

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



Variabilidad en la expresión de citoquinas proinflamatorias y factores de transcripción inmunoreguladores en células dendríticas expuestas a hialuronano de bajo peso molecular y estimuladas con bacterias patógenas periodontales.

José Matías Guevara Vergara

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

Tutor Principal: Dr. Rolando Vernal Astudillo

Tutor Asociado: Dr. Gustavo Monasterio Ocares

Santiago-Chile

2018

Agradecimientos

A mis padres, por darme una educación privilegiada.

A Paulina, por su constante apoyo.

A mis amigos, por estos años de buenos y malos momentos.

A Juan Pablo y Gonzalo, por las alegrías y por los proyectos que se vienen en conjunto.

A Rolando y Gustavo, por ayudarme a conocer la odontología desde otro punto de vista.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
a. Periodontitis	5
b. Bacterias asociadas a la periodontitis	5
c. Respuesta inmune: Células dendríticas y su regulación transcripcional	5
d. Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)	10
e. Hialuronano de bajo peso molecular como señal de daño DAMP	11
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	13
5. METODOLOGÍA	
a. Bacterias patógenas periodontales	14
b. Selección de los donantes	14
c. Purificación de monocitos y generación de células Dendríticas	14
d. Estimulación de las células dendríticas con LMW-HA	15
e. Estimulación de las células dendríticas con bacterias	15
f. Grupos controles y experimentales	15
g. Extracción de RNA total	16
h. Síntesis de la primera cadena de cDNA	16
i. Cuantificación de la expresión de citoquinas y factores de transcripción mediante RT-qPCR	16
j. Análisis de los datos	18
6. RESULTADOS	
a. Efecto dosis-respuesta de LMW-HA	19
b. Expresión de citoquinas ante estímulo con LMW-HA y patógenos periodontales	20
c. Niveles de expresión de los factores de transcripción BATF3, IRF4, IRF8 y NOTCH2	22
7. DISCUSIÓN	24
8. CONCLUSIÓN	31
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
10. ANEXO	41

Resumen

El ácido hialurónico o hialuronano (HA) es un glicosaminoglicano no sulfatado distribuido en todos los tejidos del organismo, entre ellos los tejidos periodontales. En su forma fisiológica de alto peso molecular (HMW-HA) interviene en diferentes procesos, tal como la cicatrización de heridas, angiogénesis, motilidad, adhesión y proliferación celular. Sin embargo, en estados inflamatorios, el HMW-HA puede degradarse a fragmentos de bajo peso molecular (LMW-HA) que activan la respuesta inmune del individuo.

Las células dendríticas, como presentadoras de antígeno, definen la respuesta inmune adquirida desplegada durante diversas patologías. De esta manera, estas células maduran a diferentes líneas celulares que a su vez participan en la diferenciación selectiva de los distintos subtipos de linfocitos T y, así, determinan el fenotipo clínico de la enfermedad. Durante la periodontitis, los niveles de LMW-HA están particularmente elevados; así, podrían ser reconocidos y procesados por las células dendríticas y contribuir al desarrollo de una respuesta inmune adquirida asociada a la inflamación y resorción ósea alveolar determinante de la pérdida de los dientes.

En este estudio, se analizó la expresión de distintas citoquinas y factores de transcripción en células dendríticas expuestas in vitro a LMW-HA y luego estimuladas con *Agregatibacter actinomycetemcomitans* o *Porphyromonas gingivalis*. El LMW-HA indujo un incremento en la expresión de citoquinas y factores de transcripción asociados a respuesta inmunoinflamatoria en las células dendríticas expuestas a *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*. Sobre la base de estos resultados, podemos sugerir que el LMW-HA podría estar implicado en la generación de un microambiente molecular periodontal que potenciaría el efecto inmunogénico de ciertas bacterias periodonto-patógenas.

Antecedentes Bibliográficos

Periodontitis

La periodontitis es una patología inflamatoria crónica que afecta los tejidos de soporte dentario. Se manifiesta clínicamente con inflamación gingival, pérdida de la inserción conectiva, resorción del hueso alveolar y formación de saco periodontal (Armitage, 1999; Van Der Velden, 2005).

El inicio de la enfermedad se asocia a un incremento en la biomasa de ciertos patógenos clave en el ambiente subgingival, los que inducen fenómenos de disbiosis a nivel local e invaden los tejidos de inserción de los dientes, desarrollándose la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero (Hajishengallis and Lamont, 2012). De no resolverse, esta respuesta puede evolucionar a un proceso crónico en el que intervienen mediadores proinflamatorios tales como prostaglandina E₂ (PGE₂), interleuquina (IL)-1 β , e IL-6 (Kurgan and Kantarci, 2017). La acción de estos mediadores desencadena la producción del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL), que produce la activación de los osteoclastos y de esta forma la resorción de hueso alveolar que lleva a la pérdida de los dientes (Hienz et al., 2015; Kornman, 2008; Pihlstrom et al., 2005; Harvey, 2017)

Bacterias asociadas a la periodontitis

La placa subgingival está compuesta principalmente por cientos de especies bacterianas organizadas en comunidades complejas (Darveau, 2010). Entre las especies implicadas en la etiología y progresión de la periodontitis, las de mayor relevancia en cuanto a su potencial patogénico son *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* (Kinane, 2002).

A. actinomycetemcomitans es un cocabacilo Gram negativo, capnofílico, no móvil, altamente prevalente en la periodontitis agresiva localizada (Könönen and Müller, 2014; Suzuki et al., 2005). *A. actinomycetemcomitans* expresa distintos factores de virulencia, entre los cuales se encuentran: leucotoxina, fimbria, toxina distensora citoletal, adhesinas epiteliales, proteínas de adhesión e invasión celular

y lipopolisacárido (LPS), antígeno inmunodominante y determinante clave del tipo de inmunidad adquirida desplegada en los tejidos infectados (Perry et al., 1996; Gholizadeh et al., 2017).

P. gingivalis es un cocobacilo Gram negativo, no móvil, anaerobio estricto y asacarolítico, altamente prevalente tanto en periodontitis crónica como agresiva (Olsen et al., 2017). *P. gingivalis* expresa diferentes factores de virulencia, tales como cápsula extracelular, LPS, hemaglutininas, fimbrias y enzimas proteolíticas (Díaz Zúñiga, 2012; van Winkelhoff et al., 1993).

Respuesta inmune: Células dendríticas y su regulación transcripcional

Las células dendríticas (CDs) son células presentadoras de antígeno que desempeñan un rol clave en la respuesta inmune del hospedero, capturando, procesando y presentando los antígenos a los linfocitos T, para así iniciar y regular la respuesta inmune adaptativa (Song et al., 2017). Ante una disminución en la función de las CDs, aumenta la susceptibilidad a la periodontitis, lo que sugiere que las CDs tienen un efecto global protector en el periodonto (Xiao et al., 2015). Sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas, la desregulación en la producción de sus mediadores proinflamatorios puede alterar la homeostasis inmune, perpetuando una serie de patologías inflamatorias crónicas, tal como la periodontitis (Banchereau and Steinman, 1998). En esta patología, las CDs pueden ser estimuladas por *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, los que estimulan los receptores tipo toll TLR2 y TLR4, promoviendo su activación y, consecutivamente, la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β , IL-23, factor de necrosis tumoral (TNF)- α y TNF- β (Díaz-Zúñiga et al., 2015).

Las citoquinas secretadas y su patrón inflamatorio dependen del subtipo de CD estimulada (Murphy, 2013), lo que podría llevar a generar diferencias en la respuesta inmune desplegada y en el desarrollo de enfermedades como la periodontitis. De esta forma, el estudio de los factores de transcripción que regulan la activación de los diferentes subtipos de CDs podría llegar a ser clave para dilucidar los fenómenos moleculares implicados en esta patología (Figura 1).

Las CDs se dividen en dos grandes grupos: CDs plasmocitoides (pCDs) y CDs comunes o convencionales (cCDs). Las pCDs son activadas por virus y están especializadas en la producción de interferón (IFN)- α . Los factores de transcripción que regulan este fenotipo son IRF8 y E2-2 (Ma et al., 2015). Por otro lado, las cCDs son, en su mayoría, activadas por bacterias y se dividen en dos subtipos, las cCD1 y cCD2 (Collin and Bigley, 2018; Guilliams et al., 2014; Pulendran et al., 2008; Schlitzer et al., 2015; Tussiwand and Gautier, 2015).

Las cCD1, activadas principalmente por patógenos intracelulares, requieren para su desarrollo la expresión de los factores de transcripción IRF8 y BATF3. Estas células expresan receptores TLR 1, 2, 3, 6, 8 (Jongbloed et al., 2010) y están especializadas en la producción de IL-12 en timo (Chandra et al., 2017; Bigley et al., 2016; Tamura, 2017; Murphy, 2013), pero en sangre su producción es más limitada (Leal Rojas et al., 2017; Merad et al., 2013). Un incremento de IL-12 activa a las células linfoides 1 (ILC1) innatas para producir IFN- γ y, finalmente, conducirán a una respuesta inmune tipo T helper 1 (Th1) (Azuma, 2006; Bluestone et al., 2009; Collin and Bigley, 2018). Además, las cCD1 conducen a una respuesta de linfocitos CD8⁺ citotóxicos a través de la presentación cruzada con las células infectadas (Lee et al., 2017; Li et al., 2017; Zhong et al., 2017).

Las cCD2 contemplan al menos 2 subtipos. Uno de ellos es activado por patógenos extracelulares y para su desarrollo es necesaria la expresión de los factores de transcripción IRF4 y NOTCH2 (Nam and Lim, 2016; Xu et al., 2012; van Hamburg and Tas, 2018; Guilliams et al., 2014). Estas células expresan receptores TLR2 y TLR4 (Von Bubnoff et al., 2012; Leal Rojas et al., 2017; Nizzoli et al., 2014) y son las principales productoras de IL-12 e IL-1 β en sangre, promoviendo una inmunidad mediada por linfocitos Th1 y CD8⁺ (Leal Rojas et al., 2017). Además están especializadas en la producción de IL-6 e IL-23 y conducen a la inmunidad mediada por linfocitos Th17 y Th22 (Baba et al., 2012; Bluestone et al., 2009; Steinman et al., 2003; Collin and Bigley, 2018; Nizzoli et al., 2014). El otro subtipo de cCD2 es activado durante reacciones alérgicas e infecciones parasitarias, y para su desarrollo se requieren los factores de transcripción IRF4 y KLF4 (Bedoui and

Heath, 2015). Este subtipo de células conduce a la activación de una respuesta inmune tipo Th2 (Tussiwand et al., 2015).

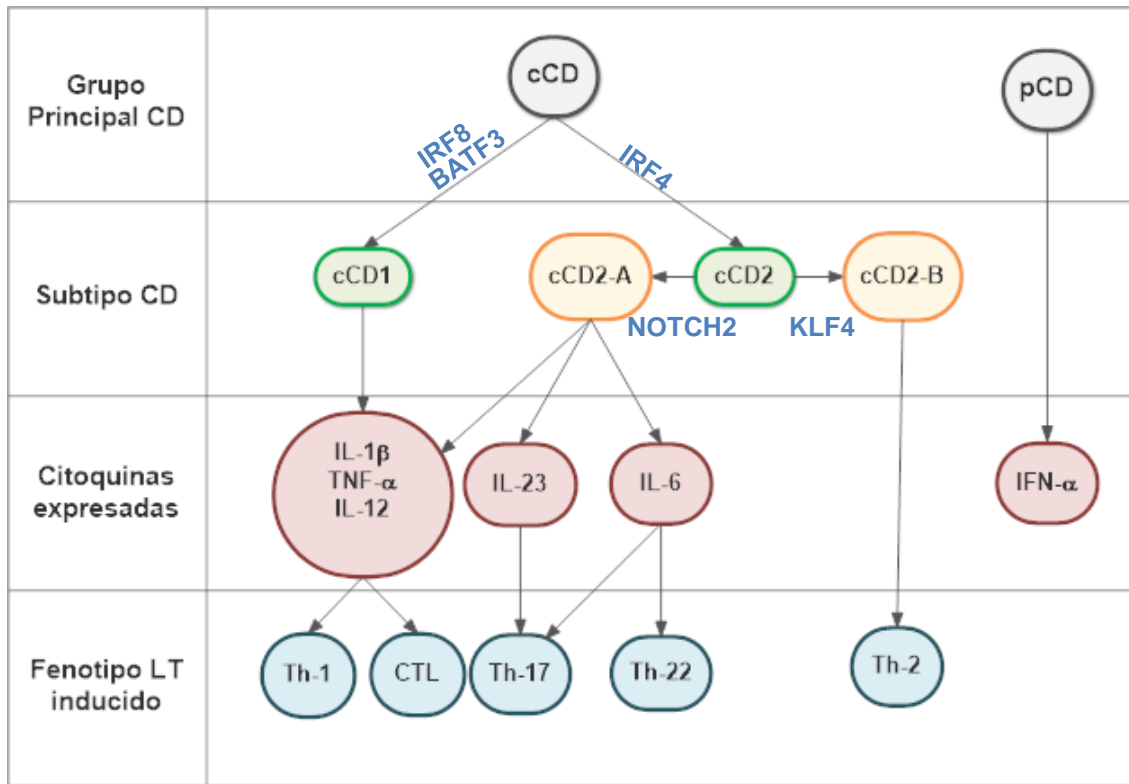


Figura 1. Linajes de células dendríticas definidos a partir de sus factores de transcripción inmunoreguladores. Se describen dos linajes de células dendríticas principales, las pCD y cCD. Las cCD están implicadas en la inmunidad ante bacterias y se dividen a su vez en dos subtipos definidos por 2 reguladores maestros: cCD1 expresa el factor BATF3 y cCD2 el factor IRF4.

Los diferentes subtipos de CDs pueden recibir señales inmunoestimuladoras variadas para la liberación de citoquinas y éstas se pueden resumir en 3 grandes grupos: (1) las señales de peligro exógenas presentes en las bacterias infectantes, como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), (2) las señales de peligro homeostático, como los cambios de pH, osmolaridad o hipoxia, y (3) las señales de peligro endógenas, es decir los patrones moleculares asociados a daño o DAMPs (del inglés, Damage-Associated Molecular Patterns), también conocidos como alarminas (Gallo and Gallucci, 2013).

Patrones moleculares asociados a daño

Los DAMPs se definen como estructuras moleculares endógenas que son activadas o secretadas por células que experimentan estrés, daño y/o muerte celular patológica, o que se originan producto de injurias a la matriz extracelular. En condiciones normales, estas moléculas tienen funciones fisiológicas; sin embargo, bajo ciertas condiciones de estrés, su sobreproducción conduce a una respuesta tisular exacerbada y no regulada, resultando en trastornos hiperinflamatorios sistémicos agudos asociados a daños colaterales o procesos de exceso de reparación acompañados de fibrosis (Liang et al., 2015). Por otro lado, pueden perpetuar una respuesta inmune de baja intensidad, no lo suficientemente eficiente como para eliminar el desencadenante inflamatorio, derivando así en la resolución inadecuada de la injuria e inflamación crónica (Mann, 2011).

En este contexto, los diferentes subtipos de linfocitos T se diferencian y activan durante la presentación antigénica, contribuyendo a la inflamación y destrucción tisular (Bomfim et al., 2017). De esta forma, los DAMPs se vinculan con la patogénesis de diversos trastornos y enfermedades en humanos, tal como el cáncer, infarto agudo al miocardio, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad de Alzheimer, asma, neumonía y hepatitis. Además, pueden actuar potenciando la reacción del hospedero ante infecciones bacterianas (Liang et al., 2015; Timmermans et al., 2016; Land, 2015). Los DAMPs son reconocidos por las CDs mediante los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs), a través de los cuales inducen mecanismos efectores innatos,

tal como la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas (Satoh and Akira, 2016). La principal secuencia en la que los DAMPs intervienen en una infección bacteriana se resume de la siguiente forma: (1) invasión bacteriana, (2) estrés celular o daño tisular, (3) liberación de DAMPs, (4) reconocimiento por células inmunes innatas portadoras de PRRs, tal como las CDs, (5) activación del sistema inmune innato y, por último, (6) despliegue de la respuesta inmune adaptativa con diferenciación y activación de linfocitos T (Land, 2015).

Existen diversas moléculas que han sido calificadas como DAMPs, entre ellas las más estudiadas son las proteínas de alta movilidad-1 (HMGB1), proteínas s100, proteínas de choque térmico (HSP), ácidos nucleicos (DNA y RNA), ATP, ácido úrico y el hialuronano de bajo peso molecular (LMW-HA) (Timmermans et al., 2016; Gallo and Gallucci, 2013).

Hialuronano de bajo peso molecular como señal de daño DAMP

El hialuronano (HA) es un glicosaminoglicano no sulfatado de alto peso molecular que forma parte fundamental de la matriz extracelular de diversos tejidos, incluidos las de los tejidos periodontales (Liang et al., 2011; Bansal et al., 2010; Necas et al., 2008).

En estados fisiológicos no inflamatorios, el HA existe en forma molecular de alto peso molecular (HMW-HA) >500 kDa. En estas condiciones, el HMW-HA es inmunoregulador, al interactuar con el receptor CD44 para proporcionar señales de integridad tisular y respuestas antiinflamatorias (Liang et al., 2011). Por esta razón ha sido utilizado en diversas áreas médicas, tal como la ortopedia, la dermatología y la oftalmología (Bowden et al., 2017). En el campo de la odontología, el HMW-HA ha mostrado efectos antiinflamatorios y antibacterianos durante el tratamiento de la gingivitis y la periodontitis (Bertl et al., 2015). Debido a su rol en la modulación de la cicatrización de heridas, se ha propuesto además que podría brindar efectos beneficiosos en la regeneración de los tejidos periodontales (Bansal et al., 2010).

Sin embargo, en estados inflamatorios, el HA puede degradarse en LMW-HA con un peso molecular <500 KDa (Braza et al., 2016; Hull et al., 2015). Esta

degradación es resultado de la actividad enzimática de las hialuronidasas activadas por estrés mecánico u oxidativo (Stern et al., 2006). El LMW-HA puede señalar vía TLR2 o TLR4, desencadenando la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), factor de transcripción clave en la regulación de la expresión de citoquinas que promueven la respuesta inmunoinflamatoria (Powell and Horton, 2005; Petrey and de la Motte, 2014; Termeer et al., 2002; Scheibner et al., 2006). Así, el LMW-HA lleva a un incremento en la secreción de IL-8, IL-12, TNF- α y óxido nítrico (NO) en muchos tipos celulares, incluyendo las CDs, en las cuales actúa como una molécula coadyuvante de la activación linfocitaria a través de la regulación de las moléculas coestimuladoras (Termeer et al., 2002; Scheibner et al., 2006). Además, el LMW-HA promueve la migración de las CDs hacia los linfonodos (Rizzo et al., 2014).

Los niveles de LMW-HA están particularmente elevados en los tejidos gingivales de los pacientes afectados de periodontitis (Yamalík et al., 1998), posiblemente como resultado de la acción de las enzimas bacterianas hialuronidasas (Casale et al., 2016). Estudios no publicados de nuestro laboratorio indican que los niveles de LMW-HA se mantienen incrementados incluso después del tratamiento periodontal no exitoso.

El propósito de este estudio es evaluar el potencial inmunogénico del LMW-HA en las CDs estimuladas con bacterias patógenas periodontales, lo que podría explicar, al menos en parte, la respuesta inmunoinflamatoria exacerbada característica de la periodontitis. Para ello, se analizará la variabilidad en la producción de citoquinas y factores de transcripción en CDs estimuladas con *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* expuestas o no a LMW-HA.

Hipótesis

El hialuronano de bajo peso molecular (LMW-HA) induce un incremento en la expresión de factores de transcripción inmunoreguladores y citoquinas proinflamatorias en las células dendríticas estimuladas con *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Objetivo general

Determinar la expresión de factores de transcripción inmunoreguladores y citoquinas proinflamatorias en células dendríticas derivadas de monocitos humanos, estimuladas con *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, expuestas o no a hialuronano de bajo peso molecular (LMW-HA).

Objetivos específicos

1. Cuantificar mediante RT-qPCR los niveles de expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-23 y TNF- α en células dendríticas estimuladas con *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, expuestas o no a hialuronano de bajo peso molecular (LMW-HA).
2. Cuantificar mediante RT-qPCR los niveles de expresión de los factores de transcripción IRF8, BATF3, IRF4 y NOTCH2 en células dendríticas estimuladas con *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, expuestas o no a hialuronano de bajo peso molecular (LMW-HA).

Metodología

Bacterias patógenas periodontales

La cepa *A. actinomycetemcomitans* ATCC® 43718™ (Y4), serotipo b, se sembró en medio agar infusión cerebro-corazón (BHI; Oxoid LTD, Hampshire, England) e incubó a 37°C en condiciones de capnofilia (O₂ 8% y CO₂ 12%) usando un generador de condición microaerobia CampyGen™ (Oxoid Ltd, Hampshire, Inglaterra). La cepa *P. gingivalis* W50, serotipo K1, se sembró en medio agar sangre hemina-menadiona (5% de sangre desfibrinada de caballo y 0,5 mg/L de hemina y menadiona) en condiciones de anaerobiosis (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) a 37°C usando generadores AnaeroGen™ (Oxoid Ltd, Hampshire, Inglaterra).

Selección de los donantes

Se purificaron células sanguíneas a partir de donaciones de sangre total obtenidas por el método de capa leucoplaquetar (“buffy-coat”) de 15 pacientes sanos donantes del banco de sangre del Hospital Dr. José Joaquín Aguirre, Universidad de Chile. Los criterios de exclusión fueron la prueba positiva del virus VIH y/o de hepatitis B ó C, la presencia de infecciones manifiestas durante el último mes, fiebre, alergias sintomáticas, recuentos anormales de células sanguíneas, aumento de enzimas hepáticas y consumo de medicamentos de cualquier tipo, excepto vitaminas y anticonceptivos orales. Los pacientes participantes fueron voluntarios que firmaron un consentimiento informado que fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo).

Purificación de monocitos y generación de células dendríticas

Usando una gradiente de concentración (Ficoll-Paque Plus®, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), se aislaron las células periféricas mononucleares (del inglés, Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs). Los monocitos se purificaron desde los PBMCs mediante separación inmunomagnética (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Alemania). Para ello, las PBMCs se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano conjugado con partículas inmunomagnéticas, durante 15 minutos a 4°C. Luego de ser lavadas en amortiguador fosfato salino

(PBS), los monocitos se aislaron usando columnas de separación tamaño MS montadas en un campo magnético (MACS). Posteriormente, la fracción de células CD14⁺ purificada, correspondiente a los monocitos, se contaron utilizando una cámara de Neubauer[®] y se sometieron inmediatamente a un protocolo estandarizado de diferenciación a CDs (Vernal et al., 2008). Para ello, los monocitos CD14⁺ se cultivaron durante 6 días a una concentración de 1x10⁶ células/mL en 2 mL de medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp) y 20 ng/mL de los siguientes factores: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-4 (R&D, Minneapolis, MN USA). Para cada individuo los experimentos se realizaron por separado.

Estimulación de las células dendríticas con LMW-HA

Las CDs se estimularon con LMW-HA 20 KDa (R&D systems, Minneapolis, MN, EEUU) a los días 3 y 5 de diferenciación celular, usando 3 concentraciones diferentes: 25 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL, para determinar el efecto dosis respuesta. Como control, se usaron CDs sin estimulación con LMW-HA.

Estimulación de las células dendríticas con bacterias

Las CDs expuestas o no a LMW-HA se estimularon luego con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis* a una multiplicidad infectante (MOI) de 10² (razón bacterias/CDs) durante 2 días. Como control, se usaron CDs sin estimulación bacteriana.

Grupos controles y experimentales (Tabla 1)

Tabla 1. Grupos controles y experimentales.

	Estímulo con LMW-HA	Estímulo bacteriano
Grupo 1	No	No
Grupo 2	No	<i>P. gingivalis</i>
Grupo 3	No	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Grupo 4	Sí	No
Grupo 5	Sí	<i>P. gingivalis</i>
Grupo 6	Sí	<i>A. actinomycetemcomitans</i>

Extracción de RNA total

Luego de 2 días, se extrajo el RNA citoplasmático total de las CDs utilizando 400 μ L de amortiguador de lisis celular que contiene Igepal[®] CA-630 0,5% (SigmaAldrich, Saint Louis, MO, USA), Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM y VRC-40 10 mM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para ello, las CDs se centrifugaron a 2.000 xg durante 5 minutos a 20°C y luego se lavaron con 1 mL de PBS. Luego de eliminar el sobrenadante, las células se lisaron realizando movimientos vigorosos con una micropipeta P1000. El lisado celular se centrifugó a 8.000 xg durante 10 segundos y el sobrenadante libre de fragmentos celulares se depositó en tubos nuevos, para ser incubado con SDS 20%, EDTA 0,5 M y proteinasa K 10 mg/mL durante 2 horas a 37°C. Luego de agregar 400 μ L de un mix de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1), se recuperó el RNA total mediante centrifugación a 8.000 xg durante 10 minutos. El RNA total se precipitó en presencia de acetato de sodio 3 mM, glicógeno 20 μ g/ μ L y 1 mL de alcohol etílico 100% a -80°C durante 24 horas y se cuantificó usando un espectrofotómetro (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, EEUU) a partir del valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm.

Síntesis de la primera cadena de cDNA

Las primeras cadenas de cDNA se sintetizaron a partir 5 μ g del RNA total usando un kit de transcripción reversa siguiendo las instrucciones del fabricante (SuperScrip[™]; Invitrogen, Grand Island, NY, EEUU).

Cuantificación de la expresión de citoquinas y factores de transcripción mediante RT-qPCR

A partir de 50 ng de cDNA, se cuantificaron los niveles de expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF- α y de los factores de transcripción BATF3, IRF4, IRF8 y NOTCH2, usando partidores específicos (Tabla 2 y 3 respectivamente), el reactivo de qPCR KAPA[™] SYBR[®] (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EEUU) y un equipo de qPCR StepOnePlus[®] (Applied Biosystems,

Singapur) siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: 95°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos. Finalmente se realizó una curva de degradación de los productos de amplificación de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos, para detectar la formación de productos no específicos y amplificación de falsos positivos. Los niveles de rRNA 18S fueron cuantificados y se utilizaron como referencia para la cuantificación relativa.

Tabla 2. Partidores específicos utilizados para la amplificación de citoquinas (Vernal et al., 2009).

	Partidor 1	Partidor 2
IL-1 β	ctgtcctgcgtgttgaaaga	ttgggtaattttgggatctaca
IL-6	gccagctatgaactccttct	gaaggcagcaggcaacac
IL-23	agcttcatgcctccctactg	ctgctgagctcccagtggt
TNF- α	cagcctcttctccttctgat	gccagagggctgattagaga
rRNA18s	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

Tabla 3. Partidores específicos utilizados para la amplificación de factores de transcripción.

	Partidor 1	Partidor 2
IRF8	tggggatgatcaaaaggagcc	aactggctgggtcgaagac
BATF3	agaccagaaggctgacaag	ctccgcagcatggtgtt
IRF4	gacaacgccttacccttcg	aggggtggcatcatgtagtt
NOTCH2	cagttaccacccacaggtc	ccatacaggcagtcaatggaa

Análisis de los datos

Los niveles de expresión de los mRNA de las citoquinas y los factores de transcripción fueron expresados como niveles de expresión relativos promedio \pm desviación estándar. Los datos se calcularon normalizando la expresión de los mRNA a los niveles de expresión de rRNA 18S y comparando los niveles normalizados de cada condición experimental a los niveles normalizados de la condición sin estímulo bacteriano y no expuestas a LMW-HA, usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el software SPSS v.22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Se determinó la normalidad de la distribución de datos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante los test ANOVA y post-hoc de Bonferroni. Las diferencias se establecieron como estadísticamente significativas cuando el p-value fue <0.05 .

Resultados

Efecto dosis-respuesta de LMW-HA

Las CDs fueron estimuladas con LMW-HA a diferentes concentraciones (25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$) y se cuantificó la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-23 y TNF- α (Figura 2). Mayores niveles de expresión de citoquinas fueron detectados en las CDs estimuladas con LMW-HA a 100 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con las CDs no estimuladas. Además, se puede observar un efecto dependiente de la dosis en donde, a medida que aumenta la concentración de LMW-HA, aumentan los niveles de expresión de las diferentes citoquinas.

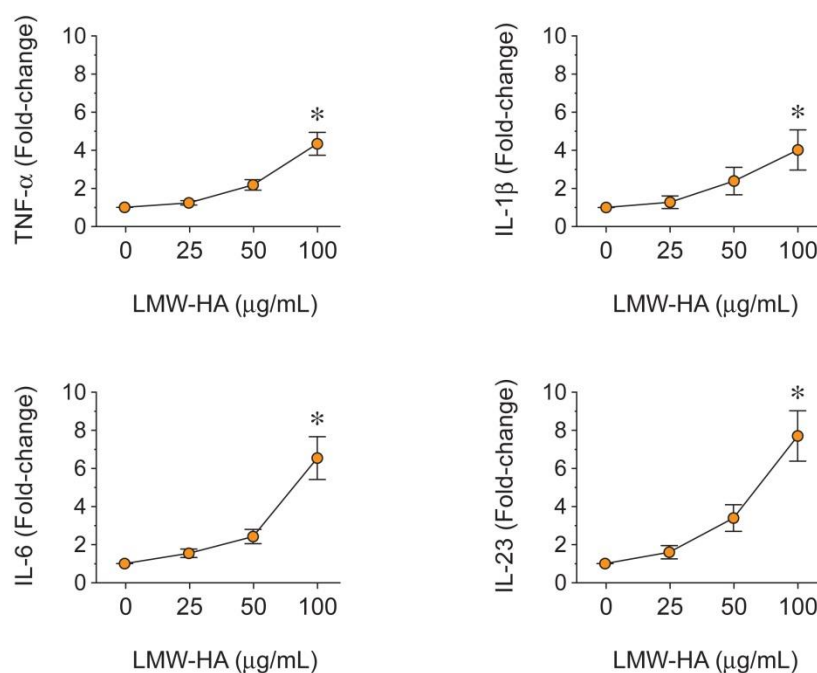


Figura 2. Expresión de citoquinas en CDs estimuladas con LMW-HA a concentraciones 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$. A partir de 3 experimentos independientes se cuantificaron los niveles de mRNA de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-23 y TNF- α en CDs estimuladas con LMW-HA a 25, 50 o 100 $\mu\text{g/mL}$. Los niveles de expresión obtenidos en células sin estimular fueron considerados como valor 1 para la cuantificación relativa. * $p < 0,05$.

Expresión de citoquinas ante estímulo con LMW-HA y patógenos periodontales

Los niveles de expresión de las diferentes citoquinas en CDs expuestas a LMW-HA y estimuladas con *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* fueron cuantificados mediante RT-qPCR (Figura 3). Se detectaron mayores niveles de expresión de IL-1 β , IL-6, IL-23 y TNF- α en CDs estimuladas con LMW-HA 100 μ g/mL y *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*, comparadas con las CDs estimuladas únicamente con las bacterias. Para el grupo estimulado con *A. actinomycetemcomitans* y LMW-HA, los incrementos en la expresión relativa fueron de 1,7 veces para IL-1 β ($p=0,002$), 1,7 veces para IL-6 ($p=0,038$), 1,8 veces para IL-23 ($p=0,031$) y 2,3 veces para TNF- α ($p<0,001$). Para el grupo estimulado con *P. gingivalis* y LMW-HA, los aumentos en la expresión relativa fueron de 1,6 veces para IL-1 β ($p=0,030$), 2,1 veces para IL-6 ($p=0,02$), 1,8 veces para IL-23 ($p=0,011$) y 2,5 veces para TNF- α ($p<0,001$).

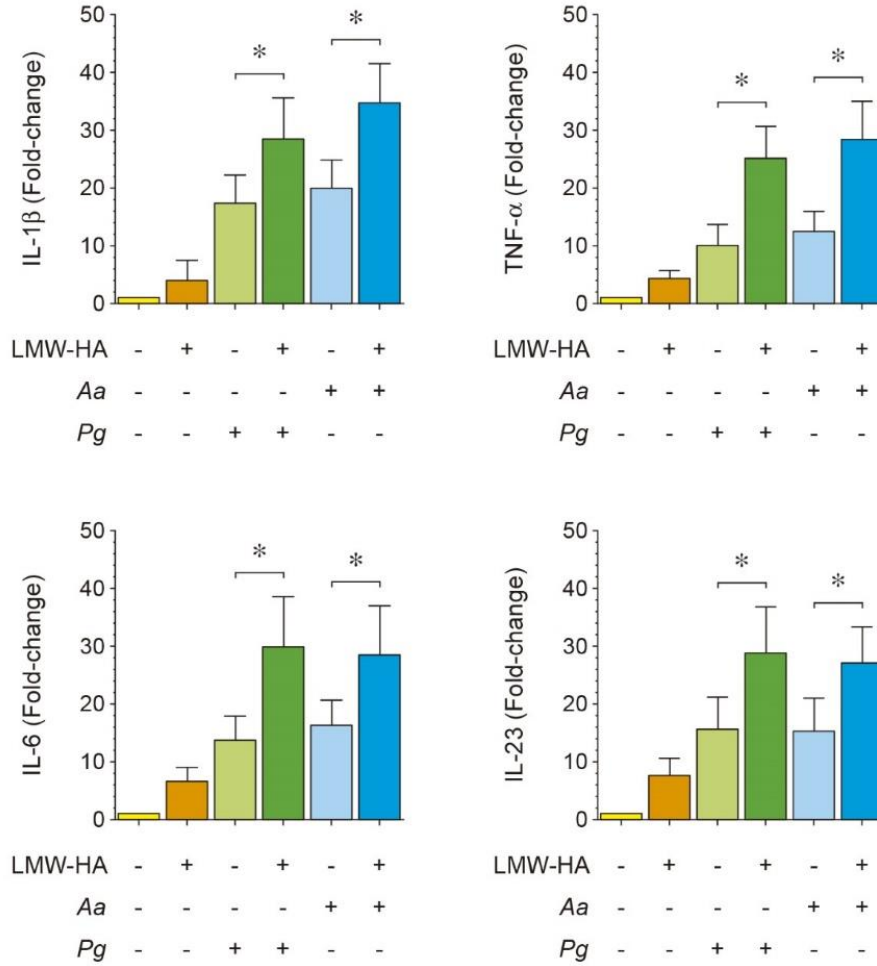


Figura 3. Expresión de citoquinas en CDs expuestas a LMW-HA y estimuladas con *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans*. A partir de 4 experimentos independientes se cuantificaron los niveles de mRNA de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-23 y TNF- α en CDs estimuladas con LMW-HA 100 μ g/mL y expuestas a *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*. Los niveles de expresión obtenidos en células sin estimular fueron considerados como valor 1 para la cuantificación relativa. *p<0,05.

Niveles de expresión de los factores de transcripción BATF3, IRF4, IRF8 y NOTCH2

Los niveles de expresión de los diferentes factores de transcripción en CDs expuestas a LMW-HA y estimuladas con *P. gingivalis* o *A. actinomycetemcomitans* fueron cuantificados mediante RT-qPCR (Figura 4). Se detectaron mayores niveles de expresión de BATF3, IRF4, NOTCH2 y en CDs estimuladas con LMW-HA 100 µg/mL y *A. actinomycetemcomitans*, en comparación a las CDs estimuladas únicamente con la bacteria. Adicionalmente, se detectaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción IRF4 y NOTCH2 en CDs estimuladas con LMW-HA 100 µg/mL y *P. gingivalis*, comparadas con las CDs estimuladas solo con la bacteria. Para el grupo estimulado con *A. actinomycetemcomitans* y LMW-HA, los aumentos en la expresión relativa fueron de 1,8 veces para IRF4 ($p=0,005$), 1,7 veces para NOTCH2 ($p=0,032$) y 1,5 veces para BATF3 ($p=0,04$). Para el grupo estimulado con *P. gingivalis* y LMW-HA, los aumentos en la expresión relativa fueron de 2,1 veces para IRF4 ($p=0,003$) y 1,9 veces para NOTCH2 ($p=0,033$). Con respecto a IRF8 no se detectaron incrementos estadísticamente significativos en ninguna de las condiciones experimentales.

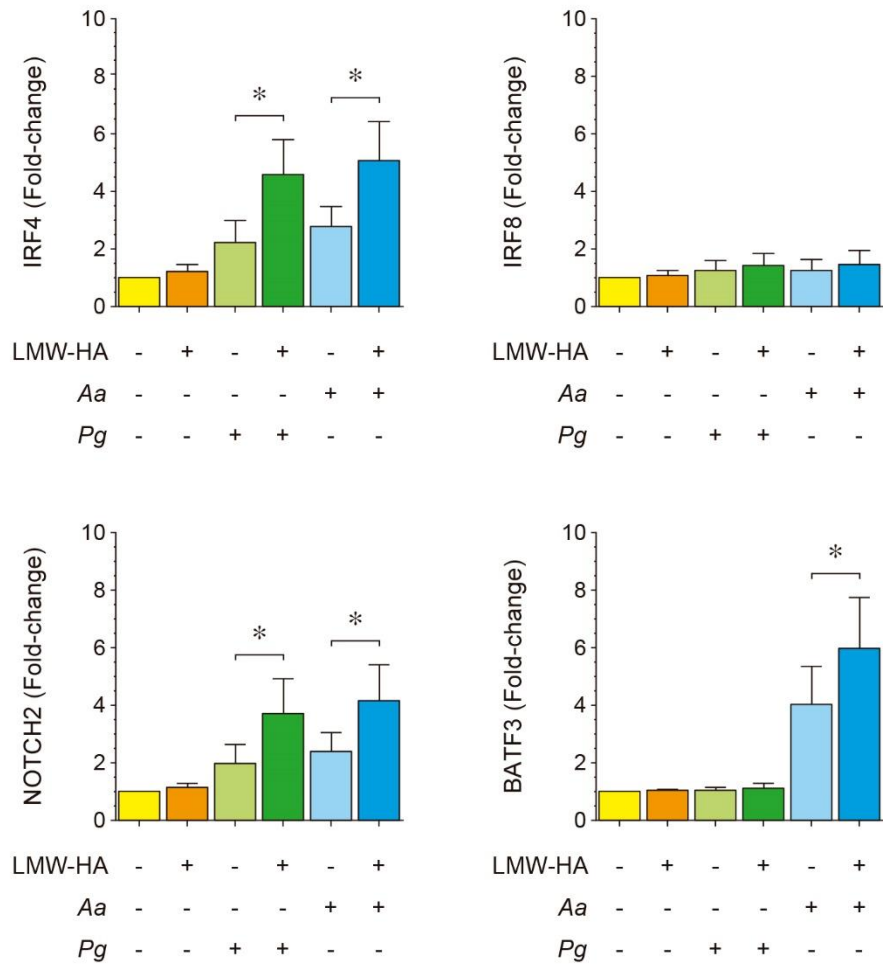


Figura 4. Niveles de expresión de los factores de transcripción BATF3, IRF4, IRF8 y NOTCH2. A partir de 4 experimentos independientes se cuantificaron los niveles de mRNA de los factores de transcripción BATF3, IRF4, IRF8 y NOTCH2 en CDs estimuladas con LMW-HA 100 µg/mL y expuestas a *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*. Los niveles de expresión obtenidos en células sin estimular fueron considerados como valor 1 para la cuantificación relativa. *p<0,05.

Discusión

El LMW-HA es un glicosaminoglicano no sulfatado que puede formarse en los sitios de la inflamación a partir de la fragmentación del HA, componente de la matriz extracelular de los tejidos mineralizados y no mineralizados del organismo. Desde un punto de vista inmune, el LMW-HA actúa como DAMP, ya que promueve la producción de citoquinas proinflamatorias por células inmunes como monocitos y CDs (Braza et al., 2016; Hull et al., 2015; Powell and Horton, 2005; Petrey and de la Motte, 2014; Rizzo et al., 2014). En los tejidos periodontales, el LMW-HA se asocia a la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos implicados en la formación del hueso alveolar (Fujioka-Kobayashi et al., 2017) y la inducción de apoptosis en los fibroblastos gingivales (Tanne et al., 2013), lo que favorece la pérdida de homeostasia y la destrucción de los tejidos periodontales. En este estudio se analizó el efecto del LMW-HA en la inmunidad inducida en CDs cuando son estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis* y se demostró que el LMW-HA incrementa la expresión de los factores de transcripción y citoquinas proinflamatorias inducida por estas bacterias.

En este trabajo se analizó el efecto dosis/respuesta del LMW-HA en las CDs, cuantificando la expresión de citoquinas proinflamatorias inducida ante diferentes concentraciones de LMW-HA (25, 50 o 100 µg/mL) fisiológicamente relevantes de acuerdo a lo reportado previamente (Jordan et al., 2014; Wang et al., 2016; Yamawaki et al., 2009; Stabler et al., 2017). El LMW-HA indujo una estimulación dependiendo de la dosis, donde a 100 µg/mL se produjo el mayor efecto inmunomodulador en la expresión de las citoquinas (Figura 2), lo que es coherente con resultados previos que utilizaron concentraciones de 25, 50, 100 y 200 µg/mL de LMW-HA y que determinaron que a 100 µg/mL se induce la mayor proliferación de linfocitos T y B (Ke et al., 2013). En este contexto, se analizó el efecto de la estimulación celular con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis* posterior a la exposición con LMW-HA 100 µg/mL (Figura 3). Sobre la base de los resultados de este análisis, se sugiere que el LMW-HA podría estar implicado en la generación de

un microambiente celular local que favorece y eventualmente potencia el efecto inmunogénico de las bacterias periodontopatógenas sobre las CDs.

El LMW-HA señala a través de los receptores TLR2 y TLR4 expresados en las CDs (Yamawaki et al., 2009; Scheibner et al., 2006; Termeer et al., 2002). En este contexto, la producción de citoquinas en las CDs estimuladas con serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* o serotipo K1 de *P. gingivalis* es dependiente de TLR2 y TLR4 (Díaz-Zúñiga et al., 2015), lo cual nos permite especular que vías de señalización dependientes de TLR comunes entre estas bacterias y el LMW-HA podrían tener alguna implicancia en el efecto inductor de LMW-HA en la expresión de citoquinas proinflamatorias. De esta manera, el LMW-HA podría estar actuando como una molécula coadyuvante en la señalización TLR2 y TLR4, incrementando la afinidad de estos receptores por las bacterias o formando complejos con compuestos bacterianos más fácilmente reconocibles por los receptores, tal como ocurre con otros DAMPs, como la proteína HMGB1 que forma complejos con LPS bacteriano (Qin et al., 2014). De esta forma la respuesta inmune se desarrolla tras la participación de estos DAMPs en dichos complejos que se unen a los TLR en lugar de unirse individualmente al receptor (Rani et al., 2017). También el LMW-HA podría estar contribuyendo a generar efectos aditivos en la respuesta de las CDs por medio de sus propias señalizaciones. Por ejemplo, si una CD reconoce a *P. gingivalis* mediante TLR4, la activación de NF- κ B, factor de transcripción clave en la regulación de la expresión de citoquinas, podrá ser estimulada además por el LMW-HA a través de TLR2, de esta forma podría haber sinergia entre ambas señales inmuno-estimuladoras. Sin embargo, se ha establecido que el LMW-HA podría inducir también una regulación negativa de estos receptores durante la maduración de las CDs (Rizzo et al., 2014). Otro mecanismo por el cual el LMW-HA estaría potenciando la inflamación sería mediante la importación intracelular de los fragmentos por parte de las bacterias. En un estudio reciente, se reportó la vía metabólica por la cual las bacterias incorporan fragmentos de HA. En específico, se han detectado sitios de unión del HA a sistemas proteicos de *Streptobacillus moniliformis* que degradan el HA a disacáridos y lo importan al periplasma bacteriano para luego ser metabolizado (Oiki et al., 2017). De esta forma, el HA

estaría siendo un sustrato de nutrición bacteriana y con esto un factor de invasión a los tejidos. Por lo tanto, al encontrarse en una conformación de bajo peso molecular favorecería aún más este proceso de importación celular de los fragmentos.

En las CDs, las citoquinas expresadas dependen del subtipo celular que ha sido estimulado (Murphy, 2013), lo que determina la activación de un patrón de respuesta inmune adaptativa particular (Bluestone et al., 2009). Al respecto, las cCDs se asocian principalmente al reconocimiento y presentación de antígenos de origen bacteriano (Geginat et al., 2015; Nizzoli et al., 2014). En este sentido, el LMW-HA por sí sólo no indujo la sobreexpresión de los factores de transcripción estudiados. Así, las CDs expuestas a LMW-HA sólo en presencia de *A. actinomycetemcomitans* incrementan los niveles de BATF3, IRF4 y NOTCH2, y en presencia de *P. gingivalis* incrementan los niveles de IRF4 y NOTCH2 (Figura 4).

El factor de transcripción BATF3 es clave en la activación de subtipo cCD1, el que se asocia al desarrollo de un patrón de respuesta inmune Th1 (Chandra et al., 2017). IRF4, por su parte, es el factor de transcripción maestro de la activación del fenotipo cCD2, también asociado a la inmunidad tipo Th1 (Nizzoli et al., 2014). Sin embargo, cuando IRF4 se sobreexpresa junto a NOTCH2, tal como se detecta en el presente estudio ante ambas bacterias, se predetermina un fenotipo cCD2 específico (Bedoui and Heath, 2015; Tussiwand and Gautier, 2015), el que está relacionado con la producción de IL-6 e IL-23 y la inducción de un patrón de respuesta inmune Th17 y Th22 (Collin and Bigley, 2018). En particular, *A. actinomycetemcomitans* estaría induciendo los fenotipos cCD1 y cCD2 y el LMW-HA estaría potenciando esta diferenciación. Previamente, se ha establecido que el LMW-HA induce un fenotipo de CD madura, incrementando la expresión de la molécula coestimuladora CD86 y MHC-II, al cual se conjugan los antígenos (Rizzo et al., 2014); no obstante, este es el primer estudio que lo relaciona con subtipos de CDs particulares. Consistentemente, el LMW-HA indujo un incremento en la expresión de IL-1 β y TNF- α , relacionadas con un patrón de respuesta tipo Th1; además, indujo la sobreexpresión de IL-6 e IL-23, citoquinas relacionadas con la inmunidad tipo Th17 y Th22. Pese a que la expresión de BATF3 determina la etapa

final de maduración del linaje cCD1 (Chandra et al., 2017), su sobreexpresión suele estar acompañada con la de IRF8. Sin embargo esto no ocurrió en el presente estudio, lo que podría estar relacionado con que el GM-CSF utilizado durante el protocolo de diferenciación de las CDs podría inducir la inhibición temprana de IRF8, sin afectar los niveles de IRF4 y BATF3 (Collin and Bigley, 2018; Briseño et al., 2016). De esta forma, las CDs derivadas de monocitos, utilizadas en este trabajo, podrían presentar variaciones fenotípicas en los programas de transcripción de cCD1 humanos, pero que presentan similitudes con el subtipo cCD2. Esto podría representar una limitación de este estudio que podría mejorarse mediante el uso de protocolos de obtención de cCDs (Balan et al., 2014).

Por otro lado, las CDs estimuladas con *P. gingivalis* incrementaron la expresión de IRF4 y NOTCH2 en presencia de LMW-HA, por lo que también estarían promoviendo la activación de cCD2. Sin embargo, esta combinatoria no indujo la sobreexpresión de BATF3, por lo que no se asociaría a una respuesta mediada por cCD1. Se puede especular entonces que *A. actinomycetemcomitans* estaría implicado en la inducción de la diferenciación de más subtipos de CDs involucrados en respuesta inflamatoria y fenómenos osteodestructivos en comparación a *P. gingivalis*, el que induciría sólo una respuesta inflamatoria mediante un único subtipo de CD. Esto sería consistente con la mayor inmunogenicidad de *A. actinomycetemcomitans* en comparación a *P. gingivalis* reportada previamente en CDs (Vernal et al., 2008). En particular, la respuesta Th1 ante *A. actinomycetemcomitans* se asociaría a la actividad de las cCD1 y cCD2 y la respuesta Th1 ante *P. gingivalis* se asociaría a la actividad de las cCD2. Esto es consistente con el patrón de receptores expresados por cada subtipo: tanto cCD1 como cCD2 expresan TLR2, mientras que TLR4 solo es expresado en cCD2 (Jongbloed et al., 2010; Von Bubnoff et al., 2012; Leal Rojas et al., 2017; Nizzoli et al., 2014). Como la actividad inmunoestimuladora de *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, se desencadena en gran parte por la unión con el receptor TLR2, mientras que la de *P. gingivalis* serotipo K1, lo hace mediante TLR4, la respuesta cCD ante *P. gingivalis* solo podría estar mediada por cCD2. Si bien se detectaron patrones de respuesta diferentes ante ambas bacterias, en los dos casos se puede

establecer que el LMW-HA no altera estas tendencias, pero aumenta la magnitud de la respuesta, potenciando la diferenciación de las cCD1 y cCD2.

En este trabajo de investigación se analizó la expresión de los mRNA de las citoquinas y factores de transcripción expresados por las CD mediante RT-qPCR dado que es un método rápido y el más sensible para cuantificar bajos niveles de expresión de un marcador particular (Giulietti et al., 2001). Aunque los datos son concluyentes, es necesario ratificarlos a nivel de proteína. Otra limitación de este trabajo es que al ser un estudio *in vitro* las condiciones en un ambiente inflamatorio periodontal *in vivo* pueden ser diferentes, ya que el LMW-HA podría actuar de manera diferente en presencia de otros DAMPs o mediadores locales, los cuales podrían inducir una sobrefragmentación de esta molécula hasta disacáridos que no tienen actividad inmunoestimuladora (Kolar et al., 2015). Además, como la periodontitis es una enfermedad polimicrobiana, otras bacterias podrían estar interviniendo en el efecto final que tengan los DAMPs durante la inflamación.

El aspecto traslacional de este estudio radica en la importancia de los DAMPs liberados durante las periodontitis destructivas y su rol en la patogenia de la enfermedad; así, estas señales podrían contribuir al desarrollo de lesiones periodontales más severas o a la cronicidad de la enfermedad. La periodontitis se caracteriza por una respuesta inmunoinflamatoria desregulada que conduce a un estado inflamatorio crónico y a la destrucción del tejido que sostiene los dientes. Durante la destrucción de la matriz extracelular, la generación de LMW-HA activa las CD y, en consecuencia, promueve la respuesta inmune adaptativa (Powell and Horton, 2005). De hecho, el LMW-HA favorece la presentación de antígenos induciendo la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (Termeer et al., 2000), estimula la migración de CD hacia los ganglios linfáticos (Rizzo et al., 2014) y aumenta la expresión de citoquinas relacionadas con cCD1 / cCD2 y factores de transcripción, como se demostró en la presente investigación. Por lo tanto, durante la periodontitis, el LMW-HA podría actuar como un fuerte adyuvante de la respuesta inmune adaptativa contra los patógenos periodontales, promoviendo la descomposición de los tejidos periodontales, la formación adicional

de LMW-HA y, por lo tanto, la cronicidad de la enfermedad. Por otro lado, si bien el tratamiento periodontal convencional propone la desorganización mecánica de las bacterias que componen la placa bacteriana disbiótica, esta misma acción mecánica podría contribuir a la generación de DAMPs, favoreciendo la activación de la respuesta inmune y por ende la cronicidad de la enfermedad, lo que también podría ser válido para el éxito de implantes dentales, el pronóstico de cirugías del territorio máxilofacial y cualquier otro medio invasivo de terapia orofacial. De acuerdo con este modelo propuesto, en este experimento cobra relevancia la exposición con LMW-HA previa a la estimulación con bacterias para generar, al menos parcialmente, un microambiente comparable con el ambiente subgingival de un sujeto sometido a este tipo de tratamientos. De esta forma, al quedar las CDs presensibilizadas con LMW-HA luego del tratamiento mecánico, la enfermedad podría recurrir ante una posterior noxa bacteriana. Así, el tratamiento convencional debería complementarse con otras estrategias que contemplen a los DAMPs como blancos terapéuticos; por ejemplo, mediante terapias complementarias que aborden la disminución de la producción de estas señales, o bien limiten su señalización en las células inmunes. En esta línea, el condroitín sulfato se ha propuesto como una molécula antiinflamatoria, debido a su capacidad de inhibir la actividad NF- κ B inducida por la interacción celular con las bacterias patógenas y los fragmentos de HA (Stabler et al., 2017). Además, se han estudiado los efectos que producen moléculas de HA de alto peso molecular, tal como el HMW-HA, el cual cumpliría un rol antiinflamatorio y antibacteriano durante la periodontitis (Bertl et al., 2015). Los disacáridos de HA, por su parte, pueden bloquear la señalización vía TLR2 y TLR4, disminuyendo la señalización proinflamatoria (Kolar et al., 2015). Estos antecedentes permiten orientar otro posible blanco terapéutico, basado en el bloqueo específico de la señalización vía TLR mediante el uso de disacáridos de HA. Así, las potenciales estrategias terapéuticas estarían orientadas a la generación de un balance entre las moléculas antiinflamatorias (condroitín sulfato, HLMW-HA y disacáridos de HA) y proinflamatorias (LMW-HA y otros DAMPS) derivadas de la matriz extracelular, para favorecer el estado de salud y promover los mecanismos reparativos de los tejidos periodontales. De cualquier forma, la integridad de la

matriz extracelular de los tejidos periodontales debe ser una variable importante a considerar al momento de proponer nuevas estrategias terapéuticas que sean efectivas y sin efectos secundarios.

Conclusión

El Hialuronano de bajo peso molecular (LMW-HA) induce un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias y factores de transcripción inmunoreguladores en células dendríticas estimuladas con *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*.

Bibliografía

Armitage GC (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4:1–6.

Azuma M (2006). Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res* 41:361–373.

Baba N, Rubio M, Kenins L, Regairaz C, Woisetschlager M (2012). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAF347 selectively acts on monocytes and naïve CD4⁺ Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells. *Hum Immunol* 73:795–800.

Balan S, Ollion V, Colletti N, Chelbi R, Montanana-Sanchis F, Liu H (2014). Human XCR1⁺ Dendritic cells derived in vitro from CD34⁺ progenitors closely resemble blood dendritic cells, including their adjuvant responsiveness, contrary to monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 193:1622–1635.

Banchereau J, Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–252.

Bansal J, Kedige SD, Anand S (2010). Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. *Indian J Dent Res* 21:575-578.

Bedoui S, Heath WR (2015). Krüppel-ling of IRF4-dependent DCs into two functionally distinct DC Subsets. *Immunity* 42:785–787.

Bertl K, Bruckmann C, Isberg PE, Klinge B (2015). Hyaluronan in non-surgical and surgical periodontal therapy: A systematic review. *J Clin Periodontol* 42:236–246.

Bigley V, Barge D, Collin M (2016). Dendritic cell analysis in primary immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 16:530–540.

Bluestone JA, MacKay CR, O’Shea JJ, Stockinger B (2009). The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811–816.

Bomfim GF, Rodrigues FL, Carneiro FS (2017). Are the innate and adaptive immune systems setting hypertension on fire? *Pharmacol Res* 117:377–393.

Bowden DJ, Byrne CA, Alkhayat A, Eustace SJ, Kavanagh EC (2017). Injectable viscoelastic supplements: A review for radiologists. *Am J Roentgenol* 209:883–888.

Braza F, Brouard S, Chadban S, Goldstein DR (2016). Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes. *Nat Rev Nephrol* 12:281–290.

Briseño CG, Haldar M, Kretzer NM, Wu X, Theisen DJ, Wumesh KC (2016). Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Rep* 15:2462–2474.

Von Bubnoff D, Sell U, Arriens S, Specht S, Hoerauf A, Bieber T (2012). Differential expression of toll-like receptor 2 on dendritic cells from asymptomatic and symptomatic atopic donors. *Int Arch Allergy Immunol* 159:41–50.

Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B (2016). Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *Int J Immunopathol Pharmacol* 29:572–582.

Chandra J, Kuo PTY, Hahn AM, Belz GT, Frazer IH (2017). Batf3 selectively determines acquisition of CD8⁺ dendritic cell phenotype and function. *Immunol Cell Biol* 95:215–223.

Collin M, Bigley V (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154:3–20.

Darveau RP (2010). Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 8:481–490.

Díaz-Zúñiga J, Melgar-Rodríguez S, Alvarez C, Monasterio G, Benítez A (2015). T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent. *J Periodontal Res* 50:824–835.

Díaz-Zúñiga J, Monasterio G, Alvarez C, Melgar-Rodríguez S, Benítez A (2015). Variability of the Dendritic Cell Response Triggered by Different Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* Is Toll-Like Receptor 2 (TLR2) or TLR4 Dependent. *J Periodontol* 86:108–119.

Diaz Zúñiga J (2012). Virulence and variability on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their association to periodontitis. *Rev Clin Periodoncia Implant Rehabil Oral* 5:40–45.

Fujioka-Kobayashi M, Müller H-D, Mueller A, Lussi A, Sculean A, Schmidlin PR (2017). In vitro effects of hyaluronic acid on human periodontal ligament cells. *BMC Oral Health* 17:44.

Gallo PM, Gallucci S (2013). The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front Immunol* 10:4-138.

Geginat J, Nizzoli G, Paroni M, Maglie S, Larghi P, Pascolo S (2015). Immunity to Pathogens Taught by Specialized Human Dendritic Cell Subsets. *Front Immunol* 13:6-527.

Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V (2017). Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog* 113:303–311.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001). An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25:386–401.

Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14:571–578.

Hajishengallis G, Lamont RJ (2012). Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* 27:409–419.

van Hamburg JP, Tas SW (2018). Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 87:69–81.

Harvey JD (2017). Periodontal Microbiology. *Dent. Clin. North Am.* 61:253–269.

Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S (2015). Mechanisms of bone resorption in

periodontitis. *J Immunol Res* 2015:615486.

Hull RL, Bogdani M, Nagy N, Johnson PY, Wight TN (2015). Hyaluronan: A Mediator of Islet Dysfunction and Destruction in Diabetes? *J Histochem Cytochem* 63:592–603.

Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 207:1247–1260.

Jordan AR, Lokeshwar SD, Lopez LE, Hennig M, Chipollini J (2014). Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid fragments in pre-clinical models of bladder cancer. *Oncotarget* 8:24262–24274.

Ke C, Wang D, Sun Y, Qiao D, Ye H, Zeng X (2013). Immunostimulatory and antiangiogenic activities of low molecular weight hyaluronic acid. *FOOD Chem. Toxicol* 58:401–407.

Kinane DF (2002). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 25:8–20.

Kolar SL, Kyme P, Tseng CW, Soliman A, Kaplan A (2015). Group B Streptococcus Evades Host Immunity by Degrading Hyaluronan. *Cell Host Microbe* 18:694–704.

Könönen E, Müller HP (2014). Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 65:46–78.

Kornman KS (2008). Mapping the pathogenesis of periodontitis: A new look. *J Periodontol* 79:1560–1568.

Kurgan S, Kantarci A (2017). Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontol 2000* 76:51–67.

Land WG (2015). The role of damage-associated molecular patterns in human diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos Univ. Med J* 15:9–21.

- Leal Rojas IM, Mok W-H, Pearson FE, Minoda Y, Kenna TJ, Barnard RT (2017). Human Blood CD1c⁺ Dendritic Cells Promote Th1 and Th17 Effector Function in Memory CD4⁺ T Cells. *Front Immunol* 8:971.
- Lee W, Kim HS, Hwang SS, Lee GR (2017). The transcription factor Batf3 inhibits the differentiation of regulatory T cells in the periphery. *Exp Mol Med* 49:393.
- Li Y, Liu X, Duan W, Tian H, Zhu G (2017). Batf3-dependent CD8 α ⁺Dendritic Cells Aggravates Atherosclerosis via Th1 Cell Induction and Enhanced CCL5 Expression in Plaque Macrophages. *EBioMedicine* 18:188–198.
- Liang J, Jiang D, Noble P (2011). Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiol Rev* 91:221–264.
- Liang J, Jiang D, Noble PW (2015). Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 97:186–203.
- Ma J, Yu H, Yin X, Cheng M, Shi Q (2015). E2-2, a novel immunohistochemical marker for both human and monkey plasmacytoid dendritic cells. *Biophys Reports* 1:139–147.
- Mann DL (2011). The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: For whom the cell tolls. *Circ Res* 108:1133–1145.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol* 31:563–604.
- Murphy KM (2013). Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. 1st ed. Elsevier Inc.
- Nam S, Lim J-S (2016). Essential role of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in immune cell development. *Arch Pharm Res* 39:1548–1555.
- Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet Med* 53:397–411.
- Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, Steinfelder S, Facciotti F, Gruarin P (2014). Human

CD1c⁺ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122:932–942.

Oiki S, Mikami B, Maruyama Y, Murata K, Hashimoto W (2017). A bacterial ABC transporter enables import of mammalian host glycosaminoglycans. *Sci Rep* 7:1–16.

Olsen I, Lambris JD, Hajishengallis G (2017). *Porphyromonas gingivalis* disturbs host–commensal homeostasis by changing complement function. *J Oral Microbiol* 9:1340085.

Perry MB, MacLean LM, Brisson JR, Wilson ME (1996). Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur J Biochem* 242:682–688.

Petrey AC, de la Motte CA (2014). Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol* 5:1–13.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW (2005). Periodontal diseases. *Lancet* 366:1809–1820.

Powell JD, Horton MR (2005). Threat matrix: Low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol Res* 31:207–218.

Pulendran B, Tang H, Denning TL (2008). Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20:61–67.

Qin Y, Chen Y, Wang W, Wang Z, Tang G, Zhang P (2014). HMGB1-LPS complex promotes transformation of osteoarthritis synovial fibroblasts to a rheumatoid arthritis synovial fibroblast-like phenotype. *Cell Death Dis* 5:1–10.

Rani M, Nicholson SE, Zhang Q, Schwacha MG (2017). Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation. *Burns* 43:297–303.

Rizzo M, Bayo J, Piccioni F, Malvicini M (2014). Low molecular weight hyaluronan-pulsed human dendritic cells showed increased migration capacity and induced

resistance to tumor chemoattraction. *Plos One* 9:107944

Satoh T, Akira S (2016). Toll-Like Receptor Signaling and its Inducible Proteins. *Microbiol Spectr* 4.

Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 177:1272–1281.

Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F (2015). Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* 41:9–22.

Song L, Dong G, Guo L, Dana G (2017). The function of dendritic cells in modulating the host response. *Mol Oral Microbiol* 12:3218–3221.

Stabler T V, Huang Z, Montell E, Vergés J, Kraus VB (2017). Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. *Osteoarthr Cartil* 25:166–174.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003). Tolerogenic Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* 21:685–711.

Stern R, Asari AA, Sugahara KN (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85:699–715.

Suzuki N, Yoshio N, Yoshida Y, Daisuke I (2005). Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotypes by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 39:2002–2005.

Tamura T (2017). Regulation of mononuclear phagocyte development by IRF8. *Japanese J Clin Hematol* 58:798–805.

Tanne Y, Tanimoto K, Okuma S, Kunimatsu R, Hirose N, Mitsuyoshi T (2013). Effects of hyaluronan oligosaccharides on apoptosis of human gingival fibroblasts. *Open Journal of Stomatology* 3:19–24.

Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T (2002).

Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 195:99–111.

Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, M. Weiss J, Prehm P (2000). Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol* 165:1863–1870.

Timmermans K, Kox M, Scheffer GJ, Pickkers P (2016). Danger in the intensive care unit: Damps in critically ill patients. *Shock* 45:108–116.

Tussiwand R, Everts B, Grajales-Reyes GE, Kretzer NM, Iwata A, Bagaitkar J (2015). Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. *Immunity* 42:916–928.

Tussiwand R, Gautier EL (2015). Transcriptional regulation of mononuclear phagocyte development. *Front Immunol* 6:1–11.

Van Der Velden U (2005). Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontol 2000* 39:13–21.

Vernal R, Leon R, Herrera D, Garcia-Sanz JA, Silva, Sanz M (2008). Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 43:689–697.

Wang Y, Han G, Guo B, Huang J (2016). Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis. *Pharmacol Reports* 68:1126–1132.

Xiao W, Dong G, Pacios S, Alnammary M, Barger LA, Wang Y (2015). FOXO1 deletion reduces dendritic cell function and enhances susceptibility to periodontitis. *Am J Pathol* 185:1085–1093.

Xu WD, Pan HF, Ye DQ, Xu Y (2012). Targeting IRF4 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 11:918–924.

Yamalik N, Kilinc K, Caglayan F, Eratalay K, Caglayan G (1998). Molecular size distribution analysis of human gingival proteoglycans and glycosaminoglycans in

specific periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 25:145–152.

Yamawaki H, Hirohata S, Miyoshi T, Takahashi K, Ogawa H, Shinohata R (2009). Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes. *Glycobiology* 19:83–92.

Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J (2010). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci* 107:11942–11947.

Zhong W, Xu X, Zhu Z, Du Q, Du H, Yang L (2017). Increased expression of IRF8 in tumor cells inhibits the generation of Th17 cells and predicts unfavorable survival of diffuse large B cell lymphoma patients. *Oncotarget* 8:49757–49772.

Anexo

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto

“Variabilidad en la expresión de citoquinas proinflamatorias y factores de transcripción inmunoreguladores en células dendríticas expuestas a hialuronano de bajo peso molecular y estimuladas con bacterias patógenas periodontales.”

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 y factores de transcripción 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 15 pacientes sanos invitados a participar voluntariamente del estudio. Los criterios de exclusión serán la prueba positiva del virus VIH y/o de hepatitis B ó C, la presencia de infecciones manifiestas durante el último mes, fiebre, alergias sintomáticas, recuentos anormales de células sanguíneas, aumento de enzimas hepáticas y consumo de medicamentos de cualquier tipo, excepto vitaminas y anticonceptivos orales.

La persona invitada a participar del estudio tiene derecho a rechazar la incorporación, retirar sus datos o abandonar el estudio en cualquier momento.

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

Toma de muestra

A las personas que participen del estudio se les tomará una muestra de sangre venosa, que se obtendrá mediante punción en una vena del antebrazo utilizando los procedimientos estándar (aguja y jeringa)

Procedimiento de laboratorio y destino de las muestras de sangre:

Las muestras de sangre se utilizarán para aislar células, las que en los experimentos se estimularán con las bacterias en estudio para analizar las

citoquinas y factores de transcripción que producen. Cualquier resto sobrante de sangre será destruido.

En las muestras de sangre NO se realizarán estudios genéticos.

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

El procedimiento de toma de muestra de sangre es inocuo y estándar. An 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:

Una vez tomada la muestra de sangre, el paciente terminará su participación en el estudio.

Beneficios de 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 en las encías y los dientes (gingivitis y periodontitis). Esto implica beneficios para el investigador y eventualmente para la odontología clínica.

Los pacientes 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. Eduardo Fernández Godoy, quien se domicilia en la calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago.

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 del 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>	