



**Escuela de Medicina
Centro de Investigaciones Biomédicas**

**PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS POR CÉLULAS
DENDRÍTICAS ESTIMULADAS POR PERIODONTO-
PATÓGENOS: ROL DE LA REGULACION MEDIADA
POR miRNA-146a, -146b, -155.**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en
Biología Celular y Molecular**

Samanta Azucena Melgar Rodríguez

Directores de Tesis:

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo

Co-Director de Tesis:

Prof. Dra. Paola Carvajal Pavez

Supervisor de Programa:

Prof. Dr. Mario Párraga San Román

Adscrito a FONDECYT 1140904

08 de diciembre de 2015



Escuela de Medicina
Programa de Magíster en Ciencias Médicas
Mención Biología Celular y Molecular

**“Producción de citoquinas por células dendríticas
estimuladas por periodonto-patógenos: Rol de la regulación
mediada por miRNA-146a, -146b y -155.”**

Samanta Azucena Melgar Rodríguez

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Prof. Dr. Rolando Vernal A. en el laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, aprobado por los miembros de la Comisión.

Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo
Director de Tesis

Prof. Dra. Paola Carvajal Pavez
Co-Director de Tesis

Prof. Dra. Irene Morales Bozo
Comisión Evaluación Tesis

Prof. Dr. Mario Párraga San Román
Comisión Evaluación Tesis

Prof. Dr. Wilfredo González Arriagada
Comisión Evaluación Tesis

**Valparaíso, Chile
2015**

ÍNDICE

1. ABREVIACIONES	4
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
3. RESUMEN	6
4. INTRODUCCIÓN	7
4.1. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	7
4.2. Células dendríticas.....	8
4.3. <i>microRNAs</i>	9
4.4. <i>miRNAs</i> en células del sistema inmune.....	10
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
6. HIPÓTESIS	13
7. OBJETIVO GENERAL	13
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
9. MATERIALES Y MÉTODOS	14
9.1. Selección de los sujetos y obtención de la muestra biológica.....	14
9.2. Cultivo de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	14
9.3. Curvas de crecimiento bacteriano	14
9.4. Purificación de monocitos	15
9.5. Diferenciación y estimulación de células dendríticas	15
9.6. Análisis del fenotipo celular	15
9.7. Purificación del RNA mensajero citoplasmático total.....	16
9.8. Síntesis de la primera cadena de cDNA.....	16
9.9. Expresión de <i>miRNAs</i> y TLRs mediante qPCR.....	16
9.10. Secreción de citoquinas pro-inflamatorias mediante ELISA.....	17
9.11. Análisis de los datos	17
10. RESULTADOS	19
10.1. Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas	19
10.2. Activación de células dendríticas	19
10.3. Niveles de secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	20
10.4. Niveles de expresión de <i>miRNAs</i> en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	21
10.5. Correlación entre los niveles de expresión de <i>miRNAs</i> y de secreción de citoquinas.....	22
10.6. Bloqueo de TLR2 y TLR4 y expresión de <i>miRNAs</i> en células dendríticas estimuladas con el serotipo b de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	24
10.7. Niveles de expresión de TLR3, TLR5 y TLR7 en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	25
10.8. Correlación entre los niveles de expresión de <i>miRNAs</i> y de TLR3 y entre los niveles de expresión de TLR3 y la de secreción de citoquinas	26
11. DISCUSIÓN	28
12. CONCLUSIONES	33
13. REFERENCIAS	34
14. ANEXOS	40
14.1. Consentimiento informado.....	40
14.2. Ficha Clínica	44
14.3. Metodología de Biopsias para tejidos periodontales.....	53
14.4. Esquema de la respuesta inmune celular ante una bacteria periodonto-patógena.....	55

1. ABREVIACIONES

AGO: **A**rgonautas (Complejo proteico necesario para la función RISC).

AP-1: **P**roteína **a**ctivadora **1**.

CD: **C**luster of **d**ifferentiation.

DO: **D**ensidad **ó**ptica.

ELISA: **E**nsayo por **i**nmuno-**a**bsorción **l**igado a **e**nzimas.

FITC: **I**sotiocianato de **F**luoresceína.

GM-CSF: **F**actor **e**stimulantes de **c**olonias de **g**ranulocitos y **m**onocitos.

IFI: Proteína **i**nductora de **i**nterferón.

IFN- γ : **I**nterferón.

IFNR: **R**eceptor del **i**nterferón.

IL: **I**nterleuquina.

KPC1: **C**omplejo **p**romotor de la ubiquitinización **Kip1**.

LPS: **L**ipopolisacárido.

MHC: **C**omplejo **m**ayor de **h**istocompatibilidad.

miRNA: **m**icro**RNA**.

MOI: **M**ultiplicidad **i**nfectante **i**ncremental.

NF- κ B: **F**actor **n**uclear **κ** **B**.

PBMCs: **C**élulas **p**eriféricas **m**ononucleares.

PBS: **T**ampón de **f**osfato **s**alino.

qPCR: **R**eacción en **c**adena de la **p**olimerasa cuantitativa en tiempo real.

PE: **F**icoeritrina.

RISC: **C**omplejo **r**ibonucleoprotéico de RNA **i**nductor del **s**ilenciamiento.

RPMI: **R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute medium.

STAT-1: **T**ransductor de **s**eñales y **a**ctivadores de **t**ranscripción **1**.

TLR: **R**eceptor **t**ipo **T**oll.

TNF- α : **F**actor de **n**ecrosis **t**umoral.

TNFR: **R**eceptor del **f**actor de **n**ecrosis **t**umoral.

UFC: **U**nidades **f**ormadoras de **c**olonias.

VRC: **C**omplejo **r**ibonucleosido **v**anadil.

2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1.</i>	<i>Pág. 19</i>
<i>Figura 2.</i>	<i>Pág. 20</i>
<i>Figura 3.</i>	<i>Pág. 21</i>
<i>Figura 4.</i>	<i>Pág. 22</i>
<i>Figura 5a.</i>	<i>Pág. 23</i>
<i>Figura 5b.</i>	<i>Pág. 23</i>
<i>Figura 5c.</i>	<i>Pág. 24</i>
<i>Figura 6.</i>	<i>Pág. 25</i>
<i>Figura 7.</i>	<i>Pág. 25</i>
<i>Figura 8a.</i>	<i>Pág. 26</i>
<i>Figura 8b.</i>	<i>Pág. 27</i>
<i>Figura 9.</i>	<i>Pág. 32</i>
<i>Tabla 1.</i>	<i>Pág. 17</i>

3. RESUMEN

Las periodontitis son un conjunto de enfermedades de naturaleza inmuno-inflamatoria y etiología infecciosa cuya causa principal es la biopelícula subgingival. Esta biopelícula está conformada por una amplia variedad de bacterias *Gram*-negativas anaerobias, entre ellas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. En particular, *A. actinomycetemcomitans* despliega su potencial patogénico mediante la expresión de diversos factores de virulencia, tal como el lipopolisacárido (LPS). Sobre la base de las variaciones estructurales y composición molecular del O-polisacárido, inmunógeno principal del LPS, en *A. actinomycetemcomitans* se describen 6 serotipos bacterianos distintos; entre ellos, los serotipos a, b y c son los de mayor prevalencia en humanos.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* poseen una inmunogenicidad distinta. En particular, cuando las células dendríticas, iniciadores de la respuesta inmuno-inflamatoria desarrollada por el hospedero, fueron estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se indujo mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias en comparación a la estimulación con los otros serotipos bacterianos.

Recientemente, se ha propuesto que los microRNAs (miRNA) cumplen un rol importante en la regulación y definición del tipo de respuesta inmune inducida ante los microorganismos. Así, podrían cumplir un rol en la variabilidad de la respuesta descrita en las células dendríticas ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

En este trabajo de investigación, se cuantificaron los niveles de expresión de los miRNA-146a, -146b y -155 en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* y se asoció su expresión a la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Las células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* expresaron mayores niveles de miRNA-146a, -146b y -155 y este incremento se asoció a una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias; permitiéndonos especular que existen vías alternas de regulación a la señalización mediada por receptores de reconocimiento de patrones microbianos, las que son capaces de determinar una respuesta variable en las células dendríticas.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans es un cocobacilo *Gram*-negativo, capnofílico, no móvil, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Suzuki et al., 2001). Clínicamente, se ha asociado tanto a la etiología de las periodontitis crónicas y agresivas (Zambon et al., 1983a, Schifferle et al., 1989, Gmur et al., 1993, Armitage, 1999, Socransky et al., 2002, van Winkelhoff et al., 2002, Gajardo et al., 2005, Socransky et al., 2005, Herrera et al., 2008), como al desarrollo de trastornos cardiovasculares, aterosclerosis, neumonías, parto prematuro y bajo peso del neonato (Asikainen et al., 1991, Lopez et al., 2002, Lopez et al., 2005, Novak et al., 2008, Zhang et al., 2010, Hyvarinen et al., 2012).

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

Los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* detectados más frecuentemente en la cavidad oral en humanos son los serotipos a, b y c, siendo el serotipo b el detectado con mayor frecuencia en pacientes afectados de periodontitis agresiva (Asikainen et al., 1991, Slots, 1999, Socransky et al., 2005, Schacher et al., 2006, Cortelli et al., 2012). Esta mayor frecuencia de detección del serotipo b se asocia a una serie de respuestas celulares inducidas por este serotipo y que participan en la patogenia de las periodontitis. En células epiteliales, inhibe la proliferación e incrementa la expresión de interleuquina (IL)-8 y la molécula de adhesión intracelular (ICAM)-1 (Shimada et al., 2008, Díaz-Zúñiga et al., 2014). En macrófagos, induce mayores niveles de secreción de IL-1 β (Takahashi et al., 1991) y, en neutrófilos, estimula una mayor resistencia a la fagocitosis (Yamaguchi et al., 1995). Estos estudios demuestran una variable inmunogenicidad en distintas células del hospedero entre

los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y estas variaciones podrían determinar diferencias en su rol etiológico en las periodontitis; sin embargo, los mecanismos asociados a esta potencial variable patogenicidad aún no se han descrito completamente (Zambon et al., 1983b, Kaplan et al., 2001, Shimada et al., 2008, Henderson et al., 2010, Díaz-Zúñiga et al., 2013).

4.2. Células dendríticas

Las células dendríticas reconocen a las bacterias infectantes mediante los receptores de reconocimiento de patrones tipo *Toll* (TLR), los que tienen la capacidad de identificar estructuras bacterianas altamente conservadas, tal como el LPS (Perry et al., 1996a, Perry et al., 1996b, Kaplan et al., 2001, Bhattacharyya et al., 2010, Kachlany, 2010). En particular, el LPS de *A. actinomycetemcomitans* es reconocido mediante TLR2 y TLR4 (Kikkert et al., 2007, Diaz-Zuniga et al., 2015b) y su vía de señalización activa el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y la proteína activadora (AP)-1, ambos factores de transcripción asociados a la producción de citoquinas y quimioquinas (Banchereau et al., 2000, Wallet et al., 2005, Kikkert et al., 2007, Zhu et al., 2008, Nussbaum et al., 2009, Bhattacharyya et al., 2010). Al ser estimuladas con LPS, las células dendríticas incrementan la producción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interferón (IFN)- γ y de las moléculas co-estimuladoras de la presentación antigénica CD80 y CD86 (Karin et al., 1997, Jacobs-Helber et al., 1998, Brightbill et al., 1999, Banchereau et al., 2000, Gasparini et al., 2009, Lawrence, 2009).

En células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos capsulares de *Porphyromonas gingivalis* se detectó un incremento en los niveles de expresión de CD80, CD83 y CD86 y un incremento en los niveles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias, con patrones de producción dependientes del serotipo bacteriano infectante (Vernal et al., 2009). Además, la cepa *P. gingivalis* 381 con fimbria mostró un efecto inductor potente de secreción de IL-12 en células dendríticas (Cutler et al., 2004), mientras que ante la cepa *P. gingivalis* O55:B5, se detectaron niveles bajos de secreción de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (Kanaya et al., 2004). En efecto, la cepa *P. gingivalis* 381 con fimbria fue más eficaz que la cepa mutante *P. gingivalis* DPG3 carente de fimbria en invadir las células dendríticas, inducir la expresión de CD80, CD83 y CD86 y la secreción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α (Cutler et al., 2004). Las células dendríticas maduras secretan IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12 (Brightbill et al., 1999) y la activación y maduración celular dependerá del antígeno reconocido y de su inmunogenicidad. En este sentido, una cepa más virulenta, como la descrita para *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, inducirá una mayor respuesta en las células dendríticas y podrá estar relacionada con la activación de distintas moléculas reguladoras de la expresión génica,

por ejemplo los microRNAs (miRNAs).

4.3. microRNAs

Los microRNAs son moléculas pequeñas de RNA endógeno de cadena simple que no codifican para proteína (Xie et al., 2011, Naqvi et al., 2013). Actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica, uniéndose por complementariedad a los mRNAs e inhibiendo su traducción a proteína; así, cumplen una función esencial en la activación, proliferación, diferenciación y homeostasis en las distintas células del hospedero (Wei et al., 2010, Nakasa et al., 2011, Chen et al., 2013, Naqvi et al., 2013, Liu et al., 2015, Kong et al., 2015). Los miRNAs fueron descritos por primera vez en *Caenorhabditis elegans*, detectándose la presencia de un gen *lin-4* que se expresa sin codificar a proteína, pero que induce cambios en la expresión de otros genes (Lee et al., 1993, Lee et al., 2001). Actualmente, se han identificando distintos miRNA en diferentes células del hospedero y se especula que todos los genes codificantes de proteínas tienen miRNAs que regulan su expresión y, así, modifican su función en las células humanas (Xie et al., 2011, Naqvi et al., 2013).

Los miRNAs se transcriben por la RNA polimerasa II que genera una molécula llamada pri-miRNA o miRNA primario, que se caracteriza por ser un RNA de doble hebra con un *loop* estructural. En el núcleo celular, el pri-miRNA es procesado por la enzima Drosha que corta simétricamente ambas cadenas en sitios cercanos a la estructura primaria para transformarlo en un pre-miRNA. Este, luego, es transportado al citosol por la exportina 5 (Yi et al., 2003, Baltimore et al., 2008, Lakshmiathy et al., 2008, Lindsay, 2008, Liston et al., 2010, Turner et al., 2011). En el citosol, el pre-miRNA es procesado por la endonucleasa RNasa III llamada Dicer que genera una doble hebra de RNA de 20 a 25 nucleótidos de longitud con dos nucleótidos colgantes por cada extremo (Baltimore et al., 2008, Lindsay, 2008). Posteriormente, las dos cadenas son separadas y una de ellas, denominada miRNA maduro, se incorpora al complejo ribonucleoprotéico de RNA inductor del silenciamiento (RISC), el cual contiene de 1 a 4 proteínas llamadas argonautas (AGO) cuya función es inhibir la transducción de los mRNAs, mientras que la otra cadena es degradada (Baltimore et al., 2008, Liston et al., 2010, Turner et al., 2011, Rebane et al., 2013).

Los miRNAs maduros son fundamentales, entre otros, en la regulación de la embriogénesis, el desarrollo del cáncer, la hematopoyesis y la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero ante infecciones virales, bacterianas y fúngicas (Pedersen et al., 2008, Naqvi et al., 2013, Rebane et al., 2013, Staedel et al., 2013). En efecto, durante la embriogénesis, los miRNA-10 y -196 regulan la formación de las extremidades inferiores (Sonkoly et al., 2008, Lund, 2010, Chen et al., 2011), el miRNA-124a induce la diferenciación de la célula progenitora neuronal a neuronas (Xu et al., 2008) y el miRNA-1 regula la diferenciación de

cardiomiocitos (Wystub et al., 2013). En lesiones neoplásicas, el miRNA-let-7a cumple un rol fundamental en la patogénesis del cáncer pulmonar (Hu et al., 2010, Naqvi et al., 2013) y los miRNA-372 y -373 inducen la oncogénesis en células germinales testiculares (Voorhoeve et al., 2007). Además, elevados niveles del miRNA-21 en glioblastomas y adenocarcinomas de mama y páncreas se asocian con una mayor progresión tumoral (Sheedy et al., 2010). En la hematopoyesis, se ha descrito que la presencia de miRNA-223 regula la diferenciación de granulocitos (Fazi et al., 2007, Garzon et al., 2007) y la expresión de miRNA-19 y -21 regulan los niveles de expresión de NF- κ B (Taganov et al., 2006, Sheedy et al., 2010). Por lo tanto, existen antecedentes que permiten proponer que los miRNAs son capaces de regular la respuesta de distintas células del sistema inmune, tal como macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, y por lo tanto, pueden determinar el tipo de respuesta inmuno-inflamatoria desplegado en el hospedero durante las infecciones (Malumbres et al., 2010, Turner et al., 2011, Naqvi et al., 2013).

4.4. miRNAs en células del sistema inmune

Durante las infecciones, los macrófagos y las células dendríticas cumplen el rol de fagocitar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos TCD4⁺ *naïve* y de memoria (Abbas et al., 1996, Banchereau et al., 2000). La fagocitosis es un proceso regulado por la actividad tioreductasa lisosomal y por la activación de la proteína inductora de interferón (IFI) (Baltimore et al., 2008, Lindsay, 2008). La expresión de IFI30 es modulada por las citoquinas producidas posterior a la activación del TLR y se ha descrito que su expresión se encuentra altamente regulada por miRNA-29b (Naqvi et al., 2013). En efecto, una disminución en los niveles de miRNA-29b incrementa los niveles de IFI30 estimulando la fagocitosis y la posterior presentación antigénica (Naqvi et al., 2013).

En monocitos y células dendríticas inmaduras se detectó la expresión de los miRNA-21, -25, -93, -106 y -342 que cumplen el rol de modular el desarrollo celular (Hashimi et al., 2009, Lu et al., 2011, Turner et al., 2011). En las células dendríticas maduras se estableció que los miRNA-146 y -155 son fundamentales en el proceso de diferenciación, maduración y proliferación celular (Turner et al., 2011, Busch et al., 2012). En particular, la expresión de miRNA-146a y -146b es inducida posterior a la activación de TLR2 y del receptor IL-1R (Baltimore et al., 2008). Al activarse estos receptores, se fosforila y activa IRAK1, que posteriormente induce la fosforilación y activación de TRAF6, que finalmente induce la activación de NF- κ B (Kawai et al., 2007). En efecto, la expresión de los miRNA-146a y -146b regula la activación de NF- κ B y esta activación determina un incremento en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias; así, estos miRNAs inducen un incremento en la respuesta inmuno-inflamatoria. Además, se ha detectado que la presencia de miRNA-146a y -146b se

asocia con la etiopatogenia de las osteoartritis (Yamasaki et al., 2009), mediante la inducción de mayores niveles de expresión y secreción de IL-1 β y TNF- α en fibroblastos (Sheedy et al., 2008) y secreción de IL-1 β , IL-8 y RANTES en células epiteliales (Perry et al., 2008).

Las células dendríticas maduras expresan también miRNA-155 posterior a la activación de TLR2, TLR4, TNFR e IFNR (Rodriguez et al., 2007, Zhou et al., 2010, Dunand-Sauthier et al., 2011, Lu et al., 2011), inhibiendo la transducción del complejo promotor de la ubiquitinización Kip1 (KPC1) y activando la transducción de p27kip1 (Lu et al., 2011, Turner et al., 2011), que favorece a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Dunand-Sauthier et al., 2011). Sin embargo, la disminución en los niveles de expresión del miRNA-155 induce menores niveles de expresión de la molécula co-estimuladora CD86 y del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II), además de la muerte celular por apoptosis (Turner et al., 2011). Estos datos demuestran que un incremento en la expresión de miRNA-155 se asocia a un aumento en la actividad de las células dendríticas y, por lo tanto, promueven su actividad pro-inflamatoria.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La variable inmunogenicidad de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* determina una respuesta inmune distinta en las células dendríticas (Zambon et al., 1983a, Kaplan et al., 2001, Shimada et al., 2008, Díaz-Zúñiga et al., 2012, Díaz-Zúñiga et al., 2014). Este periodonto-patógeno es reconocido por TLR2 y TLR4, y mediante estas vías induce la maduración de las células dendríticas, la activación de NF- κ B, la expresión de CD80, CD83, CD86 y MHC-II y, finalmente, la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Díaz-Zúñiga et al., 2013, Díaz-Zúñiga et al., 2014). Por lo tanto, los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* al tener una inmunogenicidad diferente podrían activar distintas moléculas que regulan la expresión génica en las células dendríticas, tal como los microRNAs.

En particular, miR-146a, -146b y -155 son esenciales en la regulación de las células dendríticas. Tanto miR-146a como -146b tienen la capacidad de aumentar los niveles de NF- κ B y la producción de citoquinas pro-inflamatorias y miR-155 promueve el incremento de los niveles del CD86 y MHC-II, la maduración y la activación de las células dendríticas (Turner et al., 2011, Dunand-Sauthier et al., 2011). En este contexto, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* mediante una señalización vía TLR2 y/o TLR4 podría estimular la sobre-expresión de miR-146a, -146b y -155 y, por lo tanto, incrementaría la producción de citoquinas pro-inflamatorias. De esta forma, el mecanismo intracelular de regulación funcional miRNA-dependiente podría determinar, al menos en parte, la respuesta inmune diferencial de las células dendríticas ante los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

6. HIPÓTESIS

En células dendríticas humanas, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce mayores niveles de expresión de miRNA-146a, miRNA-146b y miRNA-155 en comparación a los otros serotipos y este incremento se asocia a la señalización vía TLR2 y TLR4 y a la mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de los miRNA-146a, miRNA-146b y miRNA-155 en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* y asociar esta expresión con los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 y producción de citoquinas pro-inflamatorias.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Cuantificar los niveles de expresión de miRNA-146a, miRNA-146b y miRNA-155 en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.
- b. Cuantificar los niveles de secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.
- c. Asociar los niveles de expresión de miRNA-146a, miRNA-146b y miRNA-155 con los niveles de secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.
- d. Asociar la señalización vía TLR2 y TLR4 con los niveles de expresión de miRNA-146a, miRNA-146b y miRNA-155 y secreción de citoquinas pro-inflamatorias en células dendríticas humanas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Selección de los sujetos y obtención de la muestra biológica

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de sujetos voluntarios donantes sanos seleccionados por el método no probabilístico de casos consecutivos del banco de sangre del Hospital Del Salvador, perteneciente al Servicio de Salud Metropolitano Oriente. A partir de las leuco-reducciones obtenidas durante el proceso de plaquetoféresis, se purificaron los monocitos circulantes periféricos, tal como se describe en detalle más adelante. El estudio fue formulado y conducido de acuerdo a la Declaración de Helsinki de 1975, revisada el 2000, y su protocolo fue explicado a todos los voluntarios participantes, quienes firmaron un consentimiento informado (Protocolo #2010/14) aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) y el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

9.2. Cultivo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Se utilizaron las cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC® 43717™ (serotipo a), ATCC® 43718™ (serotipo b) y ATCC® 43719™ (serotipo c). Estas se sembraron en medio de cultivo agar infusión cerebro-corazón (Oxoid Ltd, Hampshire, England) e incubaron a 37°C en condiciones de capnofilia (O₂ al 8% y CO₂ al 12%) usando generadores CampyGen™ (Oxoid Ltd). Para obtener un número similar de microorganismos de cada serotipo para la estimulación celular, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano y se seleccionaron bacterias vivas en fase de crecimiento exponencial de tal manera que mantengan todo su potencial inmunogénico (Vernal et al., 2008).

9.3. Curvas de crecimiento bacteriano

Cada una de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* se inoculó en medio cerebro-corazón (BD, Le Pont de Claix, France) suplementado con 5 mg/L de hemina y 1mg/L de menadiona. Las muestras bacterianas se suspendieron en 10 mL de medio hasta llegar a una densidad óptica de 0,05 medida mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm (Spectronic 20; Bausch & Lomb, Rochester, NY, USA). Las lecturas de espectrofotometría se tomaron en diferentes tiempos y el experimento se detuvo cuando las bacterias llegaron a la fase de crecimiento estacionario. En cada medición de densidad óptica, se obtuvo una muestra la que fue diluida en serie log₁₀ con amortiguador de fosfato salino (PBS). Luego, se sembraron 100 µL de cada dilución y se incubaron a 37°C en condiciones anaeróbicas. Después de 3 a 7 días, el número de unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) se contabilizó y se construyeron las curvas densidad óptica *versus* tiempo y densidad óptica

versus UFC/mL, para que así en cada experimento se utilice un número conocido y similar de UFC/mL durante la estimulación celular.

9.4. Purificación de monocitos

A partir de la sangre periférica obtenida y utilizando una gradiente de concentración (Ficoll-Paque Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), se aislaron células periféricas mononucleares (PBMCs) usando protocolos estándar. Los monocitos se purificaron desde una fracción aislada de PBMCs mediante separación inmuno-magnética (MACS; Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany). En detalle, las PBMCs se lavaron 2 veces en PBS y posteriormente se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD14 humano conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 15 min a 4°C. Luego de ser lavadas 2 veces en PBS, las células se hicieron pasar a través de un campo magnético en columnas de purificación MS y se purificaron las células CD14⁺ correspondientes a los monocitos. Los monocitos purificados se contabilizaron utilizando una cámara de Neubauer® y su fenotipo se confirmó usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.5. Diferenciación y estimulación de células dendríticas

Los monocitos purificados se sometieron inmediatamente a un protocolo estandarizado de diferenciación *in vitro* a células dendríticas (Vernal et al., 2008, Vernal et al., 2009, Díaz-Zúñiga et al., 2014). Los monocitos CD14⁺ se cultivaron durante 6 días a una concentración de $0,7 \times 10^6$ células/mL en 3 mL medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA), 20 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos recombinante humano (rhGM-CSF) y 20 ng/mL de rhIL-4 (R&D, Minneapolis, MN USA) a 37°C y 5% de CO₂. Las células dendríticas diferenciadas se estimularon con las distintas cepas de *A. actinomycetemcomitans* a una multiplicidad infectante incremental (MOI) de 10² y 10¹ (razón bacterias/células dendríticas) durante 2 días. El fenotipo celular se confirmó usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

9.6. Análisis del fenotipo celular

La purificación de los monocitos, su diferenciación a células dendríticas y su posterior activación en presencia de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* se evaluó mediante citometría de flujo usando los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugados con fluorocromos PE, FITC o PE/Cy5: anti-CD14 (monocitos), anti-CD1a

(células dendríticas inmaduras), anti-CD83 (células dendríticas maduras), anti-CD80 y anti-CD86 (moléculas co-estimuladoras necesarias para la presentación antigénica a los linfocitos T) (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA). El porcentaje de células positivas de cada fenotipo fue cuantificado utilizando un equipo FACScan de citometría de flujo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

9.7. Purificación del RNA mensajero citoplasmático total

Luego de 5 días de estimulación celular, las células se lavaron dos veces en PBS y se lisaron en 400 μ L de amortiguador de lisis que contiene Igepal[®] CA-630 al 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 10 mM del vanadyl-ribonucleosidos (VRC) (Gibco Invitrogen, Carlsbad). La lisis celular completa se llevó a cabo resuspendiendo vigorosamente las células 10 veces en el amortiguador de lisis. El núcleo fue removido mediante centrifugación por 10 seg a 14.000 xg y 400 μ L del sobrenadante fueron sometidos a digestión con 25 μ g/mL de proteinasa K (Roche Ltd, Basel, Switzerland) por 30 min a 37°C, en presencia de SDS al 1% y 15 mM EDTA (FLuka Sigma-Aldrich). Posteriormente, el RNA citoplasmático total fue extraído con 400 μ L de fenol:cloroformo:isoamylalcohol 25:24:1 (Fluka Sigma-Aldrich) centrifugando por 10 min a 14.000 xg a temperatura ambiente. El RNA presente en la solución acuosa se precipitó por 1 hora a -20°C con 0,3 M de acetato de sodio, 1 mL de etanol al 100% y 20 μ g/ μ L de glicógeno (Roche Ltd), seguidamente se recuperó por centrifugación a 14.000 xg durante 30 min y se resuspendió en 20 μ L de agua milli-Q libre de RNAsas. El RNA citoplasmático total fue cuantificado usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (Synergy HT, Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT) y almacenado a -80°C a una concentración de 1 μ g/ μ L.

9.8. Síntesis de la primera cadena de cDNA

A partir de 2 μ g de RNA total se procedió a la síntesis de las primeras cadenas de cDNA mediante transcripción reversa, utilizando el kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

9.9. Expresión de miRNAs y TLRs mediante qPCR

Los niveles de expresión tanto de los miRNA-146a, -146b y -155 como de los receptores TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR7 se analizaron a partir de 50 ng de cDNA mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR), utilizando partidores específicos (*Tabla 1*) y un reactivo conjugado con SYBR Green[®] (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Utilizando un termociclador en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA), se

realizó la amplificación siguiendo el siguiente protocolo: 95°C durante 3 min y 40 ciclos de 95°C durante 3 seg y 60°C durante 30 seg. Para cuantificar los niveles relativos de expresión de los miRNAs y TLRs se usó como control endógeno el RNA nuclear U6 y la subunidad de rRNA 18S, respectivamente.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de miRNAs mediante qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

miRNA/mRNA	Secuencia madura de miRNA	Primer Forward	Primer Reverse
hsa-miR-146b-5p	tgagaactgaattccataggct	gggtgagaactgattcca	cagtgcgtgtcgtggagt
hsa-miR-146a	tgagaactgaattccatgggtt	gggtgagaactgaattcca	cagtgcgtgtcgtggagt
hsa-miR-155	ttaatgctaatacgtgataggggt	gggttaatgctaatacgtgat	cagtgcgtgtcgtggagt
RNA nuclear U6		gcttcggcagcacataactaaaat	cgcttcacgaattgctgtcat
TLR2		ctctcgggtgcggaatgct	aggatcagcaggaacagagc
TLR3		tcagcaacttcatggctaaca	ccctttgggatgctgtgt
TLR4		ccctccctgtacccttct	tccctgccttgaataccttc
TLR5		ggggatggtccttgaacac	cggggcttctgtttatctg
TLR7		ggtgcccacactcaatctg	ttaaccaattgcttccgtgct
18S		ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

9.10. Secreción de citoquinas pro-inflamatorias mediante ELISA

A partir de 100 o 200 μ L del sobrenadante de cultivos celulares, dependiendo de las instrucciones de los fabricantes, se cuantificaron los niveles de secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α mediante ELISA siguiendo los protocolos recomendados (R&D, Minneapolis, USA) y analizando la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un lector automatizado de placas (Synergy HT).

9.11. Análisis de los datos

Los datos de citometría de flujo se representaron como histogramas usando el software WinMDi 2.9 (The Scripps Research Inst., La Jolla, CA, USA) y se expresan como porcentaje promedio \pm desviación estándar de células positivas sobre el total de células analizadas en cada condición experimental. La cuantificación de los miRNAs y TLRs se muestra como niveles de expresión relativos con respecto al no inducido y utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los niveles de secreción de las citoquinas como concentración pg/mL. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software SPSS v.15.0 (Lead Technologies Inc., Charlotte, NC, USA). La normalidad de la distribución de los datos se determinó usando la prueba de

Kolgomorov-Smirnov. Las diferencias en la expresión de los marcadores de superficie se analizaron mediante la prueba χ^2 . Las diferencias en los niveles de expresión de los miRNAs y TLRs y de secreción de las citoquinas se analizaron utilizando la pruebas ANOVA y post-hoc de Tukey (gráficas de barra o puntos, mostrando promedio \pm desviación estándar) o las pruebas de Kruskal Wallis y post hoc de Dunn (gráficas de cajas y clavijas, mostrando mediana, recorrido intercuartílico Q_1-Q_3 e interpercentílico $P_{10}-P_{90}$). La asociación entre la secreción de las citoquinas y la expresión de los miRNAs y TLRs se analizó usando la prueba de correlación de Pearson o Spearman. Las diferencias se establecieron como estadísticamente significativas considerando un *p-value* < 0,05.

10. RESULTADOS

10.1. Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas

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

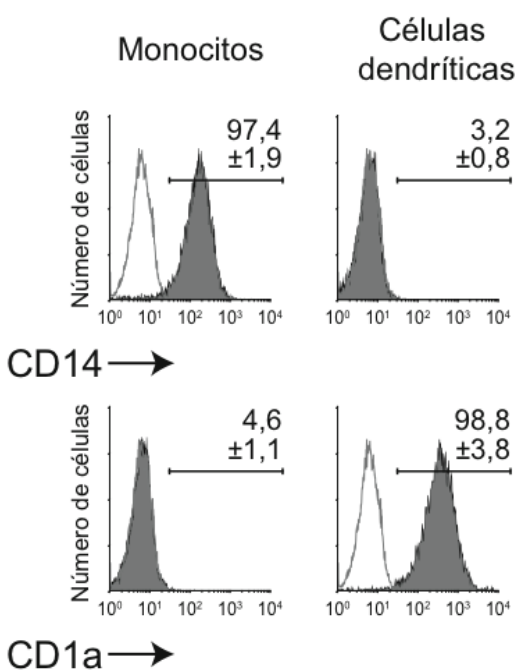


Figura 1. Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas.

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

10.2. Activación de células dendríticas

Los niveles de activación de las células dendríticas se evaluó analizando los niveles de expresión de CD80, CD83 y CD86 mediante citometría de flujo (Figura 2). Un alto porcentaje de células dendríticas activas se observó posterior a la estimulación con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*, tal como se demuestra por el incremento de los marcadores CD80 (>95%), CD83 (>95%) y CD86 (>94%). No se observaron diferencias en los niveles de activación de las células dendríticas ante la estimulación con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (CD83 $p=0,532$; CD83 $p=0,938$ y CD86 $p=0,933$).

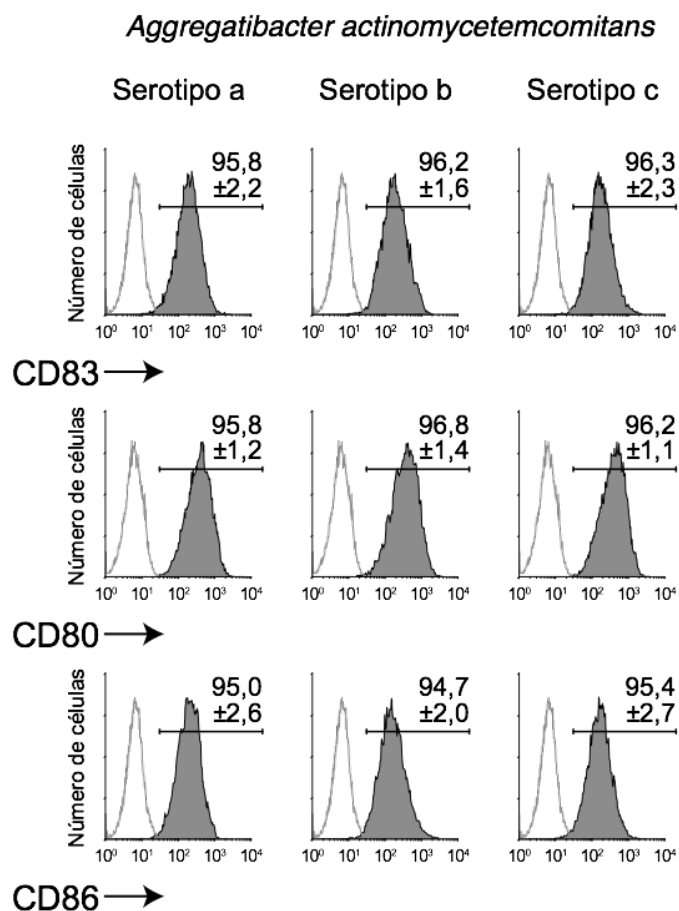


Figura 2. Activación de las células dendríticas ante los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de expresión de CD83, CD80 y CD86 que evidencian la activación de las células dendríticas luego de la estimulación durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²).

10.3. Niveles de secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* se determinaron los niveles de secreción (pg/mL) de las citoquinas IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN-γ y TNF-α, mediante ELISA (Figura 3). La secreción de citoquinas fue dependiente de la cantidad de microorganismos infectantes en cada condición experimental (MOIs=10² y 10¹). Mayores niveles de secreción de IFN-γ (MOI=10² $p < 0,001$ y MOI=10¹ $p < 0,04$), TNF-α (MOI=10² $p < 0,001$ y MOI=10¹ $p < 0,002$), IL-1β (MOI=10² $p < 0,05$), IL-12 (MOI=10² $p < 0,05$), IL-23 (MOI=10² $p < 0,05$ y MOI=10¹ $p < 0,001$) se detectaron en las células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*. Para las citoquinas IL-5 e IL-10 no se detectaron diferencias entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Además, no se detectaron diferencias de secreción para ninguna citoquina entre los serotipos a o c de *A. actinomycetemcomitans*.

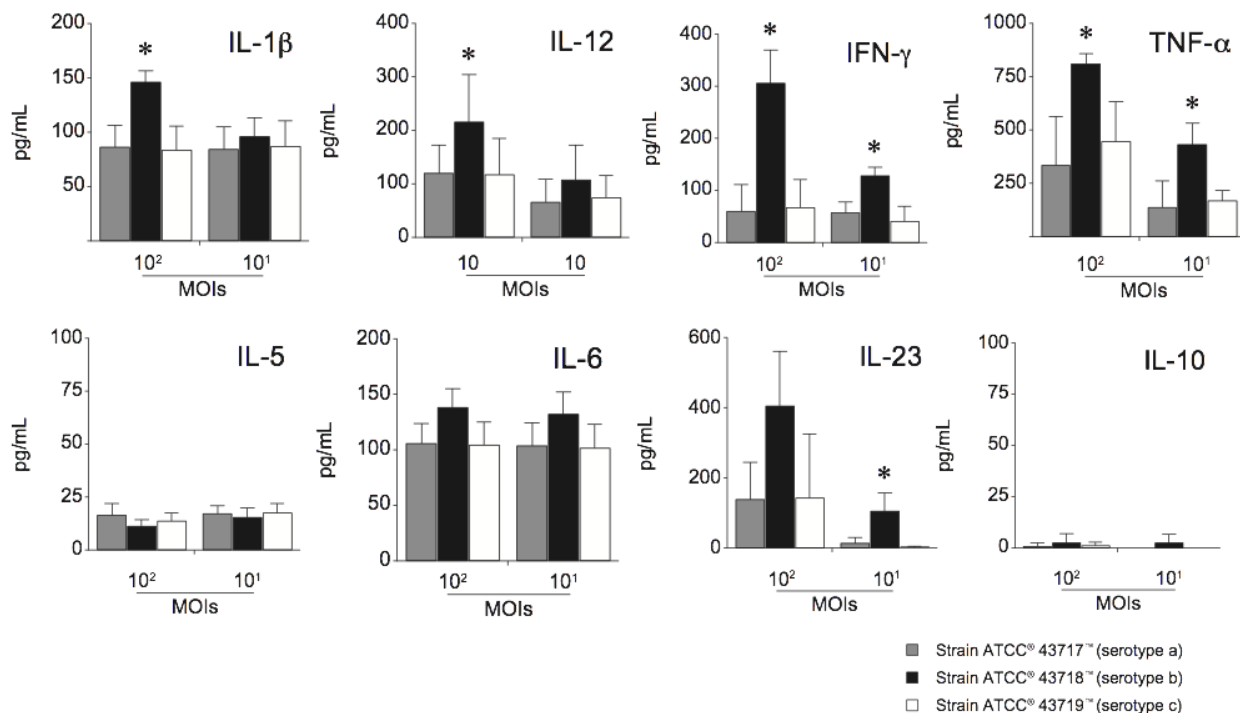


Figura 3. Niveles de secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

La secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α fue cuantificada mediante ELISA en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC[®] 43717[™]), b (ATCC[®] 43718[™]) o c (ATCC[®] 43719[™]) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²).

10.4. Niveles de expresión de miRNAs en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* se cuantificaron los niveles de expresión de los miRNAs-146a, -146b y -155 mediante qPCR (Figura 4). En todas las condiciones experimentales se detectó un incremento en los niveles de los miRNAs analizados en comparación a las células no inducidas (n.i.). Las células dendríticas estimuladas con el serotipo b expresaron mayores niveles de los miRNA-146a ($p > 0,05$ y $p = 0,029$), miRNA-146b ($p > 0,05$ y $p > 0,05$) y miRNA-155 ($p = 0,029$ y $p = 0,011$) en comparación a células dendríticas estimuladas con el serotipo a o c, respectivamente. Además, no hubo diferencias en los niveles de expresión cuando las células fueron estimuladas con los serotipos a o c.

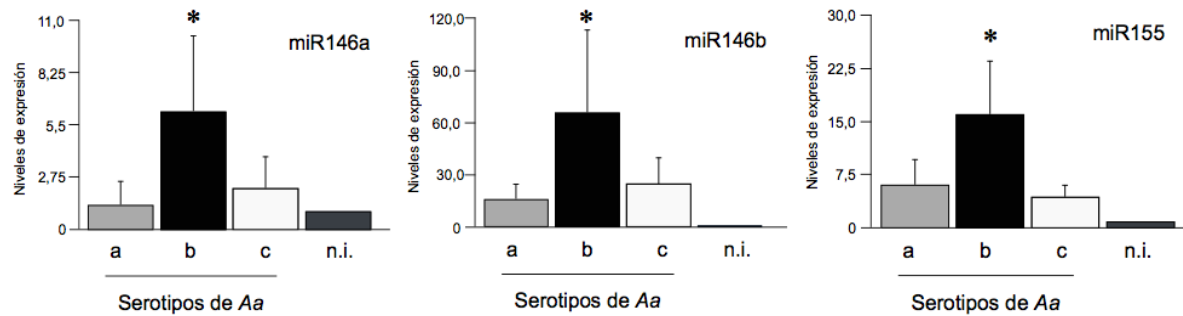


Figura 4. Niveles de expresión miRNAs en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

La expresión de los miRNAs-146a, -146b y -155 fue determinada mediante PCR cuantitativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²).

10.5. Correlación entre los niveles de expresión de miRNAs y de secreción de citoquinas

En células dendríticas estimuladas con el serotipo a de *A. actinomycetemcomitans* se detectó una correlación positiva entre los niveles de expresión de los miRNAs-146a y -155 con los niveles de secreción de las citoquinas IL-12 e IFN- γ , respectivamente (Figura 5a y 5c). De manera similar, en las células dendríticas estimuladas con el serotipo b se detectó una correlación positiva entre los niveles de expresión de los miRNAs-146a, -146b y -155 con los niveles de secreción de las citoquinas IL-12, IL-10 e IL-5 y las citoquinas IL-10 e IL-12, respectivamente (Figura 5a, 5b y 5c). Finalmente, en las células dendríticas estimuladas con el serotipo c se obtuvo una correlación positiva entre los niveles de expresión de los miRNAs-146a, -146b y -155 con los niveles de secreción de las citoquinas IL-1 β , IFN- γ e IL-1 β , respectivamente (Figura 5a, 5b y 5c). Se detectó una correlación negativa entre los niveles de expresión del miRNA-146a con la secreción de la citoquina IFN- γ (Figura 5a).

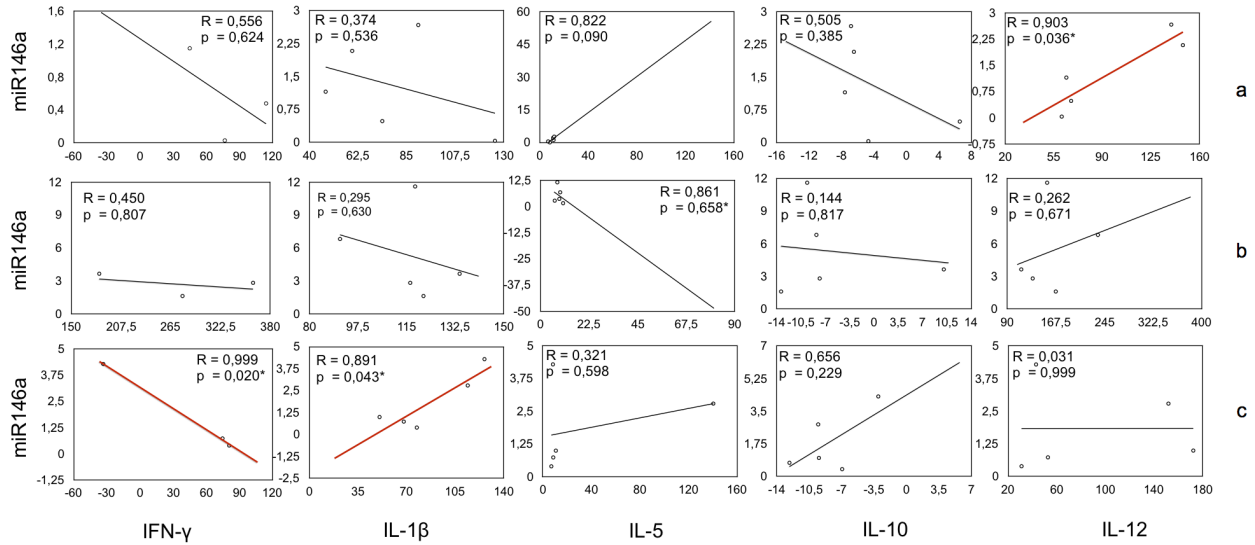


Figura 5a. Correlación entre los niveles de expresión del miRNA-146a y de secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

La expresión entre los niveles expresados del mRNA del miRNA-146a y los niveles de secreción de IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-10 e IL-12 producidos por células dendríticas estimuladas con los a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²). Los coeficientes de correlación de Pearson (r) fueron calculados a partir de 10 experimentos independientes. *p<0,05

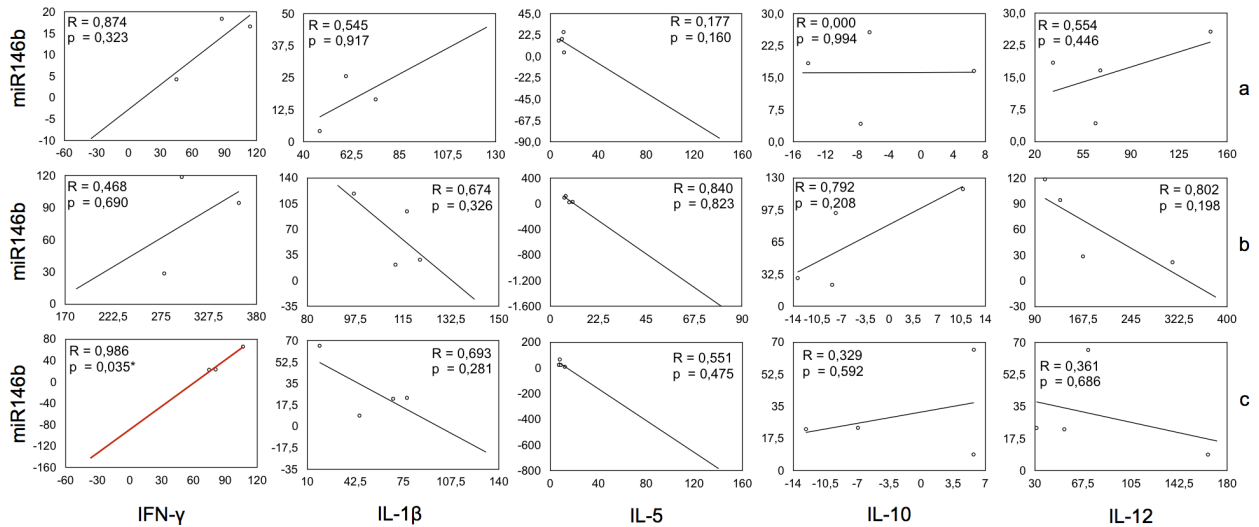


Figura 5b. Correlación entre los niveles de expresión del miRNA-146b y de secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

La expresión entre los niveles expresados del mRNA del miRNA-146b y los niveles de secreción de IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-10 e IL-12 producidos por células dendríticas estimuladas con los a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²). Los coeficientes de correlación de Pearson (r) fueron calculados a partir de 10 experimentos independientes. *p<0,05

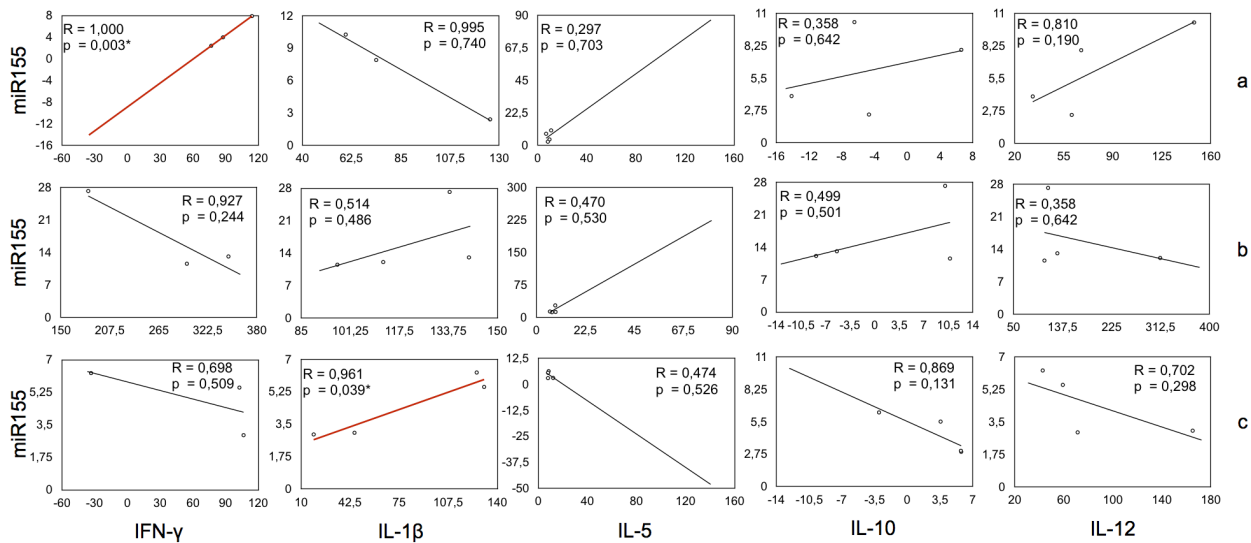


Figura 5c. Correlación entre los niveles de expresión del miRNA-155 y de secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

La expresión entre los niveles expresados del mRNA del miRNA-155 y los niveles de secreción de IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-10 e IL-12 producidos por células dendríticas estimuladas con los a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²). Los coeficientes de correlación de Pearson (r) fueron calculados a partir de 10 experimentos independientes. * $p < 0,05$

10.6. Bloqueo de TLR2 y TLR4 y expresión de miRNAs en células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*

Cuando las células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* fueron previamente expuestas a anticuerpos monoclonales anti-TLR2 o TLR4, con el objeto de bloquear la señalización específica, se detectó un incremento en los niveles de expresión de los miRNAs estudiados (Figura 6). En particular, al bloquear la señalización TLR2-dependiente se observó un aumento significativo de miRNA-146a ($p > 0,0001$), mientras con el bloqueo de la señalización TLR4 se observó un incremento no significativo en la expresión de miRNA-155 ($p > 0,05$).

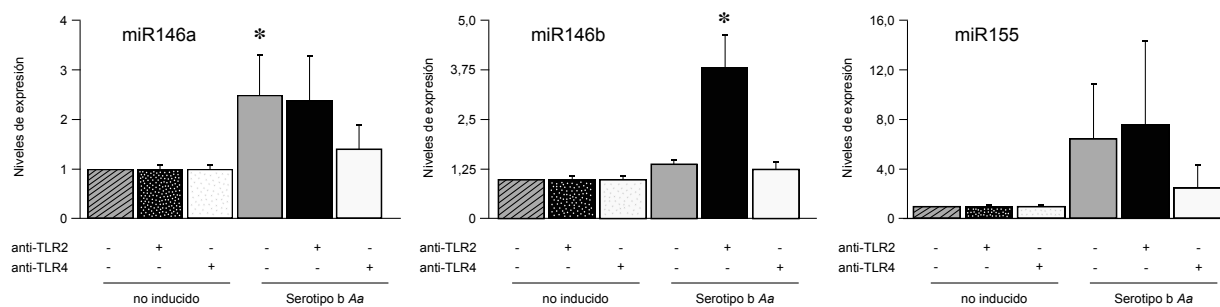


Figura 6. Bloqueo de TLR2 y TLR4 asociado a la expresión de miRNAs en células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*.

Análisis mediante PCR cuantitativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de los niveles de expresión de los miRNAs-146a, -146b y -155 que evidencian la presencia (+) o ausencia (-) de los anticuerpos monoclonales anti-TLR2 y anti-TLR4 con el serotipo b (ATCC® 43718™) de *A. actinomycetemcomitans* ($p=0,0$).

10.7. Niveles de expresión de TLR3, TLR5 y TLR7 en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* se cuantificaron los niveles de expresión de TLR3, TLR5 y TLR7 mediante qPCR (Figura 7). Las células dendríticas estimuladas con el serotipo b expresaron mayores niveles de TLR3 ($p>0,05$ y $p=0,029$) en comparación a los serotipo a o c, respectivamente. Para los TLR5 y TLR7 no se detectaron diferencias en los niveles de expresión entre los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

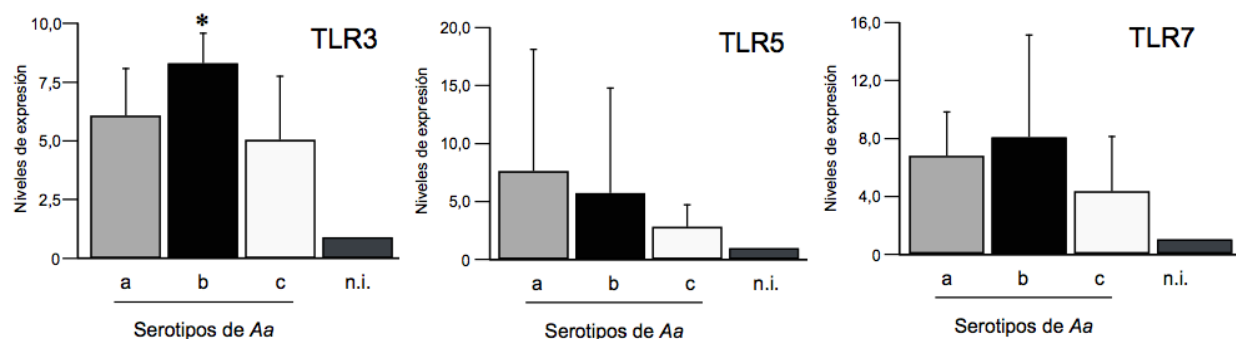


Figura 7. Niveles de expresión de TLR3, TLR5 y TLR7 en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.

La expresión de los mRNA de los TLR3, TLR5 y TLR7 fue determinada mediante PCR cuantitativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* ($MOI=10^2$).

10.8. Correlación entre los niveles de expresión de miRNAs y de TLR3 y entre los niveles de expresión de TLR3 y la de secreción de citoquinas

En células dendríticas estimuladas con el serotipo a de *A. actinomycetemcomitans* se detectó una correlación negativa entre los niveles de expresión del miRNA-146a con los de TLR3 (Figura 8a). Por otro lado, en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* no se detectó correlación significativa entre los niveles de expresión de TLR3 y la secreción de citoquinas (Figura 8b).

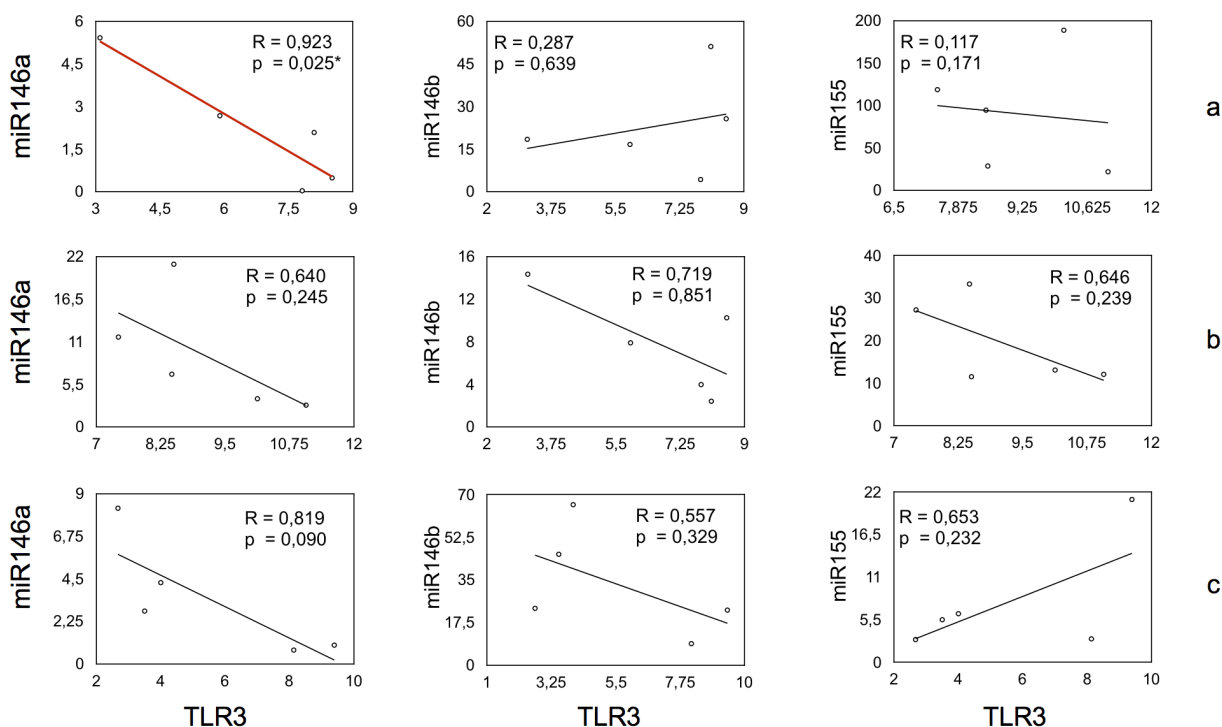


Figura 8a. Correlación entre los niveles de expresión de los miRNAs y de expresión de TLR3 en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. La expresión entre los niveles expresados del mRNA del miRNA-146a, 146b y 155 y los niveles de expresión del TLR3 producidos por células dendríticas estimuladas con los a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²). Los coeficientes de correlación de Pearson (r) fueron calculados a partir de 10 experimentos independientes. *p<0,05

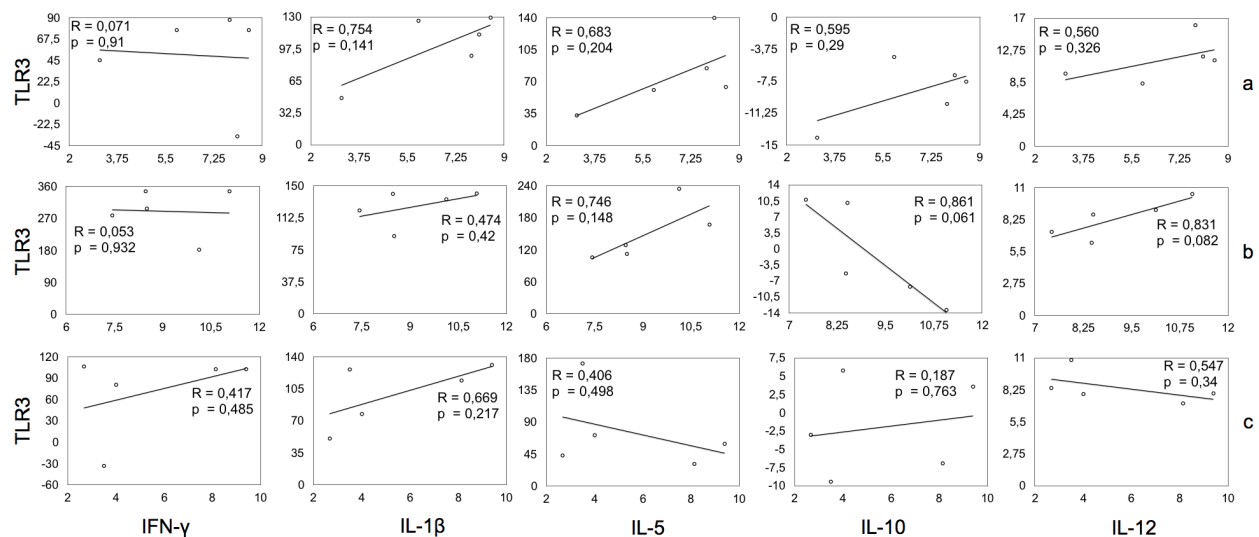


Figura 8b. Correlación entre los niveles de expresión del TLR3 y de secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*. La expresión entre los niveles expresados del TLR3 y los niveles de expresión de las citoquinas IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-10 e IL-12 producidos por células dendríticas estimuladas con los a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=10²). Los coeficientes de correlación de Pearson (r) fueron calculados a partir de 10 experimentos independientes. *p<0,05

11. DISCUSIÓN

En el presente estudio, células dendríticas humanas derivadas de monocitos de sangre periférica fueron estimuladas *in vitro* con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* con el objeto de cuantificar los niveles de expresión de los miRNA-146a, -146b y -155 y de secreción de IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α , detectándose un incremento cuando las células fueron estimuladas con el serotipo b comparado con los otros. Sobre la base de los datos presentados, se puede establecer que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* es capaz de inducir la expresión diferencial de miRNA-146a, -146b y -155 en células dendríticas, los que en conjunto estarían involucrados en los mecanismos intracelulares que regulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias y, de esta manera, determinan en parte la inflamación de los tejidos periodontales infectados.

Durante las periodontitis, existen cambios locales en los tejidos infectados que generan variaciones en la composición y cantidad de microorganismos que componen la biopelícula subgingival (Socransky et al., 1998). La concentración parcial de oxígeno disminuye a medida que incrementa la profundidad del saco periodontal, permitiendo el crecimiento de bacterias más virulentas asociadas a la destrucción periodontal (Holt et al., 1980, Dzink et al., 1985, Dzink et al., 1988, Haffajee et al., 1994, Socransky et al., 1998, Socransky et al., 2002, Socransky et al., 2005). En efecto, *A. actinomycetemcomitans* es una bacteria que ha sido ampliamente asociada a la etiología de las periodontitis y es frecuentemente detectada en lesiones periodontales profundas en pacientes afectados con periodontitis agresiva (Zambon et al., 1983a, Zambon et al., 1983b). *A. actinomycetemcomitans* expresa diversos factores de virulencia, entre ellos el LPS presente en la membrana externa, esencial para la mantención de la integridad bacteriana y el anclaje a proteínas de adhesión durante la invasión tisular (Perry et al., 1996a, Perry et al., 1996b, Kaplan et al., 2001, Díaz-Zúñiga et al., 2012). En los serotipos a y c, el O-polisacárido del LPS está compuesto por disacáridos de talosa en quilaridad; en cambio, el O-polisacárido del LPS del serotipo b es un complejo de trisacáridos, conformado por un esqueleto central de fucosa y ramnosa y una cadena lateral de β -N-acetil-galactosamina (Perry et al., 1996a, Perry et al., 1996b, Kaplan et al., 2001). Esta variable estructural otorga al serotipo b una mayor virulencia e inmunogenicidad en diversas células del hospedero (Li et al., 2006, Tang et al., 2010, Tang et al., 2012, Díaz-Zúñiga et al., 2014).

El O-polisacárido del LPS de *A. actinomycetemcomitans* es reconocido por los TLRs de las células dendríticas, iniciando así una cascada de señalización pro-inflamatoria (Naqvi et al., 2013). Recientemente, nuestro grupo de investigación evaluó la activación de los TLR2 y TLR4 en células dendríticas estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, detectándose una sobre-expresión de TLR2 ante el serotipo b en

comparación a los otros y una disminución en la producción de citoquinas y quimioquinas cuando la señalización mediada por TLR2 fue inhibida (Diaz-Zuniga et al., 2015b). Estos resultados sugieren que la variable inmunogenicidad de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* es dependiente del LPS y, considerando los datos presentados en este estudio, se propone que la expresión de los miRNA-146a, -146b y -155 tendrían un rol en la regulación de la señalización intracelular dependiente de TLR2. En efecto, se ha descrito que el incremento de los miRNA-146a, -146b y -155 en macrófagos activa a los segundos mensajeros IRAK1 y TRAF6 de la vía canónica del NF- κ B (Baltimore et al., 2008, Naqvi et al., 2013), determinando la activación de una respuesta pro-inflamatoria y la disminución en los niveles de expresión y secreción de citoquinas inmuno-moduladoras (Taganov et al., 2006).

TLR2 y TLR4 son determinantes clave en la activación de la respuesta inmuno-inflamatoria inducida en las células dendríticas cuando son expuestas a *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis* (Diaz-Zuniga et al., 2015b). Sin embargo, existen otros TLRs cuyo rol no ha sido analizado en la etiopatogenia de las periodontitis. Entre ellos, TLR1 y TLR6 que dimerizan con TLR2, donde la unión TLR1/2 es capaz de activar la vía canónica de NF- κ B e inducir una respuesta pro-inflamatoria, mientras que la unión TLR6/2 es capaz de inducir la expresión de IL-10 que regula y modula la respuesta inmune (Ben-Ali et al., 2011). Por otro lado, TLR3 es un receptor nuclear y endosómico capaz de ser activado en presencia de LPS, mediando la vía canónica y no canónica de activación de NF- κ B (Alexopoulou et al., 2001). Además TLR5 y TLR7 son receptores endosomales que ante distintos estímulos inducen la activación de NF- κ B. En este contexto, TLR5 es activado por la flagelina bacteriana y TLR7 por la cápsula viral (Smith et al., 2003, Means et al., 2003, Hemmi et al., 2002, Du et al., 2000). En efecto, de acuerdo a los datos presentados en este trabajo de investigación, al cuantificar los niveles de expresión de los receptores TLR3, TLR5 y TLR7 en células dendríticas, se detectó una respuesta diferencial de TLR3 ante el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, sin detectar diferencias entre los otros TLRs. Al establecer la correlación entre los niveles de expresión de TLR3 y de secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-5, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ , se detectaron asociaciones positivas sin significancia estadística, lo que nos permite especular que los niveles de secreción de las citoquinas podrían depender, al menos en parte, de los niveles expresados de TLR3.

Mientras que los miRNA-146a, -146b y -155 son capaces de modular la señalización TLR2 y TLR4, activando la fagocitosis e incrementando los niveles de activación de NF- κ B, la activación de TLR3 es capaz de activar la vía no canónica de NF- κ B. Así, la respuesta inmuno-inflamatoria es consecuencia de un balance secuencial de distintas señalizaciones intracelulares, donde la vía canónica y no canónica activan diferencialmente la respuesta inmuno-inflamatoria y/o inmuno-moduladora que, dependiendo de los TLRs activados, inducirán un incremento o disminución de los distintos miRNAs que regularán la expresión de

sus genes blanco. Por lo tanto, podríamos especular que los receptores TLR2 y TLR4 reconocen el LPS bacteriano y lo internalizan formando fagosomas y activando los primeros mensajeros que activan la vía NF- κ B canónica y las vías IRF1, Akt y posiblemente AP-1 (Andreaskos et al., 2004, An et al., 2002). Una vez formado el fagolisosoma y degradada la bacteria, algunos de sus factores de virulencia pueden migrar al citosol y activar receptores endosomales, tal como TLR3, y este receptor incrementaría la activación de la vía no canónica de NF- κ B y la vía IRF3 (Alexopoulou et al., 2001, Jiang et al., 2004). No obstante, los TLRs son determinantes de la modulación de los macrófagos y neutrófilos, la presencia de otros receptores pueden cumplir distintos roles, que en conjunto con los miRNA-146a, -146b y -155, podrían participar en la activación de TLR2, TLR3 y TLR4, dependiendo de: 1) la inmunogenicidad de la bacteria infectante, 2) la capacidad de sus factores de virulencia para migrar del fagolisosoma al citosol y activar receptores intracelulares, 3) del equilibrio coordinado de los miRNAs que activan o bloquean la transcripción de los genes, y 4) la dinámica activación de mensajeros intracelulares que son comunes para los distintos receptores y que permiten activar la respuesta inmuno-inflamatoria. Así, la respuesta detectada en las células dendríticas ante los distintos serotipos bacterianos de *A. actinomycetemcomitans* es consecuencia de un sistema intracelular pre-configurado que se activa o inhibe ante una señal inmunogénica, tal como la induce el LPS purificado de los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (Díaz-Zúñiga et al., 2013, Díaz-Zúñiga et al., 2014, Diaz-Zuniga et al., 2015a, Diaz-Zuniga et al., 2015b, Melgar-Rodriguez et al., 2015).

No obstante, nuestras especulaciones pueden ser categóricas, resulta necesario realizar más estudios con el objeto de determinar el efecto funcional de los miRNAs en la activación o inhibición de la respuesta inmuno-inflamatoria. Así, en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* sería interesante evaluar los niveles proteicos de las moléculas asociadas a la vía canónica y no canónica de NF- κ B y, este contexto, analizar las vías de señalización dependientes de TLRs mediante bloqueo utilizando siRNAs. En particular, al realizar ensayos funcionales podríamos tener la certeza que nuestras especulaciones se encuentran bien fundadas. Dados nuestros resultados, se propone de manera interesante la existencia de una respuesta inmuno-inflamatoria que no sólo depende de la señalización vía TLRs, sino que también de los miRNAs-146a, -146b y -155, al menos en nuestro modelo de mono-infección periodontal *in vitro*.

Posterior a los resultados obtenidos en el presente estudio y de manera adicional a los objetivos de este trabajo, evaluamos los niveles de expresión de los miRNAs-146a, -146b y -155 en biopsias de lesiones periodontales o gingivales de pacientes con periodontitis o gingivitis, respectivamente, y en biopsias gingivales de individuos sanos (Figura 9). Se detectó una disminución en los niveles de expresión de miRNA-146a en pacientes con periodontitis ($p=0,009$) y gingivitis ($p=0,006$) en comparación a individuos sanos y, además,

se detectó un incremento en los niveles de expresión de miRNA-146a en pacientes con periodontitis ($p=0,001$) en comparación a pacientes con gingivitis. Además, se detectó un incremento en los niveles de expresión de miRNA-146b en pacientes con periodontitis ($p=0,036$) en comparación a individuos sanos. No se detectaron diferencias en los niveles de expresión de miRNA-155 entre los diferentes grupos. Estos datos sustentan en parte nuestra hipótesis, donde el incremento en los niveles de secreción de las citoquinas pro-inflamatorias podrían asociarse positivamente con los niveles detectados de miRNA-146b y miRNA-155 y la presencia de elevados niveles de miRNA-146a en individuos sanos se asociaría controversialmente con bajos niveles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias y mayores niveles de citoquinas inmuno-moduladoras. En efecto, la detección de los miRNA-146a y miRNA-146b en plasma sanguíneo es un determinante de sepsis bacteriana, lo que podría indicar que aún en salud los niveles de miRNA-146a indican la presencia de bacteremia por bacterias comensales y los niveles de miRNA-146b sugerirían la presencia de bacteremia por patógenos periodontales (Dumache et al., 2015). En nuestro estudio se detectaron asociaciones positivas y negativas entre los miRNAs y las citoquinas estudiadas, esto sugiere la participación de otros receptores o miRNAs en la regulación de la respuesta inmuno-inflamatoria en las células dendríticas. Futuros estudios nos permitirían determinar nuevos receptores o miRNAs asociados a la respuesta diferencial inducida por los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* o de cualquier patógeno periodontal.

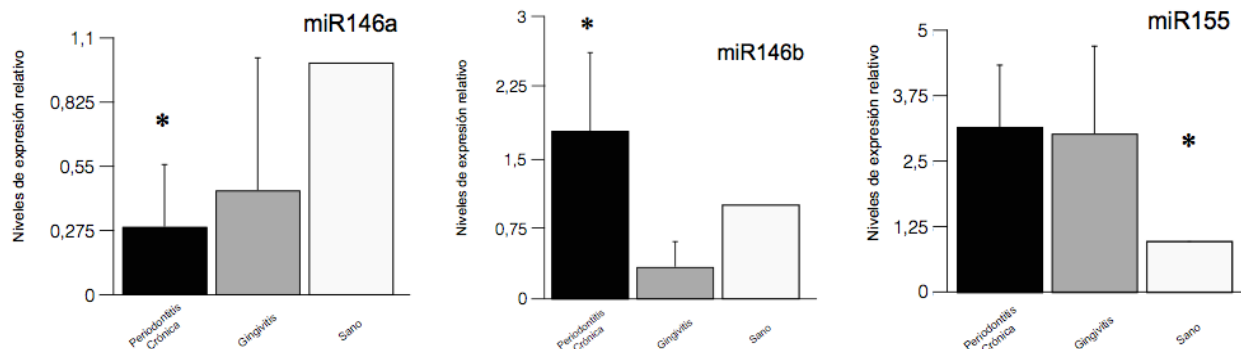


Figura 9. Niveles de expresión de miRNAs en biopsias de tejidos periodontales.

La expresión de los miRNAs-146a, -146b y -155 fue determinada mediante PCR cuantitativo en biopsias de lesiones periodontales o gingivales de pacientes con periodontitis y gingivitis. Como control se utilizaron biopsias de tejidos gingivales de individuos sanos.

Finalmente, el presente estudio nos ha permitido identificar que los receptores TLR2 y TLR4 no son los únicos determinantes de la respuesta inmuno-inflamatoria inducida por *A. actinomycetemcomitans*. La participación de otros TLRs en la activación de vías alternas que inducen la respuesta inmuno-inflamatoria sugieren que las bacterias o sus factores de

virulencia activan secuencialmente distintas señales que actúan de forma sinérgica con el objetivo de establecer un patrón de respuesta particular. Así, la función celular en la inducción de una respuesta inmuno-inflamatoria es la consecuencia de la activación simultánea y equilibrada de distintos receptores ubicados en *lipid rafts* de la membrana plasmática que desencadenan un final previamente anunciado.

12. CONCLUSIONES

- a. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce en las células dendríticas mayores niveles de expresión de los miRNA-146a, miRNA-146b y miRNA-155 en comparación a los otros serotipos.
- b. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce en las células dendríticas mayores niveles de secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-12, IL-23, IFN- γ y TNF- α en comparación a los otros serotipos.
- c. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce en las células dendríticas un incremento en los niveles de expresión de los miRNA-146a, -146b y 155, asociándose de manera positiva con los niveles de secreción de IL-1 β e IFN- γ .
- d. El serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce en las células dendríticas un incremento en los niveles de expresión de TLR3. Además, los miRNA-146a, -146b y 155 y los receptores TLR2, TLR3 y TLR4 participan en la activación de la respuesta inmuno-inflamatoria inducida en las células dendríticas posterior a la estimulación con distintos serotipos bacterianos de *A. actinomycetemcomitans*.

13. REFERENCIAS

- Abbas, A., Murphy, K. & Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-93.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8.
- An, H., Yu, Y., Zhang, M., Xu, H., Qi, R., Yan, X., Liu, S., Wang, W., Guo, Z., Guo, J., Qin, Z. & Cao, X. (2002) Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* **106**, 38-45.
- Andreaskos, E., Sacre, S. M., Smith, C., Lundberg, A., Kiriakidis, S., Stonehouse, T., Monaco, C., Feldmann, M. & Foxwell, B. M. (2004) Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* **103**, 2229-37.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6.
- Asikainen, S., Lai, C. H., Alaluusua, S. & Slots, J. (1991) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* **6**, 115-8.
- Baltimore, D., Boldin, M. P., O'Connell, R. M., Rao, D. S. & Taganov, K. D. (2008) MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* **9**, 839-45.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.
- Ben-Ali, M., Corre, B., Manry, J., Barreiro, L. B., Quach, H., Boniotto, M., Pellegrini, S. & Quintana-Murci, L. (2011) Functional characterization of naturally occurring genetic variants in the human TLR1-2-6 gene family. *Hum Mutat* **32**, 643-52.
- Bhattacharyya, S., Borthakur, A., Dudeja, P. K. & Tobacman, J. K. (2010) Lipopolysaccharide-induced activation of NF-kappaB non-canonical pathway requires BCL10 serine 138 and NIK phosphorylations. *Exp Cell Res* **316**, 3317-27.
- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J. & Modlin, R. L. (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**, 732-6.
- Busch, M. & Zerneck, A. (2012) microRNAs in the regulation of dendritic cell functions in inflammation and atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* **90**, 877-85.
- Caroff, M. & Karibian, D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* **338**, 2431-47.
- Chen, C., Zhang, Y., Zhang, L., Weakley, S. M. & Yao, Q. (2011) MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *J Cell Mol Med* **15**, 14-23.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C. Y. (2013) microRNAs are ligands of Toll-like receptors. *RNA* **19**, 737-9.
- Cortelli, J. R., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Roman-Torres, C. V., Franco, G. C., Gomez, R. S., Batista, L. H. & Costa, F. O. (2012) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 1311-8.
- Cutler, C. W. & Jotwani, R. (2004) Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000* **35**, 135-57.
- Diaz-Zuniga, J., Melgar-Rodriguez, S., Alvarez, C., Monasterio, G., Benitez, A., Ciuchi, P., Diaz, C., Mardones, J., Escobar, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2015a) T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent. *J Periodontol Res* **50**, 824-35.
- Diaz-Zuniga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodriguez, S., Benitez, A., Ciuchi, P., Garcia, M., Arias, J., Sanz, M. & Vernal, R. (2015b) 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**, 108-19.
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Yañez, J., Alvarez, C., Rojas, C., Benitez, A., Ciuchi, P., Monasterio, G. &

- Vernal, R. (2013) Variabilidad de la síntesis de citoquinas por células dendríticas humanas estimuladas con los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* **6**, 57-62.
- Díaz-Zúñiga, J., Yañez, J., Melgar-Rodríguez, S., Alvarez, C., Rojas, C. & Vernal, R. (2012) Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* **5**, 40-45.
- Díaz-Zúñiga, J., Yañez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernandez, M., Sanz, M. & Vernal, R. (2014) Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* **41**, 242-51.
- Du, X., Poltorak, A., Wei, Y. & Beutler, B. (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* **11**, 362-71.
- Dumache, R., Rogobete, A. F., Bedreag, O. H., Sarandan, M., Cradigati, A. C., Papurica, M., Dumbuleu, C. M., Nartita, R. & Sandesc, D. (2015) Use of miRNAs as biomarkers in sepsis. *Anal Cell Pathol (Amst)* **2015**, 186716.
- Dunand-Sauthier, I., Santiago-Raber, M. L., Capponi, L., Vejnar, C. E., Schaad, O., Irla, M., Seguin-Estevez, Q., Descombes, P., Zdobnov, E. M., Acha-Orbea, H. & Reith, W. (2011) Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function. *Blood* **117**, 4490-500.
- Dzink, J. L., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1988) The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **15**, 316-23.
- Dzink, J. L., Tanner, A. C., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1985) Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol* **12**, 648-59.
- Fazi, F., Racanicchi, S., Zardo, G., Starnes, L. M., Mancini, M., Travaglini, L., Diverio, D., Ammatuna, E., Cimino, G., Lo-Coco, F., Grignani, F. & Nervi, C. (2007) Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell* **12**, 457-66.
- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A. & Gamonal, J. (2005) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* **76**, 289-94.
- Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Visentini, M., Aqeilan, R., Cimmino, A., Wang, H., Sun, H., Volinia, S., Alder, H., Calin, G. A., Liu, C. G., Andreeff, M. & Croce, C. M. (2007) MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* **26**, 4148-57.
- Gasparini, C., Foxwell, B. M. & Feldmann, M. (2009) RelB/p50 regulates CCL19 production, but fails to promote human DC maturation. *Eur J Immunol* **39**, 2215-23.
- Gmur, R., McNabb, H., van Steenberghe, T. J., Baehni, P., Mombelli, A., van Winkelhoff, A. J. & Guggenheim, B. (1993) Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol Immunol* **8**, 116-20.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**, 78-111.
- Hashimi, S. T., Fulcher, J. A., Chang, M. H., Gov, L., Wang, S. & Lee, B. (2009) MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood* **114**, 404-14.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. & Akira, S. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**, 196-200.
- Henderson, B., Ward, J. M. & Ready, D. (2010) *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol 2000* **54**, 78-105.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E. & Leon, R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* **35**, 106-13.
- Holt, S. C., Tanner, A. C. & Socransky, S. S. (1980) Morphology and ultrastructure of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Infect Immun* **30**, 588-600.

- Hu, G., Zhou, R., Liu, J., Gong, A. Y. & Chen, X. M. (2010) MicroRNA-98 and let-7 regulate expression of suppressor of cytokine signaling 4 in biliary epithelial cells in response to *Cryptosporidium parvum* infection. *J Infect Dis* **202**, 125-35.
- Hyvarinen, K., Mantyla, P., Buhlin, K., Paju, S., Nieminen, M. S., Sinisalo, J. & Pussinen, P. J. (2012) A common periodontal pathogen has an adverse association with both acute and stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* **223**, 478-84.
- Jacobs-Helber, S. M., Wickrema, A., Birrer, M. J. & Sawyer, S. T. (1998) AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol Cell Biol* **18**, 3699-707.
- Jiang, Z., Mak, T. W., Sen, G. & Li, X. (2004) Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3533-8.
- Kachlany, S. C. (2010) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res* **89**, 561-70.
- Kanaya, S., Nemoto, E., Ogawa, T. & Shimauchi, H. (2004) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides induce maturation of dendritic cells with CD14⁺CD16⁺ phenotype. *Eur J Immunol* **34**, 1451-60.
- Kaplan, J. B., Perry, M. B., MacLean, L. L., Furgang, D., Wilson, M. E. & Fine, D. H. (2001) Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* **69**, 5375-84.
- Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-6.
- Kawai, T. & Akira, S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**, 460-9.
- Kikkert, R., Laine, M. L., Aarden, L. A. & van Winkelhoff, A. J. (2007) Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **22**, 145-51.
- King, E. O. & Tatum, H. W. (1962) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Hemophilus aphrophilus*. *J Infect Dis* **111**, 85-94.
- Kong, H., Yin, F., He, F., Omran, A., Li, L., Wu, T., Wang, Y. & Peng, J. (2015) The Effect of miR-132, miR-146a, and miR-155 on MRP8/TLR4-Induced Astrocyte-Related Inflammation. *J Mol Neurosci*.
- Lakshmiopathy, U. & Hart, R. P. (2008) Concise review: MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* **26**, 356-63.
- Lawrence, T. (2009) The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001651.
- Lee, R. C. & Ambros, V. (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862-4.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-54.
- Li, W., Xin, Y., McNeil, M. R. & Ma, Y. (2006) *rmlB* and *rmlC* genes are essential for growth of mycobacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 170-8.
- Lindsay, M. A. (2008) microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* **29**, 343-51.
- Liston, A., Linterman, M. & Lu, L. F. (2010) MicroRNA in the adaptive immune system, in sickness and in health. *J Clin Immunol* **30**, 339-46.
- Liu, H. Y., Huang, C. M., Hung, Y. F. & Hsueh, Y. P. (2015) The microRNAs Let7c and miR21 are recognized by neuronal Toll-like receptor 7 to restrict dendritic growth of neurons. *Exp Neurol* **269**, 202-12.
- Lopez, N. J., Da Silva, I., Ipinza, J. & Gutierrez, J. (2005) Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol* **76**, 2144-53.
- Lopez, N. J., Smith, P. C. & Gutierrez, J. (2002) Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* **73**, 911-24.
- Lu, C., Huang, X., Zhang, X., Roensch, K., Cao, Q., Nakayama, K. I., Blazar, B. R., Zeng, Y. & Zhou, X. (2011) miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. *Blood* **117**, 4293-303.
- Lund, A. H. (2010) miR-10 in development and cancer. *Cell Death Differ* **17**, 209-14.

- Malumbres, R. & Lossos, I. S. (2010) Expression of miRNAs in lymphocytes: a review. *Methods Mol Biol* **667**, 129-43.
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A. & Luster, A. D. (2003) The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* **170**, 5165-75.
- Melgar-Rodriguez, S., Diaz-Zuniga, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G., Carvajal, P., Escobar, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2015) Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Mol Oral Microbiol*.
- Nakasa, T., Nagata, Y., Yamasaki, K. & Ochi, M. (2011) A mini-review: microRNA in arthritis. *Physiol Genomics* **43**, 566-70.
- Naqvi, A. R., Fordham, J. B., Khan, A. & Nares, S. (2013) MicroRNAs responsive to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* LPS modulate expression of genes regulating innate immunity in human macrophages. *Innate Immun*.
- Novak, M. J., Novak, K. F., Hodges, J. S., Kirakodu, S., Govindaswami, M., Diangelis, A., Buchanan, W., Papapanou, P. N. & Michalowicz, B. S. (2008) Periodontal bacterial profiles in pregnant women: response to treatment and associations with birth outcomes in the obstetrics and periodontal therapy (OPT) study. *J Periodontol* **79**, 1870-9.
- Nussbaum, G., Ben-Adi, S., Genzler, T., Sela, M. & Rosen, G. (2009) Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components. *Infect Immun* **77**, 3939-47.
- Pedersen, I. & David, M. (2008) MicroRNAs in the immune response. *Cytokine* **43**, 391-4.
- Perry, M. B., MacLean, L. L., Gmur, R. & Wilson, M. E. (1996a) Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect Immun* **64**, 1215-9.
- Perry, M. B., MacLean, L. M., Brisson, J. R. & Wilson, M. E. (1996b) Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur J Biochem* **242**, 682-8.
- Perry, M. M., Moschos, S. A., Williams, A. E., Shepherd, N. J., Larner-Svensson, H. M. & Lindsay, M. A. (2008) Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol* **180**, 5689-98.
- Rebane, A. & Akdis, C. A. (2013) MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **132**, 15-26.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M. V., Couttet, P., Soond, D. R., van Dongen, S., Grocock, R. J., Das, P. P., Miska, E. A., Vetrie, D., Okkenhaug, K., Enright, A. J., Dougan, G., Turner, M. & Bradley, A. (2007) Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* **316**, 608-11.
- Schacher, B., Baron, F., Ludwig, B., Valesky, E., Noack, B. & Eickholz, P. (2006) Periodontal therapy in siblings with Papillon-Lefevre syndrome and tinea capitis: a report of two cases. *J Clin Periodontol* **33**, 829-36.
- Schifferle, R. E., Reddy, M. S., Zambon, J. J., Genco, R. J. & Levine, M. J. (1989) Characterization of a polysaccharide antigen from *Bacteroides gingivalis*. *J Immunol* **143**, 3035-42.
- Sheedy, F. J. & O'Neill, L. A. (2008) Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* **67 Suppl 3**, iii50-5.
- Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E. J., Martin, C., O'Leary, J. J., Ruan, Q., Johnson, D. S., Chen, Y. & O'Neill, L. A. (2010) Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* **11**, 141-7.
- Shimada, T., Sugano, N., Nishihara, R., Suzuki, K., Tanaka, H. & Ito, K. (2008) Differential effects of five *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains on gingival epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 455-8.
- Slots, J. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. *Periodontol 2000* **20**, 7-13.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T. & Aderem, A. (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **4**, 1247-53.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* **28**, 12-55.

- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* **38**, 135-87.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134-44.
- Sonkoly, E., Stahle, M. & Pivarcsi, A. (2008) MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* **18**, 131-40.
- Staedel, C. & Darfeuille, F. (2013) MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol* **15**, 1496-507.
- Suzuki, N., Nakano, Y., Yoshida, Y., Ikeda, D. & Koga, T. (2001) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **39**, 2002-5.
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. & Baltimore, D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12481-6.
- Takahashi, T., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Shibuya, N., Moro, I. & Koga, T. (1991) Murine macrophage interleukin-1 release by capsularlike serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **59**, 18-23.
- Tang, G., Kawai, T., Komatsuzawa, H. & Mintz, K. P. (2012) Lipopolysaccharides mediate leukotoxin secretion in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol* **27**, 70-82.
- Tang, G. & Mintz, K. P. (2010) Glycosylation of the collagen adhesin EmaA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is dependent upon the lipopolysaccharide biosynthetic pathway. *J Bacteriol* **192**, 1395-404.
- Turner, M. L., Schnorfeil, F. M. & Brocker, T. (2011) MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function. *J Immunol* **187**, 3911-7.
- van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A. & van der Velden, U. (2002) *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* **29**, 1023-8.
- Vernal, R., Leon, R., Herrera, D., Garcia-Sanz, J. A., Silva & Sanz, M. (2008) Variability in the response of human dendritic cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res* **43**, 689-97.
- Vernal, R., Leon, R., Silva, A., van Winkelhoff, A. J., Garcia-Sanz, J. A. & Sanz, M. (2009) Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol* **36**, 823-9.
- Voorhoeve, P. M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y. P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., Zlotorynski, E., Yabuta, N., De Vita, G., Nojima, H., Looijenga, L. H. & Agami, R. (2007) A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Adv Exp Med Biol* **604**, 17-46.
- Wallet, M. A., Sen, P. & Tisch, R. (2005) Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* **3**, 166-75.
- Wei, B. & Pei, G. (2010) microRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cell Mol Immunol* **7**, 175-81.
- Wystub, K., Besser, J., Bachmann, A., Boettger, T. & Braun, T. (2013) miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. *PLoS Genet* **9**, e1003793.
- Xie, Y. F., Shu, R., Jiang, S. Y., Liu, D. L. & Zhang, X. L. (2011) Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *Int J Oral Sci* **3**, 125-34.
- Xu, X. L., Li, Y., Wang, F. & Gao, F. B. (2008) The steady-state level of the nervous-system-specific microRNA-124a is regulated by dFMR1 in *Drosophila*. *J Neurosci* **28**, 11883-9.
- Yamaguchi, N., Kawasaki, M., Yamashita, Y., Nakashima, K. & Koga, T. (1995) Role of the capsular polysaccharide-like serotype-specific antigen in resistance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **63**, 4589-94.
- Yamasaki, K., Nakasa, T., Miyaki, S., Ishikawa, M., Deie, M., Adachi, N., Yasunaga, Y., Asahara, H. & Ochi, M. (2009) Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum* **60**, 1035-41.

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-6.
- Zambon, J. J., Christersson, L. A. & Slots, J. (1983a) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* **54**, 707-11.
- Zambon, J. J., Slots, J. & Genco, R. J. (1983b) Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun* **41**, 19-27.
- Zhang, T., Kurita-Ochiai, T., Hashizume, T., Du, Y., Oguchi, S. & Yamamoto, M. (2010) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 143-51.
- Zhou, H., Huang, X., Cui, H., Luo, X., Tang, Y., Chen, S., Wu, L. & Shen, N. (2010) miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **116**, 5885-94.
- Zhu, L., Fang, Y., Liu, Z., Wang, P., Wang, Y. & Xu, H. (2008) Rabbit anti-human leukocyte polyclonal antibody inhibits xenogeneic cell-mediated immune responses. *Transplant Proc* **40**, 2760-3.

14. ANEXOS

14.1. Consentimiento informado

Página 14

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

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

Objetivo de la investigación:

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

Personas estudiadas:

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

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

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

Examen clínico y toma de la muestra:

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



Procedimiento de laboratorio y destino de las muestras de sangre

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

En las muestras de sangre NO se realizarán estudios genéticos.

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

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

Duración de la participación de las personas en el estudio

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

Beneficios por participar en el estudio

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

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

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



Confidencialidad de los datos

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

Responsable del Proyecto de Investigación

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

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

Institución patrocinante

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

Comité Ético Científico

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

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

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



FORMULARIO
CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaración del paciente:

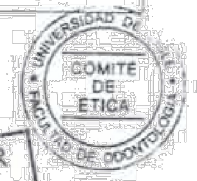
He comprendido las explicaciones que se me han dado, en un lenguaje claro y sencillo, y el investigador me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que le he planteado.

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

Acepto voluntariamente tomar parte en el estudio.

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

Edición del Formulario de Consentimiento Informado: Diciembre de 2010



14.2. Ficha Clínica

FICHA CLINICA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDAD DE CHILE

Clinica de Periodoncia
Año

MODULO 1		Ficha N°
Fotos o Diapos. Si o No o	Notas Médicas Especiales	
Ingreso: / /200		
Egreso: / /200		

Nombre del Alumno:	
Nombre del Docente:	código
PACIENTE:	
SEXO: Masc. O Fem. O	Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno
Dirección	Fono:
Fecha de Nacimiento: / /19	edad: Profesión u Ocupación:

Motivo de consulta:

MODULO 2	Anamnesis GENERAL	
Antecedentes Médicos	Tratamiento que sigue actualmente	
Anexo: Si 0 No 0		
Cardiovasculares 0	Discrasias sanguíneas 0	
Diabetes 0	Enf. Infecto-contagiosos 0	
Gastrointestinales 0	Enf. Neurológicas 0	
Alergias 0		
Embarazo 0		
Descripción de la enfermedad y Otros	Nombre y Teléfono de Médico Tratante	
Anamnesis ODONTOLÓGICA		

Su última visita al dentista: (fecha y motivo)

Tratamientos dentales que ha recibido anteriormente

Mantenimiento Periodontal: Si 0 No 0

¿Ha recibido antes anestesia? ¿Qué Tipo?

OTROS DATOS DE LA ANAMNESIS:

HABITOS

Tipo de cepillo dental que usa actualmente:

Técnica:

Usa OTROS elementos de Higiene: No 0 Si: 0 cuáles?:

	SI	NO		SI	NO
Onicofagia	0	0	Respirador Bucal	0	0
Interposición lingual	0	0	Tabaquismo	0	0
Bruxismo	0	0	Bebe	0	0
Succiona cítricos	0	0	Interposición de Objetos	0	0

Otros Hábitos:

Antecedentes de Enfermedad Periodontal

DOLOR Dientes: No 0 Si 0 Encías: No 0 Si 0 Otros, Explique:

Sangramiento Espontáneo 0 Provocado 0 Explique:

Movilidad Dentaria No 0 Si 0 Se han superado 0 Se ha elongado 0

Halitosis No 0 Si 0

Antecedentes Familiares: Padre 0 Madre 0 Hermanos 0 Otros 0

Otros Antecedentes:

MODULO 3	Examen Extra - Oral
Facies: (describa)	
Ganglios palpables: No 0 Si 0 (Ubicación)	
Músculos de Cabeza y Cuello: Puntos y/o zonas Dolorosas No 0 Si 0 (ubicación)	
A.T.M. (articulación témporo-mandibular):	
Dolor: No 0 Si 0 espontáneo 0 provocado 0	
Ubicación de zonas de dolor:	
Ruidos: No 0 Si 0 Explique:	

Otras observaciones del Examen Extra - Bucal

MODULO 4

Examen Intra - Bucal

TEJIDOS BANDOS	Tipo de Lesión	Descripción (tamaño, forma, color, etc.)
Labios – Comisuras		
Lengua		
Vestíbulos		
Piso de la Boca		
Paladar		
Mucosa mejillas		
Región Faringoamigdalina		
Otras		

Uso de Prótesis: No 0 Si 0 Tipo:
Ubicación y condiciones:

Anomalías Dento-Maxilares: No 0 Si 0
Describe:

Examen de Oclusión

Patología Muscular: Si 0 No 0	Patología Articular Si 0 No 0			
Contactos Prematuros en Céntricas: Si 0 No 0	Dientes en contacto: (Si no hay patología articular ni muscular)			
Dinámica Mandibular				
APERTURA BUCAL: Aumentada 0	Normal (4,2-4,4 cm.) 0	Disminuida 0		
Movto. PROTUSIVO: No 0	Si 0	Guía incisal: Si 0	Contactos Post Si 0	
Movto. De Lateralidad DERECHA: No 0	Si 0	aumentado 0	normal 0	disminuido 0
Guía canina: 0				
Función de Grupo 0		Piezas en función: Contacto en Balance: No 0 Si 0		Piezas en contacto:
Otras Guía 0		Piezas involucradas		

Movto. De Lateralidad IZQUIERDA: no 0	Si 0	aumentado 0	normal 0	disminuido 0
Guía canina: 0				
Función de Grupo 0		Piezas en función: Contacto en Balance: No 0 Si 0		Piezas en contacto:
Otras Guía 0		Piezas involucradas		

Otras Observaciones del Examen Intra - Bucal:

MODULO 5			
Examen Periodontal			

Describa las características de la encía en cuanto a

Color:

Forma:

Posición:

Tamaño:

Consistencia y superficie:

Índice gingival (G.I.):

Løe & Silness 1963

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
VESTIBULAR																
MESIAL																
PALATINO																
DISTAL																
	Índice Grupo I:					Índice Grupo II:					Índice Grupo III:					

Boca:

	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
VESTIBULAR																
MESIAL																
LINGUAL																
DISTAL																
	Índice Grupo IV:					Índice Grupo V:					Índice Grupo VI:					

Anote en cada cara de cada diente en la boca las graduaciones 0, 1, 2 y 3 según corresponda. 0: encía normal, no inflamación ni cambio de color ni sangramiento. 1: leve inflamación y alteración de la superficie gingival. No hay sangramiento. 2: inflamación moderada, eritema y edema. Sangramiento al sondaje o bajo el efecto de la presión. 3: inflamación severa, eritema de importancia y edema. Tendencia al sangramiento espontáneo. Ulceración.

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
VESTIBULAR																
MESIAL																
PALATINO																
DISTAL																
	Índice Grupo I:					Índice Grupo II:					Índice Grupo III:					

Boca:	%	Boca:	%	Boca:	%	Boca:	%
Fecha:		Fecha:		Fecha:		Fecha:	

	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
VESTIBULAR																
MESIAL																
LINGUAL																
DISTAL																
	Índice Grupo IV: %					Índice Grupo V: %					Índice Grupo VI: %					

Anote un signo + si la cara observada presenta tinción del revelador en contacto con la encía marginal y un signo - en caso de ausencia de coloración. Divida el número de superficies sin placa por el número de superficies examinadas y obtendrá el INDICE de HIGIENE

NOTA: Estos índices deben realizarse VARIAS veces durante el tratamiento y en CADA control por lo que deberá usar lápiz grafito. No olvide consignar los valores encontrados cada vez en la Hoja de Evolución.

C.P.I.T.N.=Índice de necesidades de tratamiento periodontal en comunidad

Códigos	0	1	2	3	4
Observaciones	SANO	Hemorragia al sondaje. No hay sacos ni cálculos. No hay hombros.	Sacos < 3mm. Se ve totalmente parte negra de la sonda. Iatrogenia ++, y tártaro	Parte negra de la sonda se ve parcialmente. Saco 4-5 mm. Iatrogenia ++	Parte negra de la sonda desaparece en un saco inflamado. Saco > 6mm.

Coloque en cada grupo el valor mas alto encontrado
Ej. Pieza 18:3 y Pieza 15:2 valor Grupo 1=3

Grupo I=					Grupo II=					Grupo III=				
18	17	16	15	14	13	12	11	21	23	24	25	26	27	28

Grupo IV=					Grupo V=					Grupo VI=				
18	17	16	15	14	13	12	11	21	23	24	25	26	27	28

FACTORES ETIOLOGICOS LOCALES

Caries, cálculo, malposiciones, Odontología Restauradora defectuosa, etc.:

	Diente (s)	EFECTO PROVOCADO

Alteraciones Muco-Gingivales Si 0 No 0

Describe:

Disposición Psicológica: nervioso 0 indiferente 0 cooperador 0

Otra Observación

Examen Radiológico

Exámenes radiográficos solicitados

Diagnóstico Radiográfico:

Observaciones Radiológicas

MODULO 6	Diagnóstico y Evaluación
----------	--------------------------

Elementos relevantes para el diagnóstico de los módulos 1 y 2:

Elementos relevantes para el diagnóstico de los módulos 3 y 4:

Elementos relevantes para el diagnóstico del módulo 5:

Trauma Oclusal I: Si 0 No 0
 Piezas Involucradas:

	Diagnóstico	
<i>Fundamentos del Diagnóstico</i>		

PRONOSTICO

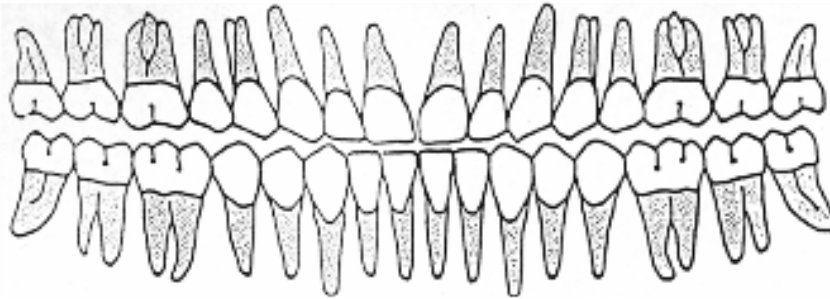
GENERAL:

PARTICULAR:

Fundamentos del Pronóstico:

PACIENTE: _____ EDAD _____ FECHA: ____ / ____ /20____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Supuración																
Sangramiento																
Movilidad																
Furca: V																
Posic.. Encía																
Prof. Surco																
N. Inserción																



	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Supuración																
Sangramiento																
Movilidad																
Furca: V																
Posic.. Encía																
Prof. Surco																
N. Inserción																

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Supuración																
Sangramiento																
Movilidad																
Furca: V																
Posic.. Encía																
Prof. Surco																
N. Inserción																



	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Supuración																
Sangramiento																
Movilidad																
Furca: V																
Posic.. Encía																
Prof. Surco																
N. Inserción																

14.3. Metodología de Biopsias para tejidos periodontales

1. Selección de sujetos y obtención de biopsias gingivales

Mediante muestreo no probabilístico de casos consecutivos asistentes a la clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, se seleccionaron 20 pacientes con periodontitis crónica moderada o severa, 8 pacientes con gingivitis y 7 sujetos sanos. A cada uno se le realizó un examen periodontal por un único operador y en la ficha clínica (Anexo 1) se registró la profundidad al sondaje, el nivel de inserción clínico, el índice de placa y el índice de sangrado en 6 sitios periodontales por diente, excluyendo los terceros molares. El diagnóstico de periodontitis crónica se estableció cuando se detectó una profundidad al sondaje ≥ 5 mm, pérdida del nivel de inserción ≥ 3 mm y evidencia radiográfica de pérdida ósea. El diagnóstico de gingivitis se estableció cuando se detectó una profundidad al sondaje < 4 mm, un índice gingival $> 0,5$ y un índice de placa $> 30\%$. Además, los individuos seleccionados eran mayores de 18 años, con al menos 17 dientes, no estaban afectados de una enfermedad distinta a la periodontitis o gingivitis, no recibieron tratamiento con antibióticos o anti-inflamatorios en los últimos 6 meses y en caso de ser género femenino, no se encontraban en período de gestación o lactancia. En estos sujetos, de acuerdo a las necesidades terapéuticas quirúrgicas periodontales o por indicación de exodoncia por razones protésicas, ortodóncicas o quirúrgicas y bajo anestesia local troncular, se obtuvo una biopsia gingival de aproximadamente 1 mm de grosor, que comprometía epitelio y tejido conectivo gingival, las que se sumergieron inmediatamente en 2 mL de RNA Safer (Omega Biotek Inc., GA, USA) y almacenaron a -80°C hasta la extracción de RNA (en detalle más adelante).

2. Purificación del RNA mensajero citoplasmático total de biopsias

Las biopsias de tejido gingival almacenadas en -80°C se descongelaron y centrifugaron por 10 seg a 10.000 xg a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se disgregaron en un homogenizador manual con 1 mL de TRIzol® Reagent (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, para luego incorporar 200 μL de cloroformo (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y agitar durante 15 seg, incubar durante 3 min a temperatura ambiente y centrifugar a 12.000 xg durante 15 min a 4°C . El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo estéril y se adicionó 5 μg de glicógeno (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Roche Ltd, Basel, Switzerland) y 100 μL de isopropanol (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugó a 12.000 xg durante 10

min a 4°C. Luego, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de etanol al 75%, se agitó durante 3 seg y centrifugó a 7.500 *xg* durante 5 min a 4°C. Finalmente, se aspiró el etanol y se resuspendió el *pellet* en 30 µL de agua milliQ. El RNA obtenido se almacenó a -80°C a una concentración final de 1 µg/µL. Para su análisis y cuantificación se utilizaron los equipos anteriormente mencionados.

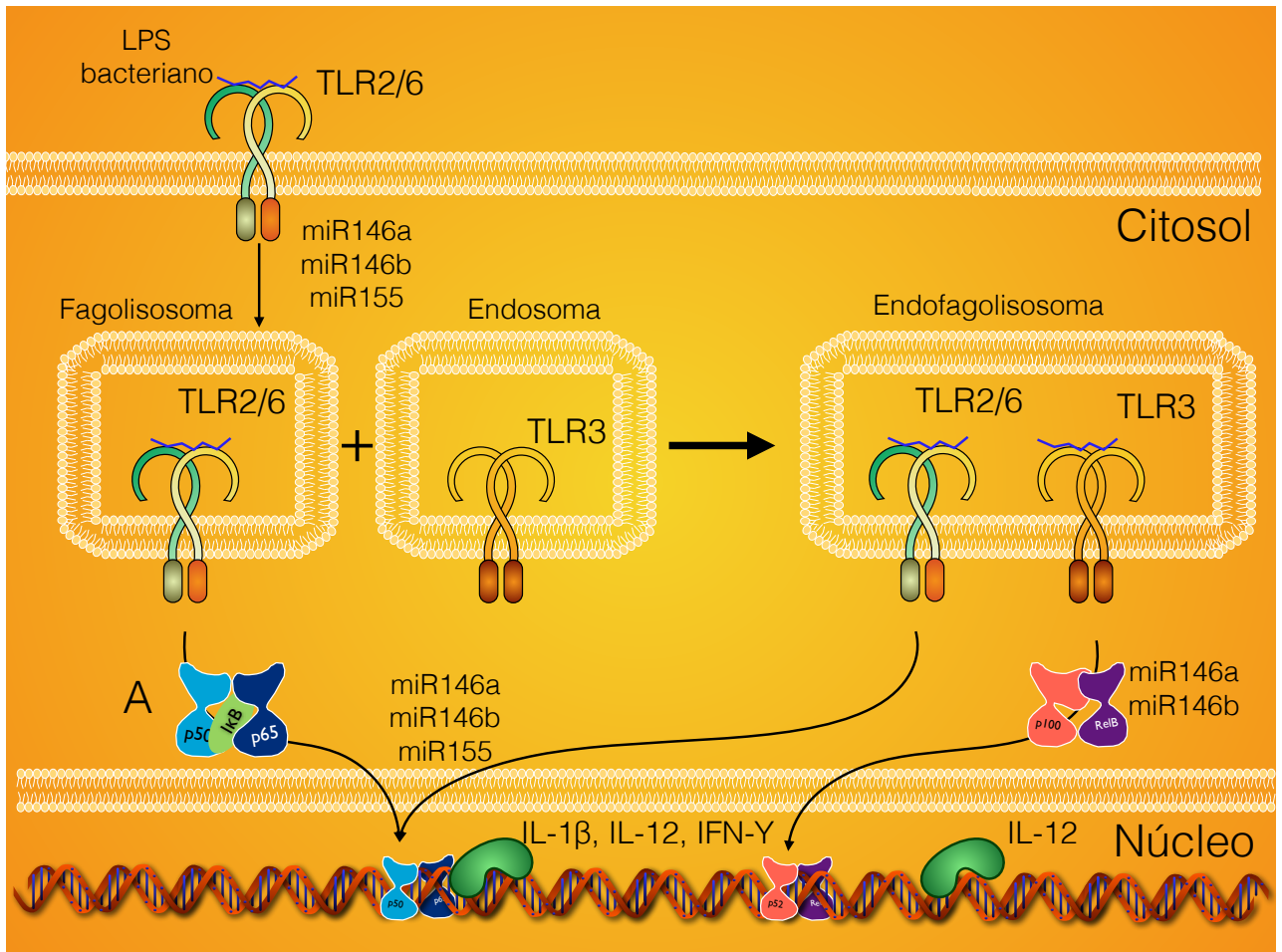
3. Síntesis de la primera cadena de cDNA

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

4. Expresión de miRNAs mediante RT-PCR en tiempo real

La expresión de los mRNAs de los miRNA-146a, -146b y -155 se cuantificó a partir de 50 ng de cDNA mediante qPCR en tiempo real, utilizando partidores específicos (Tabla 1) y un reactivo SYBR Green® (Invitrogen, Grand Island). Utilizando un termociclador qPCR StepOne Plus (Applied Biosystem, CA, USA) se realizó el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo de 95°C durante 3 min y 40 ciclos de 95°C durante 3 seg y 60° durante 30 seg. Como control de amplificación y para realizar la cuantificación relativa se analizaron los niveles de expresión de la subunidad rRNA 18S.

14.4. Esquema de la respuesta inmune celular ante una bacteria periodonto-patógena



El LPS bacteriano al unirse con el TLR2/6 inician una cascada de señalización que mediada por los miRNAs, resulta en la formación del fagolisosoma y al acoplarse con el endosoma que incluye al TLR3 constituyen un endofagolisosoma que mediante mensajeros moleculares y la regulación de los miRNAs activan la vía canónica y no canónica de NF-κB para la producción de moléculas pro-inflamatorias.