



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**Mayores niveles de linfocitos TCD4⁺CCR7⁺ en periodontitis y su potencial
implicancia en la formación de tejido linfoide ectópico periodontal
Carolina Isabel Rojas Pérez**

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

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo
TUTORA EXPERTA
Dra. Carla Álvarez Rivas**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT regular 1140904
Santiago - Chile
2017**



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

**Mayores niveles de linfocitos TCD4⁺CCR7⁺ en periodontitis y su potencial
implicancia en la formación de tejido linfoide ectópico periodontal
Carolina Isabel Rojas Pérez**

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

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo
TUTORA EXPERTA
Dra. Carla Álvarez Rivas**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT regular 1140904
Santiago - Chile
2017**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su amor incondicional. Gracias por haber estado siempre para mí, no existen personas más admirables que ustedes. Me inculcaron principios y dieron las herramientas para alcanzar mis metas. Sin ustedes nada de esto sería posible.

A mi hermana, por ser mi compañera de vida desde que nací. Has sido mi modelo a seguir desde chica y siempre lo serás. Gracias por ser mi cómplice y quererme incondicionalmente a pesar de nuestras diferencias.

A Luis, por el enorme cariño que me entregas a diario. Siempre he admirado tu pasión y forma de ver la vida, eres tú el que siempre me inspira a perseguir mis sueños a pesar de las dificultades. Gracias por apoyarme en todos mis proyectos y por hacerme inmensamente feliz todos los días. Te amo.

A mis amigos, que crecieron conmigo y me acompañaron todos estos años de colegio y universidad. Soy muy afortunada por haber compartido aventuras, risas, llantos, conversaciones eternas y carretes con ustedes. Los quiero mucho.

A scout, por convertirme en la persona que soy el día de hoy. Por entregarme valores y despertar en mí la convicción de dejar el mundo mejor de cómo lo encontramos.

A mis tutores, el doctor Rolando Vernal Astudillo y Carla Álvarez Rivas. Gracias de corazón por guiarme en este proceso. Por hacerme creer en mis capacidades y por despertar en mí el gusto por la ciencia y la docencia. Pero, sobre todo, por sus enseñanzas, dedicación y paciencia. Se vienen nuevos desafíos y no podría estar mejor acompañada.

Y, por último, a la Universidad de Chile. No ha existido día en el que me arrepienta de mi elección. Su formación dirigida hacia el servicio público, el pluralismo, la participación y hacia la libertad de pensamiento y expresión, me incentivan a seguir creciendo como profesional y como persona. Este no es el final de una etapa, sino el comienzo...

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
Respuesta inmune durante las periodontitis.....	10
Fenotipos efectores de linfocitos T.....	11
Expresión diferencial de CD25 α , CD45R y CCR7 en los linfocitos T	13
Fenotipos linfocitarios y periodontitis	15
Tejido linfoide ectópico	16
CCR7 y su rol en la formación del tejido linfoide ectópico	17
Planteamiento del problema.....	18
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVO GENERAL	22
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Selección de los sujetos y obtención de muestras biológicas	23
Consideraciones Éticas.....	24
Procesamiento de muestras biológicas para inmunofluorescencia	24
Procesamiento de muestras biológicas para citometría de flujo	25
Análisis de fenotipo celular	27

Estrategia de marcaje y análisis celular	28
Análisis de Datos.....	28
7. RESULTADOS.....	29
Activación linfocitos T CD4 ⁺	29
Expresión de CCR7 ⁺ en linfocitos T CD4 ⁺ diferenciados	30
Frecuencia de linfocitos T CD4 ⁺ <i>naïve</i> CCR7 ⁺	32
Frecuencia de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria CCR7 ⁺	33
Detección de CD4 y CCR7 en biopsias gingivales	35
8. DISCUSIÓN.....	36
10.CONCLUSIONES	39
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
12.ANEXOS	49
ANEXO 1: Ficha clínica.....	49
ANEXO 2: Consentimiento Informado	51

1. RESUMEN

Las periodontitis son un conjunto de patologías inflamatorias crónicas que se desencadenan en respuesta a la disbiosis polimicrobiana generada por bacterias periodonto-patógenas residentes en la bio-película sub-gingival. En este contexto, la formación de un denso infiltrado inmuno-inflamatorio en los tejidos periodontales, compuesto por una amplia variedad de leucocitos, citoquinas, quimioquinas proinflamatorias y factores ósteo-destructivos, resulta en la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes.

El receptor de quimioquinas homeostático CCR7 y sus ligandos desempeñan un rol clave en la migración de linfocitos y células dendríticas hacia los órganos linfoides secundarios, regulando el proceso de presentación antigénica. En otras enfermedades inflamatorias crónicas, se ha demostrado que la expresión ectópica de CCR7 altera la ubicación de los infiltrados de células inmunitarias, promoviendo la migración, activación y diferenciación de células *naïve* en la periferia, induciendo la formación de agregados linfoides ectópicos. Sin embargo, el rol de CCR7 en etiopatogenia de la periodontitis no ha sido aun completamente dilucidado. El objetivo de este estudio fue establecer la frecuencia de linfocitos T CD4⁺CCR7⁺ infiltrantes en tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica y sujetos sanos.

A partir de biopsias gingivales obtenidas de pacientes afectados de periodontitis y sujetos sanos, se obtuvieron células totales en suspensión mediante digestión enzimática. La expresión de los marcadores CD4, CD25 α , CD45RA, CD45RO, RORC2, Foxp3, T-bet y CCR7 fue analizada mediante citometría de flujo. Además, los marcadores CD4 y CCR7 fueron inmunolocalizados en los tejidos periodontales mediante inmuno-fluorescencia.

Se detectó un mayor porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25 α ⁻CD45RA⁺CCR7⁺ (*naïve*), CD4⁺CD25 α ⁻CD45RO⁺CCR7⁺ (memoria) y

CD4⁺CD25⁺RORC2⁺CCR7⁺ (Th17) en pacientes afectados de periodontitis en comparación con los sujetos sanos.

En conclusión, existe un aumento en la frecuencia de linfocitos T *naïve*, de memoria y Th17 CCR7⁺ en los tejidos periodontales de sujetos afectados de periodontitis, lo que sugiere el posible rol quimiotáctico de CCR7 en la formación del infiltrado inflamatorio y de agrupaciones linfoides ectópicas durante la periodontitis.

2. INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son un conjunto de patologías inflamatorias crónicas de alta prevalencia en el mundo, cuya causa son las bacterias patógenas residentes en la bio-película subgingival (Jacob 2012; Salvi y Lang 2005). Estas bacterias, inducen respuestas inmuno-inflamatorias en el hospedero, las que comprometen la integridad de los tejidos de soporte del diente y afectan la patogenia de otras patologías y condiciones sistémicas (Hajishengallis 2014a; Salvi y Lang 2005).

Durante la última década, se ha propuesto un nuevo modelo que describe la patogénesis de las periodontitis (Hajishengallis 2014a; Hajishengallis y Korostoff 2017). En este modelo, la enfermedad deriva de la disbiosis generada por bacterias específicas que perturban la homeostasis ecológica de las comunidades microbianas comensales asociadas a la salud periodontal (Hajishengallis y Lamont, 2012; Rosier y cols. 2014). Este desbalance es provocado por microorganismos patógenos que sobre-expresan factores de virulencia y, en consecuencia, se adaptan a un ecosistema dentro de un contexto inflamatorio, conformando sinérgicamente una entidad patogénica compuesta mayormente por bacterias anaerobias, que causan la enfermedad en individuos susceptibles (Abusleme y cols. 2013; Han y Wang 2013; Lamont y Hajishengallis 2015).

Si bien los microorganismos que colonizan la bio-película subgingival pueden generar daño directo en los tejidos periodontales, este daño no es suficiente para explicar el inicio y progresión de las periodontitis (Garlet y cols. 2003). En efecto, la exacerbada y sostenida respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero ante estos microorganismos es la culpable de la destrucción de los tejidos de soporte periodontal: cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar, responsable final de la pérdida de los dientes (Hernández y cols. 2011; Yucel-Lindberg y Båge 2013).

Actualmente, la terapia periodontal convencional se centra en la remoción mecánica de la bio-película presente en las superficies dentarias y los tejidos blandos adyacentes. La finalidad del tratamiento es mitigar la inflamación y la destrucción tisular mediante la disminución de la carga microbiana; sin embargo, en muchos casos clínicos, el tratamiento estándar no es suficiente para lograr salud periodontal estable, debido a la nueva formación de una bio-película y a la acelerada respuesta inmuno-inflamatoria inducida (Yucel-Lindberg y Båge, 2013). Es por lo tanto imperativo generar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la evidencia científica que permitan resolver estos casos, particularmente mediante la modulación de la respuesta inmuno-inflamatoria desplegada en los tejidos infectados, responsable central de la pérdida de los dientes.

Respuesta inmune durante las periodontitis

Durante las periodontitis, la respuesta inmuno-inflamatoria se inicia a partir de la interacción entre la microbiota oral patogénica y los componentes moleculares y celulares de la respuesta inmune innata, en particular las células presentadoras de antígeno (APCs, del inglés *antigen presenting cells*). Las APCs, reconocen patrones moleculares bacterianos de superficie altamente conservados (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), tales como lipopolisacárido, peptidoglicano, ácido lipoteicoico y ADN bacteriano, mediante receptores de membrana denominados receptores de reconocimiento de patógenos (PRR, del inglés, *pathogen recognizing receptors*) (Darveau 2010; Khan 2015). Estos receptores se expresan principalmente en células residentes tisulares, macrófagos y células dendríticas (Mogensen 2009). Estas últimas, tienen la potencialidad de presentar ciertos antígenos a las células de la respuesta inmune adaptativa.

Tras el reconocimiento bacteriano, se inicia la activación de diferentes vías de señalización que terminan en la expresión y secreción de mediadores pro-inflamatorios solubles, tal como citoquinas y quimioquinas, los cuales inducen

vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular local y reclutamiento de leucocitos hacia los tejidos infectados (Di Benedetto y cols. 2013; Harvey 2017). En términos generales, las APCs fagocitan las bacterias, procesan sus antígenos y los conjugan a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC, del inglés, *Class II Major histocompatibility complex*) (Azuma 2006), para ser presentadas a linfocitos T CD4⁺ indiferenciados o vírgenes (en inglés, *naïve*) (Hajishengallis y Korostoff, 2017).

El paradigma actual señala que las APCs, principalmente las células dendríticas, migran hacia los linfonodos regionales para realizar la presentación antigénica (Cutler y Teng 2007; Wilensky y cols. 2014). En los linfonodos, regulan la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ *naïve* a linfocitos T efectores o de memoria. La diferenciación selectiva de los linfocitos activados depende del antígeno presentado, el patrón de citoquinas ambientales y las señales co-estimuladoras que bidireccionalmente señalizan durante la interacción celular (Wilensky y cols. 2014). Finalmente, los linfocitos T *naïve* se polarizan y diferencian en distintos fenotipos efectores T *helper*: Th1, Th2, Th17 o linfocitos T reguladores (Treg) (Di Benedetto y cols. 2013; Yucel-Lindberg y Båge 2013).

Cada fenotipo linfocitario efector se caracteriza por la expresión de un *master switch gene* (factor de transcripción específico que regula la expresión de un gen en particular), el cual determina la expresión del patrón genético asociado a la producción de citoquinas (**Tabla 1**) (Hajishengallis y Korostoff 2017).

Fenotipos efectores de linfocitos T

Los linfocitos Th1 expresan el factor de transcripción T-bet y son responsables de la inmunidad mediada por células ante patógenos intracelulares mediante la secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-12, las cuales inducen y perpetúan la inflamación durante las periodontitis (Dutzan y cols. 2009; Hajishengallis y Korostoff 2017). Los linfocitos Th2 expresan el factor de transcripción GATA-3 y

presentan actividad inmuno-moduladora dependiente principalmente de la secreción de IL-4, asociada a estabilidad periodontal (Gaffen y Hajishengallis 2008; Silva y cols. 2015).

El fenotipo Th17 expresa el factor de transcripción RORC2, responsable de la inmunidad contra patógenos extracelulares (Noack y Miossec 2014; Vernal y Garcia-Sanz 2008). Estas células producen principalmente IL-17, IL-21 e IL-23 (Dutzan y cols. 2016; Gaffen y Hajishengallis 2008), citoquinas que inducen la producción de enzimas asociadas a la destrucción de la matriz colágena extracelular, tales como las MMPs (del inglés, *matrix metalloproteinases*) (Silva y cols. 2015) y de factores asociados a la resorción del hueso alveolar, tal como RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B) (Hienz y cols. 2015). Por otro lado, los linfocitos Tregs se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3, el cual permite la expresión del programa génico inmuno-regulador. Estas células expresan IL-10, TGF- β 1 (del inglés, *Transforming growth factor beta 1*) y CTLA-4 (del inglés, *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) (Bozec y Zaiss 2017), los cuales en conjunto suprimen la actividad de fenotipos efectores inflamatorios y osteo-destructivos, Th1 y Th17. Así, los Tregs, promueven la tolerancia inmunológica, restaurando la homeostasis inmune asociada a salud periodontal (Hienz y cols. 2015).

Tabla 1. Linfocitos T helper junto a su perfil de citoquinas y principal función.

	FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CLAVE	CITOQUINAS ASOCIADAS	FUNCIONES
Th1 	T-bet	TNF- α IFN- γ IL-2 IL-12	Inflamación
Th2 	GATA3	IL-4 IL-6 IL-13	Inmuno-modulación
Th17 	RORC2	IL-17A IL-17F IL-21 IL-22	Osteo-destrucción
Treg 	Foxp3	IL-10 TGF- β 1	Tolerancia y regulación de respuestas inmunes

Expresión diferencial de CD25 α , CD45R y CCR7 en los linfocitos T CD4 $^{+}$

Durante la diferenciación de los linfocitos TCD4 $^{+}$ *naïve*, es fundamental la señalización de IL-2 mediada por su receptor IL-2R α (CD25 α), el cual es utilizado como marcador de activación de linfocitos T (Boyman y Sprent 2012). En este sentido, IL-2 actúa como factor de crecimiento de linfocitos T, ya que promueve su proliferación y expansión clonal (Driesen y cols. 2008). Luego de la activación celular durante la presentación antigénica, los linfocitos T *helper* efectores sobre-

expresan CD25 α en su membrana plasmática; sin embargo, el fenotipo Treg sobre-expresa CD25 α constitutivamente. En contraste, la expresión de CD25 α es prácticamente indetectable en linfocitos inactivos, como los linfocitos T *naïve* y de memoria (Arenas-Ramirez 2015).

Por otro lado, los linfocitos T *naïve* y de memoria pueden ser identificados mediante la expresión recíproca de las isoformas del antígeno CD45R (Chang y cols. 2016). Así, los linfocitos T CD45RA⁺ se consideran como linfocitos T *naïve* y las células CD45RO⁺ como linfocitos T de memoria (Mackay 1999).

La expresión de CCR7, receptor de quimioquinas que controla el *homing* (fenómeno en el cual las células migran a su órgano de origen) dirigido hacia los órganos linfoides secundarios (OLS), permite dividir a los linfocitos T de memoria en 2 subtipos funcionalmente diferentes. Las células de memoria CCR7⁻ migran hacia los tejidos infectados de manera que puedan desplegar una función efectora inmediata (Sallusto y cols. 1999). Por el contrario, las células de memoria CCR7⁺ migran hacia los linfonodos; no obstante, tienen el potencial de diferenciarse en células T efectoras CCR7⁻ ante un segundo estímulo y llevar a cabo una respuesta cualitativa y cuantitativamente mejorada (Sallusto y cols.1999).

En resumen (**Tabla 2**), de acuerdo a la expresión de CD25 α se puede determinar el estado de activación de los linfocitos T (Linfocitos CD25 α ⁺: células activas (efectoras) y linfocitos CD25 α ⁻: células inactivas (*naïve* /memoria), y de acuerdo a la expresión de CD45RA, CD45RO y CCR7 se puede determinar el estado *naïve*/memoria y su perfil migratorio (Linfocitos CD45RA⁺CCR7⁺: células *naïve*; linfocitos CD45RO⁺CCR7⁺: células de memoria central; y linfocitos CD45RO⁺CCR7⁻: células de memoria periférica) (Berard y Tough, 2002; Mahnke y cols. 2013).

Tabla 2. Caracterización fenotípica de linfocitos TCD4⁺.

TIPO CELULAR	CD4	CD25 α	CD45RA	CD45RO	CCR7
Linfocitos T <i>naïve</i>	+	-	+	-	+
Linfocitos T de memoria central	+	-	-	+	+
Linfocitos T de memoria periférica	+	-	-	+	-
Linfocitos T efectores	+	+	-	-	Secundariamente en Th17 y Treg

Adaptada de Berard Tough 2002 y Manke y cols., 2013

Fenotipos linfocitarios y periodontitis

Durante las periodontitis, la respuesta inmuno-inflamatoria sostenida en el tiempo determina la cronicidad de la enfermedad. Este proceso se caracteriza por la maduración del infiltrado inflamatorio, el cual en estados tardíos de la enfermedad se compone mayoritariamente por linfocitos T y B (Ford y cols. 2010). La respuesta mediada por linfocitos, en particular del tipo Th1 y Th17 (Di Benedetto y cols. 2013), da lugar al contexto periodontal enriquecido en mediadores pro-inflamatorios y factores osteo-destructivos, los cuales determinan los signos y síntomas clínicos característicos de la enfermedad (Harvey 2017).

En otras patologías inflamatorias crónicas, tal como la artritis reumatoide, se ha descrito un patrón de respuesta inmune principalmente linfocitario. Este infiltrado inflamatorio comienza a acumularse y a organizarse espacialmente en los tejidos inflamados, en donde producen mediadores quimiotácticos que favorecen el reclutamiento y la retención de linfocitos TCD4⁺, promoviendo respuestas inmunes adaptativas específicas que exacerban la cronicidad de la enfermedad (Aloisi y Pujol-Borrell 2006; Neyt y cols. 2012).

En este contexto, recientemente se estableció que la inflamación crónica induce la formación de agregados linfoides que facilitan la migración no sólo de células efectoras, sino también de linfocitos indiferenciados (Höpken y cols. 2007; Timmer y cols. 2007). Estos agregados linfoides se caracterizan por la producción de quimioquinas que en condiciones homeostáticas se concentran en los OLS. Como consecuencia, el tejido inflamado se enriquece en componentes moleculares y celulares característicos de los linfonodos (Pitzalis y cols. 2014). En los últimos años, se ha definido esta organización linfoide como Tejido Linfoide Ectópico (TLE), cuya formación se ha asociado a un incremento en el potencial de activación y diferenciación inmune local en enfermedades inflamatorias crónicas, autoinmunes y cáncer (Carragher y cols. 2008; Dieu-Nosjean y cols. 2014; Neyt y cols. 2012).

Tejido linfoide ectópico

Los TLEs o también denominados estructuras linfoides terciarias, corresponden a agregados linfoides funcionalmente organizados, que se desarrollan en respuesta a la inflamación crónica local o sistémica (Jing y Choi, 2016; Pitzalis y cols. 2014). Su composición varía desde estrechas agrupaciones linfocitarias, hasta estructuras altamente organizadas con centros germinales funcionales e histológicamente semejantes a los OLS (Drayton y cols. 2006; McNamee y cols. 2013). A diferencia de los OLS que surgen en localizaciones claves del organismo durante la embriogénesis (Nishikawa y cols. 2003), los TLEs se desarrollan en sitios no predecibles, inducidos por factores ambientales entre los cuales se describen la infección e inflamación crónica (Neyt y cols. 2012). Se generan folículos de linfocitos B y T, con células dendríticas entre las células estromales especializadas en sitios de inflamación activa una vez que se ha completado el desarrollo normal de los órganos linfoides (Pitzalis y cols. 2014). Su arquitectura específica maximiza la interacción intercelular entre las APCs y los

linfocitos T, de manera que se genere una respuesta inmune adaptativa más rápida y eficaz (Gretz y cols. 1997).

Muchas de las señales celulares y moleculares que controlan el desarrollo de OLS han sido identificadas también en el desarrollo de los TLEs (Aloisi y Pujol-Borrell, 2006; Drayton y cols. 2006). Las quimioquinas homeostáticas CXCL13, CCL21, CCL19 y CXCL12, así como sus receptores específicos, CXCR5, CCR7 y CXCR4, son críticos para el tráfico y reclutamiento de leucocitos (Pavert y Mebius 2010). Estas moléculas señalizan en estrecha cooperación con las citoquinas inflamatorias, particularmente del perfil Th17, regulando la distribución de los linfocitos y las células dendríticas en los diferentes compartimientos tisulares (Cyster 2003; Moschovakis y Förster 2012).

Recientemente se ha descrito que la expresión ectópica del receptor CCR7 y sus quimioquinas ligando-específicas CCL19 y CCL21, cumplen un rol clave en la inducción de la formación del TLE en patologías inflamatorias crónicas (McNamee y cols. 2013). Por ejemplo, en la artritis reumatoide, el incremento en la expresión de CCR7 y CXCR4 en linfocitos T sinoviales promueve la entrada y retención de linfocitos T infiltrantes en las articulaciones afectadas, mediante la atracción quimiotáctica y la inducción de neovascularización, lo que sugiere un posible rol en la formación de folículos linfoides ectópicos (Moschovakis y Förster 2012; Timmer y cols. 2007).

CCR7 y su rol en la formación del tejido linfoide ectópico

CCR7 es un receptor de quimioquinas homeostático conformado por 7 dominios proteicos transmembrana que media sus señales a través de proteínas G heterotriméricas. Se expresa principalmente en células dendríticas maduras activadas, linfocitos T *naïve*, linfocitos T de memoria y linfocitos B, además de diferentes células no inmunes (Förster y cols. 2008). La principal función del eje CCR7/CCL19/CCL21 es dirigir la migración de los linfocitos T *naïve* hacia los

órganos linfoides primarios, secundarios y terciarios (Moschovakis y Förster 2012). Además, este eje está involucrado en el *homing* de varias sub-poblaciones de linfocitos T y células dendríticas en los linfonodos, coordinando su posicionamiento dentro de compartimentos tisulares bien definidos y funcionales (Bromley y cols. 2005; Förster y cols. 2008).

Los linfocitos T *naïve* responden a gradientes de concentración de CCL19 y CCL21, migrando hacia su fuente de secreción (Bromley y cols. 2008). De esta manera, la retención de células T *naïve* en los órganos linfoides permite el encuentro con las APCs, favoreciendo la presentación antigénica y la polarización selectiva de los linfocitos T hacia uno de los diferentes fenotipos efectores con funciones especializadas (**Tabla 1**) (McNamee y cols. 2015).

En condiciones homeostáticas, CCR7 se expresa esencialmente en OLS (Moschovakis y Förster 2012); sin embargo, durante la inflamación crónica aumenta la expresión local de CCR7, asociándose a la formación de agregados linfoides ectópicos (Timmer y cols. 2007). De esta manera, CCR7 favorece la presentación antigénica *in situ*, promoviendo la inflamación crónica. Por otro lado, CCR7 induce la generación de linfocitos T de fenotipo patológico (Kodati y cols. 2014). En efecto, las quimioquinas CCL19 y CCL21 inducen la producción de IL-23, citoquina clave para el crecimiento y supervivencia de los linfocitos efectores Th17 (Kuwabara y cols. 2009). Si bien el rol patogénico de la expresión ectópica de CCR7 y sus ligandos ha sido documentada en distintas patologías inflamatorias (Moschovakis y Förster 2012; Pickens y cols. 2012; Hellmann y cols. 2016), el rol de este eje en la patogenia de las periodontitis aún no ha sido dilucidado.

Planteamiento del problema

Las periodontitis implican una serie de manifestaciones clínicas asociadas a la respuesta inmuno-inflamatoria desplegada por el hospedero ante infección subgingival (Ferreira y cols. 2017). El paradigma actual establece que, tras el

reconocimiento de los microorganismos patógenos, las APCs migran desde los tejidos periodontales infectados hacia los linfonodos regionales que drenan el territorio periodontal, en donde ocurre la presentación antigénica a los linfocitos T *naïve*. Posteriormente, las células efectoras ya activadas deben retornar a los tejidos infectados para así llevar a cabo su función.

Recientemente se ha propuesto un cambio en el patrón migratorio de los linfocitos T *naïve* dependiente de la expresión de CCR7, el que involucra su concentración en los tejidos periféricos junto a las APCs, en vez de los linfonodos regionales. En este caso, los linfocitos T *naïve* CCR7⁺ son quimio-atraídos hacia los tejidos inflamados, favoreciendo su activación y diferenciación periférica. De esta manera, no es necesaria la migración de las APCs hacia los linfonodos, lo cual promueve una respuesta adaptativa local más eficiente y rápida, que se ha asociado a la cronicidad de la enfermedad.

Debido a que CCR7 es un receptor expresado en células que migran y son retenidas en los OLS, la expresión de CCR7 en los tejidos periodontales inflamados daría cuenta de un cambio en el patrón migratorio celular asociado a las periodontitis. En particular, la detección de linfocitos T *naïve*, de memoria y Th17 CCR7⁺ durante las periodontitis crónicas podría significar una nueva organización funcional del infiltrado inflamatorio, promoviendo la presentación antigénica y la polarización efectora *in situ*. Por otro lado, la detección de linfocitos Th17 CCR7⁺, permitirá asociar la expresión de CCR7 con la migración y retención de células Th17 en los tejidos periodontales inflamados (Bombardieri y cols. 2017; Kodati y cols. 2014). En este contexto, la detección de sub-poblaciones linfocitarias CCR7⁺ asociadas a periodontitis permitirá establecer nuevas funciones patogénicas del eje CCR7/CCL19/CCL21, así como entregar nuevos antecedentes respecto al estatus funcional y estructural del infiltrado inflamatorio periodontal. Estos antecedentes permitirán comprender de mejor manera la patogenia de las

periodontitis, con el fin de generar nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y/o terapéuticas que sean confiables y estables en el tiempo.

3. HIPÓTESIS

Los tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica moderada a severa presentan niveles aumentados de linfocitos T CD4⁺CCR7⁺ *naïve* (CD45RA⁺), de memoria (CD45RO⁺) y efectoros (CD25α⁺) en comparación con individuos sanos.

4. OBJETIVO GENERAL

Establecer la frecuencia de los linfocitos T $CD4^+CCR7^+$ *naïve* ($CD45RA^+$), de memoria ($CD45RO^+$) y efectores ($CD25\alpha^+$) infiltrantes en tejidos periodontales de pacientes con periodontitis crónica en comparación con individuos sanos.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión del marcador de activación $CD25\alpha$ en linfocitos T $CD4^+$ presentes en los tejidos periodontales de individuos sanos y pacientes con periodontitis crónica.
- Cuantificar la frecuencia de linfocitos T *naïve* $CD4^+CD45RA^+CCR7^+$ y de linfocitos T de memoria $CD4^+CD45RO^+CCR7^+$ presentes en los tejidos periodontales de individuos sanos y pacientes con periodontitis crónica.
- Cuantificar la frecuencia de los linfocitos T $CD4^+CCR7^+$ efectores Th1, Th17 y Treg presentes en los tejidos periodontales de individuos sanos y pacientes con periodontitis crónica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los sujetos y obtención de muestras biológicas

Se seleccionaron pacientes de la clínica odontológica de la Universidad de Chile entre los años 2016 y 2017 diagnosticados con periodontitis crónica moderada a severa con indicación de extracción dentaria por motivos periodontales. Además, se seleccionaron individuos con diagnóstico de tejidos periodontales sanos con indicación de extracción dentaria por motivos ortodónticos. El protocolo de investigación fue explicado a todos los participantes del estudio, quienes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (**Anexo 2**).

El diagnóstico de periodontitis crónica se realizó según los siguientes parámetros clínicos: presentar al menos 6 dientes con profundidad de sondaje (PS) ≥ 5 mm y pérdida del nivel de inserción clínica (NIC) ≥ 3 mm con signos radiográficos de pérdida ósea $\geq 30\%$ en los sitios periodontales (Dutzan y cols., 2012). El diagnóstico de tejidos periodontales sanos se basó en los siguientes parámetros clínicos: tejidos gingivales con punteado característico; color rosa pálido; margen gingival ubicado en la unión entre el cemento radicular y el esmalte; PS de 1-3 mm; ausencia de sangrado al sondaje u otros signos clínicos de inflamación (Highfield 2009). El registro de los datos se realizó en la ficha clínica confeccionada para este estudio (**Anexo 1**).

Criterios de Inclusión:

Adultos sanos ≥ 35 años, que no sufran de alguna enfermedad sistémica (Diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerativa, discrasias sanguíneas, enfermedad de

Crohn, infección VIH, cáncer, trastornos endocrinos, entre otros), con el diagnóstico de periodontitis crónica o de tejidos periodontales sanos.

Criterios de Exclusión:

Haber recibido tratamiento periodontal previo al momento del examen, terapia antibiótica o antiinflamatoria hace menos de 3 meses antes del estudio. Fumar o padecer de alguna condición que altere la respuesta inmune (Ej: enfermedades autoinmunes congénitas o adquiridas, terapia con fármacos inmunosupresores, etc.).

Posterior al procedimiento de exodoncia dentaria se obtuvieron biopsias gingivales bajo anestesia local, de 1 a 2 mm³, las cuales fueron transportadas siguiendo distintos protocolos según su finalidad. Para citometría de flujo, las biopsias obtenidas fueron transportadas en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos (Penicilina, Estreptomina y L-glutamina) para luego ser procesadas mediante digestión enzimática y así obtener una suspensión de células totales. Para inmunofluorescencia las muestras biológicas fueron depositadas en PFA (paraformaldehído) al 4% durante 24 horas, para luego traspasarlas a PBS (del inglés, *phosphate buffered saline*) estéril hasta el momento de corte.

Consideraciones Éticas

El protocolo de investigación se realizó de acuerdo a la versión actualizada de la Declaración de Helsinki, revisada el año 2000 (Carlson y cols., 2004), la cual fue claramente explicada a todos los participantes que aceptaron participar en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado (**Anexo 2**).

Procesamiento de muestras biológicas para inmunofluorescencia

Previo al proceso de corte, las muestras se depositaron en sacarosa al 10% durante 24 horas a 4°C. Luego, se transfirieron a sacarosa al 30% para su traslado y posterior procesamiento.

Para la preparación de los bloques para corte, se embebieron las muestras en el *cryo gel Tissue Tek OCT* (del inglés, *optimum cutting temperature*) (*Electron Microscopy Sciences*, Radnor, PA USA) y congelaron a -20°C por una hora. Consecutivamente, se realizaron cortes seriados de 30 µm en el criostato Microm-Zeiss (Waldorf, Germany). Luego, se recuperaron las muestras en TrisPO₄, para luego permeabilizarlas con Tris Tritón 100x al 0,5% y se lavaron en TrisPO₄.

Para el marcaje, se incubó el anticuerpo primario antihumano para CD4 (*Biologend*, San Diego, CA USA) y CCR7 (R&D Systems, MI USA) en Tris-BSA 1%-Tritón 0,2% y se sumergieron las muestras en éste por 12 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron las muestras en TrisPO₄ tres veces y se procedió a realizar el marcaje con los anticuerpo secundarios anti-ratón Alexa Fluor 488 (*Thermofisher*, Waltham, MA USA) y Tropo 3 (*Thermofisher*, Waltham, MA USA) en las concentraciones 1/300 y 1/10.000 respectivamente, incubados en Tris-BSA 1%-Tritón 0,2%. Finalmente, el análisis de inmunofluorescencia se realizó en el Microscopio Confocal Espectral/ Dos-Fotones LSM780 del Centro de Microscopía Avanzada Biobío de la Universidad de Concepción.

Procesamiento de muestras biológicas para citometría de flujo

A partir de las biopsias gingivales, se obtuvo una suspensión celular utilizando el medio de digestión tisular RPMI 1640 suplementado con 50 UI/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina, y 200 mmol/L de L-glutamina además de 200 U/mL de colagenasa tipo IV e hialuronidasa (*Gibco by life technologies*TM, GI, New York). Las células obtenidas fueron lavadas dos veces con PBS, filtradas a través de *Cell Strainer* de 70 µm, para luego realizar el conteo celular en una

cámara de Neubauer (*Marienfeld Superior- Neubauer improved, Heyn* Santiago, Chile) utilizando un microscopio de fase-contraste (*Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, NY, USA*), mediante el método de exclusión con azul de Tripán.

Análisis de fenotipo celular

Para el análisis fenotípico, se realizó el marcaje de 1×10^6 células usando anticuerpos monoclonales de ratón antihumano conjugados con los fluorocromos presentados en la **Tabla 3**. Primero se realizó el marcaje extracelular incubando las células en 200 μ L de PBS, suplementado con 5% SFB (suero fetal bovino) con las siguientes concentraciones de anticuerpos conjugados para citometría: 1/200 Anti-CD197 (CCR7), 1/400 CD4, 1/200 CD45RA, 1/200 CD45RO, por 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, las células fueron lavadas con 200 μ L de PBS + 5% SBF, fueron fijadas y permeabilizadas para el marcaje intracelular utilizando el kit *Flow Cytometry Permeabilization/Wash Buffer* (R&D Systems, MI, USA) según las instrucciones del fabricante. El marcaje fue realizado con anticuerpos para los factores de transcripción: RORC2, Foxp3 y T-bet en la concentración 1/200, por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas en PBS y re-suspendidas en 300 μ L de PFA al 2% para su posterior análisis en el citómetro de flujo BD LSR Fortessa X-20 de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Tabla 3. Anticuerpos específicos para el marcaje celular.

ANTICUERPO	MARCAJE	FLUOROCROMO
CD4 ⁺	LT- helper	FITC / PE
CD25 ⁺	Activación	PE Cy7
CD45RA ⁺	<i>Naïve</i>	FITC
CD45RO ⁺	Memoria	PE
CD197 ⁺	CCR7	FITC
RORC2	Th17	APC
Foxp3	Treg	APC
T-bet	Th1	PerCP

Estrategia de marcaje y análisis celular

Con el objetivo de detectar la frecuencia de células T CD4⁺ activadas en pacientes enfermos en comparación con sujetos sanos, la expresión de CD25 α (marcador de activación) fue evaluada mediante citometría de flujo usando anticuerpo de ratón antihumano conjugado con el fluorocromo PECy7. (BD Biosciences Pharmingen, San José, CA, USA).

A partir de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ (activos) y CD25⁻ (inactivos) se evaluaron los niveles de expresión del marcador de indiferenciación CD45RA (*naïve*) o de memoria CD45RO, en conjunto con la expresión de CD197 (CCR7).

Similarmente, a partir de los linfocitos TCD4⁺CD25⁺ (activos) y CD25⁻ (inactivos) se evaluaron los niveles de expresión de los marcadores de caracterización fenotípica RORC2 (Th17), Foxp3 (Treg) y T-bet (Th1) en conjunto con la expresión de CD197 (CCR7).

Análisis de Datos

El análisis de los datos obtenidos de la citometría de flujo se realizó usando el software WinMDi 2.9. Las frecuencias de las diferentes poblaciones celulares fueron expresadas como porcentaje promedio \pm desviación estándar de células positivas sobre el total. Los datos fueron analizados estadísticamente usando el software SPSS v.22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). La normalidad de la distribución de los datos fue determinada usando la prueba de Kolgomorov-Smirnov y dependiendo de su distribución se analizaron las diferencias entre las frecuencias detectadas en las muestras de sanos *versus* enfermos mediante t-test no pareado, considerando como estadísticamente significativo $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Se obtuvieron 19 biopsias gingivales (n=19), 10 de pacientes diagnosticados con periodontitis y 9 de sujetos sanos.

Activación linfocitos T CD4⁺

La activación de los linfocitos T CD4⁺ fue analizada según la expresión de CD25 α , mediante citometría de flujo (**Figura 1**). En pacientes con periodontitis crónica se detectó una mayor frecuencia de linfocitos T CD4⁺ totales y T CD4⁺ CD25 α ⁺ en comparación con individuos sanos.

A partir de los linfocitos T CD4⁺CD25 α ⁺ se definió el *gate* (subgrupo de células a analizar) de células activas (**R1**). Asimismo, a partir de los linfocitos T CD4⁺ CD25 α ⁻ se definió el *gate* de células inactivas (**R2**) para el posterior análisis de los diferentes subtipos de linfocitos T CD4⁺.

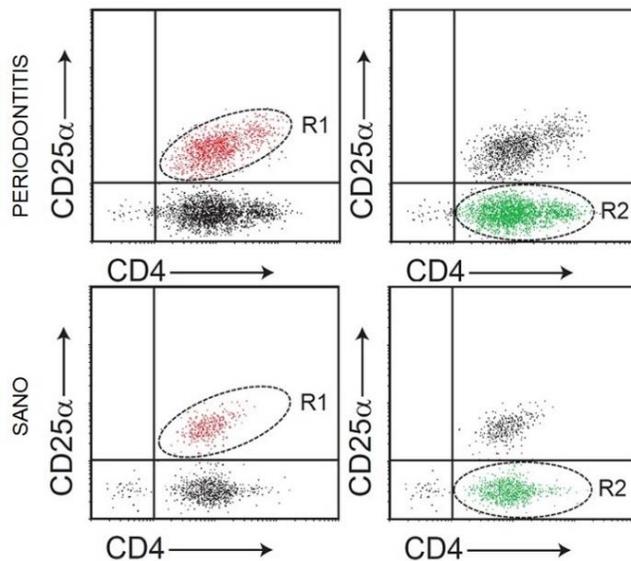


Figura 1. Niveles de expresión de CD25 α en linfocitos T CD4⁺.

Análisis mediante citometría de flujo de la expresión del marcador de activación CD25 α en linfocitos T CD4⁺. Gráfico de *dot plot* representativo de 10 muestras biológicas de pacientes con periodontitis crónica (n=5) e individuos sanos (n=5) en el cual **R1** representa linfocitos T *helper* activos (CD4⁺ CD25 α ⁺) y **R2** representa linfocitos T *helper* inactivos (CD4⁺ CD25 α ⁻). Se detectó una mayor frecuencia de linfocitos T CD4⁺ totales, tanto activos como inactivos.

Expresión de CCR7⁺ en linfocitos T CD4⁺ diferenciados

Se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ diferenciados a fenotipos efectoros que a su vez co-expresaban el receptor CCR7, según la expresión de los factores de transcripción T-bet (Th1), RORC2 (Th17) y Foxp3 (Treg) (**Figura 2 y Tabla 4**).

En las biopsias de pacientes con periodontitis crónica se detectaron mayores niveles de expresión de T-bet, RORC2 y Foxp3 en comparación con las biopsias de sujetos sanos.

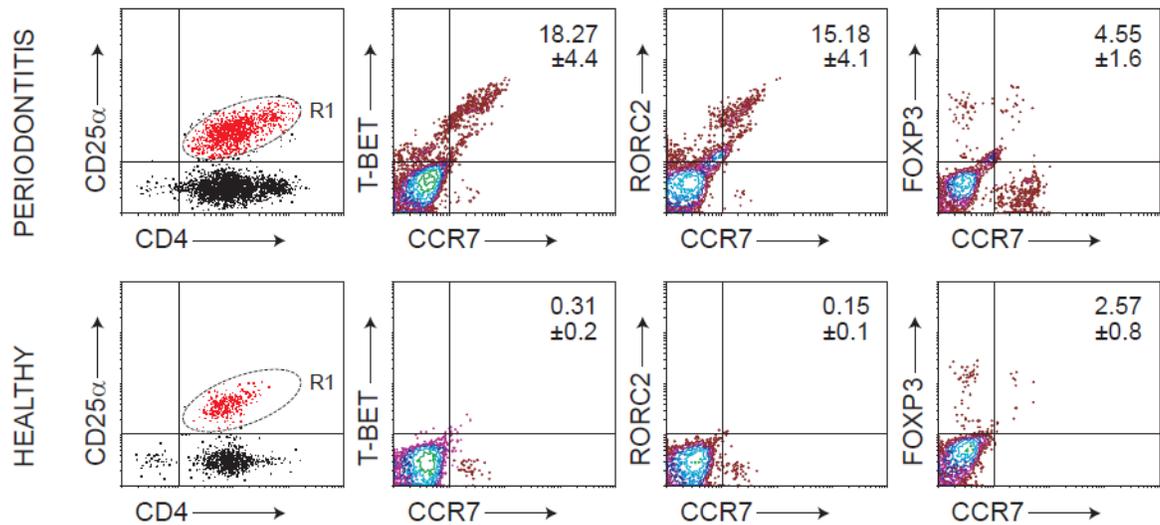


Figura 2. Expresión de CCR7 en linfocitos T CD4⁺ efectoros.

Dot plots representativos que indican la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ Th1 (T-bet⁺), Th17 (RORC2⁺) y Treg (Foxp3⁺) CCR7⁺ presentes en las biopsias gingivales de pacientes con periodontitis crónica (n=5) e individuos sanos (n=5). Se detectó una mayor frecuencia de linfocitos T CD4⁺ Th1, Th17 y Treg CCR7⁺ en las biopsias gingivales de pacientes con periodontitis crónica en comparación con las de sujetos sanos.

Tabla 4. Frecuencia de linfocitos T CD4⁺ efectores CCR7⁺.

Población	Periodontitis (% ± SD)	Sanos (% ± SD)	p-value
Th1 (CD25α⁺T-bet⁺CCR7⁺)†	18,27 ± 4,4	0,31 ± 0,2	0,028*
Th17 (CD25α⁺RORC2⁺CCR7⁺)	15,18 ± 4,1	0,05 ± 0,0	0,0012*
Treg (CD25α⁺Foxp3⁺CCR7⁺)	4,55 ± 1,6	2,57 ± 0,8	0,04*

* p<0,05; SD: Desviación estándar. † Los experimentos con T-bet tienen un n=2, los demás tienen un n=5.

Frecuencia de linfocitos T CD4⁺ *naïve* CCR7⁺

A partir de los linfocitos T CD4⁺ inactivos (R1), se cuantificó la frecuencia de linfocitos T *naïve* según la expresión del marcador CD45RA⁺, que además co-expresan el receptor de quimioquinas CCR7 (R2) (**Figura 3 y Tabla 5**). En las biopsias de pacientes con periodontitis crónica, la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺ fue significativamente mayor en comparación con las biopsias de sujetos sanos.

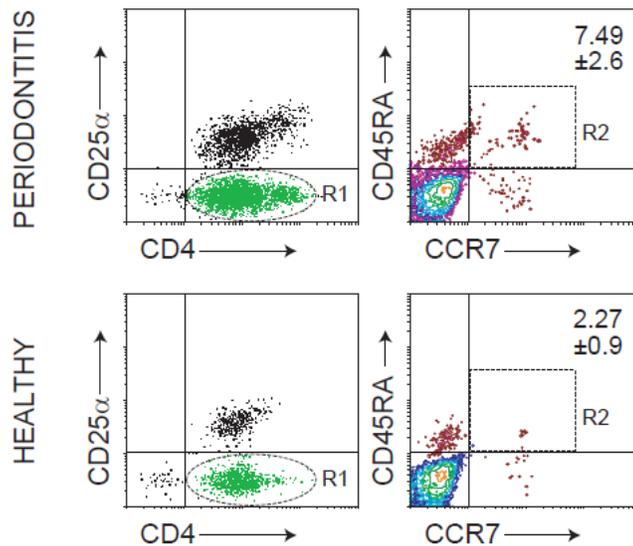


Figura 3. Expresión de CCR7 en linfocitos T CD4⁺ *naïve*.

Análisis mediante citometría de flujo de la frecuencia linfocitos T CD4⁺ *naïve* (CD45RA⁺) que expresan CCR7 a partir de la población inactiva de linfocitos T *helper* (R1). Gráfico de *dot plot* representativo de 10 muestras biológicas de pacientes con periodontitis crónica (n=5) e individuos sanos (n=5).

Se detectó una mayor frecuencia de linfocitos T *naïve* CCR7⁺ en los tejidos gingivales de pacientes con periodontitis en comparación con sujetos sanos.

Tabla 5. Frecuencia de linfocitos T *naïve* CCR7⁺.

Población	Periodontitis (% ± SD)	Sanos (% ± SD)	p-value
T CD4 ⁺ <i>naïve</i> CD25 ^α CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	7,49 ± 2,6	2,27 ± 0,9	0,0084

*p<0,05; SD: Desviación estándar

Frecuencia de linfocitos T CD4⁺ de memoria CCR7⁺

A partir de los linfocitos T CD4⁺ activos e inactivos (R1) se determinó la frecuencia de linfocitos T de memoria según la expresión del marcador CD45RO⁺, y que co-expresan el receptor CCR7. **(Figura 4).**

En biopsias de pacientes con periodontitis crónica aumentó la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ de memoria CD45RO⁺CCR7⁺ totales, CD25α⁺ o CD25α⁻, en comparación con sujetos sanos. De la misma manera, en pacientes con periodontitis crónica se detectó un aumento en la frecuencia de linfocitos Th1, Th17 y Treg de memoria CCR7⁺ **(Tabla 6).**

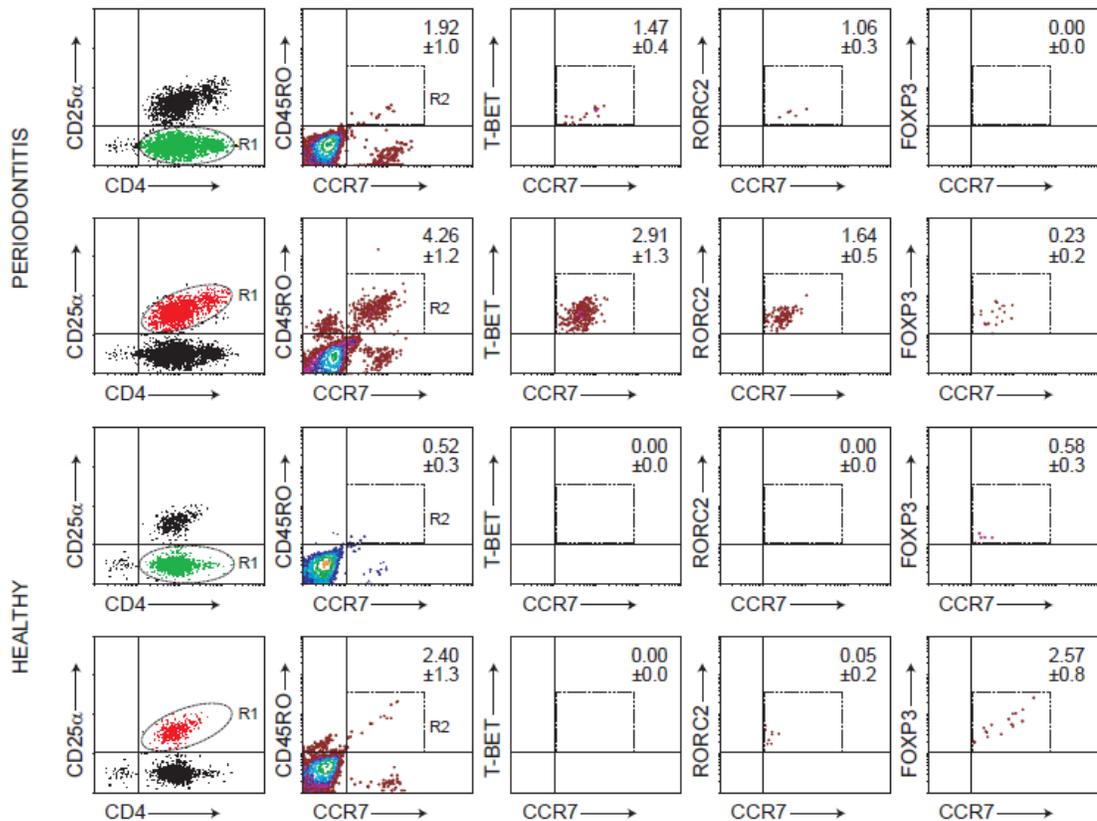


Figura 4. Frecuencia de linfocitos T CD4⁺ de memoria CCR7⁺

Dot plots representativos de la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ de memoria (CD45RO⁺) CCR7⁺ presentes en las biopsias gingivales de pacientes con periodontitis crónica (n=5) y sujetos sanos (n=5). Se detectó una mayor frecuencia de linfocitos T CD4⁺ de memoria (CD45RO⁺) CCR7⁺ en las biopsias gingivales de pacientes con periodontitis crónica en comparación con las de sujetos sanos.

Tabla 6. Frecuencia de linfocitos T de memoria CCR7⁺

Población	Periodontitis (% ± SD)	Sanos (% ± SD)	p-value
T CD4 ⁺ de memoria activos CD25 ^α ⁺ CD45RO ⁺ CCR7 ⁺	4,26 ± 1,2	2,40 ± 1,3	0,046*
T CD4 ⁺ de memoria inactivos CD25 ^α ⁻ CD45RO ⁺ CCR7 ⁺	1,92 ± 1,0	0,52 ± 0,3	0,032*
Th1 de memoria CD4 ⁺ CD25 ^α ⁺ CD45RO ⁺ CCR7 ⁺ T-bet ⁺ †	2,91 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0.08
Th17 de memoria CD4 ⁺ CD25 ^α ⁺ CD45RO ⁺ CCR7 ⁺ RORC2 ⁺	1,64 ± 0,5	0,05 ± 0,2	0.002*
Treg de memoria CD4 ⁺ CD25 ^α ⁺ CD45RO ⁺ CCR7 ⁺ Foxp3 ⁺	0,23 ± 0,02	2,57 ± 0,08	0.002*

* p<0,05; SD: Desviación estándar. Los experimentos con T-bet tienen un n=2, los demás un n=5

Detección de CD4 y CCR7 en biopsias gingivales

Se realizó la detección por inmuno-fluorescencia de CD4 y CCR7 en biopsias gingivales de pacientes con periodontitis y sujetos sanos (**Figura 5**). Las imágenes son representativas de 3 biopsias de pacientes con periodontitis y 2 de sujetos sanos.

Las células CD4⁺, definidas por la presencia de núcleo (marcados con Tropa3), se localizaron principalmente en el tejido conjuntivo sub-epitelial y en mayor frecuencia en biopsias gingivales de periodontitis. De la misma forma, CCR7 también se expresa en mayores niveles en periodontitis en comparación con biopsias de sujetos sanos.

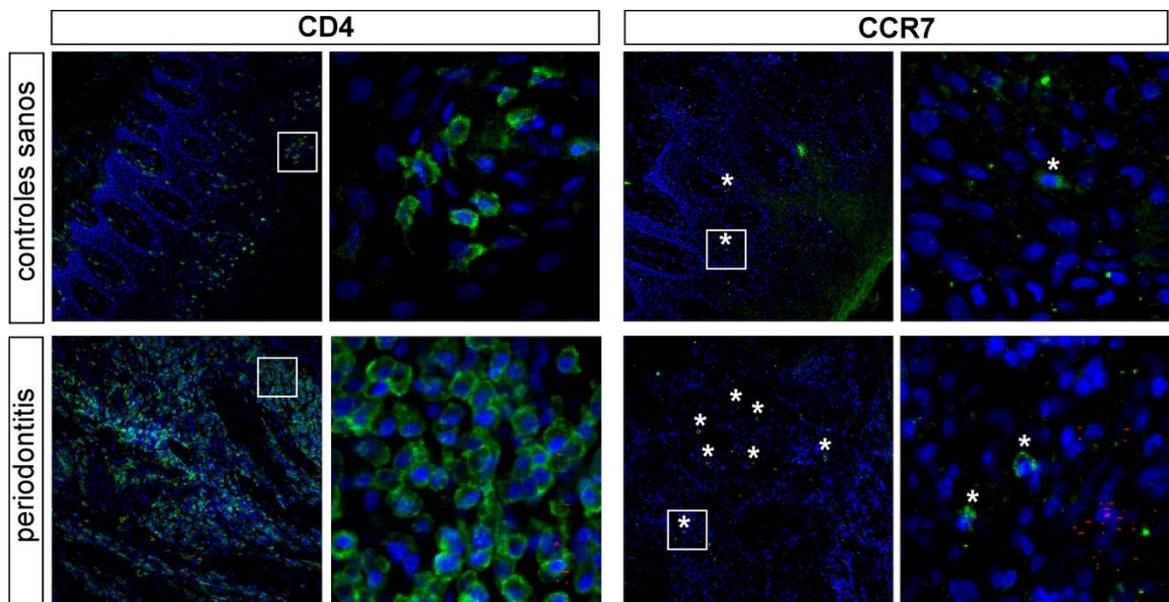


Figura 5. CD4 y CCR7 incrementan su expresión en periodontitis

Biopsias de pacientes con periodontitis y sujetos sanos. En el panel izquierdo se presentan células, definidas según la presencia de núcleo (azul), que expresaron el marcador CD4⁺ (verde). En el panel derecho se presentan células que expresaron CCR7 (verde) las cuales fueron representadas con un asterisco. En periodontitis se detectó un infiltrado enriquecido en células CD4⁺ (panel izquierdo) y mayor expresión de CCR7 (panel derecho).

8. DISCUSIÓN

Las periodontitis son un conjunto de patologías de naturaleza inflamatoria, en las cuales la formación de una bio-película patogénica sub-gingival es considerada factor etiológico primario. Así, las manifestaciones clínicas y la progresión de la enfermedad dependen de las características de la respuesta inmuno-inflamatoria inducida por el hospedero ante el desafío microbiano (Hajishengallis 2014). El infiltrado inflamatorio periodontal está enriquecido en linfocitos T CD4⁺, los cuales se diferencian en distintos fenotipos efectores. En particular, los fenotipos Th1 y Th17 ejercen funciones pro-inflamatorias y osteo-destructivas; en cambio, los Tregs desempeñan funciones supresoras (Hernández y cols., 2011; Silva y cols., 2015).

La migración diferencial de los distintos fenotipos de linfocitos T CD4⁺ depende de la expresión de receptores de quimioquinas (Garlet y cols. 2003). No obstante, la expresión y función de CCR7 en periodontitis debido no ha sido completamente dilucidado, en parte debido a que se le considera un receptor homeostático asociado a la migración constitutiva dirigida hacia órganos linfoides secundarios (Moschovakis y Förster, 2012). En el presente estudio detectamos mediante citometría de flujo la expresión preferencial del receptor CCR7 en distintos subtipos de linfocitos T CD4⁺ infiltrantes en biopsias gingivales de pacientes afectados de periodontitis crónica, en comparación con sujetos sanos.

En concordancia con estudios previos, en biopsias de pacientes con periodontitis detectamos mayor frecuencia de linfocitos T CD4⁺CD25^α⁺, indicativo de la activación linfocitaria y migración masiva hacia el sitio periodontal infectado (Meyle and Chapple 2015; Yucel-Lindberg and Båge 2013a). Además, detectamos que aquellos linfocitos efectores correspondían a los fenotipos Th1, Th17 y Treg, los cuales co-expresaban el receptor CCR7. La expresión de CCR7 da cuenta de la migración selectiva hacia los tejidos periodontales inflamados, mediada por sus ligandos CCL19 y CCL21 (Choi y cols. 2009).

Con el fin de determinar el grado de indiferenciación de los linfocitos T CD4⁺ presentes en el infiltrado inflamatorio periodontal, analizamos la frecuencia de linfocitos T *naïve* y de linfocitos T de memoria CCR7⁺. Ambos subtipos se consideran como propios de los órganos linfoides (Förster y cols., 2008), ya que el eje CCR7/CCL19/CCL21 regula la migración de las APCs hacia estos linfocitos para su activación y diferenciación (Förster y cols., 2008). El aumento en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ *naïve* y de memoria CCR7⁺ en periodontitis indica un cambio en el patrón migratorio de estas células hacia los tejidos periféricos. Esto sugiere que durante las periodontitis, al igual que en otras enfermedades inflamatorias crónicas como la ileítis crónica (McNamee y cols., 2013, 2015), artritis reumatoide (Jones y cols., 2016; Timmer y cols., 2007), el síndrome de Sjögren (Pitzalis y cols., 2014) y la diabetes autoinmune (Kendall y cols., 2018), se podría estar generando la retención y organización linfocitaria hacia agregados linfoides locales (TLE). De esta manera, se favorecería la activación y diferenciación *in situ* de células indiferenciadas y, por consiguiente, la promoción de una respuesta adaptativa local más eficiente y rápida.

Por otro lado, se ha propuesto que las células Th17 podrían participar en la formación del TLE, cumpliendo el rol de las células inductoras de tejido linfoide (LTi, del inglés: *lymphoid tissue inducers*) (Grogan y Ouyang 2012; Peters y cols., 2011). En concordancia, detectamos que los linfocitos Th17 CCR7⁺ aumentaron considerablemente su frecuencia en biopsias de individuos afectados de periodontitis, en comparación con los sujetos controles sanos. Diversos estudios han reportado una mayor infiltración de linfocitos Th17 en tejidos con periodontitis asociados a niveles elevados de IL-17 (Lester y cols., 2007; Ohyama y cols., 2009). La producción de IL-17 secundaria a la infección es crucial para la migración, expansión y reclutamiento de neutrófilos, suceso clave para el desarrollo de la respuesta inmune innata (Yu y cols., 2007). Sin embargo, su producción desregulada no sólo induce la secreción de citoquinas proinflamatorias, sino que también tiene un efecto osteoclastogénico a través del

aumento de RANKL (Vernal y cols., 2014; Yago y cols., 2009), contribuyendo a la resorción del hueso alveolar y confirmando su efecto deletéreo sobre los tejidos de soporte periodontal (Hienz y cols., 2015b; Miossec y Kolls, 2012; Sato y cols., 2006).

En resumen, nuestros resultados sugieren que CCR7, receptor de *homing* linfoide, se sobre-expresa en los tejidos gingivales de pacientes afectados de periodontitis en respuesta al estímulo generado por la inflamación crónica local. Los linfocitos T *naïve* CCR7⁺ son quimio-atraídos direccionalmente hacia los tejidos inflamados, lo que puede inducir su diferenciación periférica *in situ*. La detección de linfocitos T *naïve*, de memoria y Th17 CCR7⁺ durante las periodontitis podría significar una nueva organización funcional del infiltrado inflamatorio.

Se ha planteado que el desarrollo de TLE surge como una estrategia para evitar la diseminación de microorganismos patógenos, pero puede promover respuestas inmunes patológicas en un contexto inflamatorio. Una respuesta inmune iniciada y desarrollada localmente podría explicar, al menos en parte, la sitio especificidad de las periodontitis. Por esta razón, planteamos que CCR7 posee un potencial rol en la formación de TLE periodontal, lo cual perpetuaría una respuesta inmune desregulada y favorecería la cronicidad de la enfermedad, a pesar de la remoción mecánica exitosa de la bio-película patogénica sub-gingival.

En definitiva, se necesitan estudios adicionales que evalúen la expresión de otros receptores de quimioquinas homeostáticos asociados a la organización del TLE periodontal, con el fin de corroborar su formación y consecuencias clínicas. De esta manera sería posible racionalizar estrategias terapéuticas que apunten a la inhibición de la formación del TLE en las periodontitis.

10. CONCLUSIONES

1. La frecuencia de linfocitos T CD4⁺ totales y activos se incrementa en biopsias de pacientes con periodontitis crónica en comparación con sujetos sanos.
2. La frecuencia de linfocitos T CD4⁺ *naïve* y de memoria CCR7⁺ es mayor en biopsias gingivales de pacientes afectados de periodontitis crónica en comparación con sujetos sanos.
3. La frecuencia de linfocitos Th1, Th17 y Treg efectores y de memoria CCR7⁺ fue significativamente mayor en biopsias de pacientes afectados de periodontitis en comparación con los sujetos sanos.
4. La expresión de CD4 y CCR7 se localiza en el tejido conjuntivo sub-epitelial y es mayor en biopsias de pacientes afectados de periodontitis en comparación con sujetos sanos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abusleme, L et al. 2013. "The Subgingival Microbiome in Health and Periodontitis and Its Relationship with Community Biomass and Inflammation." *Isme J* 7(5): 1016–25.
- Aloisi, Francesca, and Ricardo Pujol-Borrell. 2006. "Lymphoid Neogenesis in Chronic Inflammatory Diseases." *Nature reviews. Immunology* 6(3): 205–17.
- Arenas-Ramirez, Natalia, Janine Woytschak, and Onur Boyman. 2015. "Interleukin-2: Biology, Design and Application." *Trends in Immunology* 36(12): 763–77.
- Azuma, M. 2006. "Fundamental Mechanisms of Host Immune Responses to Infection." *Journal of Periodontal Research* 41(5): 361–73.
- Di Benedetto, Adriana, Isabella Gigante, Silvia Colucci, and Maria Grano. 2013. "Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss." *Clinical and Developmental Immunology* 2013: 1–7.
- Berard, Marion, and David F. Tough. 2002. "Qualitative Differences between Naïve and Memory T Cells." *Immunology* 106(2): 127–38.
- Bombardieri, Michele, Myles Lewis, and Costantino Pitzalis. 2017. "Ectopic Lymphoid Neogenesis in Rheumatic Autoimmune Diseases." *Nature Reviews Rheumatology* 13(3): 141–54.
- Boyman, Onur, and Jonathan Sprent. 2012. "The Role of Interleukin-2 during Homeostasis and Activation of the Immune System." *Nature Reviews Immunology* 12(March).
- Bozec, Aline, and Mario M. Zaiss. 2017. "T Regulatory Cells in Bone Remodelling." *Current Osteoporosis Reports* 15(3): 121–25.

- Bromley, Shannon K, Thorsten R Mempel, and Andrew D Luster. 2008. "Orchestrating the Orchestrators: Chemokines in Control of T Cell Traffic." *Nature immunology* 9(9): 970–80.
- Bromley, Shannon K, Seddon Y Thomas, and Andrew D Luster. 2005. "Chemokine Receptor CCR7 Guides T Cell Exit from Peripheral Tissues and Entry into Afferent Lymphatics." *Nature immunology* 6(9): 895–901.
- Carlson, Robert V., Kenneth M. Boyd, and David J. Webb. 2004. "The Revision of the Declaration of Helsinki: Past, Present and Future." *British Journal of Clinical Pharmacology* 57(6): 695–713.
- Carragher, Damian M., Javier Rangel-Moreno, and Troy D. Randall. 2008. "Ectopic Lymphoid Tissues and Local Immunity." *Seminars in Immunology* 20(1): 26–42.
- Chang, Veronica T et al. 2016. "Initiation of T Cell Signaling by CD45 Segregation at 'Close Contacts.'" *Nature Immunology* 17(5): 574–82.
- Choi, Byung-II et al. 2009. "Lymph Nodes and Peyer's Patches CCR7-Dependent Naive T Cell Trafficking to CXC Chemokine Ligand 12 Promotes CXC Chemokine Ligand 12 Promotes CCR7-Dependent Naive T Cell Trafficking to Lymph Nodes and Peyer's Patches." *J Immunol References* 182: 1287–95.
- Cutler, Christopher W, and Yen-Tung A Teng. 2007. "Oral Mucosa Dendritic Cells and Periodontitis: Many Side of The Same Coin with New Twists." *Periodontol 2000* 45(144): 35–50.
- Cyster, Jason G. 2003. "Lymphoid Organ Development and Cell Migration." *Immunological reviews* 195: 5–14.
- Darveau, Richard P. 2010. "Periodontitis: A Polymicrobial Disruption of Host Homeostasis." *Nature reviews. Microbiology* 8(7): 481–90.

- Dieu-Nosjean, Marie Caroline et al. 2014. "Tertiary Lymphoid Structures in Cancer and beyond." *Trends in Immunology* 35(11): 571–80.
- Drayton, Danielle L, Shan Liao, Rawad H Mounzer, and Nancy H Ruddle. 2006. "Lymphoid Organ Development: From Ontogeny to Neogenesis." *Nature immunology* 7(4): 344–53.
- Driesen, Julia, Alexey Popov, and Joachim L. Schultze. 2008. "CD25 as an Immune Regulatory Molecule Expressed on Myeloid Dendritic Cells." *Immunobiology* 213(9–10): 849–58.
- Dutzan, N, J E Konkel, T Greenwell-Wild, and N M Moutsopoulos. 2016. "Characterization of the Human Immune Cell Network at the Gingival Barrier." *Mucosal Immunology* 9(5): 1163–72.
- Dutzan, Nicolas et al. 2009. "Levels of Interferon-Gamma and Transcription Factor T-Bet in Progressive Periodontal Lesions in Patients with Chronic Periodontitis." *The Journal of periodontology* 80(2): 290–96.
- Dutzan, Nicolás et al. 2012. "Interleukin-21 Expression and Its Association With Proinflammatory Cytokines in Untreated Chronic Periodontitis Patients." *Journal of Periodontology* 83(7): 948–54.
- Ferreira, M. C. et al. 2017. "Impact of Periodontal Disease on Quality of Life: A Systematic Review." *Journal of Periodontal Research* 52(4): 651–65.
- Ford, Pauline J., Jorge Gamonal, and Gregory J. Seymour. 2010. "Immunological Differences and Similarities between Chronic Periodontitis and Aggressive Periodontitis." *Periodontology 2000* 53(1): 111–23.
- Förster, Reinhold, Ana Clara Davalos-Misslitz, and Antal Rot. 2008. "CCR7 and Its Ligands: Balancing Immunity and Tolerance." *Nature reviews. Immunology* 8(5): 362–71.

- Gaffen, S L, and G Hajishengallis. 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(9): 817–28.
- Garlet, Gustavo Pompermaier et al. 2003. "Patterns of Chemokines and Chemokine Receptors Expression in Different Forms of Human Periodontal Disease." *Journal of periodontal research* 38(2): 210–17.
- Gretz, J Elizabeth, Arthur O Anderson, and Stephen Shaw. 1997. "Cords, Channels, Corridors and Conduits: Critical Architectural Elements Facilitating Cell Interactions in the Lymph Node Cortex." *Immunological reviews* 156: 11–24.
- Grogan, Jane L., and Wenjun Ouyang. 2012. "A Role for Th17 Cells in the Regulation of Tertiary Lymphoid Follicles." *European Journal of Immunology* 42(9): 2255–62.
- Hajishengallis, G, and R J Lamont. 2012. "Beyond the Red Complex and into More Complexity: The Polymicrobial Synergy and Dysbiosis (PSD) Model of Periodontal Disease Etiology." *Molecular Oral Microbiology* 27(6): 409–19.
- Hajishengallis, George. 2014. "Periodontitis: From Microbial Immune Subversion to Systemic Inflammation." *Nature Reviews Immunology* 15(1): 30–44.
- Hajishengallis, George, and Jonathan M. Korostoff. 2017. "Revisiting the Page & Schroeder Model: The Good, the Bad and the Unknowns in the Periodontal Host Response 40 Years Later." *Periodontology 2000* 75(1): 116–51.
- Han, Y.W., and X. Wang. 2013. "Mobile Microbiome." *Journal of Dental Research* 92(6): 485–91.
- Harvey, John D. 2017. "Periodontal Microbiology." *Dental Clinics of North America*

61(2): 253–69.

Hellmann, Jason et al. 2016. “CCR7 Maintains Nonresolving Lymph Node and Adipose Inflammation in Obesity.” *Diabetes* 65(8): 2268–81.

Hernández, M et al. 2011. “Host-Pathogen Interactions in Progressive Chronic Periodontitis.” *Journal of dental research* 90(10): 1164–70.

Hienz, Stefan A., Sweta Paliwal, and Saso Ivanovski. 2015a. “Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis.” *Journal of Immunology Research* 2015.

Highfield, J. 2009. “Diagnosis and Classification of Periodontal Disease.” *Australian Dental Journal* 54: S11–26.

Höpken, Uta E. et al. 2007. “CCR7 Deficiency Causes Ectopic Lymphoid Neogenesis and Disturbed Mucosal Tissue Integrity.” *Blood* 109(3): 886–95.

Jacob, Shaju. 2012. “Global Prevalence of Periodontitis: A Literature Review.” *International Arab Journal of Dentistry* 3(1): 26–30.

Jing, Feifeng, and Eun Young Choi. 2016. “Potential of Cells and Cytokines / Chemokines to Regulate Tertiary Lymphoid Structures in Human Diseases.” *Immune Network* 16(5): 271–80.

Jones, Gareth Wyn, David G. Hill, and Simon A. Jones. 2016. “Understanding Immune Cells in Tertiary Lymphoid Organ Development: It Is All Starting to Come Together.” *Frontiers in Immunology* 7(December).

Kendall, Peggy L et al. 2018. “Selection of B Lymphocytes in Autoimmune Diabetes 1.”

Khan, Shariq A., Eric F. Kong, Timothy F. Meiller, and Mary Ann Jabra-Rizk. 2015. “Periodontal Diseases: Bug Induced, Host Promoted.” *PLoS Pathogens* 11(7): 1–8.

- Kodati, Shilpa et al. 2014. "CCR7 Is Critical for the Induction and Maintenance of Th17 Immunity in Dry Eye Disease." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 55(9): 5871–77.
- Kuwabara, T. et al. 2009. "CCR 7 Ligands Are Required for Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through Generating IL-23-Dependent Th17 Cells." *The Journal of Immunology* 183(4): 2513–21.
- Lamont, Richard J., and George Hajishengallis. 2015. "Polymicrobial Synergy and Dysbiosis in Inflammatory Disease." *Trends in Molecular Medicine* 21(3): 172–83.
- Lester, S. Reid, Jennifer L. Bain, Roger B. Johnson, and Francis G. Serio. 2007. "Gingival Concentrations of Interleukin-23 and -17 at Healthy Sites and at Sites of Clinical Attachment Loss." *Journal of Periodontology* 78(8): 1545–50.
- Mackay, Charles R. 1999. "Immunology: Dual Personality of Memory T Cells." *Nature* 401(October): 659–60.
- Mahnke, Yolanda D. et al. 2013. "The Who's Who of T-Cell Differentiation: Human Memory T-Cell Subsets." *European Journal of Immunology* 43(11): 2797–2809.
- McNamee, Eóin N et al. 2013. "Ectopic Lymphoid Tissue Alters the Chemokine Gradient, Increases Lymphocyte Retention and Exacerbates Murine Ileitis." *Gut* 62(1): 53–62.
- McNamee, E, Masterson, J, M Veny et al. 2015. "Chemokine Receptor CCR7 Regulates the Intestinal TH1/TH17/Treg Balance during Crohn's-like Murine Ileitis." *Journal of leukocyte biology* 97(6): 1011–22.
- Meyle, J, and Iain L C Chapple. 2015. "Molecular Aspects of the Pathogenesis of Periodontitis." *Periodontology 2000* 69: 7–17.

- Miossec, Pierre, and Jay K. Kolls. 2012. "Targeting IL-17 and TH17 Cells in Chronic Inflammation." *Nature Reviews Drug Discovery* 11(10): 763–76.
- Mogensen, Trine H. 2009. "Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses." *Clinical Microbiology Reviews* 22(2): 240–73.
- Moschovakis, Georgios Leandros, and Reinhold Förster. 2012. "Multifaceted Activities of CCR7 Regulate T-Cell Homeostasis in Health and Disease." *European Journal of Immunology* 42(8): 1949–55.
- Neyt, Katrijn et al. 2012. "Tertiary Lymphoid Organs in Infection and Autoimmunity." *Trends in Immunology* 33(6): 297–305.
- Nishikawa, Shin-Ichi, Kenya Honda, Paul Vieira, and Hisahiro Yoshida. 2003. "Organogenesis of Peripheral Lymphoid Organs." *Immunological reviews* 195: 72–80.
- Noack, Mélissa, and Pierre Miossec. 2014. "Th17 and Regulatory T Cell Balance in Autoimmune and Inflammatory Diseases." *Autoimmunity Reviews* 13(6): 668–77.
- Ohyama, H. et al. 2009. "The Involvement of IL-23 and the Th 17 Pathway in Periodontitis." *Journal of Dental Research* 88(7): 633–38.
- Pavert, Serge A Van De, and Reina E Mebius. 2010. "New Insights into the Development of Lymphoid Tissues." *Nature Publishing Group* 10(9): 664–74.
- Peters, Anneli et al. 2011. "Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation." *Immunity* 35(6): 986–96.
- Pickens, Sarah R. et al. 2012. "Role of the CCL21 and CCR7 Pathways in Rheumatoid Arthritis Angiogenesis." *Arthritis and Rheumatism* 64(8): 2471–81.

- Pitzalis, Costantino, Gareth W Jones, Michele Bombardieri, and Simon A Jones. 2014. "Ectopic Lymphoid-like Structures in Infection, Cancer and Autoimmunity." *Nature reviews. Immunology* 14(7): 447–62.
- Rosier, Bob T et al. 2014. "Historical and Contemporary Hypotheses on the Development of Oral Diseases : Are We There yet ?" *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4(July): 1–11.
- Sallusto, Federica et al. 1999a. "Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions." *Nature* 401(6754): 708–12.
- Salvi, Giovanni E., and Niklaus P. Lang. 2005. "Host Response Modulation in the Management of Periodontal Diseases." *Journal of Clinical Periodontology* 32(SUPPL. 6): 108–29.
- Sato, Kojiro et al. 2006. "Th17 Functions as an Osteoclastogenic Helper T Cell Subset That Links T Cell Activation and Bone Destruction." *The Journal of Experimental Medicine* 203(12): 2673–82.
- Silva, Nora et al. 2015. "Host Response Mechanisms in Periodontal Diseases." *Journal of Applied Oral Science* 23(3): 329–55.
- SILVA, Nora et al. 2015. "Host Response Mechanisms in Periodontal Diseases." *Journal of Applied Oral Science* 23(3): 329–55.
- Timmer, T. C G et al. 2007. "Inflammation and Ectopic Lymphoid Structures in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissues Dissected by Genomics Technology: Identification of the Interleukin-7 Signaling Pathway in Tissues with Lymphoid Neogenesis." *Arthritis and Rheumatism* 56(8): 2492–2502.
- Vernal, Rolando et al. 2014. "Activation of RANKL-Induced Osteoclasts and Memory T Lymphocytes by Porphyromonas Gingivalis Is Serotype

Dependant.” *Journal of Clinical Periodontology* 41(5): 451–59.

Vernal, Rolando, and Jose a Garcia-Sanz. 2008. “Th17 and Treg Cells, Two New Lymphocyte Subpopulations with a Key Role in the Immune Response against Infection.” *Infectious disorders drug targets* 8(4): 207–20.

Wilensky, A. et al. 2014. “Dendritic Cells and Their Role in Periodontal Disease.” *Oral Diseases* 20(2): 119–26.

Yago, Toru et al. 2009. “IL-17 Induces Osteoclastogenesis from Human Monocytes Alone in the Absence of Osteoblasts, Which Is Potently Inhibited by Anti-TNF-?? Antibody: A Novel Mechanism of Osteoclastogenesis by IL-17.” *Journal of Cellular Biochemistry* 108(4): 947–55.

Yu, Jeffrey J, Matthew J Ruddy, and Sarah L Gaffen. 2007. “An Essential Role for IL - 17 in Preventing Pathogen - Initiated Bone Destruction : Recruitment of Neutrophils to Inflamed Bone Requires IL - 17 Receptor – Dependent Signals.” *Blood* 109(9): 1–16.

Yucel-Lindberg, Tülay, and Tove Båge. 2013a. “Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Periodontitis.” *Expert Reviews in Molecular Medicine* 15(August): e7.

12. ANEXOS

ANEXO 1: Ficha clínica



CLÍNICA DOCENTE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNIVERSIDAD DE CHILE
FICHA CLÍNICA

NOMBRE EXAMINADOR _____ FECHA _____

NOMBRE PACIENTE _____ EDAD _____

TELÉFONO _____ DIRECCIÓN _____

RUT _____ GÉNERO _____

MOTIVO DE CONSULTA _____

ANAMNESIS _____

DIAGNÓSTICO _____

PERIODONTOGRAMA

PERIODONTOGRAMA

Etapas de Tratamiento: Pretratamiento Reevaluación Posttratamiento Fecha de Examen _____

				NIC-BS PS-PL MG
FRENTE				
DENTURA				
DERECHA				MG PS-PL NIC-BS
				NIC-BS PS-PL MG
IZQUIERDA				MG PS-PL NIC-BS
				NIC-BS PS-PL MG

ANEXO 2: Consentimiento Informado

Página 1/4

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

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

Objetivo de la investigación:

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

Personas estudiadas:

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

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

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

Examen clínico y toma de la muestra:

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

