



**Escuela de Medicina  
Centro de Investigaciones Biomédicas**

# **“Linfocitos T colaboradores (Th) 9 y Th22 y su asociación con las enfermedades periodontales”**

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

**JAIME ANDRÉS DÍAZ ZÚÑIGA**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

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

**Supervisor Programa: Prof. Dr. Mario Párraga San Román**

**Adscrito a Proyectos FONDECYT 11100298 y 1140904**

**25 de enero de 2016**



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Programa de Magíster en Ciencias Médicas

Mención Biología Celular y Molecular

**“Linfocitos T colaboradores (Th) 9 y Th22 y su asociación con las enfermedades periodontales”**

Jaime Andrés Díaz Zúñiga

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

Dr. Rolando Vernal Astudillo  
Director de Tesis

Dra. Paola Carvajal Pavez  
Co-Director de Tesis

Dra. María Soledad Lopetegui  
Comisión Evaluación Tesis

Dra. Andrea Paula-Lima  
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Sebastián San Martín  
Comisión Evaluación Tesis

**Valparaíso, Chile**

**2016**

## **DEDICATORIA**

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

### **A mi mamá:**

A casi 5 años de tu ausencia, seguramente me habrías apoyado en este nuevo paso que doy. Tu vida está en parte, impregnada en estas páginas.

### **A mis abuelos:**

A mis maravillosos padres con muchos años de experiencia.

### **A mi Samy:**

A mi compañera de vida. Juntos iniciamos esta nueva propuesta y juntos la terminamos con éxito.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a Álvaro, Gustavo, Fran, Carla y Matías, los alumnos que durante estos tres años han aportado una pequeña parte de su tiempo y conocimiento para el desarrollo de este trabajo. Este tiempo les ha permitido conocer de cerca la investigación y ha quedado integrado en las decisiones que han tomado. No se cansen nunca de aprender.

A Andrea, que con trabajos, ensayos, experimentos, día a día, logró hacer crecer a las bacterias y purificar el LPS con el cual trabajamos durante tanto tiempo.

A mis amigos y colegas, por todos los buenos momentos que hemos vivido y por los que vendrán. Siempre son el cable a tierra cuando las ideas y las explicaciones no logran ser concebidas.

Y, finalmente, a mis tutores de tesis. Gracias por sus críticas, análisis, correcciones, sugerencias y a veces retos, que permitieron mejorar sustancialmente este trabajo de investigación.

## INDICE

<b>1. ABREVIACIONES</b>	<b>8</b>
<b>2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>9</b>
<b>3. RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>4. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
4.1 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	12
4.2 <i>Respuesta inmune durante las periodontitis</i> .....	13
4.3 <i>Linfocitos Th9 y Th22 y su asociación a las enfermedades</i> .....	14
4.4 <i>Planteamiento del problema científico</i> .....	16
<b>5. HIPÓTESIS.</b>	<b>18</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>19</b>
<b>7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>19</b>
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>20</b>
8.1 <i>Selección de sujetos y obtención de biopsias gingivales</i> .....	20
8.2 <i>Selección de sujetos y obtención de células de sangre periférica</i> .....	20
8.3 <i>Cultivo bacteriano</i> .....	21
8.4 <i>Purificación del LPS bacteriano para la estimulación celular</i> .....	22
8.5 <i>Purificación de monocitos y linfocitos TCD4+ naïve</i> .....	22
8.6 <i>Diferenciación y estimulación de células dendríticas y activación de linfocitos TCD4+ naïve</i> .....	23
8.7 <i>Análisis de fenotipo celular</i> .....	23
8.8 <i>Purificación del RNA mensajero citoplasmático total de cultivos celulares</i> .....	24
8.9 <i>Purificación del RNA mensajero citoplasmático total de biopsias</i> .....	24
8.10 <i>Síntesis de la primera cadena de cDNA</i> .....	25
8.11 <i>Expresión de factores de transcripción y citoquinas mediante RT-PCR en tiempo real</i> .....	25
8.12 <i>Secreción de citoquinas mediante ELISA</i> .....	26
8.13 <i>Análisis de los datos</i> .....	26
<b>9. RESULTADOS.</b>	<b>28</b>
9.1 <i>Expresión de citoquinas y factores de transcripción en biopsias</i> .....	28
9.2 <i>Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción con los niveles de secreción de citoquinas en biopsias</i> .....	29
9.3 <i>Purificación de monocitos</i> .....	29
9.4 <i>Purificación de linfocitos TCD4+ naïve</i> .....	30
9.5 <i>Activación de las células dendríticas</i> .....	31

9.6 Activación de linfocitos TCD4+ naïve.....	32
9.7 Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	33
9.8 Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	34
9.9 Secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	35
9.10 Expresión de citoquinas en linfocitos TCD4+ naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	36
9.11 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4+ naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	37
9.12 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4+ naïve activados con LPS purificado de los serotipos a, b o c de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	38
9.13 Expresión de factores de transcripción en linfocitos TCD4+ naïve activados .....	39
9.14 Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción con los niveles de secreción de citoquinas .....	40
<b>10. DISCUSIÓN.</b>	<b>42</b>
<b>11. CONCLUSIONES.</b>	<b>47</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>48</b>
<b>12. ANEXOS.</b>	<b>54</b>
12.1 Consentimiento informado.....	54
12.2 Ficha clínica .....	58
12.3 Trabajos presentados en congresos internacionales.....	67
12.4 Premios. ....	68

## 1. ABREVIACIONES

*AhR*: Receptor de aril-hidrocarburo (**A**ryl **h**ydrocarbon **R**eceptor).

*Spi.B*: factor de transcripción relacionado con la oncoproteína putativa Spi-1/PU.1 (transcription factor related to the putative oncoprotein Spi-1/PU.1).

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

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

TCD4<sup>+</sup>: Linfocito TCD4<sup>+</sup> (**CD4**<sup>+</sup> **T** lymphocyte).

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

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

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

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

IFN: Interferón (**I**nterferon).

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

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear *kappa* B (**R**eceptor **A**ctivator of **N**uclear Factor **k**appa B **L**igand).

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

CCL: ligados de quimioquinas tipo C-C (**C**hemokine **C**-C **L**igand).

CCR: receptores de quimioquinas tipo CC (**C**hemokine **C**-C **R**eceptor).

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

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (**P**eripheral **B**lood **M**ononuclear **C**ells).

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

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

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (**R**everse **T**ranscription **P**olymerase **C**hain **R**eaction).

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

NF-κB: Factor nuclear κB (**N**uclear **f**actor **k**appa **B**).

## 2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1</i> .....	27
<i>Figura 2</i> .....	28
<i>Figura 3</i> .....	29
<i>Figura 4</i> .....	30
<i>Figura 5</i> .....	31
<i>Figura 6</i> .....	32
<i>Figura 7</i> .....	33
<i>Figura 8</i> .....	34
<i>Figura 9</i> .....	35
<i>Figura 10</i> .....	36
<i>Figura 11</i> .....	37
<i>Figura 12</i> .....	38
<i>Figura 13</i> .....	39
<i>Tabla 1</i> .....	25
<i>Tabla 2</i> .....	40

### 3. RESUMEN

Las periodontitis son enfermedades infecciosas cuya etiología es la biopelícula patogénica subgingival, constituida principalmente por bacterias anaerobias Gram-negativas. Durante la respuesta inmune del hospedero, estas bacterias son reconocidas por células dendríticas periodontales, las que, una vez activadas expresan moléculas co-estimuladoras y liberan citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas, determinantes de la presentación antigénica a los linfocitos TCD4<sup>+</sup>. Durante esta presentación antigénica, las células dendríticas inducen la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> hacia los distintos fenotipos efectores T colaboradores (del inglés *T helper*, Th), caracterizados por la expresión y secreción de un patrón particular y fenotipo-específico de citoquinas que determina el tipo de respuesta inmune en el hospedero y, finalmente, el fenotipo clínico de las periodontitis. Recientemente se demostró que los linfocitos Th9 son determinantes clave de la inflamación local descrita en la psoriasis y los linfocitos Th22 de la destrucción ósea asociada a la artritis reumatoide. Dado que, aunque la etiología es diferente, los fenómenos patogénicos descritos en las periodontitis poseen características similares a los descritos en la psoriasis y la artritis, es factible proponer que los linfocitos Th9 o Th22 podrían cumplir un rol en la inflamación y destrucción ósea características de las periodontitis.

En este estudio, en biopsias obtenidas de lesiones periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica, gingivitis y sujetos sanos, se cuantificaron las citoquinas y los factores de transcripción asociados a los fenotipos linfocitarios Th9 y Th22. Mayores niveles de expresión de IL-22 y *AhR* (específicos del fenotipo Th22) se detectaron en biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica en comparación a las obtenidas de sujetos sanos y un incremento en los niveles de expresión de IL-9 y *Spi.B* (específicos del fenotipo Th9) se detectó en biopsias obtenidas de pacientes con gingivitis en comparación a las de pacientes con periodontitis crónica y sujetos sanos. Adicionalmente, con el objetivo de demostrar el rol de los linfocitos Th9 y Th22 durante de la infección periodontal, se evaluó la respuesta de las células dendríticas y los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* humanos ante el estímulo *in vitro* con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uno de los microorganismos componentes de la biopelícula patogénica subgingival causante de las periodontitis. En células dendríticas, ante el serotipo b, el más inmunogénico y más prevalente en las periodontitis, se detectaron mayores niveles de expresión y secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 (asociados a los fenotipos Th1 y Th17,

respectivamente) en comparación con los serotipos a o c. En los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve*, ante el serotipo b se detectaron mayores niveles secreción de IL-22 y expresión de *AhR* (específicos del fenotipo Th22) en comparación a las mismas células estimuladas con los serotipos a o c.

En conjunto, estos datos permiten establecer que: (1) un incremento en la respuesta tipo Th22 se observa durante la periodontitis y (2) serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* tiene un mayor potencial inmuno-estimulador de tipo Th22 comparado con los serotipos de menor patogenicidad. Por lo tanto, los linfocitos Th22 se asociarían a la patogenia de la periodontitis.

## 4. INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son un conjunto de patologías de naturaleza inflamatoria y etiología infecciosa producidas por la biopelícula patogénica subgingival que coloniza el surco gingivodentario (Offenbacher, 1996). Se caracterizan por la destrucción de la inserción periodontal, conformada por el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar y, en los estados más severos de la enfermedad, pueden causar la pérdida de los dientes (Offenbacher, 1996).

La biopelícula patogénica subgingival, constituida principalmente por bacterias anaerobias Gram-negativas, es el factor etiológico responsable del inicio y progresión de las periodontitis. Esta biopelícula está compuesta por una amplia variedad de bacterias, entre ellas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Clínicamente, *A. actinomycetemcomitans* se asocia tanto a la etiología de las periodontitis crónicas o agresivas (Genco et al., 1986; Asikainen et al., 1991) como al desarrollo de trastornos cardiovasculares, aterosclerosis, neumonías, parto prematuro y bajo peso neonatal (Asikainen et al., 1991; López et al., 2002; López et al., 2005; Novak et al., 2008; Zhang et al., 2010; Hyvärinen et al., 2012).

### 4.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es un cocobacilo Gram-negativo, capnofílico, no móvil, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* (Suzuki et al., 2001). *A. actinomycetemcomitans* produce distintos factores de virulencia, entre ellos: leucotoxina, fimbria, toxina distensora citoletal, adhesinas epiteliales, proteínas de adhesión e invasión celular y lipopolisacárido (LPS), determinante clave del tipo de inmunidad inducida en los tejidos infectados del hospedero (Perry et al., 1996a; Perry et al., 1996b; Kaplan et al., 2001; Díaz et al., 2012). El LPS es una molécula localizada en la membrana externa de bacterias Gram-negativas, cubre cerca del 75% de su superficie y es esencial para la mantención de la integridad bacteriana y el anclaje a proteínas de adhesión (Perry et al., 1996a; Perry et al., 1996b; Kaplan et al., 2001). Está conformado por el lípido A, un esqueleto central de oligosacáridos y un O-polisacárido, principal antígeno que estimula la respuesta inmune del hospedero (Caroff & Karibian, 2003).

Sobre la base de la antigenicidad del O-polisacárido, se describen seis serotipos bacterianos de *A. actinomycetemcomitans*: a, b, c, d, e y f (King & Tatum, 1962;

Zambon et al., 1983; Page et al., 1991; Gmür et al., 1993; Perry et al., 1996a; Perry et al., 1996b; Kaplan et al., 2001). En efecto, se ha detectado que estos serotipos inducen una respuesta inmune diferente en distintas células del hospedero y esta respuesta depende de la estructura tridimensional y composición molecular de cada O-polisacárido, lo que define a cada serotipo (Takahashi et al., 1991; Shimada et al., 2008; Díaz-Zúñiga et al., 2014; Díaz-Zúñiga et al., 2015a).

En latino-americanos, europeos, africanos y asiáticos, los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans* son los detectados con mayor frecuencia (Kim et al., 2009; Chen et al., 2010; Roman-Torres et al., 2010; Sakellari et al., 2011; Cortelli et al., 2012), variando en prevalencia dependiendo del estado clínico periodontal del sujeto. El serotipo b es aislado con mayor frecuencia en lesiones periodontales de pacientes afectados de periodontitis crónica severa y agresiva (Paju et al., 2000; Roman-Torres et al., 2010; Cortelli et al., 2012) e induce mayor intensidad de respuesta cuando la producción de citoquinas es evaluada en células dendríticas y linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve in vitro* (Díaz-Zúñiga et al., 2014; Díaz-Zúñiga et al., 2015a).

En conjunto, sobre la base de mayor frecuencia de detección del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en las formas más severas de las periodontitis y la mayor inmunogenicidad detectada en las células dendríticas y los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve*, podemos especular que, durante las periodontitis, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* sería un determinante clave de la respuesta inmune inducida en el hospedero y por lo tanto, cuando está presente en un sitio periodontal infectado, participaría en el inicio, progresión y severidad de la enfermedad.

#### **4.2 Respuesta inmune durante las periodontitis**

Durante las periodontitis, las bacterias periodonto-patógenas son reconocidas por las células dendríticas periodontales mediante, entre otros, los receptores tipo *Toll* (del inglés *Toll-like receptor*, TLR) tipo 2 y 4. Estos receptores interactúan con los patrones moleculares conservados asociados a patógenos expresados por las bacterias periodonto-patógenas favoreciendo su fagocitosis (Hajishengallis et al., 2004; Kikkert et al., 2007). Así, las células dendríticas fagocitan las bacterias y procesan sus antígenos para presentarlos a los linfocitos TCD4<sup>+</sup>. Durante esta presentación antigénica, las células dendríticas producen citoquinas, las que cumplen un rol fundamental en la activación, proliferación y diferenciación selectiva de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* hacia linfocitos TCD4<sup>+</sup> colaboradores (del inglés *T helper*, Th) tipo Th1,

Th2, Th17 o T regulador (Treg), determinando el tipo de respuesta inmune desplegada por el hospedero y, finalmente, el fenotipo clínico de la enfermedad (Brightbill et al., 1999).

En efecto, los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg secretan distintos patrones de citoquinas que definen su función. El fenotipo Th1, cuya diferenciación está determinada por la expresión del factor de transcripción específico *T-bet*, secreta interleuquina (IL)-1 $\beta$ , IL-12, interferón (IFN)- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y TNF- $\beta$ , responsables de una respuesta pro-inflamatoria; el fenotipo Th2, determinado por el factor de transcripción *GATA3*, secreta IL-4, IL-5 e IL-13 y se asocia con una respuesta inmuno-moduladora (Seder & Paul, 1994; Abbas et al., 1996; Jankovic et al., 2001; Murphy & Reiner, 2002; Reiner, 2007); el fenotipo Th17, determinado por el factor de transcripción *RORC2*, secreta IL-6, IL-17, IL-21, IL-23 y RANKL y se considera un fenotipo pro-inflamatorio y osteo-destructivo (Harrington et al., 2006; Stockinger & Veldhoen, 2007); y el fenotipo Treg, determinado por el factor de transcripción *Foxp3*, secreta IL-10 y factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ 1 y posee un rol inmuno-regulador (Bluestone & Abbas, 2003; Reiner, 2007; Appay et al., 2008; Vernal & Garcia-Sanz, 2008; Weaver & Hatton, 2009). En términos generales, los linfocitos Th1 condicionarán un ambiente inflamatorio y los linfocitos Th17 determinarán la reabsorción del hueso alveolar, característica principal de las periodontitis (Taubman & Kawai, 2001; Walsh & Choi, 2003; Brand et al., 2005; Ikeuchi et al., 2005; Takahashi et al., 2005; Vernal et al., 2005; Sato et al., 2006; Vernal et al., 2006; Kramer & Gaffen, 2007; Sa et al., 2007; Ohyama et al., 2009).

Recientemente, se han descrito 2 nuevos fenotipos de linfocitos T: los linfocitos Th9 y Th22. Los linfocitos Th9 se diferencian en presencia de TGF- $\beta$ 1 e IL-4, los que activan al factor de transcripción específico *Sp1.B*, y producen predominantemente IL-9 (Chang et al., 2010; Baba et al., 2012; Goswami & Kaplan, 2012; Leng et al., 2012; Takami et al., 2012). Los linfocitos Th22 se diferencian en presencia de TNF- $\alpha$  e IL-6, que activan al factor de transcripción específico *Ahr*, y producen IL-22 (Ikeuchi et al., 2005; Baba et al., 2012; Honda, 2012; Kim et al., 2012).

#### **4.3 Linfocitos Th9 y Th22 y su asociación a las enfermedades**

Los linfocitos Th9 se han detectado en enfermedades alérgicas, auto-inmunes y en patologías neoplásicas (Kaplan, 2013). Se caracterizan por secretar la citoquina IL-9 y los ligandos de las quimioquinas C-C (del inglés *Cystein-cystein chemokine ligand*, CCL)-17 y CCL22 (Chang et al., 2010) y se asocian a funciones inmuno-moduladoras y

pro-inflamatorias (Leng et al., 2012). Cumplen un rol pro-inflamatorio al inducir la secreción de IL-8 e IL-13 en células musculares lisas (Goswami & Kaplan, 2011), la expresión y secreción de IL-9 en células epiteliales intestinales (Gerlach et al., 2014), la expresión de receptores de quimioquinas específicos para linfocitos Th1 (CXCR3), Th2 (CCR3), Th17 y Treg (CCR6) (Kara et al., 2013), la proliferación y diferenciación de linfocitos Th17 en modelos experimentales de encefalomiелitis autoinmune (Jäger et al., 2009) y el incremento de la producción de IL-17 en pacientes con psoriasis (Singh et al., 2013; Schlapbach et al., 2014). Además, los linfocitos Th9 tendrían un rol anti-tumoral al inducir la migración de células dendríticas y linfocitos TCD8<sup>+</sup> mediante la expresión de CCL20 en células tumorales (Lu et al., 2012), un rol inmuno-modulador en artritis reumatoide al inducir el incremento de los niveles de IL-9 (Khan et al., 2009) y un rol inmuno-supresor en pacientes con linfoma no Hodgkin de células B al disminuir la función de los linfocitos Treg, la diferenciación de linfocitos Th1 y la maduración de células dendríticas (Feng et al., 2011). En este contexto, los linfocitos Th9 pueden inducir la inflamación, proteger al hospedero de las enfermedades auto-inmunes o mediar la destrucción tisular.

Los linfocitos Th22 se han detectado en pacientes con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome mielodisplástico, trombocitopenia inmune y enfermedad de Crohn (Brand et al., 2005; Ikeuchi et al., 2005; Truchetet et al., 2011; Hu et al., 2012; Shao et al., 2012; Michalak-Stoma et al., 2013; Sugita et al., 2013; Yang et al., 2013) y se caracterizan por secretar IL-13, IL-22 e IL-26 y expresar CCR4 y CCR10 en su superficie (Duhon et al., 2009; Akdis et al., 2012; Fujita, 2013). Cumplirían un rol pro-inflamatorio en células epiteliales intestinales infectadas al inducir el incremento en la expresión de IL-8 y TNF- $\alpha$  (Sa et al., 2007; Wolk et al., 2009; Akdis et al., 2012) y rol anti-inflamatorio durante la infección viral por VIH (Missé et al., 2007) y bacterianas en queratinocitos bronquiales humanos (Aujla et al., 2008; Scriba et al., 2008; Zheng et al., 2008; Niebuhr et al., 2010) al inducir el incremento de IL-22. Además, los linfocitos Th22 participarían en los eventos osteo-destructivos en pacientes con artritis reumatoide (Ikeuchi et al., 2005; Kim et al., 2012) al incrementar la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6 y RANKL en los fibroblastos sinoviales, determinando la diferenciación y activación de osteoclastos (Kim et al., 2012).

Finalmente, en un estudio reciente en el que se caracterizó la respuesta inmuno-inflamatoria en lesiones apicales inactivas, enfermedad osteo-destructiva que afecta a los dientes con infección en los canales radiculares, se describió la presencia de elevados niveles IL-9 e IL-22 en comparación con lesiones activas, sugiriendo que

una respuesta tipo Th9 y/o Th22 podría contribuir a la estabilidad de los tejidos apicales, planteando un rol inmuno-modulador para ambos fenotipos linfocitarios (Aranha et al., 2013).

#### **4.4 Planteamiento del problema científico**

Durante las periodontitis, los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg que infiltran los tejidos periodontales infectados secretan distintos patrones de citoquinas que determinan su función. En biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica se detectan elevados niveles de citoquinas y factores de transcripción asociados a los linfocitos Th1 y Th17 en comparación a los sujetos sanos y sus niveles de detección se correlacionan con la severidad de la enfermedad (Vernal et al., 2004; Vernal et al., 2005; Vernal et al., 2006; Dutzan et al., 2009a; Dutzan et al., 2009b). Los linfocitos Th1 y Th17 se describen en artritis reumatoide, psoriasis y otras enfermedades inmuno-inflamatorias. Recientemente, se definió que la presencia de los linfocitos Th9 en la psoriasis es un determinante clave de la inflamación local (Singh et al., 2013). Por otro lado, se estableció que en artritis reumatoide la presencia de los linfocitos Th9 cumple un rol inmuno-modulador mientras que la presencia de los linfocitos Th22 incrementa la producción de RANKL en los fibroblastos sinoviales e induce la activación y maduración de los osteoclastos y la destrucción del hueso articular subcondral (Ikeuchi et al., 2005; Sa et al., 2007; Wolk et al., 2009; Ma et al., 2010; Goswami & Kaplan, 2011; Kim et al., 2012; Kaplan, 2013). En este contexto, las periodontitis y la artritis reumatoide comparten características patogénicas inmuno-inflamatorias y osteo-destructivas, aunque con una etiología diferente.

En las lesiones periodontales de pacientes con periodontitis, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se detecta con mayor frecuencia e induce una respuesta de mayor intensidad en distintas células de la inmunidad innata y adaptativa del hospedero, lo que sugiere un mayor potencial patogénico que podría asociarse a una mayor inmunogenicidad en linfocitos TCD4<sup>+</sup>. Recientemente, cuando células dendríticas humanas diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica fueron estimuladas con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans*, se demostró que el serotipo b indujo mayor expresión de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  en comparación a los serotipos a o c (Díaz-Zúñiga et al., 2014). Usando el mismo modelo experimental, una respuesta Th distinta fue descrita en linfocitos TCD4<sup>+</sup> estimulados; en particular, un fenotipo tanto Th1 como Th17 se indujo en presencia del serotipo b, con un incremento en los niveles de producción de las citoquinas IL-1 $\beta$ ,

IL-6, IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y el factor osteo-destructivo RANKL (Díaz-Zúñiga et al., 2015a). En este contexto, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* podría inducir un patrón de respuesta tipo Th9 y/o Th22 durante la infección periodontal y, en biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis, se detectarían mayores niveles de expresión de citoquinas y factores de transcripción asociado a los linfocitos Th9 y Th22 en comparación a biopsias de individuos sanos.

## 5. HIPÓTESIS.

En biopsias de lesiones periodontales de pacientes con gingivitis existe una respuesta predominantemente tipo Th9 y en biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis una respuesta tipo Th22. Además, los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* poseen una inmunogenicidad diferente e inducen en los linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve un patrón de respuesta distinta; en particular, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* induce mayores niveles de producción de citoquinas asociadas al fenotipo Th22 y menores niveles de producción de citoquinas asociadas al fenotipo Th9 en comparación a los serotipos a o c.

## 6. OBJETIVO GENERAL.

Determinar los niveles de expresión de los factores de transcripción y de expresión y secreción de las citoquinas asociadas a los fenotipos Th9 y Th22 en los tejidos periodontales de pacientes con periodontitis e individuos sanos y en linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

## 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Cuantificar los niveles de expresión de IL-9 e IL-22 y los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* en biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis o gingivitis y en biopsias de encía de individuos sanos.
2. Asociar los niveles de expresión de IL-9 con *Spi.B* e IL-22 con *AhR* en biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis, gingivitis y en biopsias de encía de individuos sanos.
3. Cuantificar los niveles de expresión y secreción de IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o su LPS purificado.
4. Cuantificar los niveles de expresión y secreción de IL-9 e IL-22 y los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* en linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o su LPS purificado.
5. Asociar los niveles de expresión de IL-9 con *Spi.B* e IL-22 con *AhR* en linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o su LPS purificado.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### ***8.1 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  $\geq 5$  mm, pérdida del nivel de inserción  $\geq 3$  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  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de RNA (en detalle más adelante).

### ***8.2 Selección de sujetos y obtención de células de sangre periférica***

Por otro lado, de 10 sujetos donantes sanos seleccionados por el método no probabilístico de casos consecutivos asistentes al banco de sangre del Hospital del Salvador, perteneciente al Servicio de Salud Metropolitano Oriente, se obtuvo un purificado celular de sangre periférica durante el proceso de plaquetoféresis. Los sujetos no tenían inflamación gingival, pérdida de inserción clínica asociada a enfermedad periodontal ni poseían algún sitio periodontal con profundidad al sondaje  $> 4$  mm. Se excluyeron todos los sujetos que fueron positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB) o de la hepatitis C

(VHC), presentaron alergias, fiebre o enfermedades infecto-contagiosas en el último mes, recuento anormal de células sanguíneas, incremento de enzimas hepáticas o ingesta de medicamentos (antibióticos, analgésicos o anti-inflamatorios esteroidales o no esteroidales), excepto vitaminas y anticonceptivos orales.

El estudio siguió las recomendaciones de la convención de Helsinki del año 2000 y su protocolo fue explicado a todos los participantes quienes firmaron un consentimiento informado previamente revisado y aprobado por los Comité Ético-Científicos de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y de la Comisión Nacional de Investigación en Ciencia y Tecnología (CONICYT) (Anexo 2)

### **8.3 Cultivo bacteriano**

Las cepas de *A. actinomycetemcomitans* ATCC® 43717™ (serotipo a), ATCC® 43718™ (serotipo b) y ATCC® 43719™ (serotipo c) se sembraron en medio de cultivo agar infusión cerebro corazón (Oxoid LTD, Hampshire, England) e incubaron a 37°C en condiciones de capnofilia (O<sub>2</sub> 8% y CO<sub>2</sub> 12%) usando generadores CampyGen™ (Oxoid Ltd). Para obtener un número similar de microorganismos de las distintas cepas de *A. actinomycetemcomitans* para la estimulación celular se realizaron curvas de crecimiento bacteriano, las cuales se obtuvieron en infusión de medio cerebro-corazón (BD, Le Pont de Claix, France) suplementado con 5 mg/L de hemina y 1 mg/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 tomó una muestra y se realizó una dilución en serie log<sub>10</sub> con tampón de fosfato salino (PBS). Luego, 100 µL de cada dilución se sembró en medio no selectivo y se incubó a 37°C en condiciones anaeróbicas. Después de 3 a 7 días, el número de unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) fue contabilizado 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.

#### **8.4 Purificación del LPS bacteriano para la estimulación celular**

El LPS de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* se purificó usando una versión modificada del protocolo de TRI-reagent. Las cepas bacterianas se cultivaron en infusión de medio cerebro-corazón hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario. Luego de centrifugar a 6.000 xg a 4°C durante 4 min, el *pellet* se lavó tres veces con PBS e incubó en 3 mL de una mezcla de TRIzol® Reagent (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y cloroformo (Fluka Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), en una proporción de 5:1 respectivamente, a temperatura ambiente durante 30 min. La fase acuosa se recuperó y liofilizó durante toda la noche. La purificación del LPS se realizó usando 0,375 M de MgCl<sub>2</sub> en etanol 95% y se lavó 5 veces con una mezcla de etanol 95% con 1% de reactivo de Folch (cloroformo y MeOH en una proporción de 2:1). El LPS se visualizó mediante electroforesis en gel de Tris-glicina de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) con un 14% de gel de poliacrilamida y tinción de ácido peryódico de plata y fue cuantificado usando la reacción del ácido tiobarbitúrico malondialdehído.

#### **8.5 Purificación de monocitos y linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve**

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

Posteriormente los linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve se purificaron utilizando un *kit* de depleción celular específico, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MACS; Miltenyi Biotec). Para esto, una fracción de las PBMCs se incubó con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$  y CD235a humanos conjugados con biotina durante 20 min a 4°C y posteriormente con anticuerpo anti-biotina conjugado con partículas inmuno-magnéticas durante 15 min a 4°C. Luego de ser lavadas, las células se resuspendieron en PBS y los linfocitos

TCD4<sup>+</sup> *naïve* se aislaron usando columnas de depleción LD montadas en un campo magnético.

La fracción de células CD14<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> purificadas corresponden a los monocitos y linfocitos, respectivamente, los que se contaron utilizando una cámara de Neubauer®. Su fenotipo se confirmó usando anticuerpos específicos analizados mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

### **8.6 Diferenciación y estimulación de células dendríticas y activación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve***

Los monocitos purificados se sometieron inmediatamente a un protocolo estandarizado de diferenciación *in vitro* a células dendríticas. Los monocitos CD14<sup>+</sup> se cultivaron durante 6 días a una concentración de 0,7x10<sup>6</sup> células/mL en 3mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp) y 20 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CFS) y la citoquina IL-4 (R&D, Minneapolis, MN USA).

Las células dendríticas diferenciadas se estimularon con las distintas cepas de *A. actinomycetemcomitans* a una multiplicidad infectante incremental (MOI) de 1 a 2 (razón bacterias/células dendríticas) durante 2 días. Como control positivo, células dendríticas se estimularon con 10 ng/mL del LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4 (Fluka, Sigma-Aldrich). Células dendríticas no estimuladas se utilizaron como control negativo. La diferenciación y estimulación de las células dendríticas se evaluó con anticuerpos específicos mediante citometría de flujo (en detalle más adelante).

Las células dendríticas estimuladas se lavaron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina y se co-cultivaron con linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* autólogos a una razón de 1:10 durante 5 días.

### **8.7 Análisis de 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 (molécula co-estimuladora de la presentación antigénica) y anti-CD86 (molécula co-estimuladora de la presentación antigénica) (BD Biosciences Pharmigen, San José, CA, USA) y utilizando un equipo FACScan de citometría de flujo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). La purificación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* se evaluó usando los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugado con fluorocromos PE o FITC: anti-CD45RA (linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve*), anti-CD45RO (linfocitos TCD4<sup>+</sup> de memoria) y anti-CD14 (monocitos) (BD Biosciences Pharmigen). La activación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* se evaluó usando los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugado con fluorocromos PE o FITC: anti-CD62L (marcador de linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve*), anti-CD69 (marcador de activación) y mediante RT-PCR en tiempo real CD25 $\alpha$  (BD Biosciences Pharmigen).

### **8.8 Purificación del RNA mensajero citoplasmático total de cultivos celulares**

Luego de la estimulación, las células se lavaron dos veces en PBS y lisaron en 400  $\mu$ L de tampón de lisis conteniendo Igepal® CA-630 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM del vanadyl-ribonucleosidos (VRC) (Gibco Invitrogen). Después de centrifugar a 14.000  $xg$  durante 10 seg, el sobrenadante se digirió con 25  $\mu$ g/mL de proteinasa K (Roche Ltd, Basel, Switzerland), 1% de SDS y 15 mM de EDTA (Fluka Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C. El RNA citoplasmático total se extrajo con 400  $\mu$ L de solución fenol:cloroformo:isoamylalcohol 25:24:1 (Fluka Sigma-Aldrich), precipitado a -20°C con 0,3 M de acetato de sodio, 1 mL de etanol 100% y 1  $\mu$ L de glicógeno (20  $\mu$ g/ $\mu$ L) (Roche Ltd), recuperándose por centrifugación a 14.000  $xg$  durante 30 min y resuspendiéndose en 30  $\mu$ L de agua milliQ libre de RNAsas. Para su análisis y cuantificación se utilizaron los equipos anteriormente mencionados.

### **8.9 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  $\mu$ L 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 µg/µL) (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.

### **8.10 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.

### **8.11 Expresión de factores de transcripción y citoquinas mediante RT-PCR en tiempo real**

La expresión de los mRNAs de las citoquinas IL-4, IL-6, IL-9, IL-22, TNF-α y TGF-β1 y de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* se cuantificó a partir de 50 ng de cDNA mediante qPCR en tiempo real, utilizando partidores específicos (Tabla 1) y el 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.

<b>Citoquina / Factor transcripción</b>	<b>Partidor <i>Forward</i></b>	<b>Partidor <i>Reverse</i></b>
IL-4	<i>5'caccgagttgaccgtaacag</i>	<i>3'gcctgcagaaggttcc</i>
IL-6	<i>5'gccagctatgaactccttct</i>	<i>3'gaaggcagcaggcaacac</i>
TNF- $\alpha$	<i>5'cagcctcttctccttctgat</i>	<i>3'gccagagggtgattagaga</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>5'cacgtggagctgtaccagaa</i>	<i>3'cagccggtgctgaggta</i>
IL-9	<i>5'catccttgctctgttttgc</i>	<i>3'cggagagacacaagcagctgg</i>
IL-22	<i>5'accttcttgaccaaactca</i>	<i>3'agcttcttctcgctcagacg</i>
<i>Spi.B</i>	<i>5'gcataccccacggagaact</i>	<i>3'cggttaagtcttctcctctgatag</i>
<i>AhR</i>	<i>5'caacatcacctacgccagtc</i>	<i>3'ctatgccgcttggaggat</i>
18S	<i>5'ctcaacacgggaaacctcac</i>	<i>3'cgctccaccaactaagaacg</i>

**Tabla 1. Partidores específicos utilizados para la cuantificación de citoquinas y factores de transcripción mediante PCR en tiempo real.**

### **8.12 Secreción de citoquinas mediante ELISA**

A partir de 100 ó 200  $\mu$ L del sobrenadante de cada cultivo celular, la secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  se cuantificaron en células dendríticas y las citoquinas IL-9 e IL-22 en linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D) y evaluando la absorbancia a 460 nm y 560 nm usando un lector automatizado de placas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

### **8.13 Análisis de los datos**

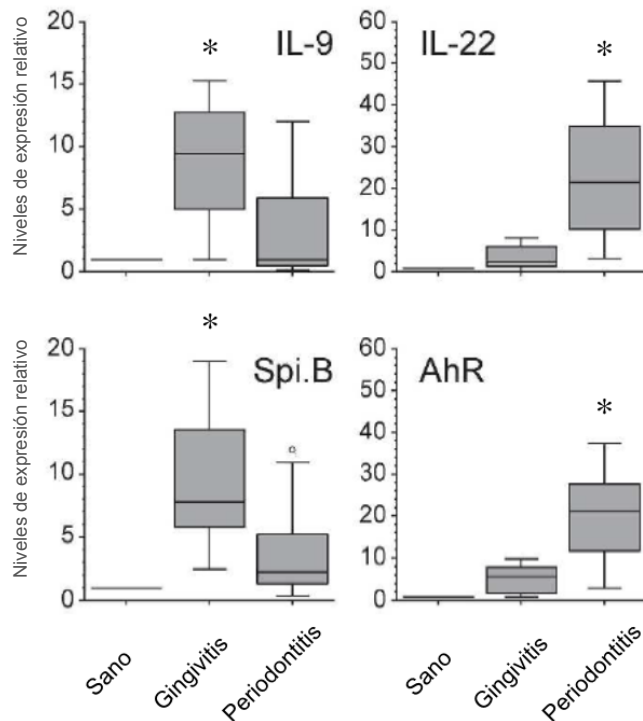
Los datos de citometría de flujo se representan como histogramas usando el software WinMDi 2.9 (The Scripps Research Inst., La Jolla, CA, USA) y se expresan como porcentaje promedio  $\pm$  desviación estándar de células positivas sobre el total de células analizadas. Los niveles de citoquinas evaluados mediante ELISA se expresan como concentración promedio  $\pm$  desviación estándar. Los niveles de citoquinas y de los factores de transcripción evaluados mediante qPCR se expresan como niveles de

expresión relativo promedio  $\pm$  desviación estándar. 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 Shapiro-Wilk. Las diferencias en la expresión de los marcadores de superficie CD1a, CD4, CD14, CD45RA, CD45RO, CD80, CD83 y CD86 se analizaron mediante la prueba  $\chi^2$ , los niveles de expresión de los factores de transcripción y los niveles de expresión y secreción de las citoquinas se analizaron utilizando las pruebas ANOVA y de Tukey o las pruebas de Kruskal-Wallis y de Dunn. La asociación de los datos se realizó con una prueba de correlación determinando el coeficiente de correlación de Spearman o de Pearson. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de *p-value* fue  $<0,05$ .

## 9. RESULTADOS.

### 9.1 Expresión de citoquinas y factores de transcripción en biopsias

En biopsias de tejidos gingivales de pacientes con periodontitis crónica, gingivitis e individuos sanos se cuantificaron mediante PCR en tiempo real los niveles de expresión de las citoquinas IL-9 e IL-22 y los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* (Figura 1). Mayores niveles de expresión de IL-22 se detectaron en lesiones de pacientes con periodontitis crónica en comparación con lesiones de pacientes con gingivitis y tejido gingival de individuos sanos ( $p=0,001$  y  $p<0,001$ , respectivamente) y mayores niveles de IL-9 se detectaron en lesiones de pacientes con gingivitis en comparación con lesiones de pacientes con periodontitis crónica y tejido gingival de individuos sanos ( $p=0,003$  y  $p=0,001$ , respectivamente). Además, mayores niveles de expresión de *AhR* se detectaron en lesiones de pacientes con periodontitis crónica en comparación con lesiones de pacientes con gingivitis y tejido gingival de individuos sanos ( $p=0,001$  y  $p<0,001$ , respectivamente) y mayores niveles de *Spi.B* se detectaron en lesiones de pacientes con gingivitis en comparación con lesiones de pacientes con periodontitis crónica y tejido gingival de individuos sanos ( $p=0,007$  y  $p=0,001$ , respectivamente).



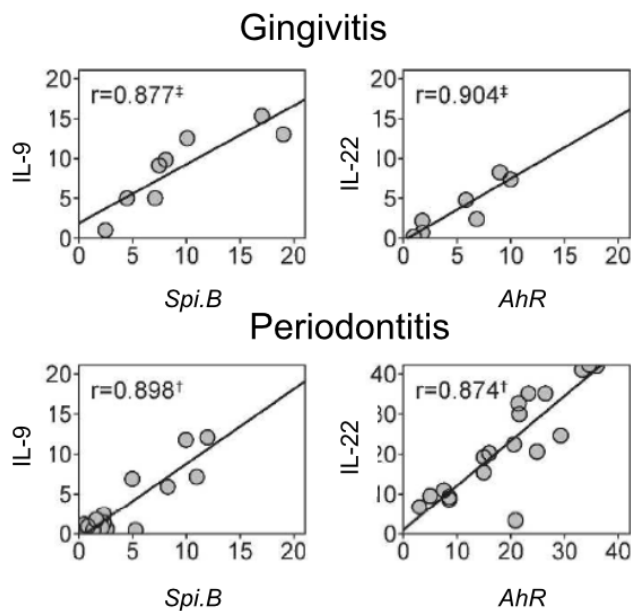
**Figura 1. Expresión de citoquinas en biopsias de tejidos gingivales.** A partir de 20 biopsias de tejidos gingivales de pacientes con periodontitis crónica y 8 con gingivitis, la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-9 e IL-22 y de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* fue determinada mediante cuantificación por PCR en tiempo real. Como control negativo, se utilizaron biopsias de tejido gingival de individuos sanos. \* $p<0,05$ .

## 9.2 Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción con los niveles de secreción de citoquinas en biopsias

A partir de los resultados obtenidos en las biopsias de lesiones gingivales de pacientes con periodontitis crónica, gingivitis e individuos sanos, se calculó el coeficiente de correlación de *Pearson* ( $r$ ) entre los niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* (Th9) y *AhR* (Th22) y los niveles expresados de las citoquinas IL-9 e IL-22 (Figura 2).

Para el perfil Th9, se detectó una correlación positiva entre *Spi.B* e IL-9 en biopsias de lesiones gingivales de pacientes con periodontitis crónica y gingivitis ( $p=0,004$  y  $p<0,001$ , respectivamente).

Para el perfil Th22, se detectó una correlación positiva entre *AhR* e IL-22 en biopsias de lesiones gingivales de pacientes con periodontitis crónica y gingivitis ( $p<0,05$ ).

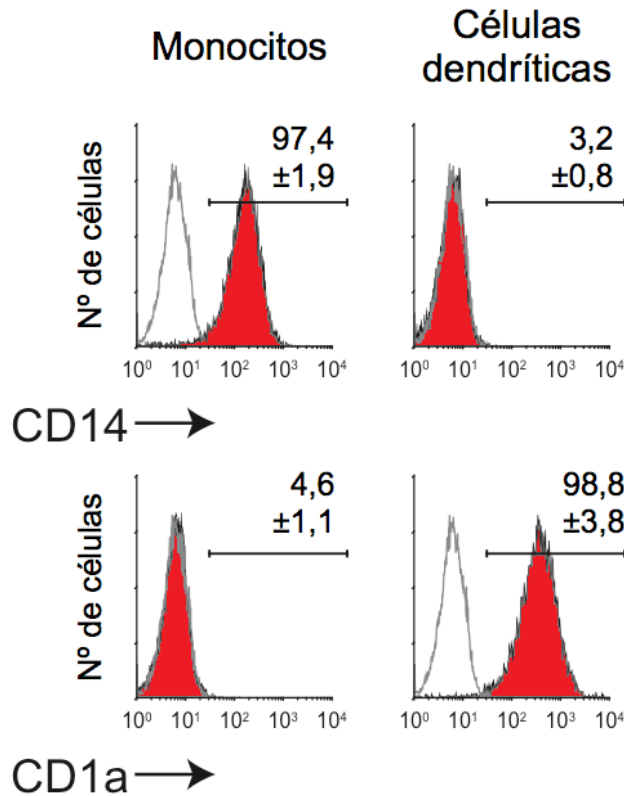


**Figura 2. Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción y de expresión de las citoquinas.** A partir de 20 biopsias de tejidos gingivales de pacientes con periodontitis y 8 con gingivitis, se calculó el coeficiente de correlación de *Pearson* ( $r$ ) entre los niveles de expresión de mRNA de los factores de transcripción *Spi.B* (Th9) y *AhR* (Th22) y los niveles de expresión de las citoquinas IL-9 e IL-22. \* $p<0,05$ .

## 9.3 Purificación de monocitos

La purificación de los monocitos y su diferenciación a células dendríticas fue evaluada mediante citometría de flujo (Figura 3). A partir de las PBMCs aisladas de sangre periférica se obtuvo una población de monocitos de alta pureza, demostrado

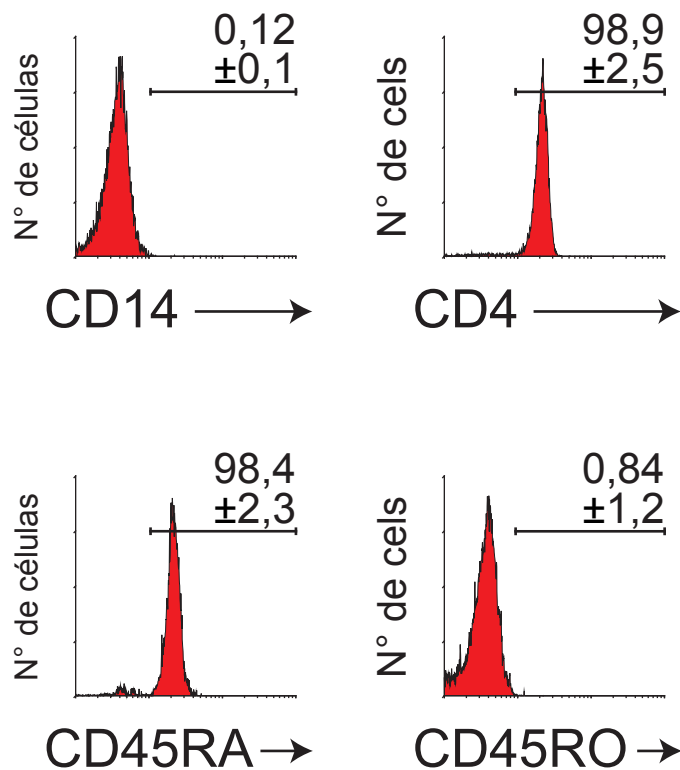
por el marcador específico CD14 (>97%). Un alto porcentaje de ellos (>98%) se diferenciaron a células dendríticas ante la estimulación con GM-CSF e IL-4, tal como se demuestra por la pérdida del marcador de monocitos CD14 y el incremento en los niveles de expresión de CD1a.



**Figura 3. Purificación de monocitos y diferenciación a células dendríticas.** Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de monocitos (células CD14<sup>+</sup>) a partir de las PBMCs y de su diferenciación a células dendríticas (células CD1a<sup>+</sup>) en presencia de GM-CSF e IL-4.

#### 9.4 Purificación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve

La purificación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve se evaluó mediante citometría de flujo (Figura 4). A partir de las PBMCs aisladas de sangre periférica, se obtuvo una población de linfocitos de alta pureza, demostrado por los elevados niveles de expresión del marcador específico CD4 (> 98%) y bajos niveles de expresión del marcador CD14 de monocitos (< 0,12%). La población aislada correspondía a linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve, evaluada por los marcadores CD45RA (98%) y CD45RO (0,84%).

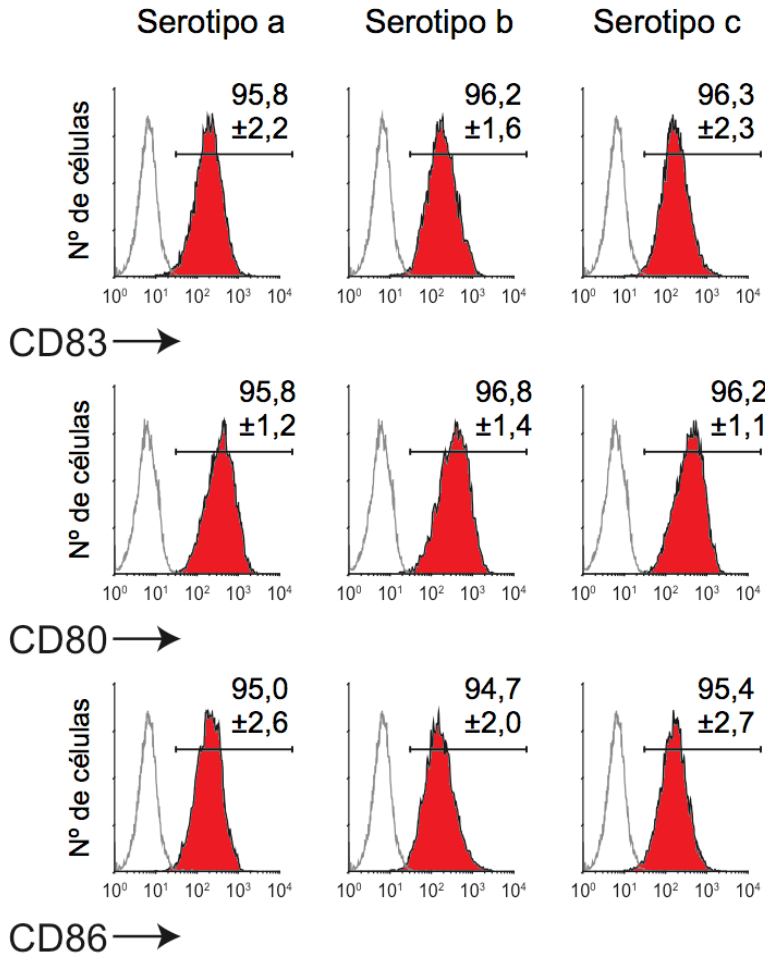


**Figura 4. Purificación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve.** Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de purificación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve (células CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>) a partir de las PBMCs.

### 9.5 Activación de las células dendríticas

Los niveles de activación de las células dendríticas se evaluaron analizando los niveles de expresión de CD80, CD83 y CD86 mediante citometría de flujo (Figura 5). 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 estadísticas en los niveles de activación de las células dendríticas ante la estimulación con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* (CD83  $p=0,938$ ; CD80  $p=0,532$  y CD86  $p=0,933$ ).

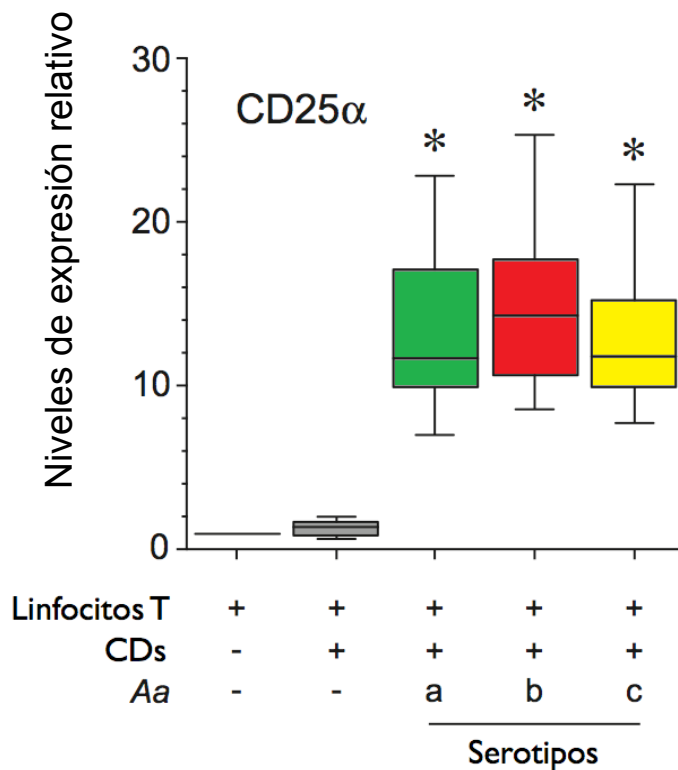
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*



**Figura 5. 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 luego de la estimulación durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) que evidencian la activación de las células dendríticas.

**9.6 Activación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve**

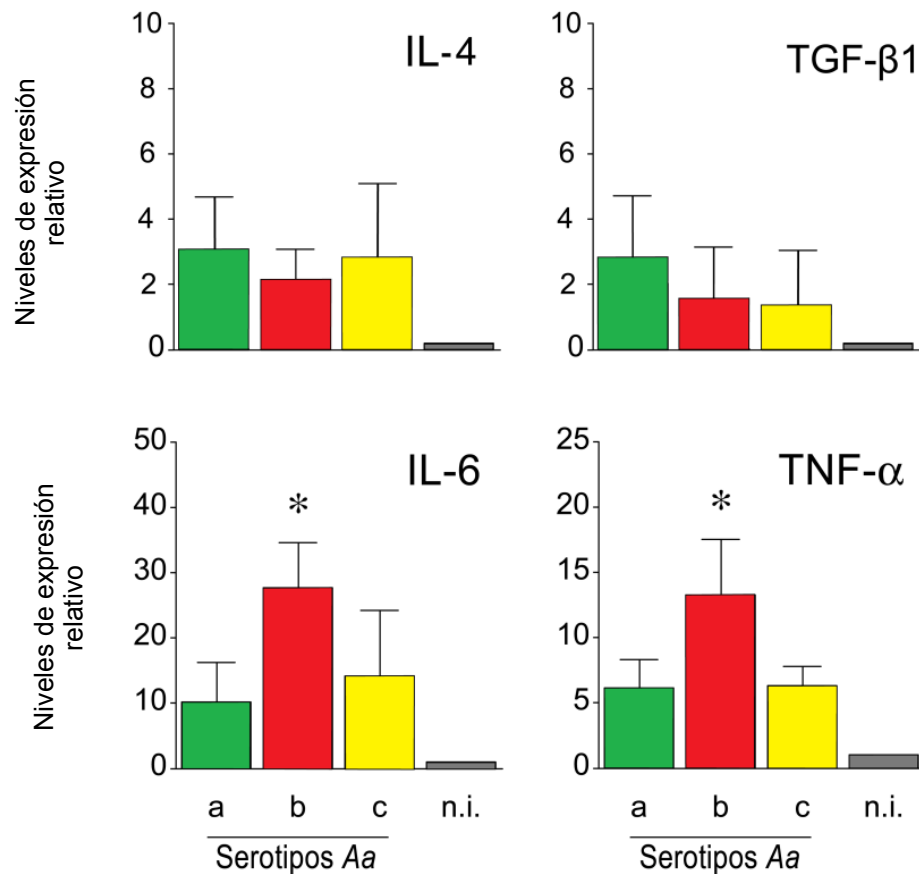
Los niveles de activación de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve se evaluaron analizando los niveles de expresión de CD25a mediante PCR en tiempo real (Figura 6). Elevados niveles de expresión de CD25a se observaron posterior a la estimulación con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans*, al ser comparados con linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve no inducidos ( $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias estadísticas en los niveles de expresión de CD25a entre los linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas autólogas.



**Figura 6. Linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de A. actinomycetemcomitans.** Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de CD25a que evidencian la activación de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve luego de 5 días de activación por células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de A. actinomycetemcomitans (MOI=2). \*p<0,05.

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

El patrón de citoquinas expresadas por células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de A. actinomycetemcomitans, asociados a la diferenciación de los fenotipos Th9 y Th22, fue confirmado luego de cuantificar los niveles de expresión de los mRNA de las citoquinas IL-4, IL-6, TNF-α y TGF-β1 por PCR en tiempo real (Figura 7). Las células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC® 43718™) expresaron mayores niveles de TNF-α (p=0,006 y p=0,007) en comparación a células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente. Además, el serotipo b indujo mayores niveles de expresión de IL-6 en comparación al serotipo a (p=0,01), pero no en comparación al serotipo c (p=0,28). No hubo diferencias en los niveles de expresión de las citoquinas IL-4 y TNF-α entre los serotipos a o c.

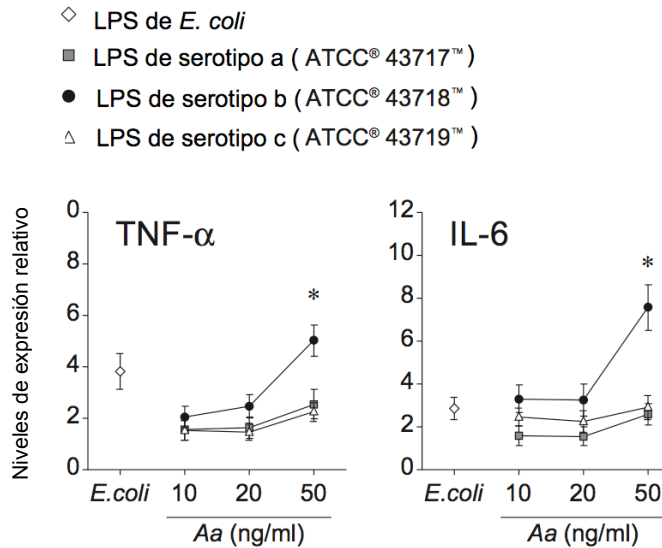


**Figura 7. Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.** A partir de 10 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  fue determinada mediante cuantificación por PCR en tiempo real, en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Como control negativo, se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). \* $p < 0,05$ .

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

En células dendríticas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante PCR en tiempo real, los niveles de expresión de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 8). Se detectaron mayores niveles de expresión de TNF- $\alpha$  ( $p=0,021$  y  $p=0,012$ ) e IL-6 ( $p=0,003$  y  $p=0,004$ ) en

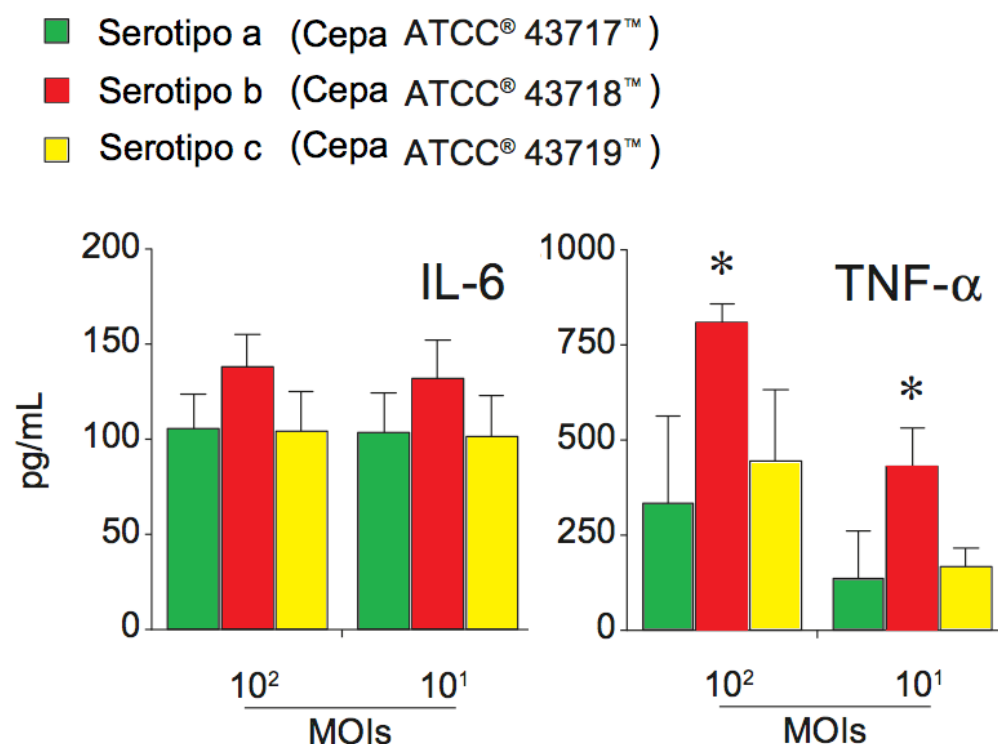
células dendríticas estimuladas con 50 ng/mL de LPS del serotipo b, en comparación a las células dendríticas estimuladas con el LPS de los serotipos a o c, respectivamente.



**Figura 8. Expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b y c de *A. actinomycetemcomitans*.** A partir de 6 experimentos independientes, la expresión de las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con el LPS purificado del serotipo a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* a una concentración de 10, 20 ó 50 ng/mL. Como control positivo células dendríticas fueron estimuladas con 10 ng/mL de LPS de *E. coli* cepa 0111:B4. \* $p < 0,05$ .

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

En las células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se determinaron los niveles de secreción (pg/mL) de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 mediante ELISA (Figura 9). Mayores niveles de secreción de TNF- $\alpha$  (MOI=1,  $p=0,002$ ; MOI=2,  $p < 0,001$ ) se detectaron en las células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC® 43718™) de *A. actinomycetemcomitans*, en comparación a los otros serotipos bacterianos. Además, no se detectaron diferencias de secreción de IL-6 entre los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans*.

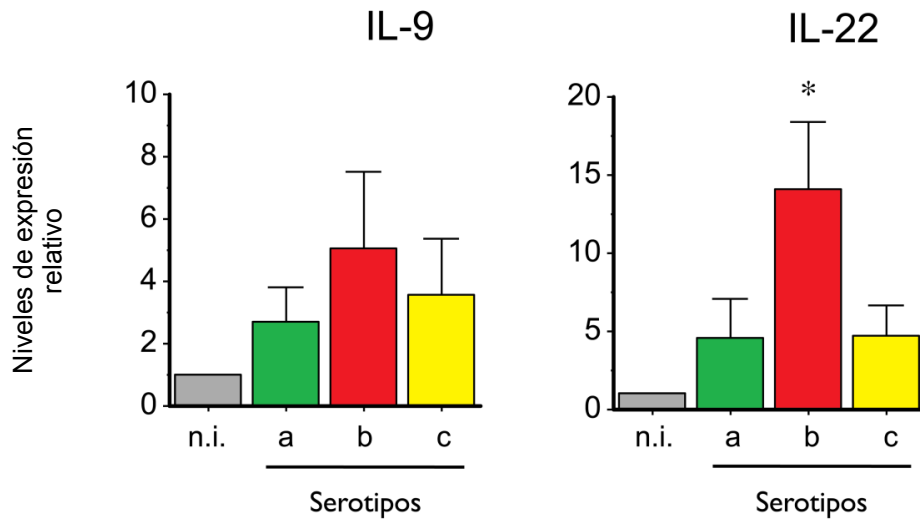


**Figura 9. Secreción de citoquinas en células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.** A partir de 10 experimentos independientes, la secreción de las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  fue cuantificada mediante ELISA en células dendríticas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=1 a 2). Como control negativo se utilizaron células dendríticas sin estimular y como control positivo, células dendríticas se estimularon durante 48 horas con 10 ng/mL del LPS de *E. coli* cepa 0111:B4. \* $p < 0,05$ .

### **9.10 Expresión de citoquinas en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans***

En linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante qPCR en tiempo real, los niveles de expresión de las citoquinas IL-9 e IL-22 (Figura 10). Mayores niveles de expresión de IL-22 ( $p > 0,05$ ) se detectaron en linfocitos TCD4<sup>+</sup>

*naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b en comparación a los serotipos a o c. No se detectaron diferencias de expresión de IL-9 entre los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans*.

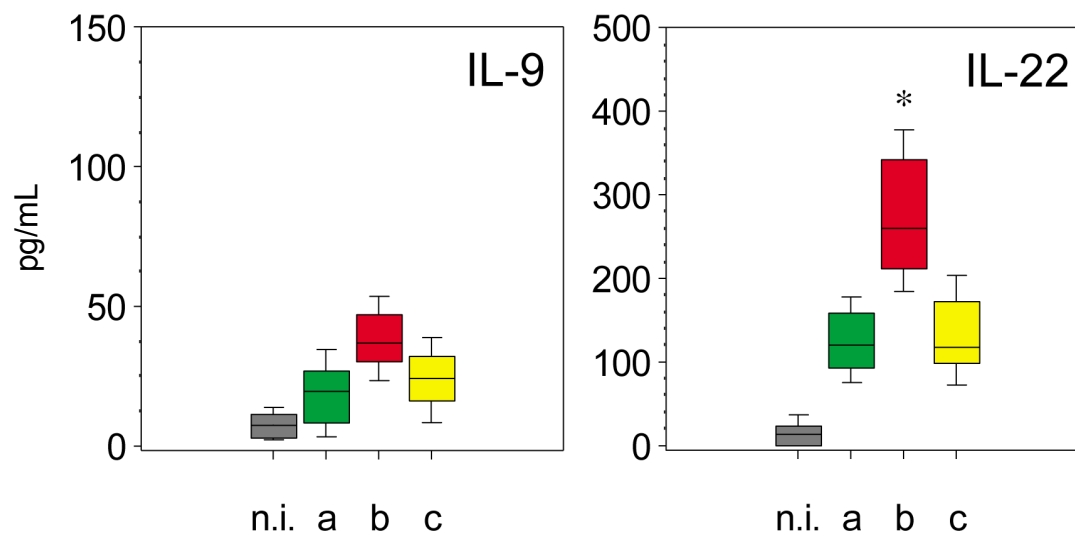


**Figura 10. Niveles de expresión de citoquinas en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.** A partir de 6 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de las citoquinas IL-9 e IL-22 en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los distintos serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2), fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real. Como control negativo se utilizaron linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). \* $p < 0,05$ .

### **9.11 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans***

Para evaluar el patrón de citoquinas secretadas por los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* se cuantificaron los niveles de secreción (pg/mL) de IL-9 e IL-22 mediante ELISA (Figura 11). Mayores niveles de secreción de IL-22 ( $p > 0,05$ ) MOI=2 se detectaron en los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo b (ATCC® 43718™) de *A. actinomycetemcomitans*, en comparación a los otros serotipos

bacterianos. No se detectaron diferencias de secreción de IL-9 entre los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans*.

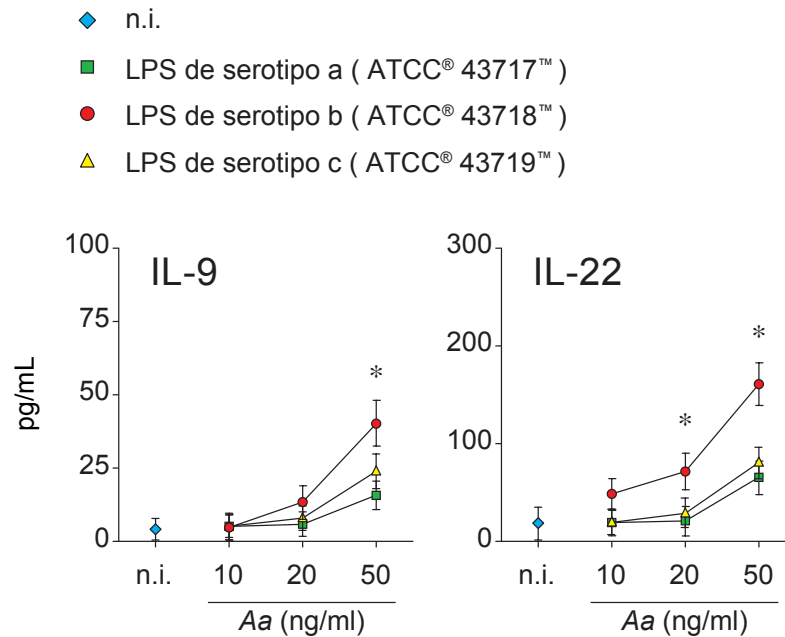


**Figura 11. Secreción de citoquinas linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.** A partir de 6 experimentos independientes, la secreción de las citoquinas IL-9 e IL-22 fue cuantificada mediante ELISA en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas durante 48 horas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Como control positivo, los niveles de secreción de citoquinas fueron cuantificados en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). \* $p < 0,05$ .

### 9.12 Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados con LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*

En linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante ELISA, los niveles de secreción de las citoquinas IL-9 e IL-22 (Figura 12). Se detectaron mayores niveles de secreción de IL-22 ( $p=0,039$  y  $p=0,0041$ ) en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 20 ng/mL de LPS del serotipo b (ATCC® 43718™) en comparación al serotipo a (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente. Mayores niveles de secreción de IL-9 ( $p=0,035$  y  $p=0,042$ ) e IL-22 ( $p=0,019$  y

$p=0,022$ ) se detectaron en linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 50 ng/mL de LPS del serotipo b (ATCC® 43718™) en comparación al (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente.

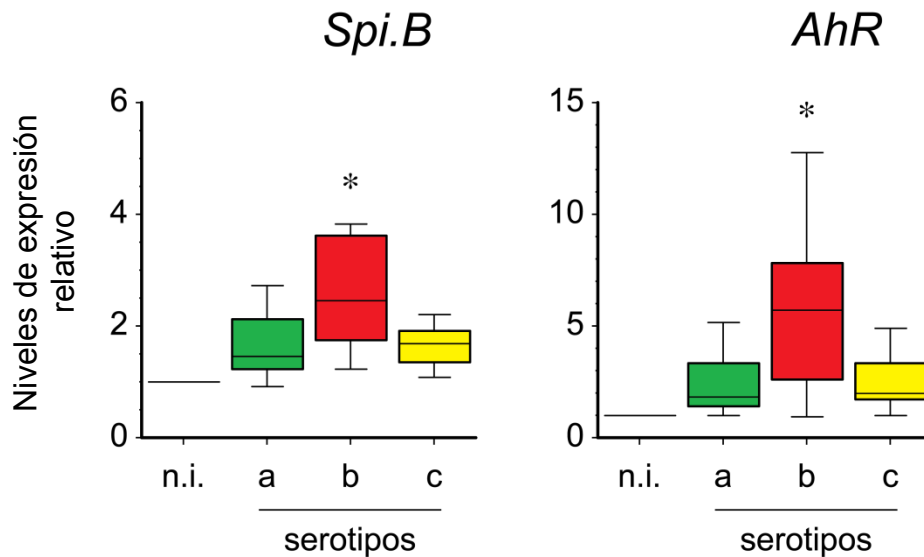


**Figura 12. Secreción de citoquinas en linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con LPS purificado de los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans*.** A partir de 6 experimentos independientes, la secreción de las citoquinas IL-9 e IL-22 fue determinada, mediante ELISA, en linfocitos TCD4<sup>+</sup> activados por células dendríticas autólogas estimuladas con 10, 20 ó 50 ng/mL de LPS purificado de los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2). Como control negativo se utilizaron linfocitos TCD4<sup>+</sup> activados por células dendríticas no inducidas (n.i.). \* $p < 0,05$ .

### 9.13 Expresión de factores de transcripción en linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados

En linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) se cuantificaron, mediante qPCR en tiempo real, los niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* (Figura 13). Los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados con células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b (ATCC® 43718™) presentaron mayores niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* ( $p=0,042$  y  $p=0,039$ ) y *AhR* ( $p=0,045$  y  $p=0,044$ ) en comparación a los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados con células

dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™) o c (ATCC® 43719™), respectivamente. No hubo diferencias en los niveles de expresión de los factores de transcripción en los linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados con células dendríticas estimuladas con los serotipos a o c.



**Figura 13. Niveles de expresión de los factores de transcripción en linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados.** A partir de 6 experimentos independientes, la expresión de los mRNA de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR* en linfocitos TCD4<sup>+</sup> activados por células dendríticas autólogas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2) fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real. Como control negativo se utilizaron células dendríticas no inducidas (n.i.). \* $p < 0,05$ .

#### **9.14 Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción con los niveles de secreción de citoquinas**

A partir de los resultados obtenidos en los linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas estimuladas con los serotipos a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* (MOI=2), se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) entre los niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* (Th9) y *AhR* (Th22) y los niveles secretados de las citoquinas IL-9 e IL-22 (Tabla 3).

Para el perfil Th9, se detectó una correlación positiva entre *Spi.B* e IL-9 en los linfocitos TCD4<sup>+</sup> naïve activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a

(ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* ( $p=0,042$ ;  $p=0,012$ ;  $p=0,007$ ; respectivamente).

Para el perfil Th22, se detectó una correlación positiva entre *AhR* e IL-22 en los linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* activados por células dendríticas estimuladas con el serotipo a (ATCC® 43717™), b (ATCC® 43718™) o c (ATCC® 43719™) de *A. actinomycetemcomitans* ( $p=0,035$ ;  $p=0,007$ ;  $p=0,037$ ; respectivamente).

<i>Cepas de Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>							
		ATCC® 43717™ (serotipo a)		ATCC® 43718™ (serotipo b)		ATCC® 43719™ (serotipo c)	
		r	p-value	r	p-value	r	p-value
<i>Spi.B</i>	IL-9	0,810	0,042	0,908	0,012	0,913	0,007
<i>AhR</i>	IL-22	0,833	0,035	0,914	0,007	0,830	0,037

**Tabla 2. Correlación entre los niveles de expresión de los factores de transcripción y de secreción de las citoquinas.** A partir de 6 experimentos independientes se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) entre los niveles de expresión de mRNA de los factores de transcripción *Spi.B* (*Th9*) y *AhR* (*Th22*) y los niveles de secreción de citoquinas asociadas a los linfocitos *Th9* y *Th22* en linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* estimulados por las células dendríticas sensibilizadas con las cepas ATCC® 43717™ (serotipo a), ATCC® 43718™ (serotipo b) o ATCC® 43719™ (serotipo c) de *A. actinomycetemcomitans* a una multiplicidad de infección (MOI) de 2.

## 10. DISCUSIÓN.

Durante las periodontitis, la destrucción de los tejidos de inserción periodontal y la pérdida de los dientes se asocia a un patrón de respuesta inmune local de tipo Th1 (pro-inflamatorio) y Th17 (osteo-destructivo) (Dutzan et al., 2009a; Dutzan et al., 2009b; Hernández et al., 2011). En efecto, en biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis crónica, se ha detectado un incremento en los niveles de los factores de transcripción y citoquinas asociadas a la diferenciación y función de linfocitos Th1 y Th17, correlacionándose estos mayores niveles a la severidad de la enfermedad (Dutzan et al., 2009a; Dutzan et al., 2009b; Hernández et al., 2011). En el presente trabajo de investigación, en pacientes con periodontitis se demostró un incremento en los niveles de expresión de *AhR* y producción de IL-22, asociados a la presencia y actividad de linfocitos Th22, y en pacientes con gingivitis un incremento en los niveles de expresión de *Spi.B* y producción de IL-9, asociados a linfocitos Th9. Por otro lado, en células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, se detectó mayor producción de IL-6 y TNF- $\alpha$ , que promueven la polarización selectiva de linfocitos Th22 durante la presentación antigénica. Además, en los linfocitos T ante el serotipo b, se detectó mayor expresión del factor de transcripción *AhR* y producción de IL-22, característicos de la diferenciación y función de linfocitos Th22 pro-inflamatorios y osteo-destructivos.

*A. actinomycetemcomitans* es un periodonto-patógeno que coloniza tardíamente los tejidos periodontales co-agregando la superficie de la biopelícula, en donde su LPS induce diversas respuestas inmunológicas en el hospedero que determinan su patogenicidad (Perry et al., 1996a; Perry et al., 1996b; Kaplan et al., 2001; Díaz-Zúñiga et al., 2014; Díaz-Zúñiga et al., 2015a). En términos generales *A. actinomycetemcomitans* se detecta en bajos niveles en los tejidos periodontales infectados; sin embargo, su LPS posee una alta inmunogenicidad, en particular el expresado por el serotipo b, el que se asocia con el fenotipo clínico más severo de la enfermedad (Asikainen et al., 1991; Teixeira et al., 2006; Shimada et al., 2008; Duhén et al., 2009; Roman-Torres et al., 2010; Cortelli et al., 2012). Recientemente, con el objetivo de cuantificar la frecuencia de detección de los serotipos a, b o c en pacientes con periodontitis crónica o agresiva de la población chilena, se obtuvieron muestras microbiológicas a 25 pacientes que asistieron a la clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, detectándose la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en 4 pacientes con periodontitis agresiva, siendo 3 de ellos positivos para el serotipo b (datos no publicados). Estos resultados avalan la

importancia de nuestro estudio que busca determinar el potencial rol del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en la inducción de una respuesta inmune más patogénica, específicamente, la inducida por los linfocitos Th22.

En estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación, se analizaron los niveles de producción de citoquinas pro-inflamatorias en células dendríticas y linfocitos TCD4<sup>+</sup> *naïve* estimulados con los distintos serotipos de *A. actinomycetemcomitans* o su LPS purificado, detectándose que el serotipo b indujo mayores niveles de expresión de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23 e IFN- $\gamma$  en células dendríticas, y de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17, IL-21, IL-23, IFN- $\gamma$  y el factor osteo-destructivo RANKL en linfocitos T, en comparación a los otros serotipos (Díaz-Zúñiga et al., 2014; Díaz-Zúñiga et al., 2015a). Además, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión y secreción de las distintas moléculas en presencia de los serotipos a o c, tanto con la bacteria *ad integrum* como su LPS purificado. En conjunto, estos datos nos permiten establecer que en pacientes con periodontitis la forma sérica más inmunogénica de *A. actinomycetemcomitans* podría asociarse con la inflamación y reabsorción del hueso alveolar características de la enfermedad al inducir un patrón de respuesta linfocitaria tipo Th1 y Th17 (Díaz-Zúñiga et al., 2014; Díaz-Zúñiga et al., 2015a). En asociación a estos datos, los presentados en el presente trabajo de investigación nos permiten proyectar el rol del serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* en la definición del fenotipo Th22 en periodontitis y Th9 en gingivitis o salud periodontal.

Los linfocitos Th9 cumplen un rol pro-inflamatorio en enfermedades auto-inmunes y alérgicas y un rol inmuno-modulador en enfermedades neoplásicas (Lu et al., 2012) y los linfocitos Th22 cumplen un rol pro-inflamatorio y osteo-destructivo en las artritis reumatoide (Ikeuchi et al., 2005; Ma et al., 2010; Goswami & Kaplan, 2011; Kim et al., 2012; Kaplan, 2013). En efecto, mientras los linfocitos Th9 disminuyen la frecuencia de proliferación de los linfocitos T e inhiben la secreción de citoquinas asociadas a los fenotipos Th1 y Th17 (Aranha et al., 2013), los linfocitos Th22 inducen la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y RANKL en fibroblastos sinoviales mediante la expresión y secreción de IL-22 activando la diferenciación y la maduración de osteoclastos (Ikeuchi et al., 2005; Ma et al., 2010; Goswami & Kaplan, 2011; Kim et al., 2012; Kaplan, 2013).

La detección de linfocitos Th22 en pacientes con artritis reumatoide ha permitido asociar los niveles de IL-22 con la severidad de la enfermedad y, en conjunto con los linfocitos Th1 y Th17, cumplirían un rol central en la etiopatogenia de la

destrucción de los tejidos articulares (Ikeuchi et al., 2005; Kim et al., 2012). Así, mientras en las fases inflamatorias de la enfermedad predominarían los linfocitos Th1, en las fases osteo-destructivas predominarían los linfocitos Th17 y Th22 (Ikeuchi et al., 2005; Ma et al., 2010; Goswami & Kaplan, 2011; Kim et al., 2012; Kaplan, 2013). Además, se ha detectado la presencia de linfocitos Th9 y elevados niveles de IL-9 en pacientes con artritis reumatoide en tratamiento, sugiriendo un potencial rol de estos linfocitos en los fenómenos reparativos asociados a la salud articular (Khan et al., 2009). De este modo, la medición de citoquinas fenotipo-específicas ha permitido detectar la actividad y severidad de la enfermedad, permitiendo proyectar nuevas terapias inmunológicas. En efecto, en un modelo murino de artritis reumatoide se bloqueó IL-22R, detectándose una disminución de los signos clínicos de inflamación y de destrucción ósea (Marijnissen et al., 2011).

No obstante, y de acuerdo a nuestros datos, el rol de los linfocitos Th9 y Th22 en la patogenia de las periodontitis podría ser antagónico, donde los linfocitos Th9 modularían la diferenciación de los linfocitos Th22 modificando la respuesta osteo-destructiva. En efecto, ante el serotipo b de *A. actinomycescomitans* se incrementaron significativamente los niveles de expresión del factor determinante de la diferenciación de los linfocitos Th9, *Spi.B*, sin detectar diferencias en los niveles de expresión y secreción de IL-9, asociándose a un silencio fenotípico o afuncionalidad. Concentraciones elevadas de INF- $\gamma$  secretadas por células dendríticas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycescomitans* disminuirían la diferenciación de los linfocitos Th9 e inhibirían la producción de IL-9, mediante la regulación negativa por IL-4 (Murugaiyan et al., 2012; Kaplan, 2013; Díaz-Zúñiga et al., 2014; Díaz-Zúñiga et al., 2015). En este contexto, los niveles de expresión detectados del factor *Spi.B* tendrían su explicación durante el proceso de diferenciación de los linfocitos Th9, Th17 y Treg, que dependen de los niveles de TGF- $\beta$ 1 para activar sus factores de transcripción específicos; mientras que los linfocitos Th17 se diferencian en presencia de elevados niveles de IL-6 y bajos de TGF- $\beta$ 1, los fenotipos Th9 y Treg requieren de una mayor concentración de TGF- $\beta$ 1 y menor de IL-6 (Dardalhon et al., 2008; Vernal & Garcia-Sanz, 2008; Chang et al., 2010; Singh et al., 2013). En efecto, nuestros estudios detectaron bajos niveles de expresión y secreción de TGF- $\beta$ 1 en las células dendríticas estimuladas con los serotipos a, b o c de *A. actinomycescomitans* (Díaz-Zúñiga et al., 2015b), condicionando un ambiente pro-inflamatorio local que facilitaría la polarización hacia los fenotipos efectores Th1, Th17 y Th22.

Interesantemente, en biopsias de lesiones gingivales de pacientes con gingivitis se detectó un incremento en los niveles de expresión de IL-9 y *Spi.B*, asociados al

fenotipo Th9, en comparación a biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis. Además, en biopsias de lesiones periodontales de pacientes con periodontitis se detectó un incremento en los niveles de expresión de IL-22 y *AhR*, asociados al fenotipo Th22, en comparación a biopsias de pacientes con gingivitis. Estos datos concuerdan con la hipótesis planteada anteriormente, sugiriendo el potencial rol de los linfocitos Th22 en la actividad osteo-destructiva durante las periodontitis y de los linfocitos Th9 en la actividad inmuno-inflamatoria inducida por periodonto-patógenos durante las gingivitis. No obstante nuestros resultados y la evidencia existente sustentan la hipótesis del posible rol de los fenotipos Th9 y Th22 en la patogenia de las enfermedades periodontales, el balance entre todos los fenotipos de linfocitos T diferenciados en una lesión periodontal particular es el determinante final de la presencia de salud o enfermedad periodontal. Así, el incremento de la actividad de un fenotipo en particular o un conjunto de fenotipos podrían ser determinantes de la historia natural del proceso de salud-enfermedad de las enfermedades periodontales, esto es salud ► gingivitis ► periodontitis.

El eje efector Th1/Th17/Th22 ha incrementado su importancia en el desarrollo de patologías osteo-destructivas y los diversos estudios analizados permiten especular que estos fenotipos se encuentran asociados al inicio, progresión y severidad de la artritis reumatoide (Kim et al., 2012). Basándonos en nuestros resultados, el eje Th1/Th17/Th22 sería característico de la patogenia de las periodontitis. Del mismo modo, el eje Th2/Th9/Treg tendría importancia en la mantención y recuperación de la salud periodontal (Veldhoen et al., 2008; Jabeen & Kaplan, 2012; Murugaiyan et al., 2012; Kaplan, 2013). En efecto, se ha postulado que el fenotipo Th9 es un linfocito dimórfico y dependiendo del ambiente local pre-existente se comprometería con un rol modulador de la respuesta de los linfocitos Th1 y Th22, sinérgico de la función pro-inflamatoria de los linfocitos Th1 o, incluso, diferenciarse hacia los linfocitos Th2 o ser un linfocito pre-Th2 (Veldhoen et al., 2008; Elyaman et al., 2009; Jäger et al., 2009). Además, especulamos que los linfocitos Th9, debido a la vía de diferenciación común que comparte con los linfocitos Th17 y Treg, podrían pertenecer a un fenotipo intermedio durante el proceso de diferenciación Th17/Treg y, dependiendo de los niveles de concentración local de las citoquinas IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 podrían permanecer como un fenotipo Th9 y tener un comportamiento dimórfico según el medio o podrían inhibir o activar la diferenciación de linfocitos T hacia el perfil Th17 (Elyaman et al., 2009; Nowak et al., 2009; Goswami & Kaplan, 2011). Independiente de las especulaciones, el dimorfismo de los linfocitos Th9 aún continúa sin ser totalmente demostrado y nuestro estudio aporta, en alguna medida, nuevos antecedentes que permitirán a futuro identificar el rol de este fenotipo linfocitario en

las enfermedades periodontales.

Nuestros resultados permiten establecer que los linfocitos Th9 cumplirían un rol pro-inflamatorio o inmuno-modulador durante las gingivitis y los linfocitos Th22 un rol osteo-destructor durante las periodontitis. Al confirmar la diferenciación de los linfocitos Th9 y Th22 en nuestro modelo *in vitro*, se logró determinar que el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* estaría asociado con la generación de un ambiente inflamatorio local que favorecería la diferenciación de los linfocitos Th22 y que los serotipos a, b o c de *A. actinomycetemcomitans* inducirían bajos niveles de linfocitos Th9. Así, el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* se relacionaría con las periodontitis a través de la activación, maduración y diferenciación de los linfocitos Th1, Th17 y Th22 y la baja frecuencia de detección de los linfocitos Th2, Th9 y Treg se vincularía con la mantención o recuperación de la salud periodontal.

## 11. CONCLUSIONES.

1. En biopsias de lesiones de pacientes con periodontitis existe un incremento en los niveles de expresión de la citoquina IL-22 y el factor de transcripción *AhR*, asociados al fenotipo Th22. En biopsias de lesiones de pacientes con gingivitis existe un incremento en los niveles de expresión de la citoquina IL-9 y el factor de transcripción *Spi.B*, asociados al fenotipo Th9.
2. En biopsias de lesiones de pacientes con periodontitis y gingivitis, el incremento en los niveles de expresión de las citoquinas IL-9 e IL-22 se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de los factores de transcripción *Spi.B* y *AhR*, respectivamente.
3. Las células dendríticas humanas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* producen mayores niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$ , necesarias para la diferenciación de los linfocitos Th22, en comparación a las células estimuladas con los serotipos a o c.
4. Los linfocitos T humanos activados por células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans* producen mayores niveles de IL-22, asociados a la diferenciación y actividad de linfocitos Th22, en comparación a las mismas células ante los serotipos a o c.
5. En los linfocitos T humanos activados por células dendríticas autólogas estimuladas con el serotipo b de *A. actinomycetemcomitans*, el incremento en los niveles de secreción de las citoquinas IL-9 e IL-22 se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de los factores de transcripción asociados a cada fenotipo *Spi.B* y *AhR*, respectivamente.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abbas, A., Murphy, K. & Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383 (6603), 787-793.
- Akdis, M., Palomares, O., van de Veen, W., van Splunter, M., Biol, D. & Akdis, C. (2012) Th17 and Th22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 129 (6), 1438-1449.
- Appay, V., Lier, R. v., Sallusto, F. & Roederer, M. (2008) Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry* 73 (11), 975-983.
- Aranha, A. M. F., Repeke, C. E., Garlet, T. P., Vieira, A. E., Campanelli, A. P., Trombone, A. P. F., Letra, A., Silva, R. M. & Garlet, G. P. (2013) Evidence supporting a protective role for Th9 and Th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *Journal of Endodontics* 39 (1), 83-87.
- Asikainen, S., Lai, C., Alaluusua, S. & Slots, J. (1991) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiology and Immunology* 6 (2), 115-118.
- Aujla, S., Chan, Y., Zheng, M., Fei, M., Askew, D., Pociask, D., Reinhart, T., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J., Dubin, P., Pilewski, J., Myerburg, M., Mason, C., Iwakura, Y. & Kolls, J. (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine* 14 (3), 275-281.
- Baba, N., Rubio, M., Kenins, L., Regairaz, C., Woisetschlager, M., Carballido, J. M. & Sarfati, M. (2012) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAK347 selectively acts on monocytes and naïve CD4+ Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells. *Human Immunology* 73 (8), 795-800.
- Bluestone, J. & Abbas, A. (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* 3 (3), 253-257.
- Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S. T., Otte, J. M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkühn, T., Göke, B., Auernhammer, C. J. & Dambacher, J. (2005) IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (4), 827-838.
- Brightbill, H., Libraty, D., Krutzik, S., Yang, R., Belisle, J., Bleharski, J., Maitland, M., Norgard, M., Plevy, S., Smale, S., Brennan, P., Bloom, B., Godowski, P. & Modlin, R. (1999) Host defense mechanism triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285 (5428).
- Caroff, M. & Karibian, D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* 338 (23), 2431-2447.
- Chang, H. C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G. L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A. N., Han, L., Nguyen, E. T., Robertson, M. J., Perumal, N. B., Tepper, R. S., Nutt, S. L. & Kaplan, M. H. (2010) The transcription factor PU.1 is required for the development of interleukin 9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature Immunology* 11 (6), 527-534.
- Chen, C., Wang, T. & Chen, W. (2010) Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Molecular Oral Microbiology* 25 (3), 207-214.
- Cortelli, J., Aquino, D., Cortelli, S., Roman-Torres, C., Franco, G., Gomez, R., Batista, L. & Costa, F. (2012) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease* 31 (7), 1311-1318.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R., Mitsdoerffer, M., Strom, T., Elyaman, W., Ho, I., Houry, S., Oukka, M. & Kuchroo, V. (2008) IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3- effector T cells. *Nature Immunology* 9 (12), 1347-1355.
- Díaz, J., Yáñez, J., Melgar, S., Álvarez, C., Rojas, C. & Vernal, R. (2012) Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* 5 (1), 40-45.
- Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Álvarez, C., Monasterio, G., Benítez, A., Ciuchi, P., Díaz, C., Mardones, J., Escobar, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2015a) T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype-dependent. *Journal of Periodontal Research* in press 451-459.
- Díaz-Zúñiga, J., Monasterio, G., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Benítez, A., Ciuchi, P., García, M., Arias,

- J., Sanz, M. & Vernal, R. (2015b) Variability on the dendritic cell response triggered by the different serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* TLR2 or TLR4-dependent. *Journal of Periodontology* 86 (1), 108-119.
- Díaz-Zúñiga, J., Yañez, J., Álvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernandez, M., Sanz, M. & Vernal, R. (2014) Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Periodontology* 41 (3), 242-251.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2009) Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology* 10 (8), 857-864.
- Dutzan, N., Gamonal, J., Silva, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2009a) Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 36 (5), 396-403.
- Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., Aguillon, J., Puente, J., Pozo, P. & Gamonal, J. (2009b) Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* 80 290-296.
- Elyaman, W., Bradshaw, E. M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renauld, J. C., Kuchroo, V. K. & Khoury, S. J. (2009) IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106 12885-12890.
- Feng, L., Gao, J., Li, P. & Wang, X. (2011) IL-9 contributes to immunosuppression mediated by regulatory T cells and mast cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Immunology* 31 (6), 1084-1094.
- Fujita, H. (2013) The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *Journal of Dermatological Science* 72 (3), 3-8.
- Genco, R., Christersson, L. & Zambon, J. (1986) Juvenil periodontitis. *International Dental Journal* 36 (3), 168-176.
- Gerlach, K., Hwang, Y., Nikolaev, A., Atreya, R., Dornhoff, H., Steiner, S., A., L. H., Wirtz, S., Vieth, M., Waisman, A., Rosenbauer, F., McKenzie, A. N., Weigmann, B. & Neurath, M. F. (2014) Th9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nature Immunology* 15 (7), 676-686.
- Gmür, R., McNabb, H., van Steenberg, T., Baehni, P., Mombelli, A., van Winkelhoff, A. & Guggenheim, B. (1993) Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiology and Immunology* 8 116-120.
- Goswami, R. & Kaplan, M. H. (2011) A brief history of IL-9. *Journal of Immunology* 186 (6), 3283-3288.
- Goswami, R. & Kaplan, M. H. (2012) Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. *Journal of Immunology* 189 (6), 3026-3033.
- Hajishengallis, G., Sojar, H., Genco, R. J. & DeNardin, E. (2004) Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptors. *Immunological Investigations* 33 (2), 157-172.
- Harrington, L., Mangan, P. & Weaver, C. (2006) Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Current Opinion in Immunology* 18 (3), 349-356.
- Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., González, F. E., Vernal, R., Sorsa, T. & Gamonal, J. (2011) Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of Dental Research* 90 (10), 1164-1170.
- Honda, K. (2012) IL-22 from T Cells: better late than never. *Immunity* 37 (6), 952-954.
- Hu, Y., Li, H., Zhang, L., Shan, B., Xu, X., Li, H., Liu, X., Xu, S., Yu, S., Ma, D., Peng, J. & Hou, M. (2012) Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Human Immunology* 73 (6), 629-635.
- Hyvärinen, K., Mäntylä, P., Buhlin, K., Paju, S., Nieminen, M., Sinisalo, J. & Pussinen, P. (2012) A common periodontal pathogen has adverse association with both acute and stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 223 (2), 478-484.
- Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K. & Nojima, Y. (2005) Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis. Potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheumatology* 52 (4), 1037-1046.

- Jabeen, R. & Kaplan, M. H. (2012) *The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. Current Opinion in Immunology* 24 303-307.
- Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Betelli, E. & Kuchroo, V. K. (2009) *Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. Journal of Immunology* 183 (11), 7169-7177.
- Jankovic, D., Liu, Z. & Gause, W. (2001) *Th1 and Th2 cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. Trends in Immunology* 22 (8), 450-457.
- Kaplan, J., Perry, M., MacLean, L., Furganga, D., Wilson, M. & Fine, D. (2001) *Structural and genetic analyses of O polysaccharide from Actinobacillus actinomycescomitans serotype f. Infection and Immunity* 69 (9), 5375-5384.
- Kaplan, M. (2013) *Th9 cells: differentiation and disease. Immunological Reviews* 252 (1), 104-115.
- Kara, E., Comerford, I., Bastow, C., Fenix, K., Litchfield, W., Handel, T. & McColl, S. (2013) *Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. Journal of Immunology* 191 (3), 1110-1117.
- Khan, I. H., Krishnan, V. V., Ziman, M., Janatpour, K., Wun, T., Luciw, P. A. & Tuscano, J. (2009) *A comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients. Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 76 (3), 159-168.
- Kikkert, R., Laine, M., Aarden, L. & van Winkelhoff, A. (2007) *Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. Oral Microbiology and Immunology* 22 (3), 145-151.
- Kim, K. W., Kim, H. R., Park, J. Y., Park, J. S., Oh, H. J., Woo, Y. J., Park, M. Y., Cho, M. L. & Lee, S. H. (2012) *Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. Arthritis Rheumatology* 64 (4), 1015-1023.
- Kim, T., Frank, P., Eickholz, P., Eick, S. & Kim, C. (2009) *Serotypes of Aggregatibacter actinomycescomitans in patients with different ethnic backgrounds. Journal of Periodontology* 80 (12), 2020-2027.
- King, E. & Tatum, H. (1962) *Actinobacillus actinomycescomitans and Haemophilus aphrophilus. Journal of Infectious Disease* 111 85-94.
- Kramer, J. & Gaffen, S. (2007) *Interleukin-17: A new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. Journal of Periodontology* 78 (6), 1083-1093.
- Leng, R. X., Pan, H. F., Ye, D. Q. & Xu, Y. (2012) *Potential roles of IL-9 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. American Journal of Clinical Experimental Immunology* 1 (1), 28-32.
- López, N., Silva, I. D., Ipinza, J. & Gutierrez, J. (2005) *Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight women with pregnancy-associated gingivitis. Journal of Periodontology* 77 (11 Suppl), 2011-2024.
- López, N., Smith, P. & Gutierrez, J. (2002) *Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: A randomized controlled trial. Journal of Periodontology* 73 (8), 911-924.
- Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J., Yang, J., Qian, J. & Yi, Q. (2012) *Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. Journal of Clinical Investigation* 122 (11), 4160-4171.
- Ma, C. S., Tangye, S. G. & Deenik, E. K. (2010) *Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21. Immunology and Cell Biology* 88 (6), 621-626.
- Marijnissen, R. J., Koenders, M. I., Smeets, R. L., Stappers, M. H., Nickerson-Nutter, C., Joosten, L. A., Boots, A. M. & van den Berg, W. B. (2011) *Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation. Arthritis and Rheumatism* 63 (10), 2939-2948.
- Michalak-Stoma, A., Bartosinska, J., Kowal, M., Juszkiewicz-Borowiec, M., Gerkowicz, A. & Chodorowska, G. (2013) *Serum levels of selected Th17 and Th22 cytokines in psoriatic patients. Disease Markers* 35 (6), 625-631.
- Missé, D., Yssel, H., Trabattoni, D., Oblat, C., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Pène, J., Gonzalez, J., Clerici, M. & Veas, F. (2007) *IL-22 participates in an innate anti-HIV-1 host-resistance network through acute-phase protein induction. Journal of Immunology* 178 (1), 407-415.
- Murphy, K. & Reiner, S. (2002) *The lineage decision of helper T cells. Nature Reviews Immunology* 2 (12), 933-944.
- Murugaiyan, G., Beynon, V., da Cunha, A. P., Joller, N. & Weiner, H. L. (2012) *IFN-γ limits Th9-mediated*

- autoimmune inflammation through dendritic cell modulation of IL-27. *Journal of Immunology* 189 (11), 5277-5283.
- Niebuhr, M., Scharonow, H., Gathmann, M., Mamerow, D. & Werfel, T. (2010) Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (6), 1176-1183.
- Novak, M., Novak, K., Hodges, J., Kirakodu, S., Govindaswami, M., DiAngelis, A., Buchanan, W., Papapanou, P. & Michawicz, B. (2008) Periodontal bacterial profiles in pregnant women: a response to treatment and associations with birth outcomes in the obstetrics and periodontal therapy (OPT) study. *Journal of Periodontology* 79 (10), 1870-1879.
- Nowak, E., Weaver, C., Turner, H., Begum-Haque, S., Becher, B., Schreiner, B., Coyle, A., Kasper, L. & Noelle, R. (2009) IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *Journal of Experimental Medicine* 206 (8), 1653-1660.
- Offenbacher, S. (1996) Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals in Periodontology* 1 (1), 821-878.
- Ohyama, H., Kato-Kogoe, N., Kuhara, A., Nishimura, F., Nakasho, K., Yamanegi, K., Yamada, N., Hata, M., Yamane, J. & Terada, N. (2009) The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *Journal of Dental Research* 88 (7), 633-638.
- Page, R. C., Sims, T. J., Engel, L. D., Moncla, B. J., Bainbridge, B., Stray, J. & Darveau, R. P. (1991) The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* 59 (10), 3451-3462.
- Paju, S., Carlson, P., Jousimies-Somer, H. & Asikainen, S. (2000) Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationship between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (1), 79-84.
- Perry, M., MacLean, L., Brisson, J. & Wilson, M. (1996a) Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *European Journal of Biochemistry* 242 (3), 682-688.
- Perry, M., MacLean, L., Gmür, R. & Wilson, M. (1996b) Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infection and Immunity* 64 (4), 1215-1219.
- Reiner, S. (2007) Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 129 (1), 33-36.
- Roman-Torres, C., Aquino, D., Cortelli, S., Franco, G., Santos, J. D., Corraini, P., Holzhausen, M., Diniz, M., Gomez, R. & Cortelli, J. (2010) Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Archives of Oral Biology* 55 (3), 242-248.
- Sa, S. M., Valdez, P. A., Wu, J., Jung, K., Zhong, F., Hall, L., Kasman, I., Winer, J., Modrusan, Z., Danilenko, D. M. & Ouyang, W. (2007) The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *Journal of Immunology* 178 (4), 2229-2240.
- Sakellari, D., Katsikari, A., Slini, T., Ioannidis, I., Konstantinidis, A. & Arsenakis, M. (2011) Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *Journal of Clinical Periodontology* 38 (2), 108-114.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. & Takayanagi, H. (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *Journal of Experimental Medicine* 203 (12), 2673-2682.
- Schlapbach, C., Gehad, A., Yang, C., Watanabe, R., Guenova, E., Teague, J. E., Campbell, L., Yawalkar, N., Kupper, T. S. & Clark, R. A. (2014) Human Th9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Sci Transl Med* 6 (219), 219-227.
- Scriba, T., Kalsdorf, B., Abrahams, D., Isaacs, F., Hofmeister, J., Black, G., Hassan, H., Wilkinson, R., Walzl, G., Gelderbloem, S., Mahomed, H., Hussey, G. & Hanekom, W. (2008) Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *Journal of Immunology* 180 (3), 1962-1970.
- Seder, R. & Paul, W. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annual Rev Immunol* 12 (6 Pt 2), 635-673.
- Shao, L., Zhang, L., Hou, Y., Yu, S., Liu, X., Huang, X., Sun, Y., Tian, T., He, N., Ma, D., Peng, J. & Hou, M. (2012) Th22 cells as well as Th17 cells expand differentially in patients with early-stage and late-stage myelodysplastic syndrome. *Public Library of Science One* 7 (12), e51339.

- Shimada, T., Sugano, N., Nishihara, R., Suzuki, K., Tanaka, H. & Ito, K. (2008) Differential effects of five *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains on gingival epithelial cells. *Oral Microbiology and Immunology* 23 (6), 455-458.
- Singh, T. P., Schön, M. P., Wallbrecht, K., Gruber-Wackernagel, A., Wang, X. J. & Wolf, P. (2013) Involvement of IL-9 in Th17-associated inflammation and angiogenesis of psoriasis. *Public Library of Science One* 8 (1), e51752.
- Stockinger, B. & Veldhoen, M. (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology* 19 (3), 281-286.
- Sugita, S., Kawazoe, Y., Imai, A., Kawaguchi, T., Horie, S., Keino, H., Takahashi, M. & Mochizuki, M. (2013) Role of IL-22 and TNF- $\alpha$  producing Th22 cells in uveitis patients with Behçet's disease. *Journal of Immunology* 190 (11), 5799-5808.
- Suzuki, N., Nakano, Y., Yoshida, Y., Ikeda, D. & Koga, T. (2001) Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (5), 2002-2005.
- Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D. & Kitetsu, S. (2005) The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 32 369-374.
- Takahashi, T., Nishihara, T., Ishihara, Y., Amano, K., Shibuya, N., Moro, I. & Koga, T. (1991) Murine macrophage interleukin-1 release by capsular like serotype-specific polysaccharide antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity* 59 (1), 18-23.
- Takami, M., Love, R. B. & Iwashima, M. (2012) TGF- $\beta$  converts apoptotic stimuli into the signal for Th9 differentiation. *Journal of Immunology* 188 (9), 4369-4375.
- Taubman, M. & Kawai, T. (2001) Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 12 (3), 125-135.
- Teixeira, R., Mendes, E., Carvalho, M. R. d., Nicoli, J., Farias, L. d. M. & Magalhaes, P. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Canadian Journal of Microbiology* 52 (3), 182-188.
- Truchetet, M., Brembilla, N., Montanari, E., Allanore, Y. & Chizzolini, C. (2011) Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Research & Therapy* 13 (5), R166.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., Snick, J. V., Helmsby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. & Stockinger, B. (2008) Transforming growth factor- $\beta$  "reprograms" the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* 9 1342-1346.
- Vernal, R., Chaparro, A., Graumann, R., Puente, J., Valenzuela, M. & Gamonal, J. (2004) Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontology* 75 (12), 1586-1591.
- Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Valenzuela, M. & Gamonal, J. (2005) Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 32 (4), 383-389.
- Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., García, L., Valle, I. D., Silva, A. & Gamonal, J. (2006) High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *Journal of Periodontology* 77 (10), 1772-1780.
- Vernal, R. & Garcia-Sanz, J. (2008) Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infectious Disorders - Drug Targets* 8 (4), 207-220.
- Walsh, M. & Choi, Y. (2003) Biology of the TRANCE axis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14 (3-4), 251-263.
- Weaver, C. & Hatton, R. (2009) Interplay between the Th17 and Treg cell lineages: a (co-) evolutionary perspective. *Nature Reviews Immunology* 9 (12), 883-889.
- Wolk, K., Haugen, H. S., Xu, W., Witte, E., Waggie, K., Anderson, M., Baur, E. v., Witte, K., Warszawska, K., Philipp, S., Johnson-Leger, C., Volk, H. D., Sterry, W. & Sabat, R. (2009) IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- $\gamma$  are not. *Journal of Molecular Medicine* 87 (5), 523-536.
- Yang, X., Wang, H., Zhao, X., Wang, L., Lv, Q. & Wang, Q. (2013) Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Immunology* 33 (4), 767-774.

- Zambon, J., Slots, J. & Genco, R. (1983) Serology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infection and Immunity* 41 (1), 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. *Federation of European Microbiological Society, Immunology & Medical Microbiology* 59 (2), 143-151.
- Zheng, Y., Valdez, P., Danilenko, D., Hu, Y., Sa, S., Gong, Q., Abbas, A., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F. & Ouyang, W. (2008) Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature Medicine* 14 (3), 282-289.

## 12. ANEXOS.

### 12.1 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 invitadas 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 de los resultados del análisis individual y de todo el estudio.



Confidencialidad de los datos:

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

Responsable del Proyecto de Investigación:

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

Los pacientes pueden contactar al investigador cuando lo deseen para planear 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 Cortes 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: +56-3-9781813
Firma	Firma
Fecha de la firma del paciente:	

Edición del Formulario de Consentimiento Informado: Diciembre de 2010

2019.01.11  
COMITE ASESOR  
DE BIOÉTICA  
FONDECYT



**12.2 Ficha clínica**

**FICHA CLINICA**

FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Clínica de Periodoncia  
Año

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

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

**Motivo de consulta:**

<b>MODULO 2</b>	<b>Anamnesis GENERAL</b>	
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	
<b>Anamnesis ODONTOLOGICA</b>		

Su última visita al dentista: (fecha y motivo)

Tratamientos dentales que ha recibido anteriormente

Mantenición Periodontal: Si 0 No 0

¿Ha recibido antes anestesia?  No 0 Si 0 ¿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)	
<b>Ganglios palpables:</b> No 0 Si 0 (Ubicación)	
Músculos de Cabeza y Cuello: Puntos y/o zonas Dolorosas No 0 Si 0 (ubicación)	
<b>A.T.M. (articulación témporo-mandibular):</b>	
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 Faringoamigdaliana		
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	
----------	--------------------	--

Describe las características de la encía en cuanto a

Color:

Forma:

Posición:

Tamaño:

Consistencia y superficie:

Índice gingival (G.I.):

Löe & 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: %		Boca: %		Boca: %		Boca: %		Boca: %	
	Fecha:		Fecha:		Fecha:		Fecha:		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: %				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)	EFFECTO 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

*Fundamentos del Diagnóstico*

PRONOSTICO

GENERAL:

PARTICULAR:

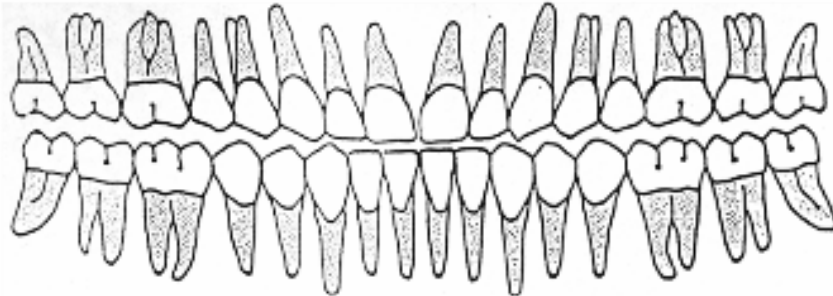
Fundamentos del Pronóstico:





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																

### **12.3 Trabajos presentados en congresos internacionales**

**Congreso Internacional de la Academia de Periodoncia , International Association of Periodontology, Santiago, abril de 2015**

#### **T-helper 9 (Th9) and Th22 lymphocytes: their association with periodontal disease and response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induced infection**

**Jaime Díaz-Zúñiga\*\***, Samanta Melgar-Rodríguez, Gustavo Monasterio, Carla Álvarez, Jocelyn Arias, Paola Carvajal, Mariano Sanz, Rolando Vernal.

**Background:** Two new T-helper (Th) phenotypes are described and named Th9 and Th22 lymphocytes; however, their role in the pathogenesis of periodontitis remains unclear. The aim of this study was to determine the potential association between Th9 and/or Th22 lymphocytes and periodontitis, as well as their pathogenic immune response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induced infection.

**Methods:** Gingival samples were obtained from patients with moderate-to-advanced chronic periodontitis, gingivitis, and healthy controls. In addition, T lymphocytes and monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) were obtained from healthy donors and stimulated with different serotypes of *A. actinomycetemcomitans* (multiplicity of infection MOI=10<sup>2</sup>) or their purified lipopolysaccharide (10-50 ng/mL). The levels for the Th9 and Th22-associated cytokines and transcription factors Spi.B and AhR were quantified by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** Higher levels of IL-22 and AhR were detected in periodontitis patients compared to gingivitis and healthy individuals. In addition, higher levels of IL-9 and Spi.B were detected in gingivitis patients compared to healthy individuals. When stimulated with the serotype b of *A. actinomycetemcomitans*, higher levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were detected in MoDCs, as well as higher levels of IL-22 and AhR were detected in T lymphocytes, when compared to stimulation with the other serotypes.

**Conclusion:** Serotype b of *A. actinomycetemcomitans* induces a Th22-type of immune response in both MoDCs and T lymphocytes. Th22 lymphocytes could be associated with pathogenesis of periodontitis.

#### **12.4 Premios.**

**Premio: Basic Research International Academy of Periodontology.**

T-helper (Th9) and Th22 lymphocytes: their association with periodontal disease and response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induced inflammation. Santiago, abril de 2015.