., Fonseca, B., Ferreira, B. & Silva, J. (2004) Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 671-679.
- Garlet, G. P., Martins, W., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M. & Silva, J. S. (2003) Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* **38**, 210-217.
- Gasparini, C., Foxwell, B. M. J. & Feldmann, M. (2009) RelB/p50 regulates CCL19 production, but fails to promote human DC maturation. *European Journal of Immunology* **39**, 2215-2223.
- Genco, R., Christersson, L. & Zambon, J. (1986) Juvenile periodontitis. *International Dental Journal* **36**, 168-176.
- Giannopoulou, C., Kamma, J. & Mombelli, A. (2003) Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 145-153.
- Gmür, R., McNabb, H., van Steenberghe, T., Baehni, P., Mombelli, A., van Winkelhoff, A. & Guggenheim, B. (1993) Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 116-120.
- Gong, J., Ran, Y., Chen, D., Yang, Y. & Ma, X. (2009) Occurrence and environmental risk of endocrine-disrupting chemicals in surface waters of the Pearl River, South China. *Environ Monit Assess* **156**, 199-210.
- Goswami, R. & Kaplan, M. H. (2012) Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *Journal of Immunology* **189**, 3026-3033.
- Haffajee, A. & Socransky, S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* **5**, 78-111.
- Hajishengallis, G. (2009) *Porphyromonas gingivalis*-host interactions: open war or intelligent guerrilla tactics? *Microbes and Infection* **11**, 637-645.
- Han, X., Lin, X., Yu, X., Lin, J., Kawai, T., LaRosa, K. & Taubman, M. (2013) *Porphyromonas gingivalis* infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF- κ B ligand. *Infection & Immunity* **81**, 1502-1509.
- Harrington, L., Mangan, P. & Weaver, C. (2006) Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Current Opinion in Immunology* **18**, 349-356.
- Haubek, D., Ennibi, O. K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S. & Kilian, M. (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* **371**, 237-242.
- Haubek, D., Poulsen, K. & Kilian, M. (2007) Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infection & Immunity* **75**, 3080-3088.
- Henderson, B., Nair, S., Ward, J. & Wilson, M. (2003) Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annual Review of Microbiology* **57**, 29-55.
- Henderson, B., Ward, J. M. & Ready, D. (2010) *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontology 2000* **54**, 78-105.
- Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., González, F., Vernal, R., Sorsa, T. & Gamonal, J. (2011) Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of Dental Research* **90**, 1160-1170.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E. & León, R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 106-113.

- Holt, S., Tanner, A. & Socransky, S. (1980) Morphology and ultrastructure of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Infection & Immunity* **30**, 588-600.
- Holt, S. C. & Ebersole, J. L. (2005) *Porphyromonas gingivalis*, *Treponemo denticola* and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* **2000** **38**, 72-122.
- Honda, K. (2012) IL-22 from T Cells: better late than never. *Immunity* **37**, 952-954.
- Hosokawa, Y., Hosokawa, I., Ozaki, K., Nakae, H. & Matsuo, T. (2009) Cytokines differentially regulate CXCL10 production by interferon-g-stimulated or tumor necrosis factor-a-stimulated human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* **44**, 225-231.
- Hyvärinen, K., Mäntylä, P., Buhlin, K., Paju, S., Nieminen, M., Sinisalo, J. & Pussinen, P. (2012) A common periodontal pathogen has adverse association with both acute and stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* **223**, 478-484.
- Ihn, H., Yamane, K., Asano, Y., Kubo, M. & 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. *Journal of Immunology* **168**, 1895-1902.
- Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K. & Nojima, Y. (2005) Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis. Potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis and Rheumatism* **52**, 1037-1046.
- Jacobs-Helber, S. M., Wickrema, A., Birrer, M. J. & Sawyer, S. T. (1998) AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3699-3707.
- Jankovic, D., Liu, Z. & Gause, W. (2001) Th1 and Th2 cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways *TRENDS in Immunology* **22**, 450-457.
- Jin, Q., Cirelli, J., Park, C., Sugai, J., Taba, M. J., Kostenuik, P. & Giannobile, W. V. (2007) RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Periodontology* **78**, 1300-1308.
- Johnson, R. & Serio, F. (2005) Interleukin-18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontology* **76**, 785-790.
- Jowatni, R. & Cutler, C. (2004) Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th1 effector response. *Infection and Immunity* **72**, 1725-1732.
- Kachlany, S. C. (2010) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *Journal of Dental Research* **89**, 561-570.
- Kanaya, S., Nemoto, E., Ogawa, T. & Shimauchi, H. (2004) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides induce maturation of dendritic cells with CD14+CD16+ phenotype. *Eur J Immunol* **34**, 1451-1460.
- Kaplan, J., Perry, M., MacLean, L., Furganga, D., Wilson, M. & Fine, D. (2001) Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infection & Immunity* **69**, 5375-5384.
- Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 240-246.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N., Gonçalves, R., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y., Miranda, L., Ernst, C., Izumi, Y. & Taubman, M. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *American Journal of Pathology* **169**, 987-998.
- Kelk, P., Abd, H., Claesson, R., Sandstrom, G., Sjostedt, A. & Johansson, A. (2011) Cellular and molecular response of human macrophages exposed to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Cell Death & Disease* **2**, e126.
- Kikkert, R., Laine, M., Aarden, L. & Winkelhoff, A. v. (2007) Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* **22**, 145-151.
- Kikuchi, T., Willis, D., Liu, M., Sukumar, S., Barbour, S., Schenkein, H. & Tew, J. (2005) Dendritic-NK cell interactions in *P. gingivalis*-specific responses. *Journal for Dental Research* **84**, 4.
- Kim, K. W., Kim, H. R., Park, J. Y., Park, J. S., Oh, H. J., Woo, Y. J., Park, M. Y., Cho, M. L. & Lee, S. H. (2012) Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis and Rheumatism* **64**, 1015-1023.
- Kim, T., Frank, P., Eickholz, P., Eick, S. & Kim, C. (2009) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *Journal of Periodontology* **80**, 2020-2027.

- King, E. & Tatum, H. (1962) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Journal of Infectious Diseases* **111**, 85-94.
- Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A., Awasthi, A., Dardalhon, V., Galileos, G., Vollmar, P., Stritesky, G., Kaplan, M., Waisman, A., Kuchroo, V. & Oukka, M. (2008) IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5.
- Kramer, J. & Gaffen, S. (2007) Interleukin-17: A new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *Journal of Periodontology* **78**, 1083-1093.
- Kunnen, A., Dekker, D., van Pampus, M., Harmsen, H., Aarnoudse, J., Abbas, F. & Faas, M. (2012) Cytokine production induced by non-encapsulated and encapsulated *Porphyromonas gingivalis* strains. *Archives in Oral Biology* **57**, 1558-1566.
- Lacey, D., Timms, E., Tang, H., Kelley, M., Dunstan, C., Burgess, T., Elliot, R., Colombero, A., Elliot, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Quian, Y., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. & Boyle, W. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 167-176.
- Lafaurie, G. I., Contreras, A., Alexandra, B., Botero, J., Mayorga-Fayad, I., Jaramillo, A., Giraldo, A., González, F., Mantilla, S., Botero, A., Archila, L. H., Díaz, A., Chacón, T., Castillo, D. M., Betancourt, M., Aya, M. R. & Arce, R. (2007) Demographic, Clinical and Microbiological aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *Journal of Periodontology* **78**, 629-639.
- Lai, C., Listgarten, M. & Hammond, B. (1981) Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research* **16**, 379-399.
- Lawrence, T. (2009) The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**, 1651-1661.
- Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A. & Steinkasserer, A. (2002) Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *International Archives of Allergy and Immunology* **129**, 113-118.
- Leng, R. X., Pan, H. F., Ye, D. Q. & Xu, Y. (2012) Potential roles of IL-9 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* **1**, 28-32.
- Li, W., Xin, Y., McNeil, M. R. & Ma, Y. (2006) rmlB and rmlC genes are essential for growth of mycobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342**, 170-178.
- Liu, X., Gao, N., Li, M., Xu, D., Hou, Y., Wang, Q., Zhang, G., Sun, Q., Zhang, H. & Zeng, X. (2013) Elevated levels of CD4+CD25+Foxp3+ T cells in systemic sclerosis patients contribute to the secretion of IL-17 and immunosuppression dysfunction. *Public Library of Science One* **8**, e64531.
- Lopez, N., Silva, I. D., Ipinza, J. & Gutierrez, J. (2005) Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight women with pregnancy-associated gingivitis. *Journal of Periodontology* **77**, 2011-2024.
- Lopez, N., Smith, P. & Gutierrez, J. (2002) Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: A randomized controlled trial. *Journal of Periodontology* **76**, 2144-2153.
- Marolda, C. L., Lahiry, P., Vines, E., Saldias, S. & Valvano, M. A. (2006) Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods in Molecular Biology* **347**, 237-252.
- Matsumoto, C., Oda, T., Yokoyama, S., Tominari, T., Hirata, M., Miyaura, C. & Inada, M. (2012) Toll-like receptor 2 heterodimers, TLR2/6 and TLR2/1 induce prostaglandin E production by osteoblasts, osteoclast formation and inflammatory periodontitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **428**, 110-115.
- Murphy, K. & Reiner, S. (2002) The lineage decision of helper T cells. *Nature Reviews Immunology* **2**, 933-944.
- Naundorf, S., Schröder, M., Höflich, C., Suman, N., Volk, H. & Grütz, G. (2009) IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN- γ but not IL-17 production in memory T cells. *European Journal of Immunology* **39**, 1066-1077.
- Novak, M., Novak, K., Hodges, J., Kirakodu, S., Govindaswami, M., DiAngelis, A., Buchanan, W., Papapanou, P. & Michawicz, B. (2008) Periodontal bacterial profiles in pregnant women: a response to treatment and associations with birth outcomes in the obstetrics and periodontal therapy (OPT) study. *Journal of Periodontology* **79**, 1870-1879.
- Nussbaum, G., Ben-Adi, S., Genzler, T., Sela, M. & Rosen, G. (2009) Involvement of toll-like receptor 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components. *Infection & Immunity* **77**, 3939-3947.
- Ohnishi, T., Okamoto, A., Kakimoto, K., Bandow, K., Chiba, N. & Matsuguchi, T. (2010) Involvement of Cot/Tp12 in bone loss during periodontitis. *Journal of Dental Research* **89**, 192-197.

- Ohyama, H., Kato-Kogoe, N., Kuhara, A., Nishimura, F., Nakasho, K., Yamanegi, K., Yamada, N., Hata, M., Yamane, J. & Terada, N. (2009) The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *Journal of Dental Research* **88**, 633-638.
- Paju, S., Carlson, P., Jousimies-Somer, H. & Asikainen, S. (2000) Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationship between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 79-84.
- Palucka, K., Ueno, H., Roberts, L., Fay, J. & Banchereau, J. (2010) Dendritic cells: are they clinically relevant? *Cancer Journal* **16**, 318-324.
- Perry, M., MacLean, L., Brisson, J. & Wilson, M. (1996a) Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *European Journal of Biochemistry* **242**, 628-634.
- Perry, M., MacLean, L., Gmür, R. & Wilson, M. (1996b) Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infection & Immunity* **64**, 1215-1219.
- Pinheiro, E., Kawamoto, D., Ota-Tsuzuki, C., Almeida, L., Nunes, A., Longo, P., Wikstrom, M. & Mayer, M. (2011) Analysis of genotypic variation in genes associated with virulence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clinical isolates. *Journal of Periodontal Research* **46**, 310-317.
- Raetz, C. & Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 635-700.
- Reiner, S. (2007) Development in motion: helper T cells at work. *Cell* **129**, 33-36.
- Repeke, C. E., Ferreira, S. B., Claudino, M., Silveira, E. M., Assis, G. F. d., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S. & Garlet, G. P. (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**, 1122-1130.
- Roman-Torres, C., Aquino, D., Cortelli, S., Franco, G., Santos, J. d., Corraini, P., Holzhausen, M., Diniz, M., Gomez, R. & Cortelli, J. (2010) Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Archives in Oral Biology* **55**, 242-248.
- Rosen, G., Nisimov, I., Helcer, M. & Sela, M. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b lipopolysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun* **71**, 3652-3656.
- Rossa, C., Liu, M. & Kirkwood, K. L. (2008) A dominant function of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in receptor activator of nuclear factor-kB ligand expression and osteoclastogenesis induction by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Periodontal Research* **43**, 201-211.
- Rossato, M., Curtale, G., Tamassia, N., Castellucci, M., Mori, L., Gasperini, S., Mariotti, B., Luca, M. D., Mirolo, M., Cassatella, M. A., Locati, M. & Bazzoni, F. (2012) IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3101-3110.
- Ruiz, T., Lenox, C., Radermacher, M. & Mintz, K. (2006) Novel surface structures are associated with the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Infection & Immunity* **74**, 6163-6170.
- Rylev, M. & Kilian, M. (2008) Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 346-361.
- Sa, S. M., Valdez, P. A., Wu, J., Jung, K., Zhong, F., Hall, L., Kasman, I., Winer, J., Modrusan, Z., Danilenko, D. M. & Ouyang, W. (2007) The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *Journal of Immunology* **178**, 2229-2240.
- Sakellari, D., Katsikari, A., Slini, T., Ioannidis, I., Konstantinidis, A. & Arsenakis, M. (2011) Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 108-114.
- Sakellari, D., Menti, S. & Konstantinidis, A. (2008) Free soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand in gingival crevicular fluid correlates with distinct pathogens in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 938-943.
- Sasaki, H., Suzuki, N., Kent, R., Kawashima, N., Takeda, J. & Stashenko, P. (2008) T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in IL-10-deficient mice. *Journal of Immunology* **180**, 6193-6198.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. & Takayanagi, H. (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 2673-2682.

- Seder, R. & Paul, W. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annual Review of Immunology* **12**, 635-673.
- Shao-Cong, S. (2011) Non-canonical NF- κ B signalling pathway. *Cell Research* **21**, 71-85.
- Shimada, T., Sugano, N., Nishihara, R., Suzuki, K., Tanaka, H. & Ito, K. (2008) Differential effects of five *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains on gingival epithelial cells. *Oral Microbiology and Immunology* **23**, 455-458.
- Socransky, S. & Haffajee, A. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28**, 12-55.
- Socransky, S. & Haffajee, A. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**, 135-187.
- Socransky, S., Haffajee, A., Cugini, M., Smith, C. & Kent, R. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-144.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Banecchi, R. & Mantovani, A. (1998) Cutting edge: differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *Journal of Immunology* **161**, 1083-1086.
- Steinman, R., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. (2003) Tolerogenic Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* **21**, 685-711.
- Stockinger, B. & Veldhoen, M. (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology* **19**.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. & Martin, T. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* **20**, 345-357.
- Suzuki, N., Nakano, Y., Yoshida, Y., Ikeda, D. & Koga, T. (2001) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2002-2005.
- Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D. & Kitetsu, S. (2005) The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 369-374.
- Takahashi, T., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Shibuya, N., Moro, I. & Koga, T. (1991) Murine macrophage interleukin-1 release by capsularlike serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection & Immunity* **59**, 18-23.
- Takami, M., Love, R. B. & Iwashima, M. (2012) TGF- β converts apoptotic stimuli into the signal for Th9 differentiation. *Journal of Immunology* **188**, 4369-4375.
- Takeichi, O., Haber, J., Kawai, T., Smith, D., Moro, I. & Taubman, M. (2000) Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *Journal of Dental Research* **79**, 1548-1555.
- Tanaka, S. (2013) Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World Journal of Orthopaedics* **4**, 1-6.
- Tang, G., Kawai, T., Komatsuzawa, H. & Mintz, K. (2011) Lipopolysaccharides mediate leukotoxin secretion in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Molecular and Oral Microbiology* **27**, 70-82.
- Tang, G., Kawai, T., Komatsuzawa, H. & Mintz, K. P. (2012) Lipopolysaccharides mediate leukotoxin secretion in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Molecular and Oral Microbiology* **27**, 70-82.
- Tang, G. & Mintz, K. P. (2010) Glycosylation of the Collagen Adhesin EmaA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is dependent upon the Lipopolysaccharide biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* **192**, 1395-1404.
- Taubman, M. & Kawai, T. (2001) Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **12**, 125-135.
- Teixeira, R., Mendes, E., Carvalho, M. R. d., Nicoli, J., Farias, L. d. M. & Magalhaes, P. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Canadian Journal of Microbiology* **52**, 182-188.
- Theill, L., Boyle, W. & Penninger, J. (2002) RANKL and RANK: T cells, Bone loss and mammalian evolution. *Annual Review of Immunology* **20**, 795-823.
- Tonetti, M., Claffey, N. & European Workshop in Periodontology group, C. (2005) Advances in progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 210-213.
- Tsai, C., Shenker, B., DiRienzo, J., Malamud, D. & Taichman, N. (1984) Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyxin B. *Infection & Immunity* **43**, 700-705.

- Ueda, N., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Kuroyanagi, T. & Noguchi, T. (1995) Role of prostaglandin in the formation of osteoclasts induced by capsular-like polysaccharide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. *Oral Microbiology and Immunology* **10**, 69-75.
- Ukai, T., Mori, Y., Onoyama, M. & Hara, Y. (2001) Immunohistological study of interferon-g- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Archives in Oral Biology* **46**, 901-908.
- van Winkelhoff, A., Appelmelk, B., Kippuw, N. & De Graaff, J. (1993) K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 259-265.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., Snick, J. v., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. & Stockinger, B. (2008) Transforming growth factor-B "reprograms" the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* **9**, 1341-1346.
- Vernal, R., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M. & Garcia-Sanz, J. (2014a) Distinct human T-lymphocyte responses triggered by *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology* **41**, 19-30.
- Vernal, R., Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Pujol, M., Diaz-Guerra, E., Silva, A., Sanz, M. & Garcia-Sanz, J. (2014b) Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal of Clinical Periodontology* **41**, 451-459.
- Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Valenzuela, M. & Gamonal, J. (2005) Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 383-389.
- Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., García, L., Valle, I. D., Silva, A. & Gamonal, J. (2006) High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *Journal of Periodontology* **77**, 1772-1780.
- Vernal, R. & Garcia-Sanz, J. (2008) Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infectious Disorders Drug Targets* **8**, 207-220.
- Vernal, R., León, R., Herrera, D., García-Sanz, J., Silva, A. & Sanz, M. (2008) Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research* **43**, 689-697.
- Vernal, R., Leon, R., Silva, A., van Winkelhoff, A., Garcia-Sanz, J. & Sanz, M. (2009) Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 823-829.
- Wallet, M. A., Sen, P. & Tisch, R. (2005) Immunoregulation of dendritic cells. *Clinical Medicine & Research* **3**, 166-175.
- Walsh, M. & Choi, Y. (2003) Biology of the TRANCE axis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **14**, 251-263.
- Wang, L., Wang, J., Jin, Y., Gao, H. & Lin, X. (2013) Oral administration of All-Trans Retinoic Acid suppresses experimental periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance. *Journal of Periodontology* **85**, 740-750.
- Wara-Aswapati, N., Surarit, R., Chayasodom, A., Boch, J. & Pittiphat, W. (2007) RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontology* **78**, 1062-1069.
- Weaver, C. & Hatton, R. (2009) Interplay between the Th17 and Treg cell lineages: a (co-) evolutionary perspective. *Nature Reviews Immunology* **9**, 883-889.
- Wilton, J., Bampton, J., Griffiths, G., Curtis, M., Life, J., Johnson, N., Powell, J., Harrap, G. & Critchley, P. (1992) Interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis. A cross sectional study. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 53-57.
- Xynogala, I., Volgina, A., DiRienzo, J. M. & Korostoff, J. (2009) Evaluation of the humoral immune response to the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 in subjects with localized aggressive periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **24**, 116-123.
- Yamaguchi, N., Kawasaki, M., Yamashita, Y., Nakashima, K. & Koga, T. (1995) Role of the capsular polysaccharide-like serotype-specific antigen in resistance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infection & Immunity* **63**, 4589-4594.
- Yamamoto, S., Mogi, M., Kinpara, K., Ishihara, Y., Ueda, N., Amano, K., Nishihara, T., Noguchi, T. & Togari, A. (1999) Anti-proliferative capsular-like polysaccharide antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptotic cell death in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Journal of Dental Research* **78**, 1230-1237.
- Zambon, J. (1996) Periodontal diseases: microbial factors. *Annals of Periodontology* **1**, 879.

- Zambon, J., Christersson, L. & Slots, J. (1983a) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *Journal of Periodontology* **54**, 707-711.
- Zambon, J., Slots, J. & Genco, R. (1983b) Serology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and Serotype Distribution in Human Periodontal Disease. *Infection & Immunity* **41**, 19-27.
- Zhang, T., Kurita-Ochiai, T., Hashizume, T., Du, Y., Oguchi, S. & Yamamoto, M. (2010) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **59**, 143-151.
- Zhang, X. & Teng, Y. (2006) Interleukin-10 inhibits gram-negative-microbe-specific human receptor activator of NF- κ B ligand-positive CD4⁺-Th1-Cell associated alveolar bone loss in vivo. *Infection & Immunity* **74**, 4927-4931.
- Zhou, L., Chong, M. & Littman, D. (2009a) Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646-655.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S., Jeker, L. & Bluestone, J. (2009b) Plasticity of CD4⁺ Foxp3⁺ T cells. *Current Opinion in Immunology* **21**, 281-285.
- Zhu, J. & Paul, W. (2008) CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood* **112**, 1557-1569.

14. ANEXOS

14.1 Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

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

Objetivo de la investigación:

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

Personas estudiadas:

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

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

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

Examen clínico y toma de la muestra:

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



Procedimiento de laboratorio y destino de las muestras de sangre:

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

En las muestras de sangre NO se realizarán estudios genéticos.

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

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

Duración de la participación de las personas en el estudio:

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

Beneficios por participar en el estudio:

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

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

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



Confidencialidad de los datos:

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

Responsable del Proyecto de Investigación:

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

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

Institución patrocinante:

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

Comité Ético Científico:

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

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

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



FORMULARIO
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaración del paciente:

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

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

Acepto voluntariamente tomar parte en el estudio.

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

Edición del Formulario de Consentimiento Informado: Diciembre de 2010



Revisión Bibliográfica

Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis

Virulence and variability on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their association to periodontitis

Díaz Zúñiga J¹, Yáñez Figueroa J¹, Melgar Rodríguez S¹, Álvarez Rivas C¹, Rojas Lagos C¹, Vernal Astudillo R¹

RESUMEN

Las periodontitis son un conjunto de patologías de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa producidas por el biofilm patogénico subgingival. *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* son bacterias periodonto-patógenas que pueden causar daño directo a las estructuras periodontales a través de los diversos factores de virulencia que expresan. Sobre la base de estos factores de virulencia, distintos genotipos y serotipos bacterianos se han descrito, cada uno de ellos con una potencial variable patogenicidad. En esta revisión bibliográfica se describen diferentes factores de virulencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* y se discute la variable inmunogenicidad y patogenicidad de los distintos genotipos y serotipos descritos para ellos. Tanto *P. gingivalis* como *A. actinomycetemcomitans* poseen diversos factores de virulencia asociados al inicio, progresión y severidad de las periodontitis. En *P. gingivalis*, los factores de virulencia para los cuales se describen distintos genotipos y/o serotipos son fimbria, LPS y cápsula bacteriana, y en *A. actinomycetemcomitans* son leucotoxina A, Cdt y LPS. Cada uno de estos distintos genotipos y serotipos induce una respuesta inmuno-inflamatoria diferente en el hospedero y, por lo tanto, se podrían asociar a una variable patogenicidad y podrían determinar las características clínicas de la enfermedad.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 5(1); 40-45, 2012.

Palabras clave: Virulencia, genotipos, serotipos, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

ABSTRACT

Periodontitis represents a heterogenic group of periodontal infections elicited by bacteria residing at the subgingival biofilm. Although this biofilm is constituted by a broad variety of bacterial species, only a limited number has been associated with the periodontitis aetiology, among them *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Both *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* express a number of virulence factors that contribute to direct tissue damage and, based on them, distinct genotypes and serotypes have been described, each one with a potential variable pathogenicity. This review aimed to analyze the different virulence factors described for *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* and to discuss the variable immunogenicity and pathogenicity of their serotypes and genotypes. *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* express different virulence factors and they determine the initiation, progression, and severity of periodontitis. In *P. gingivalis*, distinct serotypes and/or genotypes are described based on fimbriae, LPS, and capsule. Additionally, in *A. actinomycetemcomitans* distinct serotypes and/or genotypes are described based on leucotoxin A, Cdt, and LPS. These distinct serotypes and genotypes induce a differential immunoinflammatory response and, thus, could be associated with variations in pathogenicity and reflected in clinic characteristics of the disease.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 5(1); 40-5, 2012.

Key words: Virulence, genotypes, serotypes, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son un conjunto de patologías de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa producidas por el biofilm subgingival que coloniza el surco gingivodentario⁽¹⁾. Se caracterizan por la destrucción del soporte periodontal, que está conformado por el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar, y eventualmente provocan la pérdida de los dientes⁽¹⁾. En términos generales, son una de las patologías de mayor prevalencia en seres humanos y, además del daño local que inducen, son un factor modificante de la salud general del individuo⁽²⁾.

Las bacterias periodontopatógenas son los agentes etiológicos de las periodontitis⁽³⁾, entre ellas, *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* han sido ampliamente asociadas al inicio, progresión y severidad de las enfermedades periodontales^(3,4,5). Sin embargo, aunque estas bacterias pueden causar daño directo a los tejidos periodontales, es la respuesta inmune del hospedero inducida ante los periodontopatógenos el principal determinante del carácter destructivo de la enfermedad^(4,5).

P. gingivalis es una bacteria patógena de alta prevalencia tanto en periodontitis crónica como agresiva^(6,7,8). La evidencia científica

actual ha asociado a *P. gingivalis* con la destrucción activa del aparato de soporte periodontal⁽⁴⁾ y con el inicio y severidad de ciertas enfermedades y condiciones sistémicas, tales como trastornos cardiovasculares y parto prematuro con bajo peso del neonato^(1,9).

En tanto, *A. actinomycetemcomitans* ha sido ampliamente asociada a periodontitis agresiva y se ha relacionado con el desarrollo de trastornos cardiovasculares, tal como la aterosclerosis^(10,11).

Distintos serotipos se han descrito en bacterias que tienen la capacidad de inducir enfermedades infecciosas. En efecto, para *Toxoplasma gondii* y *Escherichia coli* se han descrito distintos serotipos, algunos de ellos asociados a enfermedad y otros a salud^(12,13). De igual forma, para *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* se han propuesto distintos serotipos caracterizados por una virulencia diferente⁽¹⁴⁾.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es analizar los principales factores de virulencia que expresan *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* y como los distintos genotipos y/o serotipos descritos para ellos se podrían asociar con una inmunogenicidad y patogenicidad diferente durante las periodontitis.

1. Laboratorio de Biología Periodontal. Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

Correspondencia autor: Jaime Díaz Z. zaidemiaj@gmail.com. Trabajo recibido el 03/11/2011. Aprobado para su publicación el 04/03/2012.

Variabilidad de la síntesis de citoquinas por células dendríticas humanas estimuladas con los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Variability in the cytokine synthesis by human dendritic cells in response to different *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes

Díaz-Zúñiga J¹, Melgar-Rodríguez S¹ y Yáñez JP¹, Álvarez C¹, Rojas C¹, Benítez A¹, Ciuchi P¹, Monasterio G¹, Vernal R¹

RESUMEN

Objetivo: Sobre la base de la antigenicidad del polisacárido O del LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se describen distintos serotipos bacterianos y entre ellos se ha especulado una patogenicidad e inmunogenicidad diferente. El objetivo de este trabajo es analizar las diferencias en la síntesis de citoquinas producidas por células dendríticas cuando son estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. **Metodología:** Células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos circulantes periféricos humanos fueron estimuladas a MOIs=10⁻¹-10⁻² con los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*. Mediante PCR y ELISA se evaluaron los niveles de expresión y secreción de citoquinas. **Resultados:** En las células dendríticas, la producción de citoquinas fue diferente ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, con mayores niveles de secreción de IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, IFN-γ y TNF-α cuando el microorganismo estimulante fue la cepa ATCC® 43718™ (serotipo b). **Conclusión:** El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* posee un mayor potencial inmuno-estimulador de células dendríticas comparado con los otros serotipos bacterianos y potencialmente contribuiría a inducir un patrón de respuesta inmune tipo Th1 y/o Th17 durante las periodontitis. **Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 6(2); 57-62, 2013.**

Palabras clave: Células dendríticas, citoquinas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

ABSTRACT

Objective: *A. actinomycetemcomitans* expresses a number of virulence factors that contribute to direct tissue damage and, based on the antigenicity of LPS O-polysaccharide, distinct serotypes have been described. The aim of this study was to determine the pattern of cytokine expression and secretion on dendritic cells stimulated with *A. actinomycetemcomitans* serotypes a, b and c. **Methods:** Using different multiplicity of infections of the serotypes a, b, and c of *A. actinomycetemcomitans*, the mRNA expression and secretion levels for cytokines IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, TNF-α, and IFN-γ were determined in stimulated dendritic cells using PCR and ELISA. **Results:** A dose-dependent increase in the secretion levels for IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, TNF-α, and IFN-γ was elicited on dendritic cells following stimulation with each of the serotypes of *A. actinomycetemcomitans*. In addition, *A. actinomycetemcomitans* serotype b (ATCC® 43718™) induced higher levels of IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, IFN-γ and TNF-α compared with the other strains. **Conclusion:** These data demonstrate that the distinct *A. actinomycetemcomitans* LPS O-polysaccharide serotypes induce both quantitative and qualitative differences in the dendritic cell response. Furthermore, the observed dendritic cell response to *A. actinomycetemcomitans* b serotype was characteristic of a Th1 and Th17 pattern of cytokine expression. **Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 6(2); 57-62, 2013.**

Key words: Dendritic cells, cytokines, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa, cuya causa principal son las bacterias que residen en el biofilm patogénico subgingival^(1,2). Aunque las bacterias pueden causar daño a los tejidos, es la respuesta inmune del hospedero la principal causa de la destrucción del aparato de soporte periodontal^(3,4). Estas interacciones (bacteria-hospedero) inducen la síntesis de citoquinas y quimioquinas, las que pueden determinar la destrucción del tejido conectivo y óseo característico de las periodontitis y, eventualmente, pueden llevar a la pérdida de los dientes^(5,6).

En las periodontitis, las células dendríticas reconocen las bacterias patógenas del biofilm subgingival, las fagocitan y destruyen, y luego procesan y conjugan sus antígenos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para presentarlos a los linfocitos TCD4⁺ y así, iniciar la respuesta inmune adaptativa⁽⁹⁻¹²⁾. Las células

dendríticas maduras secretan interleuquina (IL)-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, interferon (IFN)-γ, factor de necrosis tumoral (TNF)-α y TNF-β⁽¹³⁾, las que durante la presentación antigénica cumplen un rol fundamental en la activación y diferenciación de los linfocitos TCD4⁺ a alguno de los fenotipos efectores: T-helper (Th)-1, Th2, Th17 o T reguladores (Treg) inducidos⁽¹⁴⁾. Los linfocitos cumplen un rol central en la inmunidad durante la infección periodontal y sus distintos fenotipos efectores determinan las características clínicas de la enfermedad^(12,15,16).

El biofilm patogénico subgingival, constituido principalmente por bacterias anaerobias Gram-negativo, es el factor etiológico responsable del inicio y progresión de las periodontitis^(2,17-19). Las bacterias periodonto-patógenas que componen este biofilm pueden causar daño directo a los tejidos periodontales; sin embargo, es la respuesta inmuno-inflamatoria inducida en el hospedero ante ellas la principal responsable de la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes: ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar⁽⁹⁾.

1. Laboratorio de Biología Periodontal. Departamento de Odontología Conservadora. Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

Correspondencia autor: Jaime Díaz. zaidemiaj@gmail.com / Rolando Vernal. rvernal@uchile.cl. Trabajo recibido el 06/09/2012. Aprobado para su publicación el 06/03/2013.

Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Jaime Díaz-Zúñiga¹, Juan Pablo Yáñez¹, Carla Alvarez¹, Samanta Melgar-Rodríguez¹, Marcela Hernández², Mariano Sanz³ and Rolando Vernal¹

¹Periodontal Biology Laboratory, Department of Conservative Dentistry, Dental School, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile; ²Periodontal Biology Laboratory, Department of Pathology, Dental School, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile; ³EETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Díaz-Zúñiga J, Yáñez JP, Alvarez C, Melgar-Rodríguez S, Hernández M, Sanz M, Vernal R. Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 242–251. doi: 10.1111/jcpe.12205.

Abstract

Aim: Different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* have been described based on the lipopolysaccharide (LPS)-O-polysaccharide antigenicity. In turn, a distinct effect of *A. actinomycetemcomitans* serotypes has been described on cell proliferation and pro-inflammatory cytokine production in different human cells. This study was aimed to investigate the differential dendritic cell (DC) response when stimulated with different bacterial strains belonging to the most prevalent serotypes of *A. actinomycetemcomitans* (a–c).

Materials and Methods: Dendritic cells were obtained from healthy subjects and stimulated with increasing multiplicity of infection (MOI = 10^{-1} – 10^2) of *A. actinomycetemcomitans*, serotypes a–c, or their lipopolysaccharide (10–50 ng/ml). The levels for interferon (IFN)- γ , tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 and IL-23 were quantified by real-time RT-PCR and ELISA.

Results: Variable DC responses were detected when stimulated with the different strains of *A. actinomycetemcomitans*. DCs stimulated with *A. actinomycetemcomitans* strains belonging to the serotype b or their purified LPS expressed higher levels of IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ and TNF- α than DCs stimulated with the other serotypes.

Conclusions: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains belonging to the serotype b demonstrated a higher capacity to trigger Th1 and Th17-type cytokine production on DCs. These increased potential is likely explained by a higher immunogenicity of their LPS.

MS and RV contributed equally to this work and should be considered as joint last authors.

Key words: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; cytokines; dendritic cells; lipopolysaccharide; LPS; serotypes

Accepted for publication 17 November 2013

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

This research has been supported by grants from the Dental School of Universidad de Chile (FIOUCH 09-8) and the Chilean Government (FONDECYT 11100298).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is a small, non-motile, gram-negative coccobacillus, member from the genus *Aggregatibacter* belonging to the family of *Pasteurellaceae* (Norskov-Lauritsen & Kilian 2006). It grows preferentially in a facultative anaerobic, microaerophilic and capnophilic environment (Sanz et al. 2004, Schacher et al. 2007). Several lines of evidence support its

aetiological role as a true periodontal pathogen, mostly in relation to aggressive and syndromic forms of periodontitis, although it can also be found in patients with chronic periodontitis as well as in healthy subjects (Slots & Ting 1999, Socransky & Haffajee 2005, Schacher et al. 2007, Laine et al. 2013). Currently, six *A. actinomycetemcomitans* serotypes (a–f) are recognized based on

Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant

Rolando Vernal^{1,2}, Jaime Díaz-Zúñiga², Samanta Melgar-Rodríguez², Myriam Pujol², Eva Díaz-Guerra¹, Augusto Silva¹, Mariano Sanz³ and Jose A. Garcia-Sanz¹

¹Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, Spain; ²Periodontal Biology Laboratory, Department of Conservative Dentistry, Dental School, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile; ³EETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Vernal R, Díaz-Zúñiga J, Melgar-Rodríguez S, Pujol M, Díaz-Guerra E, Silva A, Sanz M, Garcia-Sanz JA. Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. J Clin Periodontol 2014; 41: 451–459. doi: 10.1111/jcpe.12236.

Abstract

Aim: Destructive periodontitis is associated with a Th1–Th17 immune response and activation of RANKL-induced osteoclasts. In addition, *Porphyromonas gingivalis* K1 and K2 serotypes induce a strong Th1–Th17 response. This study aimed to investigate whether these *P. gingivalis* serotypes induce higher osteoclasts activation, by increased Th17-associated RANKL production, and an antigen-specific memory T-lymphocyte response.

Material and Methods: The RANKL production and TRAP⁺ osteoclast induction were quantified on naïve T lymphocytes stimulated with dendritic cells primed with the *P. gingivalis* serotypes. The T-bet, GATA-3, RORC2 and Foxp3 expression was correlated with RANKL production. The frequency of proliferating memory T lymphocytes in response to *P. gingivalis* serotypes was determined in both periodontitis and healthy subjects.

Results: T lymphocytes stimulated by K1 or K2-primed dendritic cells elicited higher levels of RANKL and TRAP⁺ osteoclasts than cells stimulated with the other serotypes. RANKL positively correlated with RORC2. Whereas periodontitis patients had a higher frequency of memory T lymphocytes responding to K1 or K2, healthy subjects had a higher frequency of memory T lymphocytes responding to K4 or K[–].

Conclusions: *P. gingivalis* serotypes K1 and K2, but not others, are associated with an increased production of the osteoclastogenesis-related factor RANKL. This important information suggests that these serotypes could elicit a greater bone resorption in vivo and have a role in the periodontitis pathogenesis.

MS and JAG-S contributed equally to this work and should be considered as joint last authors.

Key words: bone resorption; periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; RANKL; serotypes; T lymphocytes

Accepted for publication 23 January 2014

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that they have no conflict of interests. The research in our laboratories has been supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2009-07974), Instituto de Salud Carlos III (RD06/0010/1010), Spanish National Research Council (PIE200420E240 and PIE200420E586) and Chilean Government (FONDECYT 11100298).

Periodontitis is one of the most common human infectious diseases and one of the primary causes of tooth loss in adults (Tonetti & Claffey 2005, Cochran 2008). It is characterized by the destruction of periodontal connective tissues and

14.3 Manuscritos aceptados para su publicación (ISI)

Nombre: T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent.

Autores: Jaime Díaz-Zúñiga, Samanta Melgar-Rodríguez, Carla Álvarez, Gustavo Monasterio, Pía Ciuchi, Claudia Díaz, Alejandro Escobar, Mariano Sanz, and Rolando Vernal.

Aceptado con comentarios: 30 de mayo de 2014.

Revista: Journal of Periodontal Research

Código: JRE-05-14-2630

Nombre: Variability on the Dendritic Cell Responses Triggered by the Different Serotypes of *A. actinomycetemcomitans* or *P. gingivalis* is TLR2 or TLR4-dependent

Autores: Jaime Díaz-Zúñiga, Gustavo Monasterio, Carla Alvarez, Samanta Melgar-Rodríguez, Alvaro Benítez, Pía Ciuchi, Matías García, Joselyn Arias, Mariano Sanz, and Rolando Vernal

Aceptado con comentarios: 02 de julio de 2014.

Revista: Journal of Periodontology

Código: JOP-14-0326

14.4 Resúmenes de trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales

- 1. 2º Congreso de Ciencia Joven, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Agosto 2012.*
- 2. X Congreso Latinoamericano de Inmunología, Lima, Perú, Mayo de 2012.*
- 3. 90th General Session & Exhibition of International Association for Dental Research. Foz do Iguaçu, Brasil, Junio de 2012.*
- 4. 91th General Session & Exhibition of International Association for Dental Research. Seattle, Washington, USA, Marzo de 2013.*
- 5. 15th International Congress of Immunology, Milán, Italia, Agosto de 2013.*
- 6. XXV Reunión Anual de la International Association for Dental Research (IADR), División Chile, Octubre de 2013.*

14.5 Resúmenes de trabajos enviados a congresos nacionales e internacionales

14.4.1. IADR/PER Congress, Dubrovnik, Croacia, Septiembre de 2014.

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype b triggers Th1 and Th17 lymphocytes differentiation**

J. DIAZ-ZUÑIGA, S. MELGAR-RODRÍGUEZ, G. MONASTERIO, P. CIUCHI, C. ALVAREZ, A. BENITEZ, J. ARIAS, and R. VERNAL, University of Chile, Santiago, Chile

Abstract

Objective:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is a gram-negative and capnophilic bacterium associated with onset, progression and severity of periodontitis. Based on the antigenicity of its lipopolysaccharide (LPS) O-polysaccharide, distinct serotypes have been described. In humans, serotypes a, b and c are the most frequently detected and, during periodontitis, the serotype b is the most frequently detected in active periodontal lesions. This study aimed to analyze if the serotype b of *A. actinomycetemcomitans* induce a Th1 and Th17-related immune response, which associate with inflammation and alveolar bone resorption during periodontitis

Method:

In human CD4⁺T lymphocytes activated with dendritic cells stimulated with 10, 20 or 50 ng/mL of LPS purified from *A. actinomycetemcomitans* a-c serotypes, the expression and secretion levels for the cytokines IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- γ , TNF- α , TNF- β and TGF- β 1 and the expression levels for the transcription factors *T-bet*, *GATA3*, *RORC2* and *Foxp3* were quantified by real-time RT-PCR and ELISA.

Result:

A dose-dependent cytokine secretion and transcription factor expression was detected on CD4⁺T lymphocytes activated with dendritic cells stimulated with LPS purified from the different *A. actinomycetemcomitans* serotypes. LPS purified from serotype b induced higher expression and secretion levels of Th1/Th17-associated transcription factors and cytokines compared with LPS purified from the other serotypes.

Conclusion:

These results demonstrate a different potential of LPS purified from the different *A. actinomycetemcomitans* serotypes to induce Th1/Th17 differentiation and function. In particular, they demonstrate a higher capacity of serotype b LPS to trigger a Th1 and Th17 immune response.

Abstract ID#: 192473

Password: 643518

Submitter's E-mail Address: zaidemiaj@gmail.com

Submitter Full Name: Jaime Díaz-Zúñiga

Program Selection: Scientific Groups

Preferred Presentation Format: Oral Session

The presenter is a Masters Student after professional degree.

This abstract is based on research that was funded entirely or partially by an outside source: FONDECYT 11100298 and 1140904

Keywords: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Immune response, Immunology, Microbiology and Periodontal

14.6 Distinciones

Premio Colgate al Mejor trabajo en Periodoncia durante la realización de la XXV Reunión Anual de la IADR División Chilena, Santiago, Chile, Octubre de 2013.