



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

**Detección de quimioquinas homeostáticas, sus receptores e
interleuquina-7 en periodontitis crónica**

Paula Andrea Yáñez Del Río

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 1140904
Santiago – Chile
2018**



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

**Detección de quimioquinas homeostáticas, sus receptores e
interleuquina-7 en periodontitis crónica**

Paula Andrea Yáñez Del Río

**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 1140904
Santiago – Chile
2018**

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos los que me han acompañado en este largo camino.

A mi familia, especialmente a mi abuela Wandi, quien ha sido pilar fundamental en mi vida, junto a mis tías Soledad y Claudia. Gracias a mi mamá Alejandra por estar siempre a mi lado, luchando conmigo para conseguir salir adelante en todos nuestros propósitos.

A todos y cada uno de mis amigos, quienes me han acompañado en el trayecto de manera incondicional, y a Gonzalo, por su amor y completo apoyo ante los obstáculos que se presentaron.

A mis tutores, Dr. Rolando Vernal y Dra. Carla Álvarez, por la infinita paciencia y enseñanzas que me entregaron para desarrollarme en el ámbito científico.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
Formación del infiltrado inflamatorio periodontal.....	7
Quimioquinas homeostáticas y sus receptores.....	8
Rol patológico de las quimioquinas homeostáticas, sus receptores e interleuquina-7	9
Planteamiento del problema.....	12
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVO GENERAL:	13
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
6. METODOLOGÍA.....	14
Selección de los individuos	14
Purificación de RNA citoplasmático total.....	15
Cuantificación de quimioquinas, receptores de quimioquinas e IL-7	15
Homogenización de tejido	16
Western Blot.....	17
Obtención y procesamiento del fluido gingival crevicular.....	17
Cuantificación de CCL19, CCL21 y CXCL12	18
Análisis de los datos.....	18
7. RESULTADOS.....	19
Expresión de las quimioquinas homeostáticas, sus receptores e IL-7.....	19
Inmunodetección de CCR7	20
Producción de CCL19, CCL21 y CXCL12 en fluido gingival crevicular	20
8. DISCUSIÓN	22
9. CONCLUSIONES.....	26
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
11. ANEXO	35

1. RESUMEN

Las enfermedades periodontales son un conjunto de patologías de etiología infecciosa y naturaleza inflamatoria que incluyen las gingivitis y periodontitis. Durante las periodontitis, si bien las bacterias que colonizan la bio-película subgingival pueden generar un daño directo al periodonto, es su interacción con el hospedero lo que provoca la formación del infiltrado inmuno-inflamatorio que lleva a la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes y eventualmente a la pérdida de ellos. Durante la constitución de este infiltrado inmuno-inflamatorio, los linfocitos T migran desde los linfonodos hacia los tejidos periodontales siguiendo la señalización de quimioquinas inflamatorias, las que aumentan localmente durante las periodontitis. En la última década, las quimioquinas homeostáticas han sido el foco de investigación de la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas, tal como la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren, en las cuales participarían en la formación de estructuras linfoides ectópicas. La presencia de quimioquinas y citoquinas homeostáticas en estas agrupaciones linfoides lleva al incremento en la migración de células indiferenciadas hacia los tejidos inflamados, favoreciendo la presentación antigénica y diferenciación linfocitaria *in situ*, perpetuándose el proceso inflamatorio. En este trabajo de investigación se analizó la expresión de varias quimioquinas homeostáticas y sus receptores durante la periodontitis crónica. A partir de biopsias obtenidas de pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos, se cuantificó mediante RT-qPCR la expresión de los mRNA de las quimioquinas CXCL12, CXCL13, CCL19 y CCL21, de los receptores CCR7, CXCR4 y CXCR5, y de la citoquina IL-7. Además, se cuantificó la secreción de CCL19, CCL21 y CXCL12 en el fluido gingival crevicular mediante ELISA. Finalmente, la expresión de CCR7 fue analizada usando Western Blot en homogeneizados tisulares. En las lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica se expresaron mayores niveles de CCL19, CCL21, CXCL12, CCR7, CXCR4 y CXCR5 en comparación a los tejidos periodontales de individuos sanos, lo que contribuiría a explicar, al menos en parte, la cronicidad y sitio-especificidad de las periodontitis.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales inducidas por placa bacteriana, gingivitis y periodontitis, son un conjunto de patologías inflamatorias de alta prevalencia en la población mundial (Hajishengallis y Korostoff 2017). Las periodontitis se caracterizan por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes y se detectan clínicamente identificando y midiendo la formación de sacos periodontales (Geurs y cols., 2015). Si bien las periodontitis son patologías de etiología compleja, existe consenso en que su principal causa es la formación de una bio-película patogénica sub-gingival (Sanz y cols., 2017).

Recientemente, se ha propuesto un nuevo modelo etiológico de las periodontitis llamado Sinergia Polimicrobiana y Disbiosis (PSD, del inglés *Polymicrobial Sinergy and Dysbiosis*) (Hajishengallis y Lamont 2012). En este modelo, la enfermedad se genera por el cambio en las interacciones ecológicas entre los microorganismos comensales y las bacterias patogénicas anaerobias Gram negativas que colonizan la bio-película sub-gingival (Potempa y cols., 2017). El desbalance ecológico, o disbiosis, incrementa la patogenicidad de la bio-película, cuyos componentes microbianos interactúan con el sistema inmune del hospedero e inducen la formación de un infiltrado inmuno-inflamatorio en los tejidos infectados (Lamont y Hajishengallis 2016). La cronicidad de esta respuesta lleva a la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes (cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar), que en casos severos puede resultar en movilidad y pérdida dentaria (Hajishengallis 2016; Hajishengallis y Korostoff 2017).

Numerosos estudios histopatológicos han descrito el cambio en la constitución del infiltrado inflamatorio a medida que incrementa la severidad y cronicidad de las enfermedades periodontales (Hajishengallis y Korostoff 2017). Sobre la base de esos estudios, Page y Schroeder describieron cuatro escenarios histopatológicos en la transición de salud-enfermedad, denominadas: lesión inicial, temprana, establecida y avanzada (Page y Schroeder 1976). En la lesión avanzada, clínicamente diagnosticada como periodontitis, predomina la presencia de linfocitos T y B, la migración hacia apical del epitelio de unión, la destrucción de colágeno de la inserción periodontal y la reabsorción del hueso alveolar (Hajishengallis y

Korostoff 2017).

Formación del infiltrado inflamatorio periodontal

Durante las periodontitis, el infiltrado inflamatorio periodontal está compuesto principalmente por macrófagos y linfocitos T y B (Gamonal y cols., 2001). En particular, las lesiones periodontales con activa destrucción tisular están enriquecidas en linfocitos T CD4⁺, los cuales expresan un perfil de citoquinas pro-inflamatorio y osteolítico (Hernández y cols., 2011). Estos linfocitos migran desde los linfonodos regionales que drenan al territorio periodontal hacia los tejidos periodontales inflamados, mediante un proceso denominado tráfico o *homing* celular (Ley y cols., 2007).

Este tráfico celular ha sido dividido en distintas fases, las principales son: el rodamiento celular en las vénulas del endotelio alto (HEVs, del inglés *high endothelial venules*), la activación celular, la adhesión celular a las HEVs, la extravasación y la trans migración celular. Las últimas fases migratorias dependen de la señalización de quimioquinas, mediada por sus receptores específicos expresados en la superficie de las células (Ley y cols., 2007). Así, los linfocitos T CD4⁺ sólo pueden migrar si son capaces de reconocer la gradiente de quimioquinas intra-tisular expresando sus receptores específicos (Ebert y cols., 2005).

Durante las periodontitis, las quimioquinas juegan un papel importante en el tráfico de células inmunes hacia las lesiones periodontales y, por tanto, determinan la formación del infiltrado inmuno-inflamatorio. Estas quimioquinas son producidas por una variedad de tipos celulares que residen o infiltran los tejidos periodontales, tal como: fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales, queratinocitos, mastocitos, neutrófilos, linfocitos T y monocitos/macrófagos (Sahingur y cols., 2015). Algunas quimioquinas descritas como incrementadas durante las periodontitis son: CXCL8 (IL-8), quimioquina inflamatoria cuya principal función es la quimio-atracción de neutrófilos (Ertugrul y cols., 2013), y CXCL10, CCL5 y CCL2, quimio-atrayentes de células pro-inflamatorias, como los linfocitos T CD4⁺ del fenotipo Th1 (Silva y cols., 2007; Stadler y cols., 2016). Además, estudios *in vitro* han documentado que las

bacterias periodonto-patógenas pueden inducir directamente la expresión de un patrón de quimioquinas pro-inflamatorio en las células inmunes (Alvarez y cols., 2015).

Quimioquinas homeostáticas y sus receptores

Funcionalmente, las quimioquinas se clasifican en homeostáticas o inflamatorias (Cekici y cols., 2015). Las quimioquinas inflamatorias son producidas durante condiciones patológicas por las células residentes tisulares y por diversas células inmunes infiltrantes (López-Cotarelo y cols., 2017). Estas quimioquinas reclutan leucocitos efectores que promueven el establecimiento de la respuesta inmuno-inflamatoria durante infección, el daño tisular o el cáncer (Moser y cols., 2004). Al contrario, las quimioquinas homeostáticas son producidas constitutivamente, ya que controlan la migración de células presentadoras de antígenos y linfocitos T indiferenciados, o *naïve*, hacia los órganos linfoides secundarios (Ebert y cols., 2005). Además, participan en la linfo-organogénesis embrionaria, así como en la formación de estructuras linfoides terciarias (ELTs).

Las ELTs, también llamadas tejido linfoide ectópico o estructuras linfoides ectópicas, son agrupaciones linfoides que se forman durante condiciones patológicas en los tejidos periféricos (Bombardieri y cols., 2017). Su organización histológica es variable, desde un acúmulo celular focalizado compuesto de linfocitos T y B hasta folículos altamente organizados (Pitzalis y cols., 2014); con presencia de estructuras como las HEVs y vías linfáticas que permiten la entrada de células presentadoras de antígenos (Jing y cols., 2016). La estructura y organización celular de las ELTs es muy similar a la de los órganos linfoides secundarios, así como las vías de señalización que participan en su formación. Algunas características fundamentales son la producción de interleuquina (IL)-7, de quimioquinas homeostáticas como CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13 y sus receptores específicos, los que en conjunto con las citoquinas pro-inflamatorias inducen la migración celular y la posterior organización de las ELTs (Jones y cols., 2016a).

Las ELTs se han descrito en distintas enfermedades inflamatorias crónicas, como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus, la miastenia gravis, las enfermedades inflamatorias intestinales y el síndrome de Sjögren (Shipman y cols., 2017). El contexto común a todas estas patologías es la inflamación crónica persistente y la expresión aumentada de quimioquinas homeostáticas (Jones y cols., 2016a). Por ejemplo, en los biopsias articulares de pacientes con artritis reumatoide, están incrementados los niveles de mRNA de las quimioquinas homeostáticas CXCL12, CXCL13, CCL19 y CCL21, y de sus receptores específicos CXCR4, CXCR5 y CCR7 (Timmer y cols., 2007). La presencia de estas quimioquinas y la detección histológica de las ELTs se ha asociado a formas más severas de la patología, con una pobre respuesta al tratamiento anti-inflamatorio (Timmer y cols., 2007). No obstante, hasta el momento no se ha estudiado la presencia ni el rol de las quimioquinas homeostáticas durante las periodontitis.

Rol patológico de las quimioquinas homeostáticas, sus receptores e IL-7

CCL19 y CCL21 son dos quimioquinas homeostáticas fundamentales para la migración de los linfocitos a través de los vasos sanguíneos hacia los órganos linfoides secundarios y las ELTs. El receptor de ambas quimioquinas es CCR7, el cual es expresado por los linfocitos T *naïve* y de memoria (Tabla 1) (Bai y cols., 2009; Ebert y cols., 2005; Hauser y Legler 2016). CCL21 promueve la inflamación al favorecer la adhesión integrina-dependiente de los linfocitos T *naïve* a los vasos sanguíneos y su posterior extravasación (Jing y cols., 2016). CCL19 contribuye a la localización de los linfocitos T *naïve* junto a células dendríticas para favorecer la presentación antigénica (Ebert y cols., 2005). En este contexto, la bacteria periodonto-patógena *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induce la expresión de CCL21 y CCR7 en linfocitos T estimulados *in vitro*, no obstante los efectos clínicos de esta asociación aún deben ser estudiados (Alvarez y cols., 2015).

Tabla 1. Quimioquinas involucradas en la migración de linfocitos T *naïve* (Adaptado de: Ebert y cols., 2005; Hauser y Legler 2016; López-Cotarelo y cols., 2017).

Quimioquina	Receptor	Función
CCL19 CCL21	CCR7	CCL19 y CCL21 son producidos en los órganos linfoides secundarios y ELTs CCR7 se expresa en linfocitos T <i>naïve</i> , T de memoria, linfocitos T reguladores, linfocitos B <i>naïve</i> y NK
CXCL12	CXCR4	CXCL12 es expresado por células endoteliales, queratinocitos y células dendríticas CXCR4 presente en mayoría de los leucocitos innatos y adaptativos
CXCL13	CXCR5	CXCL13 es producido en la zona B de órganos linfoides secundarios CXCR5 expresado por la mayoría de T CD4 ⁺ (efectores y de memoria), linfocitos B y T reguladores foliculares

CXCL12 y su receptor CXCR4 inducen la extravasación de linfocitos T y B hacia los linfonodos. Además, aumentan la sensibilidad de linfocitos T activados a la señalización vía CCR7, promoviendo su adhesión a las HEVs y la subsecuente quimiotaxis, incluso a concentraciones sub-óptimas de CCL19 y CCL21 (Bai y cols., 2009). Durante la periodontitis, los niveles de CXCL12 están incrementados en el fluido gingival crevicular, hallazgo que se ha asociado a la migración de neutrófilos (Havens y cols., 2009). No obstante, la participación de CXCL12 en la migración de los linfocitos T durante la periodontitis crónica aún no ha sido dilucidada.

La quimioquina CXCL13 y su receptor CXCR5 también actúan de manera sinérgica con los ligandos de CCR7, especialmente con CCL21 (Bai y cols., 2009). Una vez que los linfocitos T CD4⁺ han contactado al antígeno, la expresión de CXCR5 facilita su migración hacia los folículos donde se encuentra presente CXCL13, por tanto, CXCR5 promueve la migración de los linfocitos a la zona B folicular antes de que estos adquieran un fenotipo efector. Adicionalmente, este receptor puede auxiliar a los linfocitos B en la producción de inmunoglobulinas (Ebert y cols., 2005). Durante la periodontitis, CXCL13 se sobre-expresa y el número de células CXCL13⁺ es significativamente mayor en los tejidos conectivos

subyacentes al saco periodontal de pacientes afectados de periodontitis que en pacientes con gingivitis (Nakajima y cols., 2008). Además, en algunos pacientes con periodontitis se observó la acumulación de células dendríticas foliculares en las áreas enriquecidas con linfocitos B (Nakajima y cols., 2008).

La IL-7 es una citoquina producida por las células estromales epiteliales del timo, médula ósea y bazo, así como por queratinocitos, células endoteliales, hepatocitos, monocitos, linfocitos B y células dendríticas foliculares (Bikker y cols., 2012). En los órganos linfoides, IL-7 se expresa constitutivamente, independiente de estímulos externos (Surh y cols., 2008). Su receptor IL-7R α se expresa en la membrana de linfocitos B inmaduros y linfocitos T CD4⁺ (Bikker y cols., 2012). Su función principal es favorecer la generación de linfocitos B a partir de los precursores linfoides y promover la proliferación, supervivencia y maduración de linfocitos T *naïve* (Bikker y cols., 2012). IL-7 participa en la recuperación de linfocitos T cuando su cantidad está reducida, manteniendo el *pool* celular homeostático (Bikker y cols., 2012; Nguyen y cols., 2017).

Se ha reportado que el incremento en la expresión de IL-7 y su receptor se asocia a enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide (Bikker y cols., 2012). En esta última patología, se ha demostrado una elevada expresión de IL-7 en biopsias de tejido sinovial (Leistad y cols., 1998) y cartílago (Bikker y cols., 2012). IL-7 estimula la actividad de los fenotipos de linfocitos T CD4⁺, T helper (Th)1 y Th17, mediante la producción de interferón (IFN)- γ e IL-17A respectivamente (Bikker y cols., 2012). Específicamente en el desarrollo de las ELTs, IL-7 contribuye con CCL21 y otras moléculas involucradas en la formación de estas estructuras ectópicas (Bikker y cols., 2012). Su expresión aumenta la supervivencia de linfocitos T y promueve la proliferación de células inductoras de tejido linfóide (LTi), involucradas en la linfo-organogénesis durante condiciones inflamatorias crónicas (Jing y Choi 2016; Meier y cols., 2007). No obstante, hasta el momento estos efectos de IL-7 aún no han sido analizados durante las periodontitis.

Planteamiento del problema

La migración leucocitaria es un proceso clave para la formación del infiltrado inflamatorio durante las periodontitis. Durante este proceso, la producción local de quimioquinas es determinante en la migración direccional de células inmunes que promueven y perpetúan la inflamación periodontal.

Si bien diversas quimioquinas inflamatorias han sido estudiadas durante las periodontitis, las quimioquinas homeostáticas han sido poco exploradas debido a que no se les consideraba patogénicas, al asociarse a mecanismos migratorios constitutivos de órganos linfoides primarios y secundarios. No obstante, la evidencia reciente ha demostrado que en distintas patologías inflamatorias, como la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren, las quimioquinas homeostáticas inducen la migración de células indiferenciadas hacia los tejidos inflamados, lo que se asocia a formas más severas de enfermedad. Las zonas enriquecidas en células indiferenciadas conforman una estructura linfoide ectópica, la cual sólo se organiza en condiciones patológicas.

En este estudio, analizamos la presencia de las quimioquinas homeostáticas CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13, sus receptores específicos CCR7, CXCR4 y CXCR5, y la citoquina IL-7 en pacientes afectados de periodontitis crónica e individuos sanos. La presencia de quimioquinas homeostáticas e IL-7 en el sitio local de inflamación nos permitiría especular la formación de un gradiente de concentración de quimioquinas que induzca la migración de linfocitos T *naïve* hacia el sitio periodontal. Este proceso implicaría la presentación antigénica y diferenciación celular de los linfocitos T CD4⁺ *in situ*, lo que podría contribuir a la sitio-especificidad y cronicidad de la periodontitis, además de acelerar la recidiva o recurrencia inflamatoria post-tratamiento periodontal.

3. HIPÓTESIS

Mayores niveles de las quimioquinas homeostáticas CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13, sus receptores CCR7, CXCR4 y CXCR5, y la citoquina IL-7 se detectan en las lesiones periodontales de los pacientes afectados de periodontitis crónica, en comparación a los tejidos periodontales de individuos sanos.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de las quimioquinas homeostáticas CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13, sus receptores CCR7, CXCR4 y CXCR5, y la citoquina IL-7 en los tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica e individuos sanos.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Cuantificar los niveles de expresión de los mRNA de las quimioquinas homeostáticas CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13, los receptores CCR7, CXCR4 y CXCR5, y la citoquina IL-7 en los tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica e individuos sanos, mediante RT-qPCR.
- II. Cuantificar los niveles proteicos de CCL19, CCL21 y CXCL12 en el fluido gingival crevicular obtenido de pacientes afectados de periodontitis crónica e individuos sanos, mediante ELISA.
- III. Determinar la expresión de CCR7 en los tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis e individuos sanos, mediante Western Blot.

6. METODOLOGÍA

Selección de los individuos

Mediante el método no probabilístico de casos consecutivos, se seleccionaron 68 pacientes afectados de periodontitis crónica severa, con al menos un diente con pronóstico sin esperanza e indicación de exodoncia. El diagnóstico se determinó según los siguientes criterios clínicos: 1) Al menos 6 dientes con sitios periodontales con profundidad de sondaje (PS) ≥ 5 mm, 2) pérdida de nivel de inserción clínica (NIC) ≥ 3 mm, y 3) pérdida ósea radiográfica horizontal $\geq 30\%$ (Dutzan y cols., 2009). Además, se seleccionaron 16 individuos sin enfermedad periodontal que precisaran de una exodoncia por indicación ortodóntica o protésica sin enfermedad periodontal, de acuerdo a los siguientes parámetros clínicos: margen gingival ubicado en el límite amelo-cementario, PS entre 1-3 mm y ausencia de sangrado al sondaje u otros signos clínicos de inflamación (Highfield 2009).

Los individuos seleccionados no tenían enfermedades sistémicas distintas a la periodontitis ni recibieron tratamiento sobre la base de antibióticos y/o antiinflamatorios al menos en los 6 meses previos al estudio. El protocolo de investigación fue explicado a todos los participantes del estudio, los que firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética Institucional (Anexo 1).

Obtención y mantención de las muestras biológicas

En 11 pacientes con periodontitis crónica severa y 4 sujetos sanos, se obtuvieron biopsias gingivales de 1-2 mm³ bajo anestesia local troncular, las que inmediatamente se sumergieron en 1 mL de RNASafer[®] (Omega Biotek Inc., GA, EEUU) y se almacenaron a -80°C para la posterior purificación del RNA citoplasmático total y análisis mediante RT-qPCR. En 3 sujetos con periodontitis crónica severa y 3 sanos se obtuvieron biopsias para el análisis mediante Western Blot, las que se congelaron en seco a -80°C para realizar posteriormente el homogeneizado tisular.

Purificación de RNA citoplasmático total

Las biopsias se fragmentaron en trozos pequeños de $\sim 1\text{mm}^3$, se transfirieron a un homogeneizador manual de vidrio con 1 mL de reactivo Trizol (TRIzol[®] Plus; Invitrogen Corp., Barcelona, España) y se homogeneizaron hasta estar completamente disgregadas. Se agregó 200 μL de cloroformo y separaron las fases centrifugando a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. Luego, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y el RNA total se precipitó con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de glicógeno y 500 μL de isopropanol. Se centrifugó a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y re-suspendió el pellet en 1 mL de etanol 75% con el objeto de limpiar la muestra obtenida. En seguida, se agitó el tubo durante 3 segundos y centrifugó a 7.500 xg durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, el RNA citoplasmático total extraído se re-suspendió en 10 μL de agua milli-Q y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EEUU).

Cuantificación de quimioquinas, receptores de quimioquinas e IL-7

A partir de 1 μg de RNA, se sintetizó la primera cadena de cDNA utilizando un kit de transcripción reversa (SuperScrip[™] III; Invitrogen, Grand Island, NY, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión de mRNA para las quimioquinas CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13, sus receptores CCR7, CXCR4 y CXCR5, y la citoquina IL-7 se cuantificaron mediante RT-qPCR utilizando partidores específicos (Tabla 3). Para esto, 50 ng de cDNA fueron amplificados usando el kit KAPA[™] SYBR[®] Fast qPCR (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EEUU) y el equipo StepOnePlus[®] (Applied Biosystems, Singapur), siguiendo el siguiente protocolo: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos y 60°C por 30 segundos. Finalmente se realizó una curva de degradación del producto amplificado de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y 95°C por 15 segundos, para la detección de amplificación inespecífica. Se cuantificó la expresión de la subunidad 18S de rRNA como control endógeno para realizar la cuantificación relativa (Alvarez y cols., 2015).

Tabla 3. Partidores utilizados para la amplificación del mRNA de distintas quimioquinas, sus receptores e IL-7 mediante RT-qPCR (Alvarez y cols., 2015).

mRNA	Código Ensembl	Partidor 5'-3'	Partidor 3'-5'
IL-7	ENSG00000104432	tggcaatatagaaacacgaacttt	ttccactctgaaaaactgcataag
CCL19	ENSG00000172724	gcctgctggttctctggac	ggatgggttctgggtcac
CCL21	ENSG00000137077	caccctctaccacagacatgg	aggccagaaccaggataagg
CXCL12	ENSG00000107562	gccactattactgggactgtgc	ggagtcggggagagagtagg
CXCL13	ENSG00000156234	ggagtcggggagagagtagg	ctctgacaggctcaagtcc
CCR7	ENSG00000126353	ttggttaggggacaatagcc	ggctgataagctaaccagaca
CXCR4	ENSG00000121966	ggatataatgaagtcactatgggaaa	gggcacaagagaattaatgtagaat
CXCR5	ENSG00000160683	gcagttccacggagacctt	ggcaaagggcaagatgaag
18S	ENSG00000086189	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

Homogeneización de tejido

Las biopsias gingivales congeladas se utilizaron para determinar mediante Western Blot la expresión de CCR7. Para ello, las muestras biológicas se homogeneizaron con 300 µL de amortiguador de lisis constituido por Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 5 mM, y 0,01% de Triton X-100, suplementado con inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se realizó una centrifugación a 13.000 xg por 6 minutos a 4°C y se mantuvo el producto a -80°C para posteriormente cuantificar la cantidad total de proteínas utilizando un kit BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Rockford, EEUU) y realizar el análisis mediante Western Blot como fue previamente descrito (Cavalla y cols., 2013).

Western Blot

Para la detección de CCR7, 20 μ g de homogeneizado de tejido se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15%. El producto se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EEUU), las que se bloquearon con un suero bovino de albúmina al 3% en tampón salino tris base-Tween 20 al 0,1% (TBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente y, luego, se incubaron por 1 hora con un anticuerpo primario monoclonal anti-CCR7 humano (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) en una dilución 1:125. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T e incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EEUU). Previo lavado 3 veces con TBS-T, la detección de las bandas quimioluminiscentes se realizó con el kit ECL (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EEUU) usando el sistema Gel Logic Imaging (Carestream, Rochester, NY, EEUU) (Cavalla y cols., 2013).

Obtención y procesamiento del fluido gingival crevicular

Se recolectaron muestras de fluido gingival crevicular en 53 pacientes afectados de periodontitis crónica severa y 10 individuos sanos utilizando tiras de papel PerioPaper™ (OraFlow Inc., Smithtown, NY, EEUU). En los individuos sanos se obtuvieron las muestras de sitios periodontales con profundidad al sondaje menor a 3 mm, sin pérdida de inserción clínica periodontal ni sangrado gingival. En los pacientes con periodontitis, las muestras se recolectaron de sacos periodontales con PS \geq 5 mm, pérdida del NIC \geq 3 mm y pérdida ósea horizontal \geq 30%. Previo a la toma de muestras, se realizó una aislación relativa utilizando tómulas de algodón y leve secado con jeringa triple con orientación hacia apical. En cada sitio periodontal seleccionado se insertó la tira de papel hasta obtener la mínima resistencia tisular y se mantuvo en posición durante 30 segundos. El procedimiento se repitió con una segunda tira de papel. Las muestras contaminadas con sangre o saliva se descartaron. Inmediatamente, se realizó la elusión centrífuga de las muestras para obtener las proteínas totales. Para esto, las tiras de papel se incubaron con 60 μ L/tira de papel de NaCl al 0,9% suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free®; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) por

30 minutos a 4°C y centrifugaron a 12.000 xg por 5 minutos (Díaz-Zúñiga y cols., 2017).

Cuantificación de CCL19, CCL21 y CXCL12

A partir de las muestras de fluido gingival crevicular eluidas, se cuantificaron los niveles de CCL19, CCL21 y CXCL12 mediante un ensayo por inmuno-absorción ligada a enzima (ELISA) siguiendo los protocolos del fabricante (Quantikine, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EEUU). La cuantificación se determinó a 450 nm con una corrección a 540 nm en un espectrofotómetro automático (Synergy™ HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EEUU).

Análisis de los datos

Los datos obtenidos mediante RT-qPCR se analizaron utilizando el programa StepOne v2.2.2 (Applied Biosystems), normalizando la expresión de los mRNA de las quimioquinas, sus receptores e IL-7, a los niveles de expresión de 18S rRNA, mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos obtenidos mediante ELISA se calcularon en base a una curva estándar elaborada usando una ecuación de cuatro parámetros. Los resultados se analizaron usando el software estadístico SPSS 22.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU). La normalidad de la distribución de los datos se determinó usando la prueba estadística de Kolgomorov-Smirnov. Las diferencias de los datos obtenidos mediante RT-qPCR se analizaron usando la prueba estadística U de Mann-Whitney y los datos obtenidos mediante ELISA usando la prueba t de Student para muestras independientes. Las diferencias se consideraron como estadísticamente significativas cuando p-value <0,05.

7. RESULTADOS

Expresión de las quimioquinas homeostáticas, sus receptores e IL-7

En biopsias gingivales de pacientes afectados de periodontitis crónica e individuos sanos, se cuantificó la expresión mediante RT-qPCR de los mRNA de las quimioquinas CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13, sus receptores específicos CXCR4 y CXCR5, y la citoquina IL-7 (Figura 1). Se detectaron mayores niveles de expresión de las quimioquinas CCL19 ($p = 0,025$), CCL21 ($p = 0,012$) y CXCL12 ($p = 0,037$), y de los receptores CXCR4 ($p = 0,037$) y CXCR5 ($p = 0,037$) en las biopsias de pacientes con periodontitis crónica, en comparación a las de individuos sanos. Para CXCL13 e IL-7 no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos; sin embargo, la expresión tiende a ser mayor para los casos con periodontitis.

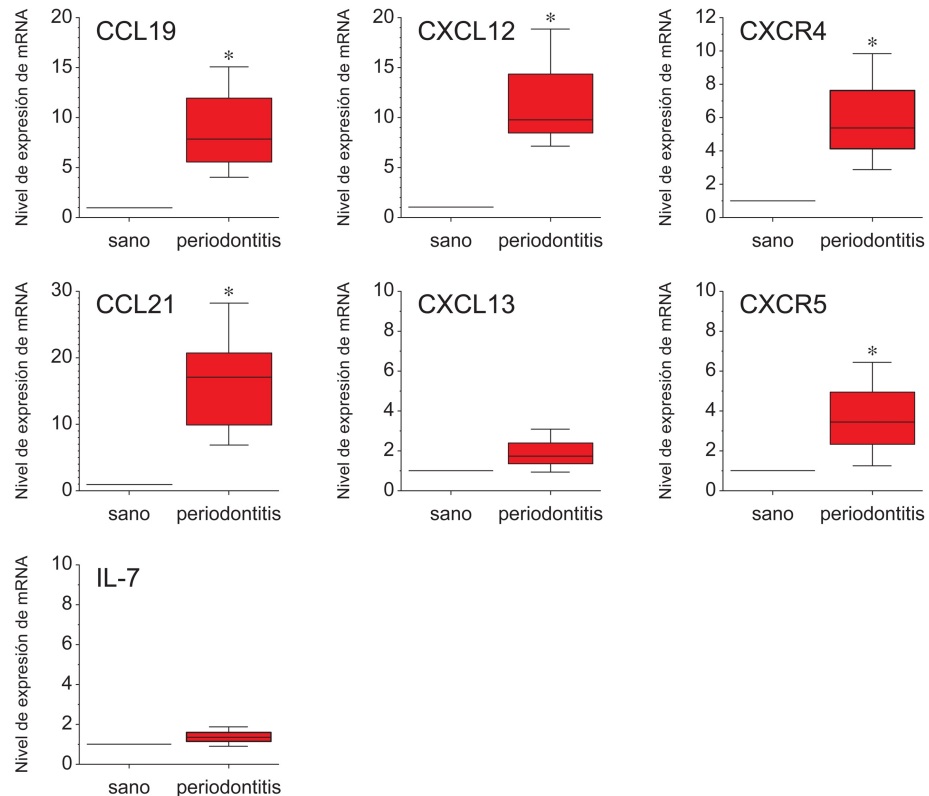


Figura 1. Expresión de quimioquinas, sus receptores e IL-7 en pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos. Los datos se representan como mediana, recorrido inter-cuartílico (cajas) y recorrido inter-percentílico (clavijas) de los niveles de expresión de los mRNA. * $p < 0,05$.

CCL19 se expresó 7,5 veces más en pacientes con periodontitis crónica que en individuos sanos, mientras que CCL21 se expresó 16 veces más en periodontitis crónica por sobre salud periodontal. En el caso de CXCL12 fue aproximadamente mayor la expresión en 8,5 veces, para CXCR4 7 veces y para CXCR5 5 veces en periodontitis crónica por sobre individuos sanos.

Inmunodetección de CCR7

CCR7 fue detectado en forma proteica mediante Western Blot en homogeneizados de biopsias gingivales obtenidas de pacientes afectados de periodontitis crónica e individuos sanos (Figura 2).

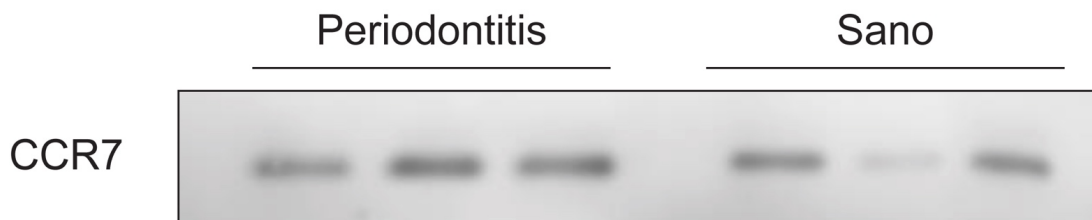


Figura 2. Expresión de CCR7 en los tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis e individuos sanos. Se realizó un ensayo de Western Blot para CCR7 en tejidos periodontales. Las bandas representan la inmuno-detección del receptor CCR7 en homogeneizados de biopsias gingivales de pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos.

Cuantificación de CCR7

Para cuantificar la expresión de mRNA del receptor CCR7, se realizó un análisis mediante RT-qPCR en biopsias gingivales de pacientes afectados de periodontitis crónica e individuos sanos. Se detectó mayores niveles de expresión para CCR7 ($p = 0,027$), en las biopsias de pacientes con periodontitis crónica, en comparación a las de individuos sanos.

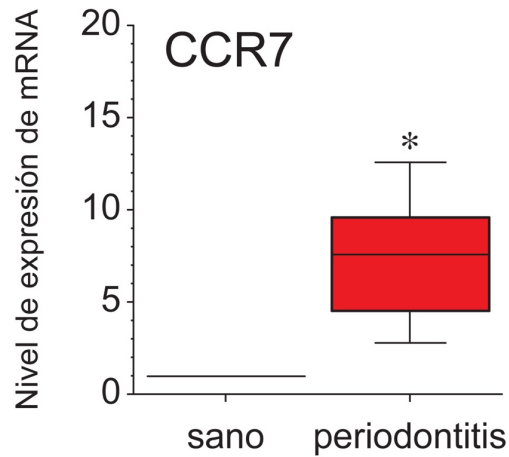


Figura 3. Expresión de CCR7 en pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos. Los datos se representan como mediana, recorrido inter-cuartílico (cajas) y recorrido inter-percentílico (clavijas) de los niveles de expresión de mRNA. *p <0,05.

La expresión de CCR7 fue aproximadamente 7,5 veces mayor en pacientes afectados de periodontitis crónica que en individuos sanos.

Producción de CCL19, CCL21 y CXCL12 en fluido gingival crevicular

Se detectaron mayores niveles de CCL19 ($p = 0,025$), CCL21 ($p < 0,009$) y CXCL12 ($p < 0,001$) en el fluido crevicular gingival de pacientes afectados de periodontitis crónica comparado con el fluido crevicular obtenido de los individuos sanos (Figura 3).

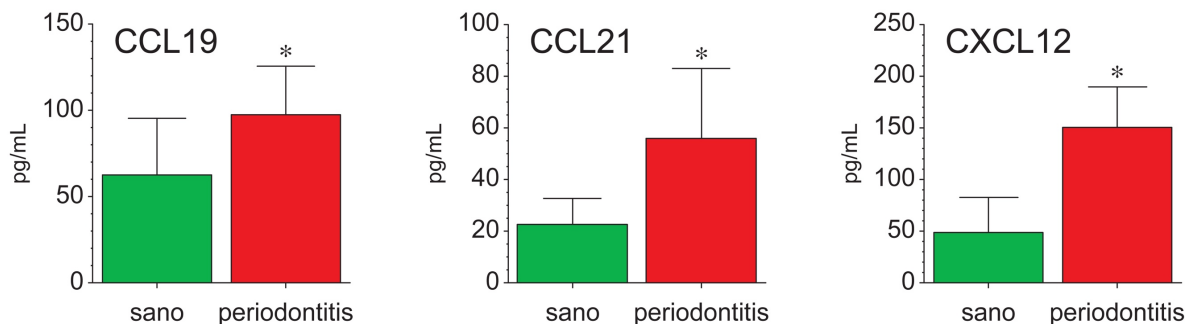


Figura 4. Detección de quimioquinas en pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos. Los datos se representan como media y desviación estándar de los niveles secretados de quimioquinas. *p <0,05.

8. DISCUSIÓN

Durante las periodontitis se forma un denso infiltrado inmuno-inflamatorio en respuesta a la disbiosis bacteriana presente en el ambiente sub-gingival. Si la infección no se resuelve, se produce la cronicidad de la respuesta inflamatoria, lo que deriva en la destrucción progresiva de los tejidos de soporte de los dientes y la eventual pérdida de ellos (Cekici y cols., 2015). Durante la respuesta inmuno-inflamatoria, se producen y secretan diversas citoquinas y quimioquinas que participan en la migración celular hacia el sitio de infección (Cekici y cols., 2015). En este contexto, las quimioquinas inflamatorias y sus receptores han sido ampliamente asociadas a la migración de linfocitos T durante periodontitis (Alvarez y cols., 2015; Garlet y cols., 2003). En cambio, las quimioquinas homeostáticas no han sido previamente analizadas en el contexto de inflamación periodontal, ya que se relacionaban sólo a un rol fisiológico en la linfo-organogénesis y migración constitutiva de células linfoides. En consecuencia, en este trabajo de investigación se analizó la expresión de distintas quimioquinas homeostáticas, sus receptores e IL-7 en los tejidos periodontales de pacientes diagnosticados con periodontitis crónica severa y sujetos sanos. Nuestros resultados describen que en periodontitis crónica se sobre-expresan las quimioquinas CXCL12, CCL19 y CCL21, los receptores CCR7, CXCR4 y CXCR5, en comparación a sujetos sanos.

En biopsias gingivales y fluido gingival crevicular de pacientes con periodontitis crónica, detectamos mayores niveles de CXCL12 y su receptor CXCR4, lo cual concuerda con estudios previos que han reportado el incremento de la expresión y secreción de CXCL12 asociada a la migración de neutrófilos durante la periodontitis (Havens y cols., 2009; Jotwani y cols., 2004; Mahanonda y cols., 2016; Miles 2014). Adicionalmente, Cavalla y cols., asocian mayores niveles de expresión de CXCL12 con actividad osteoclástica e infiltración sostenida de células inmunes, tal como mastocitos y linfocitos TCD4⁺, hacia las lesiones periodontales apicales crónicas (Cavalla y cols., 2013). Además, se ha reportado que los niveles de CXCL12 disminuyen en un 68% luego del tratamiento periodontal no quirúrgico (Havens y cols., 2009).

En nuestro estudio, detectamos mayores niveles a nivel génico y proteico de CCR7 y sus ligandos, CCL19 y CCL21, en pacientes con periodontitis crónica en comparación con individuos sanos. Estudios previos han demostrado que CCR7 y sus ligandos se sobre-expresan en condiciones inflamatorias crónicas (Nibali y cols., 2016; Souto y cols., 2014). CCR7 estimula la migración de células dendríticas maduras y linfocitos T naïve hacia los sitios inflamados, induciendo la formación de agrupaciones linfoides ectópicas que dificultan la resolución de la inflamación (Corsiero y cols., 2012, 2016). Por tanto, se debe profundizar si existe presencia de tales tipos celulares (células T indiferenciadas) en los tejidos periodontales de pacientes con periodontitis crónica, a fin de establecer el posible rol quimiotáctico del eje CCR7/CCL19-CCL21 durante la patogenia de las periodontitis.

CXCL13 es una quimioquina que se caracteriza por inducir la migración de linfocitos B que expresan el receptor CXCR5 hacia distintos órganos linfoides (Corsiero y cols., 2016). Si bien se ha descrito que en periodontitis el número de células CXCL13⁺ y CXCR5⁺ es significativamente mayor que en individuos sanos, especialmente en áreas enriquecidas en linfocitos B y T (Nakajima y cols., 2008), nuestros resultados muestran una tendencia no estadísticamente significativa hacia el aumento de la expresión de CXCL13 en periodontitis. De manera similar, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de IL-7 en biopsias de pacientes con periodontitis crónica e individuos sanos. Sin embargo, se ha reportado que los niveles de IL-7 disminuyen significativamente luego de realizar el tratamiento periodontal (Thunell y cols., 2010). A pesar de que no se obtuvieron diferencias significativas para estos dos mediadores, su expresión en los tejidos periodontales constituye un hallazgo, dado que su localización constitutiva es en zonas donde ocurre la linfo-organogénesis embrionaria (Jones y Jones, 2016b). Más allá, su presencia en la periodontitis podría implicar la acumulación de células inductoras de tejido linfoide, y otras células inmunes que se han visto involucradas en la formación de ELTs (Jones y Jones, 2016b).

La expresión de quimioquinas homeostáticas y sus receptores ha sido previamente analizada en otras patologías inflamatorias crónicas, tal como la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren, donde se asocian a la formación de las ELTs (Corsiero y cols., 2016; van Roon y cols., 2003; van Roon y cols., 2005; Schmutz y

cols., 2005; Szekanecz y cols., 2010). En este contexto, se observa una correlación positiva entre la expresión de CXCL13 y el infiltrado de linfocitos B, T y células plasmáticas (Schmutz y cols., 2005; Szekanecz y cols., 2010), así como con el incremento en la producción del factor asociado a la resorción del hueso denominado ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) (Bugatti y cols., 2014). A su vez, el incremento en la expresión de CXCR4 en los linfocitos T $CD4^+$ de memoria induce la migración de ellas hacia los tejidos inflamados, inhibiendo su apoptosis (Nanki y cols., 2000). De manera similar, CXCL12 participa en la retención y sobrevivencia de células plasmáticas (Bombardieri y cols., 2017). Además, las quimioquinas CCL19 y CCL21 atraen a linfocitos T *naïve* y células dendríticas maduras hacia las ELTs, promoviendo la presentación antigénica *in situ* (Moschovakis y Förster 2012). Por otro lado, usando diferentes modelos animales *knockout* de estas quimioquinas, se ha reportado una desorganización de los centros inmunes germinales ectópicos presentes en las ELTs (Finke y Schmutz 2008; Moschovakis y cols., 2017; Wengner y cols., 2007).

Con relación a la literatura actual, nuestra investigación, analiza por primera vez la asociación entre la expresión de quimioquinas homeostáticas y sus receptores específicos, y la periodontitis crónica. En los últimos años, se ha reportado vasta evidencia sobre su rol clave en la inducción, organización y mantención de las ELTs en los tejidos inflamados (Corsiero y cols., 2016; Schulz y cols., 2016). La organización estructural de las ELTs aumentaría la eficacia de la presentación antigénica *in situ* y por tanto la activación y diferenciación linfocitaria local (Nakajima y cols., 2008). Sobre la base de nuestros resultados, podemos especular que la sobre-expresión de quimioquinas y receptores homeostáticos en biopsias gingivales de pacientes afectados de periodontitis crónica podría asociarse a la quimioatracción de células indiferenciadas hacia el sitio periodontal, a la formación de agrupaciones linfoides ectópicas y a la presentación antigénica *in situ* (Corsiero y cols., 2016). Durante la periodontitis, la presencia de estas agrupaciones linfoides y de las quimioquinas que las inducen podría explicar, al menos en parte, tanto la cronicidad de la inflamación periodontal, como también la distribución sitio-específica de la destrucción tisular.

Si bien nuestros resultados sugieren la presencia de quimioquinas asociadas a la quimioatracción de células indiferenciadas hacia el sitio periodontal, se requieren más estudios que evalúen el fenotipo celular que migra hacia el sitio de inflamación. Así, la caracterización de las células infiltrantes hacia el sitio inflamado en respuesta a estas quimioquinas homeostáticas sería de utilidad para determinar la posible formación de ELTs. Además, es necesario evaluar cambios en el perfil de quimioquinas tras el tratamiento periodontal, para así poder valorar una posible correlación entre la expresión de las quimioquinas homeostáticas analizadas y la disminución de los signos clínicos de periodontitis.

9. CONCLUSIONES

1. Durante la periodontitis crónica, se expresan mayores niveles de mRNA de las quimioquinas CCL19, CCL21, CXCL12 y de los receptores CCR7, CXCR4 y CXCR5, en comparación a individuos sanos.
2. Durante la periodontitis crónica, se secretan mayores niveles de CCL19, CCL21 y CXCL12, en comparación a individuos sanos.
3. Se observa expresión de CCR7 tanto en los tejidos periodontales de individuos afectados de periodontitis crónica como sanos.
4. Se detectaron mayores niveles de expresión de distintas quimioquinas y receptores homeostáticos en tejidos periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica, lo cual podría explicar, al menos parcialmente, la sitio-especificidad y cronicidad característica de la periodontitis.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez Carla, Benítez Alvaro, Rojas Leticia, Pujol Myriam, Carvajal Paola, Díaz-Zúñiga Jaime, y cols., (2015). "Differential expression of CC chemokines (CCLs) and receptors (CCRs) by human T lymphocytes in response to different *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes". *Journal of Applied Oral Science* 23(5):536–46.
- Bai Zhongbin, Hayasaka Haruko, Kobayashi Masayoshi, Li Wenzhe, Guo Zijin, Jang Myoung Ho, y cols., (2009). "CXC chemokine ligand 12 promotes CCR7-dependent naïve T cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches". *The Journal of Immunology* 182(3):1287–95.
- Bikker Angela, Hack C Erik, Lafeber Floris PJG, y van Roon Joel a G (2012). "Interleukin-7: a key mediator in T cell-driven autoimmunity, inflammation, and tissue destruction." *Current pharmaceutical design* 18(16):2347–56.
- Bombardieri Michele, Lewis Myles, y Pitzalis Costantino (2017). "Ectopic lymphoid neogenesis in rheumatic autoimmune diseases". *Nature Reviews Rheumatology* 13(3):141–54.
- Bugatti Serena, Manzo Antonio, Vitolo Barbara, Benaglio Francesca, Binda Elisa, Scarabelli Martina, y cols., (2014). "High expression levels of the B cell chemoattractant CXCL13 in rheumatoid synovium are a marker of severe disease". *Rheumatology (United Kingdom)* 53(10):1886–95.
- Cavalla Franco, Reyes Montserrat, Vernal Rolando, Álvarez Carla, Paredes Rodolfo, García-Sesnich Jocelyn, y cols., (2013). "High levels of CXC Ligand 12/stromal cell-derived factor 1 in apical lesions of endodontic origin associated with mast cell infiltration". *Journal of Endodontics* 39(10):1234–9.
- Cekici Ali, Kantarci Alpdogan, Hasturk Hatice, y Dyke Thomas E Van (2015). "Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease". *Periodontology 2000* 64(1):57–80.
- Corsiero Elisa, Bombardieri Michele, Manzo Antonio, Bugatti Serena, Ugucioni Mariagrazia, y Pitzalis Costantino (2012). "Role of lymphoid chemokines in the

development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases". *Immunology Letters* 145(1–2):62–7.

Corsiero Elisa, Nerviani Alessandra, Bombardieri Michele, y Pitzalis Costantino (2016). "Ectopic lymphoid structures: Powerhouse of autoimmunity". *Frontiers in Immunology* 7(OCT):1–6.

Díaz-Zúñiga J, Melgar-Rodríguez S, Rojas L, Alvarez C, Monasterio G, Carvajal P, y cols., (2017). "Increased levels of the T-helper 22-associated cytokine (interleukin-22) and transcription factor (aryl hydrocarbon receptor) in patients with periodontitis are associated with osteoclast resorptive activity and severity of the disease". *Journal of Periodontal Research* 52(5):893–902.

Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R (2009). Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL)-17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 36:396-403.

Ebert Lisa M, Schaerli Patrick, y Moser Bernhard (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues". *Molecular Immunology* 42(7):799–809.

Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, y Bozoglan A (2013). "Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis". *Journal of Periodontal Research* 48(1):44–51.

Finke Daniela y Schmutz Sandrine (2008). "Interleukin 7-induced lymphoid neogenesis in arthritis: Recapitulation of a foetal developmental programme?" *Swiss Medical Weekly* 138(35–36):500–5.

Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, y Silva A (2001). "Characterization of Cellular Infiltrate, Detection of Chemokine Receptor CCR5 and Interleukin-8 and RANTES Chemokines in Adult Periodontitis." *Journal of Periodontal*

Research 36(3):194–203.

Garlet Gustavo P, Martins Walter, Ferreira Beatriz R, Milanezi Cristiane M, y Silva Joao S (2003). "Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease". *Journal of Periodontal Research* 38(2):210–17.

Hajishengallis G y Lamont RJ (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 y Korostoff Jonathan M (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.

Hauser Mark A y Legler Daniel F (2016). "Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes". *Journal of Leukocyte Biology* 99(6):869–82.

Havens Aaron M, Chiu Evonne, Jr Mario Taba, Wang Jincheng, Shiozawa Yusuke, Jung Younghun, y cols., (2009). "Stromal-Derived Factor-1 α (CXCL12) Levels Increase in Periodontal Disease". *Periodontics* 79(5):845–53.

Hernández M, Dutzan N, García-Sesnich J, Abusleme L, Dezerega a, Silva N, y cols., (2011). "Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis." *Journal of Dental Research* 90(10):1164–70.

Highfield J (2009). "Diagnosis and classification of periodontal disease". *Australian Dental Journal* 54:11–26.

Jing Feifeng y Choi Eun Young (2016). "Potential of cells and cytokines/chemokines to regulate tertiary lymphoid structures in human diseases". *Immune Network* 16(5):271.

Jones Gareth W, Hill David G, y Jones Simon A (2016a). "Understanding immune cells in tertiary lymphoid organ development: It is all starting to come together".

Frontiers in Immunology 7(10):1–13.

Jones, G. W., & Jones, S. A. (2016b). Ectopic lymphoid follicles: Inducible centres for generating antigen-specific immune responses within tissues. *Immunology*, 147(2), 141–51.

Jotwani R, Muthukuru M, y Cutler CW (2004). “Increase in HIV receptors/co-receptors/alpha-defensins in inflamed human gingiva.” *Journal of Dental Research* 83(5):371–77.

Lamont Richard J y Hajishengallis George (2016). “Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease”. *Dental Clinics of North America* 21(3):172–83.

Leistad L., Østensen M. Faxvaag A (1998). “Detection of cytokine mRNA in human, articular cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction”. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 27(1):61–7.

Ley Klaus, Laudanna Carlo, Cybulsky Myron I, y Nourshargh Sussan (2007). “Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated”. *Nature Reviews Immunology* 7(9):678–89.

López-Cotarelo Pilar, Gómez-Moreira Carolina, Criado-García Olga, Sánchez Lucas, y Rodríguez-Fernández José Luis (2017). “Beyond chemoattraction: multifunctionality of chemokine receptors in leukocytes”. *Trends in Immunology* 38(12):927–41.

Mahanonda Rangini, Champaiboon Chantrakorn, Subbalekha Keskanya, Sa-Ardlam Noppadol, Rattanathammatada Warattaya, Thawanaphong Saranya, y cols., (2016). “Human memory B cells in healthy gingiva, gingivitis, and periodontitis”. *The Journal of Immunology* 197(3):715–25.

Meier Dominik, Bornmann Caroline, Chappaz Stephane, Schmutz Sandrine, Otten Luc A, Ceredig Rhodri, y cols., (2007). “Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells”. *Immunity* 26(5):643–54.

- Miles Brodie (2014). "Secondary lymphoid organ homing phenotype of human myeloid dendritic cells disrupted by an intracellular oral pathogen". 82(1):101–11.
- Moschovakis Georgios L, Bubke Anja, Friedrichsen Michaela, Falk Christine S, Feederle Regina, y Förster Reinhold (2017). "T cell specific CXCR5 deficiency prevents rheumatoid arthritis". *Scientific Reports* 7: 8933.
- Moschovakis Georgios Leandros y Förster Reinhold (2012). "Multifaceted activities of CCR7 regulate T-cell homeostasis in health and disease". *European Journal of Immunology* 42(8):1949–55.
- Moser Bernhard, Wolf Marlene, Walz Alfred, y Loetscher Pius (2004). "Chemokines: Multiple levels of leukocyte migration control." *Trends in Immunology* 25(2):75–84.
- N. Geurs, V. Iacono J Krayer et al (2015). "American Academy of Periodontology task force report on the update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions". *Journal of Periodontology* 86(7):835–8.
- Nakajima T, Amanuma R, Ueki-Maruyama K, Oda T, Honda T, Ito H, y cols., (2008a). "CXCL13 expression and follicular dendritic cells in relation to B-cell infiltration in periodontal disease tissues". *Journal of Periodontal Research* 43(6):635–41.
- Nakajima T, Amanuma R, Ueki-Maruyama K, Oda T, Honda T, Ito H, y cols., (2008b). "CXCL13 expression and follicular dendritic cells in relation to B-cell infiltration in periodontal disease tissues". *Journal of Periodontal Research* 43(6):635–41.
- Nanki Toshihiro, Hayashida Kenji, El-Gabalawy Hani S, Suson Sharon, Shi Kenrin, Girschick Hermann J, y cols., (2000). "Stromal Cell-Derived Factor-1-CXC Chemokine Receptor 4 interactions play a central role in CD4 T Cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium". *The Journal of Immunology* 165(11):6590-8.
- Nguyen Vanloan, Mendelsohn Andrew, y Larrick James W (2017). "Interleukin-7 and immunosenescence". *Journal of Immunology Research* 2017;2017:4807853.
- Nibali L, Novoa L, Donos N, Henderson B, Blanco J, y Tomas I (2016). "Leukocyte

receptor expression in chronic periodontitis". *Clinical Oral Investigations* 20(9):2559–64.

Page RC y Schroeder HE (1976). "Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work." *Laboratory Investigation* 34(3):235–49.

Pitzalis Costantino,

Gareth W, Bombardieri Michele, y Jones Simon A (2014). "Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity". *Nature Reviews Immunology* 14(7):447–62.

Potempa Jan, Mydel Piotr, y Koziel Joanna (2017). "The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis". *Nature reviews. Rheumatology* 13(10):606–20.

van Roon JA, Glaudemans KA, Bijlsma JW, y Lafeber FP (2003). "Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor alpha and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis". *Annals of the Rheumatic Diseases* 62(2):113–19.

van Roon Joel AG, Verweij Marieke C, Wijk Marion Wenting-van, Jacobs Kim MG, Bijlsma Johannes WJ, y Lafeber Floris PJG (2005). "Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4⁺ T cells and macrophages". *Arthritis & Rheumatism* 52(6):1700–10.

Sahingur Sinem Esra y Yeudall W Andrew (2015). "Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer". *Frontiers in Immunology* 6: 214.

Schmutz Caroline, Hulme Alison, Burman Angela, Salmon Mike, Ashton Brian, Buckley Christopher, y cols., (2005). "Chemokine receptors in the rheumatoid synovium: Upregulation of CXCR5". *Arthritis Research & Therapy* 7(2):R217-29.

Schulz Olga, Hammerschmidt Swantje I, Moschovakis G Leandros, y Forster Reinhold (2016). "Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics." *Annual Review of Immunology* 34:203–42.

- Shipman William D, Dasoveanu Dragos C, y Lu Theresa T (2017). "Tertiary lymphoid organs in systemic autoimmune diseases: Pathogenic or protective?" *F1000Research* 6:196.
- Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, y Cunha FQ (2007). "Chemokines in oral inflammatory diseases: Apical periodontitis and periodontal disease". *Journal of Dental Research* 86(4):306–19.
- Souto Giovanna Ribeiro, Queiroz Celso Martins, Costa Fernando Oliveira, y Mesquita Ricardo Alves (2014). "Relationship between chemokines and dendritic cells in human chronic periodontitis". *Journal of Periodontology* 85(10):1416–23.
- Stadler Amanda F, Angst Patrícia DM, Arce Roger M, Gomes Sabrina C, Oppermann Rui V, y Susin Cristiano (2016). "Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis". *Journal of Clinical Periodontology* 43(9):727–45.
- Surh Charles D y Sprent Jonathan (2008). "Homeostasis of naïve and memory T cells". *Immunity* 29(6):848–62.
- Szekanecz Zoltan, Vegvari Aniko, Szabo Zoltan, y Koch Alisa E (2010). "Chemokines and chemokine receptors in arthritis". *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 2:153–67.
- Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, y cols., (2010). "A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy". *Journal of Periodontal Research* 45(1):148–52.
- Timmer Trieneke CG, Baltus Belinda, Vondenhoff Mark, Huizinga Tom WJ, Tak Paul P, Verweij Cornelis L, y cols., (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):2492–502.
- Wengner Antje M, Höpken Uta E, Petrow Peter K, Hartmann Sven, Schurigt Uta, Bräuer Rolf, y cols., (2007). "CXCR5- and CCR7-dependent lymphoid

neogenesis in a murine model of chronic antigen-induced arthritis". *Arthritis and Rheumatism* 56(10):3271–83.

11.ANEXO



CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Antecedentes Generales:

El propósito del presente estudio es determinar factores Inmunológicos, celulares y moleculares, que pueden contribuir con el Inicio, progresión y severidad de la enfermedad periodontal. El estudio se enmarca en el proyecto FONDECYT N° 1140904.

Procedimiento de la toma de muestras:

A los sujetos seleccionados para el presente estudio se les efectuará un examen clínico simple. Este es un examen de rutina que se hace para determinar o descartar la presencia de periodontitis. A los sujetos que participen en el estudio se les tomará una muestra de encía, la que se obtendrá durante una intervención quirúrgica programada para dicho paciente (Ejemplo: cirugía extracción de terceros molares) y previo consentimiento, tanto del paciente como del cirujano responsable. Todas las muestras biológicas se usarán sólo con propósito científico (ejemplo: Cuantificación de moléculas asociadas con la enfermedad). En términos generales, la obtención de la muestra no altera la cicatrización normal y, por tanto, no trae consecuencias negativas para el paciente.

En caso de alguna duda o dificultad, el teléfono de contacto del Investigador responsable es +56 9 81387501. Dra. Carla Álvarez Rivas.

Declaro:

Haber comprendido las explicaciones que se me han dado en un lenguaje claro y sencillo, y que el Investigador me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, las cuales han sido respondidas. Además, se me ha señalado que tendré absoluta confidencialidad en todos mis datos entregados. Finalmente, comprendo que en cualquier momento, y sin necesidad de dar explicación alguna, puedo revocar el consentimiento dado para participar en el presente proyecto de Investigación, y que frente a cualquier duda puedo además consultar con el Presidente del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Identificación del paciente

Nombre:
Rut:
Fono:

Firma

Identificación del Dentista

Nombre:
Rut:
Fono:

Firma

Depto. de Odontología Conservadora / Sergio Livingstone 943, Independencia;
Fono. 9781839 / Casilla 1903.