

Variabilidad de la Respuesta de las Células Dendríticas Estimuladas *in vitro* con *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Variable Dendritic Cells Response upon Stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans in vitro*

Vernal R¹, León R¹, Dutzan N¹, Herrera D², García-Sanz JA³, Silva A³, Sanz M²

RESUMEN

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno capaces de inducir la activación y maduración de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia un fenotipo efector específico Th1 o Th2, dependiendo del tipo de antígeno presentado, las señales co-estimuladoras que expresan y el ambiente de citoquinas en el cual se produce la interacción célula-célula. El objetivo del presente trabajo es analizar la respuesta de las células dendríticas estimuladas *in vitro* con distintas concentraciones de las bacterias periodontopatógenas *Pg* y *Aa*. En células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica estimuladas con 10¹ a 10⁹ bacterias/mL de *Pg* y *Aa* se evaluó la expresión del marcador de maduración CD80 mediante citometría de flujo y de las citoquinas IL1β, IL2, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13, IFNγ, TNFα y TNFβ mediante RT-PCR cuantitativa. *Aa* y *Pg* indujeron maduración de las células dendríticas, detectándose significativamente mayor expresión de CD80 con la estimulación de *Aa*, e indujeron predominantemente la expresión de citoquinas propias de una respuesta Th1. Dependiendo de la carga bacteriana, fueron detectados distintos umbrales de inducción de expresión de citoquinas. *Aa* indujo la síntesis de IL1β, IL12, IFNγ, TNFα y TNFβ a menor carga bacteriana que *Pg*. Tomados en conjunto, estos datos nos permiten especular un mayor potencial antigénico y proyectar una mayor capacidad patogénica durante la infección periodontal de *Aa* en comparación a *Pg*. *Rev. Clin Periodoncia Implantol Rehabil. Oral Vol. 1 (1); 9-16, 2008.*

Palabras clave: Células dendríticas, citoquinas, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

ABSTRACT

Dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to prime naïve T cells and polarize them towards a Th1 or Th2 response, depending on the type of the antigen presented to the TCR, the type of costimulatory signals, and the cytokine pattern in the environment. The aim of this work was to analyze the response of dendritic cells to *in vitro* stimulation with *Pg* and *Aa*. In monocyte-derived dendritic cells stimulated with 10¹ to 10⁹ bacteria/mL of *Pg* or *Aa* were evaluated both the expression of the maturation marker CD80 by flow cytometry and the expression of the cytokines IL1β, IL2, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13, IFNγ, TNFα and TNFβ by quantitative RT-PCR. Both *Pg* and *Aa* led to dendritic cell maturation, detecting higher CD80 expression upon *Aa*-stimulation, and induced a Th1 pattern of cytokine expression. *Aa*-stimulated dendritic cells expressed IL1β, IL12, IFNγ, TNFα and TNFβ mRNAs with lower bacterial charge than with *Pg*. Furthermore, our data indicated the existence of distinct thresholds for the induction of the different cytokines analyzed. Taken together, these data allow us to speculate a higher antigenic potential and higher pathogenic capacity of *Aa* than *Pg* during periodontal infections. *Rev. Clin Periodoncia Implantol Rehabil. Oral Vol. 1 (1); 9-16, 2008.*

Rev. Clin Periodoncia Implantol Rehabil. Oral Vol. 1 (1); 9-16, 2008.

Key words: Dendritic cells, cytokines, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa causada por bacterias organizadas como biofilm y que colonizan la superficie dentaria en el área del surco gingival⁽¹⁾. La enfermedad se desencadena por un desequilibrio en la respuesta inmune del hospedador debido a un incremento de bacterias periodontopatógenas específicas, que provoca la liberación de un rango amplio de citoquinas, quimioquinas y mediadores pro-inflamatorios, causando la destrucción de los tejidos de soporte periodontales, hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal, y que lleva finalmente a la pérdida de los dientes^(2,3).

La activación de la respuesta inmune involucra una serie de acontecimientos celulares y moleculares altamente coordinados cuyo papel fundamental es la defensa frente a la infección⁽⁴⁾. Las células dendríticas (CDs) son esenciales para el inicio y regulación de la respuesta inmune tanto innata como adquirida y conforman un puente entre ambas⁽⁵⁾. Las CDs son células pre-

sentadoras de antígeno (APCs, del inglés: antigen presenting cells) capaces de inducir la activación y maduración de linfocitos T vírgenes (T naïve) hacia un fenotipo efector específico T-cooperador (Th, del inglés: T-helper) 1 o Th2^(6,7), dependiendo del tipo de antígeno presentado, el subtipo de CDs involucrado, las señales co-estimuladoras que expresan y el ambiente de citoquinas en el cual se produce la interacción célula-célula^(4,8). En los tejidos peridentarios de individuos con enfermedad periodontal se han identificado abundantes CDs inmaduras, incluyendo células de Langerhans y CDs dermales (CDDs)⁽⁹⁾, y CDs maduras CD83+⁽¹⁰⁾. Las CDDs son funcionalmente similares a las CDs diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica (MoCDs) y se han identificado en asociación directa a linfocitos T durante la periodontitis⁽¹¹⁾.

En el reconocimiento de antígenos por parte de las CDs participa un número limitado de receptores, llamados receptores de reconocimiento de patógenos, los cuales reconocen patrones moleculares altamente conservados asociados a patógenos

(PAMPS, del inglés: pathogen-associated molecular patterns). Al capturar los antígenos, las CDs modifican sus propiedades funcionales: migran hacia los ganglios linfáticos regionales, expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés: major histocompatibility complex), se transforman en CDs maduras con la capacidad de presentar antígenos, expresan moléculas co-estimuladoras, interactúan con células T naïve, producen citoquinas pro-inflamatorias, e inducen la activación de linfocitos T efectores antígeno-específicos⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Los linfocitos T CD4+ son determinantes esenciales del tipo de respuesta inmune desarrollada frente al biofilm. Los linfocitos T CD4+ efectores pueden clasificarse en Th1 y Th2 de acuerdo al patrón de citoquinas que sintetizan. Las células Th1 secretan predominantemente interferón (IFN) γ , interleukina (IL) 1 β , IL2, IL12, factor de necrosis tumoral (TNF) α y TNF β , que son esenciales para la erradicación de patógenos intracelulares. Por otro lado, las células Th2 sintetizan IL4, IL5, IL6 e IL13, que son críticas para la producción de anticuerpos y la eliminación de microorganismos extracelulares⁽¹⁵⁾.

Durante las dos últimas décadas, numerosos estudios han sustentado la hipótesis que indica que la lesión periodontal estable se asocia con una respuesta tipo Th1 y la progresión de la enfermedad periodontal se asocia con una respuesta predominantemente tipo Th2⁽¹⁶⁻²⁰⁾. Sin embargo, otros estudios han sugerido un predominio de respuesta Th1 y una reducida respuesta tipo Th2 durante la periodontitis^(21,22). Esta controversia ha aumentado en los últimos años, dado que, algunos autores han establecido que tanto una respuesta Th1 como Th2 se asocian a la enfermedad periodontal^(23,24) y otros que la enfermedad periodontal se asocia a una respuesta tipo Th2^(25,26).

Recientemente, Kikuchi y colaboradores han observado que MoCDs estimuladas *in vitro* con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) producen elevados niveles de IL12 y promueven la síntesis de IFN γ por células natural killer (NK), sugiriendo una respuesta inmune potencialmente Th1⁽²⁷⁾. El mismo grupo mostró un incremento en la producción de citoquinas Th1 en MoCDs estimuladas *in vitro* con *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), mostrando una fuerte expresión de IL12 en presencia de IFN γ ⁽²⁸⁾. Tomados en conjunto, estos trabajos evidencian una diferencia en la síntesis de IL12 cuando se utilizó el mismo número de *Pg* o *Aa* para la estimulación *in vitro* de MoCDs. Así, cuando fue evaluada la síntesis de IL12 mediante ELISA en 2x10⁶ MoCDs/mL después de 24 hrs. de estimulación con *Aa*, *Pg* o *E. coli* (10⁵ a 10⁶ bacterias/mL), fueron detectados mayores niveles de IL12 en MoCDs estimuladas con *Aa* en comparación a las estimuladas con *Pg* o *E. coli*, con un efecto dosis-dependiente. Además, demostraron que el lipopolisacárido (LPS) de *Aa* es un inductor más potente de la expresión de CD86 en CDs que el LPS de *E. coli*^(27,28). Nuevamente, estos datos sugieren que la respuesta *in vitro* de las CDs depende del tipo de bacteria periodontopatógena con la cual son estimuladas, datos que han sido recientemente corroborados al comprobarse un efecto antagónico en la respuesta de CDs estimuladas con 2 cepas distintas de *Pg*. Aunque la cepa *Pg* 381, caracterizada por la presencia de fimbria, ha mostrado un efecto inductor potente de la síntesis de IL12⁽²⁹⁾, al estimular las CDs con la cepa *Pg* O55:B5 se ha detectado una débil respuesta inmunoestimuladora de la síntesis de IL6, IL8, IL10, IL12 y RANTES⁽³⁰⁾. Confirmando estos datos, Jotwani y Cutler demostraron que la cepa *Pg* 381 con fimbria es más eficaz que la cepa mutante *Pg* DPG3 carente de fimbria en invadir y penetrar CDs, inducir la expresión de HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 y la síntesis de IL6, IL10, IL12 y TNF α en MoDCs, y estimular la proliferación y la síntesis de IFN γ en linfocitos T⁽²⁹⁾. Adicionalmente, Choi y colaboradores han observado una modulación de la respuesta inmune inducida por *Pg* ante la exposición previa del hospedador a *F. nucleatum*, simulando la infección

bacteriana secuencial observada durante la periodontitis, indicando un cambio a una respuesta Th2 en vez de la respuesta inmune Th1 original⁽³¹⁾.

Estos datos podrían sugerir un diferente potencial antigénico entre *Aa* y *Pg* u otras bacterias periodontopatógenas, caracterizado por la expresión de patrones de citoquinas distintos y por una distinta capacidad de estimulación a diferentes concentraciones de carga bacteriana. Hoy en día, la caracterización de subtipos genéticos de algunas bacterias orales⁽³²⁾ permite extender ésta hipótesis, proponiendo que los distintos subtipos genéticos de una bacteria periodontopatógena determinada podrían estimular la síntesis de distintos patrones de citoquinas e inducir una respuesta inmune diferente. El objetivo del presente trabajo es analizar la expresión de CD80, marcador de maduración de CDs, y de las citoquinas IL1 β , IL2, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13, IFN γ , TNF α y TNF β en CDs estimuladas *in vitro* por distintas concentraciones de las bacterias periodontopatógenas *Pg* y *Aa*, para así evaluar los patrones de citoquinas expresados.

El poder entender el papel de las distintas bacterias periodontopatógenas y de sus subtipos genéticos en la inducción de citoquinas en CDs y en linfocitos T efectores, ampliaría en gran medida el conocimiento de la patogénesis de la periodontitis. Una distinta capacidad inmunogénica de las bacterias periodontales y sus determinados subtipos contribuiría a explicar la variabilidad en la respuesta a la infección observada en distintos individuos, así como, las variaciones de actividad de respuesta observadas en los distintos sitios periodontales asociadas a una determinada ecología bacteriana local durante la periodontitis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

Muestras de sangre venosa fueron obtenidas por punción braquial de 10 individuos donantes voluntarios sanos en el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid perteneciente al Ministerio de Sanidad de España, y fueron transportadas en condiciones isotérmicas para su inmediato análisis.

Separación celular

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron aisladas mediante un gradiente de concentración de Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los monocitos fueron purificados a partir de las PBMC utilizando un sistema magnético de separación celular (MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Brevemente, las PBMC fueron lavadas dos veces en PBS y posteriormente fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano conjugado con partículas inmunomagnéticas durante 15 min a 4°C. Después de lavarse en PBS una vez, las células fueron resuspendidas y cargadas en una columna de separación LS montada en un dispositivo generador de un campo electromagnético. La fracción de células positivas fue inmediatamente resuspendida y se procedió a su análisis mediante citometría de flujo. 10⁶ células fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales anti-CD1a, -CD14, -CD80, -CD83 y -CD86 humanos (BD Biosciences Pharmingen, San José, CA, USA), durante 20 min a 4°C en la oscuridad, para determinar la eficacia de aislamiento de monocitos mediante citometría de flujo (EPICS XL, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

Diferenciación de células dendríticas

Las CDs fueron obtenidas a partir de los leucocitos CD14+ aislados utilizando un protocolo de diferenciación estandarizado.

darizado⁽³³⁾. Brevemente, 10⁶ células/mL fueron cultivadas en placas de 6 pocillos en 3 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA), en presencia de 1000 U/mL de rhGM-CSF y 1000 U/mL de rhIL4 (Immunotools GmbH, Friesoythe, Germany) y mantenidas durante 6 días a 37°C en ambiente 5% de CO₂. Cada 2 días se adicionaron 200 µL de medio fresco suplementado con 1000 U/mL de rhGM-CSF y 1000 U/mL de rhIL4. La eficacia de diferenciación a CDs inmaduras fue evaluada mediante citometría de flujo como ha sido descrito en el párrafo anterior.

Curvas de crecimiento bacteriano

Las cepas bacterianas Pg ATCC 33277 y Aa ATCC 33384 fueron sembradas en medio de cultivo no selectivo "agar-sangre" que contiene agar y 5% de sangre de caballo (Oxoid N°2, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) suplementado con 5 mg/mL de hemina y 1 mg/mL de menadiona e incubados a 37°C en un ambiente de 80% de N₂, 10% de CO₂ y 10% de H₂.

Las curvas de crecimiento fueron realizadas en medio líquido infusión "cerebro-corazón" (BD Co., Le Pont de Claix, France) suplementado con 5 mg/mL de hemina y 1 mg/mL de menadiona. Cada especie bacteriana fue inoculada en 10 mL de medio de cultivo hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,05 medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm (Spectronic 20, Bausch & Lomb, Rochester, NY, USA). A continuación, cada 2 a 5 horas, dependiendo de la especie bacteriana en estudio, se realizaron lecturas sucesivas de DO. Adicionalmente, 100 µL de medio de cultivo fueron recogidos y se hicieron diluciones seriadas en PBS (log10); 100 µL de cada dilución fueron sembrados en medio de cultivo no selectivo e incubados a 37°C en condiciones anaeróbicas para posterior cuantificación de bacterias/mL en cada DO medida. El experimento se completó cuando cada especie bacteriana alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Después de 3 a 7 días de incubación, las colonias bacterianas fueron cuantificadas. Finalmente, se confeccionaron las gráficas de las curvas tiempo de cultivo versus DO y bacterias/mL versus DO para establecer el número de bacterias vivas con potencial antigénico previa estimulación de las CDs inmaduras en cultivo.

Estimulación de las células dendríticas

Las CDs inmaduras fueron estimuladas con 10¹ a 10⁹ bacterias/mL o con 10 ng/mL de LPS de *E. coli* serotipo 0111: B4 (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), como control positivo de estimulación, durante 2 días y en las condiciones de cultivo anteriormente descritas. La obtención de CDs maduras fue evaluada mediante citometría de flujo. Como control fueron usadas CDs mantenidas en cultivo sin estimulación.

Extracción de ARN citoplasmático

Previo lavado 3 veces en PBS, las células se resuspendieron en 400 µL de tampón de lisis compuesto de solución Noidet P-40 (NP-40) 0,5%, Tris HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM, suplementado con Vanadyl Ribonucleoside Complexes (VRC) 10 mM (Gibco), para lisar la membrana citoplasmática. Tras una breve centrifugación a 14000 rpm durante 10 seg a 4°C, se recogieron 400 µL del sobrenadante, que fue digerido mediante incubación en 20 µL de SDS 20%, 12 µL de EDTA 0,5 M y 10 µL de proteinasa K 10 mg/mL (Roche Ltd., Basel, Switzerland) durante 30 min a 37°C. El ácido ribonucleico (ARN) total se extrajo con 400 µL de solución de cloropán que contiene fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (Fluka) en la proporción 25:24:1 y centrifugando

a 14000 rpm durante 10 min a TA, posteriormente se precipitó adicionando 40 µL de acetato de sodio 3M, 1 mL de etanol 100% y glicógeno 0,05% (Roche) por 1 hr a -20°C, y, tras centrifugación a 14000 rpm durante 30 min a 4°C, el precipitado se resuspendió en 20 µL de H₂O libre de ARNasas. La calidad del ARN extraído fue determinada en un Bioanalizador Agilent 2100B (Agilent Tech., Palo Alto, CA, USA). Previa cuantificación en Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA), la concentración de ARN fue ajustada a 1 µg/µL con H₂O libre de ARNasas.

Síntesis de la primera cadena de cADN

La transcripción reversa (TR) de 1 µg de ARN fue realizada utilizando un kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, 20 µL de volumen total de reacción conteniendo 4 µL de tampón de TR, 0,5 µL de inhibidor de ARNasas, 2 µL de mezcla de deoxinucleótidos, 2 µL de primers hexaméricos aleatorios, 0,5 µL de enzima de TR, 10 µL de H₂O y 1 µL de ARN, fueron retro-transcritos utilizando las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 1 hr a 50°C (Primus 96 plus, MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany).

PCR cuantitativa

Para examinar la expresión de ARN mensajero de las citoquinas IL1β, IL2, IL5, IL6, IL10, IL12p35, IL12p40, IL13, IFNγ, TNFα y TNFβ, 50 ng de ácido desoxirribonucleico complementario (cADN) fue amplificado mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando un kit FastStart Taqman Probe Master de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche). Los primers forward y reverse fueron diseñados y una sonda específica conjugada al fluorocromo FAM fue seleccionada (Tabla 1) utilizando la página web de Laboratorios Roche (www.roche-applied-science.com). Un volumen final de reacción de 10 µL conteniendo 0,1 µL de sonda PCR, 0,1 µL de forward primer, 0,1 µL de reverse primer, 5 µL de FastStart Master, 3,7 µL de H₂O grado PCR y 1 µL de cADN, fueron amplificados en las siguientes condiciones: 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C, en un termociclador ABI PRISM 7900 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Como control endógeno la expresión del ARN ribosómico de la sub-unidad 18S fue cuantificada.

TABLA 1. Forward primers, reverse primers y sondas utilizadas para la cuantificación de citoquinas mediante PCR en tiempo real.

Citoquina	Forward Primer	Reverse Primer	Sonda*
IL1β	ctgtcctgctgttgaaga	ttggtaattttgggactaca	78
IL2	aagtttacatgccaagaagg	aagtgaagttttgcttgagc	65
IL5	ctctgaggattcctgtctgt	cagtaacccttgacaggt	47
IL6	gcccagctatgaactcctct	gaaggcagcaggcaaac	45
IL10	tgggggagaacctgaagac	ccttgcctttttcacagg	30
IL12p35	cactccaaaacctgctgag	tctctcagaagtgaagggtta	50
IL12p40	ccctgacattctgcgttca	aggcttctcctggaagactcta	37
IL13	agccctcaggaggctcat	ctccatccatgctgccatt	17
TNFα	cagcctcttctcctctgat	gccagaggctgatagaga	29
TNFβ	ctaccgccagcagtgctc	gtggtgctatggggaga	13
IFNγ	ggcatttgaagaattgaaag	tttgatgctctgctctctt	21
18S	ctcaacacgggaacctcac	cgctccaccaactaagaacg	77

IL: Interleukina.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

IFN: Interferón.

18S: Sub-unidad 18S ribosomal.

* Sonda de hidrólisis FAM-conjugada (Roche).

Análisis de los datos

Los datos de citometría de flujo fueron analizados utilizando el programa computacional WinMDi 2.8 y fueron representados como histogramas. Las células positivas para cada marcador CD fueron expresadas como porcentaje de la población total. Los datos de PCR cuantitativa fueron analizados con el programa ABI PRISM Sequence Detector Systems. La cuantificación relativa de cada citoquina se obtuvo ajustando la expresión de su respectivo ARN mensajero a la expresión del ARN ribosómico de 18S y considerando la expresión ajustada de ellas en CDs no estimuladas usadas como control. Los datos fueron expresados como media \pm desviación estándar y fueron analizadas estadísticamente utilizando el paquete estadístico SPSS 13.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

La eficiencia de purificación de monocitos, la diferenciación a CDs inmaduras y su activación en cultivos estimulados con *Pg* y *Aa* se evaluó mediante citometría de flujo. Histogramas representativos se muestran en la Figura 1.

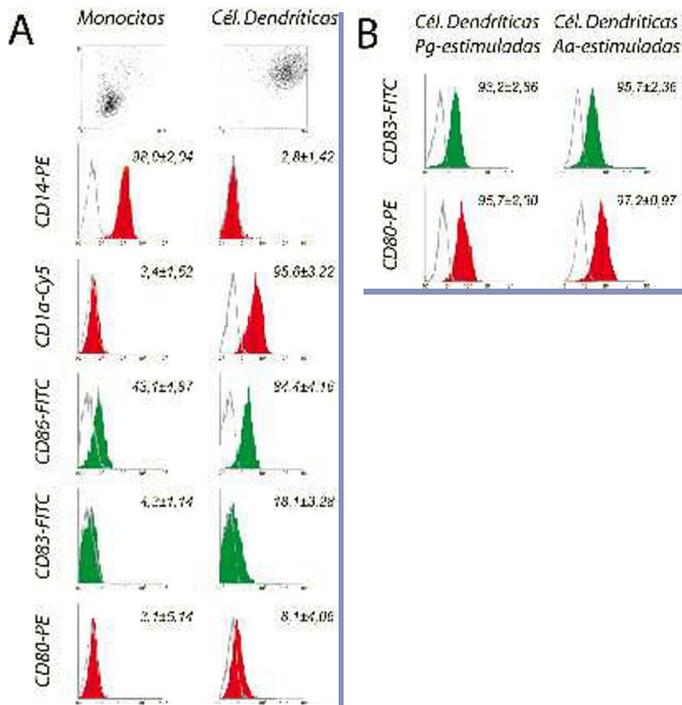


FIGURA 1. Análisis mediante citometría de flujo de los monocitos purificados y de las CDs diferenciadas y estimuladas *in vitro* con *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **(A)** Eficiencia de purificación de monocitos y diferenciación de CDs. **(B)** Activación de las CDs con 10^1 a 10^9 bacterias/mL de *Aa* y *Pg*. Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD1a, -CD14, -CD80, -CD83 y -CD86 conjugados con phycoerythrin (PE), fluorescein isothiocyanate (FITC) o Cyanine 5 (Cy5) y fueron evaluadas mediante citometría de flujo. El porcentaje de expresión positiva de 3 experimentos independientes se muestra como promedio \pm desviación estándar.

Los cultivos de las CDs obtenidas de sangre periférica y estimuladas durante 48 hs con 10^1 a 10^9 bacterias/mL de *Pg* ATCC 33277 o *Aa* ATCC 33384 generan agregados celulares claramente observables a partir de concentraciones bacterianas de 10^5 bacterias/mL en cultivos estimulados con *Pg* y 10^1 bacterias/mL en cultivos estimulados con *Aa* (Figura 2). A partir de estas concentraciones bacterianas, los agregados celulares aumentan en número de manera dosis-dependiente, alcanzando, a concentraciones de 10^8 a 10^9 bacterias/mL en cultivos estimulados con *Pg* y 10^7 a 10^9 bacterias/mL en cultivos estimulados con *Aa*, una frecuencia y aspecto similar a los observables en cultivos de CDs estimulados con LPS de *E. coli* (10 ng/mL), utilizados como control positivo. Los cultivos de CDs estimuladas con *Pg* en concentraciones de 10^1 a 10^4 bacterias/mL no muestran agregados celulares, observándose células aisladas de aspecto similar al observado en cultivos de CDs sin estimular, utilizados como control negativo.

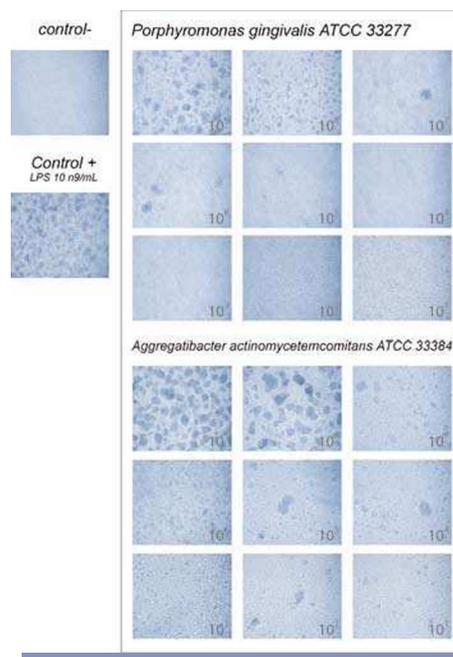


FIGURA 2. Imágenes microscópicas de CDs estimuladas *in vitro* con *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Imágenes representativas que muestran CDs estimuladas con 10^1 a 10^9 bacterias/mL de *Pg* ATCC 33277 o *Aa* ATCC 33384. CDs no estimuladas se utilizaron como control negativo (Control -) y CDs estimuladas con LPS de *E. coli* (10 ng/mL) se utilizaron como control positivo (Control +). Se observan agregados celulares a partir de cargas bacterianas de 10^5 para *Pg* y 10^1 para *Aa*, alcanzando, en forma dosis-dependiente, agregación de aspecto similar al Control + a cargas bacterianas de 10^7 a 10^9 para *Aa* y 10^8 a 10^9 para *Pg*.

Los cambios morfológicos de las células van acompañados por cambios en la expresión del marcaje de activación CD80, medidos por citometría de flujo en cultivos celulares estimulados durante 48 hs con 10^1 a 10^9 bacterias/mL de *Pg* ATCC 33277 o *Aa* ATCC 33384 (Figura 3). Los porcentajes de expresión de CD80 varían entre $22,63\pm 2,32\%$ y $95,75\pm 2,30\%$ para *Pg* y entre $26,10\pm 3,30\%$ y $97,24\pm 0,97\%$ para *Aa*. También son detectables mayores niveles de inducción de expresión de CD80 en cultivos de CDs estimulados con *Aa* en comparación a cultivos estimulados con *Pg*, con diferencias estadísticamente significativas a concentraciones bacterianas de 10^3 bacterias/mL ($44,46\pm 2,17$ vs. $33,07\pm 1,43$; $p=0,004$), 10^4 bacterias/mL ($60,29\pm 2,12$ vs. $44,18\pm 2,72$; $p=0,004$), 10^5 bacte-

rias/mL ($74,68 \pm 3,69$ vs. $63,12 \pm 1,67$; $p=0,023$) y 10^6 bacterias/mL ($85,13 \pm 1,48$ vs. $74,90 \pm 2,97$; $p=0,018$). Finalmente, observamos un plateau de expresión de CD80 a concentraciones de 10^8 a 10^9 bacterias/mL de *Aa* ($95,11 \pm 1,15$ y $97,24 \pm 0,97$) y *Pg* ($94,51 \pm 1,27$ y $95,75 \pm 2,30$).

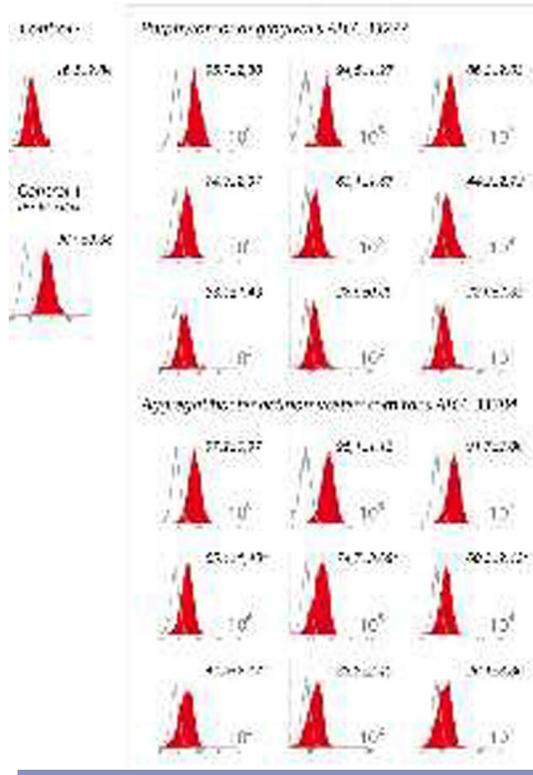


FIGURA 3. Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD80-PE en CDs estimuladas con *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Histogramas que muestran CDs estimuladas con 10^1 a 10^9 bacterias/mL de *Pg* ATCC 33277 o *Aa* ATCC 33384. CDs no estimuladas se utilizaron como control negativo (Control -) y CDs estimuladas con LPS de *E. coli* (10 ng/mL) se utilizaron como control positivo (Control +). Se observa que la inducción de la expresión de CD80 es dosis-dependiente y mayor en CDs estimuladas con *Aa* en comparación a con *Pg*, alcanzando un plateau de expresión a cargas bacterianas de 10^8 a 10^9 bacterias/mL. El porcentaje de expresión de CD80 de 3 experimentos independientes se muestra como promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Chi-cuadrado. Se consideró la diferencia como estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

La expresión relativa de las citoquinas IL1 β , IL2, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13, IFN γ , TNF α y TNF β , en CDs estimuladas *in vitro* durante 48 hs con 10^1 a 10^9 bacterias/mL de *Pg* ATCC 33277 o *Aa* ATCC 33384, cuantificada mediante PCR en tiempo real, se muestran en la Figura 4. La expresión de citoquinas aumenta de manera dependiente de la concentración bacteriana de estimulación, detectándose mayores niveles relativos de IL1 β , IL12p35, IL12p40, IFN γ y TNF α en CDs estimuladas con *Aa* en comparación a las estimuladas con *Pg*. La citoquina IL5 no se induce a ninguna concentración de *Pg* y *Aa*, a diferencia de IL6, IL10 e IL13 que, aunque no muestran diferencias de expresión entre cultivos de CDs estimulados tanto con *Pg* como *Aa*, aumentan en un bajo orden de magnitud a concentraciones bacterianas de 10^8 y 10^9 bacterias/mL. Los niveles de expresión de TNF β son mayores en cultivos de CDs estimulados con *Aa* a concentraciones de 10^4 a 10^7 bacterias/mL, pero a concentraciones de

10^8 y 10^9 bacterias/mL la expresión es mayor en cultivos estimulados con *Pg*. En todos los experimentos la expresión de IL2 fue indetectable a cualquiera de las concentraciones de *Pg* o *Aa*, así como en CDs sin estímulo bacteriano (datos no mostrados). También se observan claras diferencias entre *Aa* y *Pg* en el inicio de la inducción de expresión relativa de IL1 β , IL10, IL12p35, IL12p40, IFN γ , TNF α y TNF β dependiendo de la concentración bacteriana de estimulación. La expresión relativa de IL1 β y TNF β comienza a inducirse a concentraciones bacterianas de 10^4 bacterias/mL de *Aa* y 10^7 bacterias/mL de *Aa* y *Pg*, IL12p35 a concentraciones de 10^5 y 10^7 bacterias/mL de *Aa* y *Pg*, IL12p40 a concentraciones de 10^4 y 10^7 bacterias/mL de *Aa* y *Pg*, y tanto IFN γ como TNF α a concentraciones de 10^6 y 10^8 bacterias/mL de *Aa* y *Pg*, respectivamente.

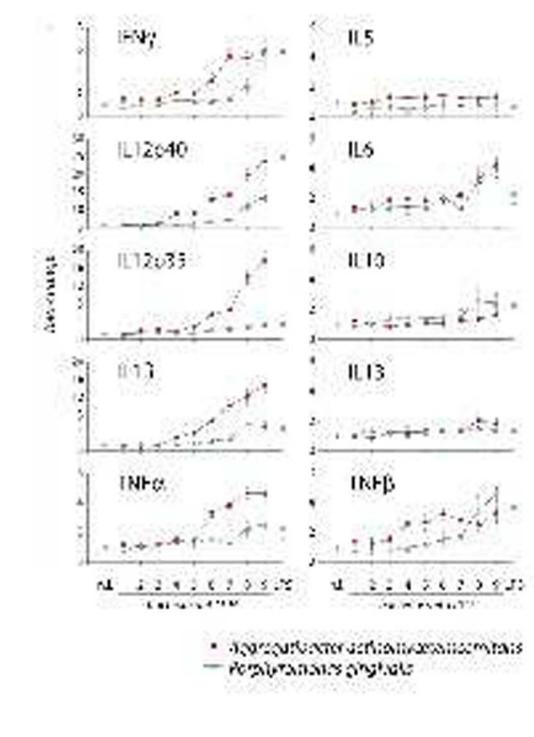


FIGURA 4. Expresión de citoquinas en CDs estimuladas *in vitro* con *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* evaluada mediante PCR cuantitativa. Expresión relativa de IL1 β , IL5, IL6, IL10, IL12p35, IL12p40, IL13, IFN γ , TNF α y TNF β en CDs estimuladas con 10^1 a 10^9 bacterias/mL de *Pg* ATCC 33277 o *Aa* ATCC 33384 (triángulos verdes y círculos rojos, respectivamente). Como control positivo se utilizaron CDs estimuladas con 10 ng/mL LPS de *E. coli* (cuadrados azules) y como parámetro de cuantificación relativa (valor 1) la expresión en CDs sin estimular (rombos amarillos). Datos de 3 experimentos independientes se muestran como promedio \pm desviación estándar. IL: Interleukina. TNF: Factor de necrosis tumoral. IFN: Interferón.

DISCUSIÓN

Las CDs representan a una extensa familia de APCs que circulan a través del torrente sanguíneo y se distribuyen en casi todos los tejidos del organismo⁽³⁴⁾. Forman parte del sistema inmune innato y sirven de puente con el sistema inmune adaptativo⁽⁵⁾. Mientras están en un estado inmaduro las CDs capturan microorganismos y sus antígenos, y estimulan a las células T en respuesta a esos antígenos en un estado maduro⁽⁷⁾.

Inicialmente, el microorganismo debe ser reconocido y capturado por las APCs, los antígenos bacterianos son entonces

procesados y conjugados intracelularmente con moléculas MHC tipo II para así ser presentados a las células T, que poseen en su superficie un receptor específico para reconocer el complejo antígeno-proteína MHC denominado receptor de linfocitos T (TCR)^(12,35). Esta señal es suficiente para estimular células T activadas o de memoria previamente sensibilizadas con el antígeno específico. Para estimular células T inmaduras que nunca han reconocido un antígeno particular, las CDs expresan una serie de señales co-estimuladoras, tales como CD80 y CD86, en respuesta a los microorganismos y citoquinas pro-inflamatorias, las que en conjunto con el complejo antígeno-proteína MHC sensibilizan a las células T^(15,35).

Existen abundantes antecedentes que evidencian el papel de las CDs en la salud oral y en la patogénesis de las enfermedades de la encía. En los tejidos periodontales se ha observado una proximidad estrecha entre células de Langerhans y linfocitos T en el epitelio gingival^(36,37) y entre CDs maduras y el foco de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el tejido conectivo gingival^(10,11).

Las células de Langerhans son CDs involucradas en la respuesta a la infección de la encía y la mucosa oral⁽¹²⁾, e incrementan en número durante la gingivitis y la periodontitis^(10,38,39). Se ha propuesto una estratificación celular, donde las células de Langerhans epiteliales reconocen los antígenos del biofilm bacteriano a nivel local y migran al tejido conectivo subyacente, madurando a células que expresan moléculas MHC clase II, en respuesta a las citoquinas inflamatorias y al patrón molecular PAMPS asociado^(12,40).

Uno de los factores determinantes de la historia natural de la periodontitis es el desarrollo de un fenotipo de respuesta Th1 o Th2. El tipo de antígeno, la forma en que éste es reconocido y procesado por las CDs, el subtipo de CDs que participa, la conjugación del antígeno a moléculas MHC tipo II, el tipo e intensidad de señales co-estimuladoras expresadas (CD80 y CD86) y el patrón de citoquinas local particular, determinarían el subtipo de linfocito T sensibilizado, y así, el tipo de respuesta Th establecido^(4,8). Entre las citoquinas más importantes en la definición de la respuesta Th se encuentran IL2, IL4, IL10, IL12 e IFN γ ⁽²¹⁾. En general se ha establecido que IFN γ e IL12 son necesarias para permitir el desarrollo de una respuesta Th1, mientras que IL4 e IL5 lo son para el desarrollo de una respuesta Th2^(15,41). Las células Th1 secretan predominantemente IFN γ , IL1 β , IL2, IL12, TNF α y TNF β y las células Th2 sintetizan IL4, IL5, IL6 e IL13⁽¹⁵⁾. Se ha postulado que un perfil específico de citoquinas Th1 y/o Th2 puede estar asociado con la susceptibilidad, inicio y progresión de la infección periodontal^(16,17,23-26).

Para dilucidar el papel de las CDs en la respuesta inmune desarrollada frente a la infección por bacterias periodontopatógenas, evaluamos la expresión *in vitro* de IL1 β , IL2, IL5, IL6, IL10, IL12p35, IL12p40, IL13, IFN γ , TNF α y TNF β , cuantificados mediante PCR en tiempo real, y la expresión de CD80, cuantificada mediante citometría de flujo, en cultivos de MoDCs estimulados con concentraciones de 10¹ a 10⁹ bacterias/mL de los periodontopatógenos *Aa* y *Pg*.

Aunque con distinto orden de magnitud, *Aa* y *Pg* indujeron predominantemente la expresión de citoquinas propias de una respuesta Th1. A alta concentración de carga bacteriana (10⁹ bacterias/mL), la expresión de IFN γ aumentó en 6 veces en CDs estimuladas con *Aa* o *Pg* en comparación al control de CDs no estimuladas, la expresión de IL1 β aumentó en 15 y 6 veces, y la expresión de IL12p40 aumentó 18 y 10 veces en cultivos de CDs estimuladas con *Aa* o *Pg*, respectivamente. Se ha establecido que IL12 es esencial para la diferenciación y activación de linfocitos T del fenotipo Th1⁽¹⁵⁾. IL12 es un heterodímero de 70-KDa codificado por 2 genes diferentes que conforman las sub-unidades p35 y p40, las que deben expresarse en la misma

célula para generar la forma secretada⁽²⁸⁾. Se ha establecido que la capacidad de *Pg* de inducir la síntesis de IL12 en CDs es débil comparada a la inducción por la estimulación de *Aa* y *E. coli*⁽²⁷⁾. En nuestro trabajo, aunque la inducción de la expresión de IL12p40 fue claramente detectable a partir de concentraciones bacterianas de 10⁷ bacterias/mL de *Pg*, la inducción de la expresión tanto de la subunidad p35 (3 a 4 veces) como de la subunidad p40 (2 veces) fue claramente menor a la detectable con *Aa*, que además mostró inducción de expresión a concentraciones bacterianas más bajas. Una óptima inducción de la expresión de la subunidad IL12p35 y la síntesis de IL12 en su forma secretada puede potenciarse cuando CDs son co-cultivadas con células NK o reciben aporte *in vitro* de IFN γ ⁽²⁸⁾. Recientes trabajos han propuesto una inducción de una respuesta tanto Th1 como Th2 mediada por *Pg*^(42,43). Estudios de un modelo donde *F. nucleatum* fue co-cultivado previo a *Pg*, replicando la infección secuencial *in vivo* observada en la periodontitis, indicó que la respuesta inmune efectora tiende a ser Th2⁽³¹⁾. Aunque la inducción de la expresión de IL12p35 en CDs estimuladas con *Pg* es menor a la detectada para la sub-unidad p40 y a la inducida por *Aa*, los niveles de inducción de IL1 β e IFN γ nos permiten especular una respuesta Th1 mediada por *Pg*.

Al comparar la respuesta inducida *in vitro* por *Pg* y *Aa*, se observa que los umbrales de síntesis de citoquinas son distintos para IL1 β , IL12, IFN γ , TNF α y TNF β . En general la inducción de la expresión de citoquinas en CDs estimuladas *in vitro* es detectable a concentraciones bacterianas de 10⁴ a 10⁶ bacterias/mL de *Aa* y 10⁷ a 10⁸ para *Pg*, lo que permitiría especular un mayor potencial antigénico de *Aa* y proyectar una mayor capacidad patogénica durante la infección periodontal. La mayoría de los estudios evalúan la actividad celular o la expresión y/o síntesis de marcadores de superficie o de mediadores pro-inflamatorios a concentraciones semejantes de bacterias, citoquinas o antígenos^(27-29,44). En un estudio *in vivo* en animales de experimentación, se observó que LPS de *E. coli* o LPS de *Pg* en combinación a ovoalbúmina (OVA) inducen expansión clonal similar de linfocitos T CD4+ y CD8+ OVA-específicos, pero expresan distinto perfil de citoquinas⁽⁴⁴⁾. Mediante ELISA se detectó una elevada síntesis de IFN γ e IL12 en cultivos de CDs de bazo estimulados con LPS de *E. coli*, asociando la respuesta a una tipo Th1, y en cultivos estimulados con LPS de *Pg* se observaron elevados niveles de IL5, IL10 e IL13, bajos niveles de IFN γ y niveles no detectables de IL12, asociando la respuesta inducida a una Th2. Desde un punto de vista de las CDs, han sido propuestos dos modelos de respuesta: El modelo instructivo, que involucra sólo un subtipo de CD capaz de responder de manera diferente a distintos microorganismos y distintas señales medio-ambientales, desencadenando distintos tipos de respuesta inmune adaptativa, y un modelo selectivo, que involucra distintos subtipos de CDs que expresan distinto repertorio de patrón de reconocimiento capaz de distinguir distintas clases de productos bacterianos⁽⁴⁴⁾. Nuestros datos avalan un modelo instructivo de respuesta de las CDs, dado que una expresión diferente de citoquinas dependiente de la carga bacteriana inductora se detectó en CDs del mismo origen (MoDCs) al ser estimuladas con dos patógenos periodontales distintos. De hecho, una diferente respuesta a dos distintas cepas de *Pg* ha sido publicada. La cepa *Pg* 381 indujo *in vitro* una elevada síntesis de IL12, y una débil síntesis de IL12 se detectó al estimular CDs con la cepa *Pg* O55: B5^(29,30). La cepa *Pg* 381 con fimbria fue más eficaz que la cepa mutante *Pg* DPG3 carente de fimbria en invadir CDs, inducir la expresión de HLA-DR, CD83, CD80 y CD86 y la síntesis de IL6, IL10, IL12 y TNF α en MoDCs, y estimular la proliferación y la síntesis de IFN γ en linfocitos T⁽²⁹⁾. Nuestros datos demuestran que niveles similares de expresión relativa de citoquinas pueden inducirse a concentraciones distintas de *Pg* y *Aa*. Cuando se es

timulan a carga bacteriana similar, se observa mayor respuesta en CD80 estimuladas con *Aa* por sobre la inducción mediada por *Pg*, ambas de manera dosis-dependiente.

En el presente trabajo se indujo la expresión de citoquinas en CD80 estimuladas con las bacterias periodontopatógenas *Pg* y *Aa ad integrum*, para así evaluar su potencialidad antigénica y proyectar la capacidad patogénica de las bacterias con todo su potencial virulento. La confección de curvas de crecimiento bacteriano y la selección de bacterias en fase de crecimiento exponencial nos ha permitido definir el número exacto de bacterias con real potencial antigénico puestas en cultivo con las CD80. La detección de mayores niveles de expresión de CD80 y la inducción de expresión de citoquinas de mayor intensidad relativa y a carga bacteriana de *Aa* más baja, en comparación a *Pg*, nos permite especular un potencial antigénico diferente entre las bacterias periodontopatógenas estudiadas. La proyección de esta mayor potencialidad patogénica requerirá profundizar el conocimiento de estos microorganismos en su interacción *in vivo* con la respuesta del hospedador, dentro de un biofilm organizado y/o evaluando sus sub-tipos genéticos.

Un conocimiento más profundo del papel de las distintas bacterias periodontopatógenas y de sus subtipos genéticos en la respuesta inmune inducida, evaluando la potencialidad patogénica individual o en conjunto en un biofilm organizado, contribuiría a esclarecer, al menos en parte, el conocimiento de la inmunopatogénesis de las enfermedades periodontales y a explicar la variable respuesta individual a la infección.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Investigación 060181 del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Ministerio de Sanidad y Consumo de España. Los autores agradecen al Dr. Pedro Lastres (Servicio de Citometría de Flujo, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) y al Dr. Jorge Gamonal (Facultad de Odontología, Universidad de Chile) por su valiosa colaboración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999; 4: 1-6.
- Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 1986; 13: 418-430.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 2005; 38: 135-187.
- Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *Journal of periodontal research* 2006; 41: 361-373.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 2000; 18: 767-811.
- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*. *The Journal of experimental medicine* 1990; 172: 631-640.
- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Witmer-Pack M, Steinman RM. Dendritic cells as antigen presenting cells *in vivo*. *International reviews of immunology* 1990; 6: 197-206.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science (New York, NY)* 1999; 283: 1183-1186.
- Cutler CW, Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface. *Journal of dental research* 2006; 85: 678-689.
- Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, et al. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: *in situ*, *in vivo*, and *in vitro* studies. *Journal of immunology* 2001; 167: 4693-4700.
- Jotwani R, Cutler CW. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells *in situ*. *Journal of dental research* 2003; 82: 736-741.
- Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontology* 2000 2004; 35: 135-157.
- Gemmell E, Carter CL, Hart DN, Drysdale KE, Seymour GJ. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral microbiology and immunology* 2002; 17: 388-393.
- Hart DN. Dendritic cell biology evolves into clinical application. *Lancet* 2005; 365: 102-104.
- Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology* 2000 2007; 43: 14-40.
- Bartova J, Kratka-Opatrna Z, Prochazkova J, et al. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *Mediators of inflammation* 2000; 9: 115-120.
- Gemmell E, Seymour GJ. Cytokines and T cell switching. *Critical reviews in oral biology and medicine* 1994; 5: 249-279.
- Manhart SS, Reinhardt RA, Payne JB, et al. Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. *Journal of periodontology* 1994; 65: 807-813.
- Reinhardt RA, McDonald TL, Bolton RW, DuBois LM, Kaldahl WB. IgG subclasses in gingival crevicular fluid from active versus stable periodontal sites. *Journal of periodontology* 1989; 60: 44-50.
- Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *Journal of periodontology* 1998; 69: 1098-1104.
- Ebersole JL, Taubman MA. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1994; 5: 112-141.
- Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I, Taubman MA. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *Journal of dental research* 2000; 79: 1548-1555.
- Berglundh T, Liljenberg B, Lindhe J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2002: 705-709.
- Nakajima T, Yamazaki K, Cullinan MP, Gemmell E, Seymour GJ. T-cell antigen specificity in humans following stimulation with *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of oral biology* 1999; 44: 1045-1053.
- Fokkema SJ, Loos BG, Slegte C, van der Velden U. A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients. *Clinical and experimental immunology* 2002; 127: 374-378.
- Yun PL, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Hydrolysis of interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis* major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. *Infection and immunity* 2001; 69: 5650-5660.
- Kikuchi T, Hahn CL, Tanaka S, Barbour SE, Schenkein HA, Tew JG. Dendritic cells stimulated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* elicit rapid gamma interferon responses by natural killer cells. *Infection and immunity* 2004; 72: 5089-5096.
- Kikuchi T, Willis DL, Liu M, et al. Dendritic-NK cell interactions in *P. gingivalis*-specific responses. *Journal of dental research* 2005; 84: 858-862.
- Jotwani R, Cutler CW. Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells *in vitro* and induces an inflammatory Th1 effector response. *Infection and immunity* 2004; 72: 1725-1732.
- Kanaya S, Nemoto E, Ogawa T, Shimauchi H. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides induce maturation of dendritic cells with CD14+CD16+ phenotype. *European journal of immunology* 2004; 34: 1451-1460.
- Choi J, Borrello MA, Smith E, Cutler CW, Sojar H, Zauderer M. Prior exposure of mice to *Fusobacterium nucleatum* modulates host response to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral microbiology and immunology* 2001; 16: 338-344.
- Aduse-Opoku J, Slaney JM, Hashim A, et al. Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity* 2006; 74: 449-460.
- Kiertcher SM, Roth MD. Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *Journal of leukocyte biology* 1996; 59: 208-218.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.

35. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-3287.
36. Seguíer S, Godeau G, Brousse N. Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Archives of oral biology* 2000; 45: 441-452.
37. Seguíer S, Godeau G, Leborgne M, Pivert G, Brousse N. Quantitative morphological analysis of Langerhans cells in healthy and diseased human gingiva. *Archives of oral biology* 2000; 45: 1073-1081.
38. Cirrincione C, Pimpinelli N, Orlando L, Romagnoli P. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. *Journal of periodontology* 2002; 73: 45-52.
39. Newcomb GM, Seymour GJ, Powell RN. Association between plaque accumulation and Langerhans cell numbers in the oral epithelium of attached gingiva. *Journal of clinical periodontology* 1982; 9: 297-304.
40. Haseus B, Jontell M, Bergenholtz G, Eklund C, Dahlgren UI. Langerhans cells from oral epithelium are more effective in stimulating allogeneic t-cells in vitro than Langerhans cells from skin epithelium. *Journal of dental research* 1999; 78: 751-758.
41. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta odontologica Scandinavica* 2001; 59: 167-173.
42. Jotwani R, Pulendran B, Agrawal S, Cutler CW. Human dendritic cells respond to *Porphyromonas gingivalis* LPS by promoting a Th2 effector response in vitro. *European journal of immunology* 2003; 33: 2980-2986.
43. Stashenko P, Goncalves RB, Lipkin B, Ficarelli A, Sasaki H, Campos-Neto A. Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by *Porphyromonas gingivalis*. *The American journal of pathology* 2007; 170: 203-213.
44. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banachereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *Journal of immunology* 2001; 167: 5067-5076.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Rolando Vernal

Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Olivos 943. Independencia. Santiago.

rvernal@uchile.cl

Trabajo recibido el 22/08/2007.

Aprobado para su publicación el 15/01/2008.