



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO DE GLICOLÍPIDOS POR  
LINFOCITOS T CD57+ EN PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA BUCAL)**

**P R E S E N T A:  
ROSMARY LIZBETH TOLOZA MEDINA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**

México, D. F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ PRINCIPALMENTE EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS DE LA SECRETARIA DE SALUD.; EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA “CONDE DE VALENCIANA”; Y EN LOS LABORATORIOS DE INMUNOLOGIA COMPARADA DE PIEL Y MUCOSAS DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR, LABORATORIO DE INMUNOPARASITOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA Y EN EL LABORATORIO 9 DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. R I C A R D O            L A S C U R A I N            L E D E S M A .

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios por haberme permitido realizar este trabajo.**

*A mi querida familia: mi Madre, hermana y su esposo, al señor Guillermo, por su amor, comprensión y apoyo incondicional desde la distancia.*

## AGRADECIMIENTOS

***Agradezco de una manera especial a la familia Palomera, familia Hernandez, al Dr Zenteno, Dr Lascurain, Dra Ana Maria Fernandez y a la Dra Maria del Carmen Jiménez por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.***

*También agradezco a las siguientes personas:*

*Dra María Blanca Espinosa*

*Dr Noe Alvarado*

*Dr Demetrio Bernal*

*Sra Rosa Nieto*

*Dr Armando Perez*

*Dr Federico Barceló*

*Dra Guadalupe Marín*

*Dr Díaz de Itta*

*Dr Vicente Mendoza*

*M. en C Martha Ustarroz*

*Biol Lina Larios*

*Histotecnóloga Verónica Rodríguez*

*A todas las personas del departamento de bioquímica en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, al momento de la realización de este proyecto.*

*A mi amigos Gloria, Eva, Eudoxia, Citlaly, Nora, Maka, Carmen, Diana, Fernando, Agustin, Xchell, Liliana y Francisco.*

*A la DGEP-UNAM por la beca otorgada durante el III y el IV semestre de la maestría.*

## **DEDICATORIA**

*A Dios*

*A mi Madre, hermana Paty y su esposo, mis sobrinos Dieguito y Adriana y al señor Guillermo.*

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS PRELIMINARES</b>	<b>29</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>48</b>



## ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno
ATCC	Colección de cultivos tipo americano
BSA	Albumina de suero bovino
Cy-Chr	Cy-Chrome (fluorocromo)
DAB	Diaminobencidina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GC	Centros germinales
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
MDDCs	Células dendríticas derivadas de monocitos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MMPs	Metaloproteinasas
OPG-L	Ligando de osteoprotegerina, sinónimo de RANK-L
PBA	PBS con albumina de suero bovino y azida de Sodio
PBMC	Células mononucleadas de sangre periférica
PBS	Solución amortiguadora salino fosfatos
PBS-T	PBS con tritón X-100
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridina clorofil proteína
PFA	<i>para</i> -formaldehido
PI	Yoduro de propidio

PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo	
RANK-L	Receptor activador del ligando del factor nuclear kappa-B, OPG-L	
rpm	Revoluciones por minuto	
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio	
TBS-T	Solución amortiguadora de trizma base con tritón X-100	
Th	Linfocitos T cooperadores	30
TLCK-HCL	<i>N</i> $\alpha$ - <i>p</i> -tosil-L-lisina clorometilcetona-HCL	31
TNF- $\alpha$	Factor alfa de necrosis tumoral	32

	... en tejido gingival.	34
	... CD11a en células de tejido gingival	35
	... de linfocitos T	37
	... linfocitos T cultivados por 10 días.	38
	... CD11a en células CD3 <sup>+</sup> obtenidas de cultivo	39
	... de extractos proteicos de P. gingivalis y E. coli	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Expresión de moléculas fenotípicas en sangre venosa de paciente con periodontitis crónica.	30
Figura 2.	Expresión de V $\alpha$ 24 en linfocitos T CD4+CD57- y CD4+CD57+ de paciente con periodontitis crónica.	31
Figura 3.	Expresión de células CD57+ y células CD20+ en folículo de Amígdala humana	33
Figura 4.	Poblaciones linfoides en tejido gingival.	34
Figura 5.	Expresión de CD1a en células de tejido gingival.	35
Figura 6.	Análisis de pureza de linfocitos T.	37
Figura 7.	Viabilidad en linfocitos T cultivados por 10 días.	38
Figura 8.	Expresión de CD1a en células CD3- obtenidas de cultivo.	39
Figura 9.	Perfil electroforético de extractos proteicos de <i>P. gingivalis</i> y <i>E. coli</i> .	41

## RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad multifactorial causada principalmente por la bacteria *Porphyromonas gingivalis*, que afecta la integridad de los tejidos de soporte dentario. Durante el desarrollo de la enfermedad, linfocitos T tipo NK y células CD1+ se encuentran en el tejido inflamado. En virtud de que las moléculas CD1 presentan glicolípidos, el objetivo de la tesis fue demostrar el “Reconocimiento antigénico de glicolípidos por linfocitos T CD57+ en pacientes con periodontitis crónica”. Para este fin se determinó mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica, la expresión de CD57 en células de sangre venosa y de biopsia de tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica. También se determinó la expresión de CD1a en la biopsia gingival y en células CD3- de paquete leucocitario, cultivadas con GM-CSF e IL-4. Por otra parte, se preparó antígeno de *P. gingivalis* para su utilización en cocultivos de linfocitos T con células CD1+. Los resultados preliminares mostraron que en sangre de un paciente, el 70% de los linfocitos T CD4+ expresaron CD57 y el 15% de esta población expresó en el TCR, la cadena V $\alpha$ 24. Similarmente, en el tejido gingival se observaron células CD57+, sin embargo, en el análisis por superposición de imágenes no correspondieron con células CD3+. Otros resultados mostraron que las células de la zona externa del epitelio gingival fueron positivas para CD1a y que en el 68% de los leucocitos CD3- se indujo con citocinas, la expresión de CD1a después de 5 días de cultivo. En el análisis electroforético del antígeno soluble de *P. gingivalis* se observaron bandas proteicas que corresponden a lo

descrito por la literatura. Estos resultados preliminares apoyan el objetivo principal planteado ya que sugieren que las células CD57+ podrían jugar un papel importante al encontrarse infiltradas en la periodontitis crónica.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad Periodontal es una patología inflamatoria que afecta al ligamento periodontal, encía, hueso alveolar y cemento radicular, quienes constituyen los tejidos de soporte dentario (1). A pesar de las diferentes medidas de prevención y los avances en cuanto a las alternativas de tratamiento, la enfermedad Periodontal afecta a un porcentaje importante de la población adulta, que va del 5 al 30% en países industrializados como Estados Unidos; siendo una de las infecciones más comunes en los seres humanos (2).

La Periodontitis es considerada actualmente como una enfermedad autoinmune de origen multifactorial, en la cual los microorganismos presentes en la biopelícula dental (placa bacteriana) principalmente *Porphyromona gingivalis*, constituyen uno de los factores de riesgo más importantes para el establecimiento de la patología (3). Otros factores que inciden en la progresión de la enfermedad incluyen condiciones genéticas como el polimorfismo de la interleucina 1 (IL-1), una citocina proinflamatoria que se encuentra en altos niveles en pacientes que manifiestan la lesión (4). También, se ha propuesto que patologías sistémicas como Diabetes Mellitus, Enfermedad Cardiovascular, Osteoporosis y Artritis Reumatoide también pueden contribuir al desarrollo de la Periodontitis (5). De igual forma se ha encontrado que el hábito de fumar predispone a desarrollar la enfermedad en una manera dosis dependiente que va correlacionada con la pérdida del epitelio de unión en sus niveles de inserción normales (6).

El desarrollo de Periodontitis va precedido de una Gingivitis, la cual genera una respuesta inflamatoria no específica contra las bacterias presentes en la placa bacteriana que se encuentran a nivel supragingival (7); si la biopelícula o placa supragingival no es eliminada por medios mecánicos como el cepillado o el hilo dental, el microambiente local puede modificarse de una flora bacteriana Gram positiva facultativa, a una flora anaerobia Gram negativa, lo cual permite el crecimiento de la placa bacteriana a nivel subgingival,

así como la migración del epitelio de unión hacia la zona apical. La pérdida de inserción del epitelio de unión en sus niveles normales constituye uno de los parámetros clínicos para el diagnóstico de la Enfermedad Periodontal (8).

## Inmunidad Innata

El sistema inmunitario innato en el periodonto contiene varios elementos celulares que incluyen células epiteliales, dendríticas, macrófagos y neutrófilos (9), la presencia de leucocitos polimorfonucleados es importante para el mantenimiento de la salud periodontal. Los neutrófilos son el tipo celular más abundante en el fluido crevicular gingival, que se define como un exudado inflamatorio que circula dentro del surco gingival o bolsa periodontal alrededor del diente en una encía inflamada (10).

## Inmunidad adquirida

El sistema inmunitario adquirido es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de antígenos de distintos orígenes, se caracteriza por su alta especificidad, la cual se encuentra solamente en los linfocitos B y en los T. Los linfocitos B tienen como receptor de antígeno el complejo BCR, el cual está formado por un anticuerpo de membrana en complejo con las moléculas homodiméricas CD79A y CD79B transmisoras de señales intracelulares (11). Los linfocitos B mediante el anticuerpo de membrana pueden reconocer antígenos solubles en su forma nativa o desnaturalizada y aquéllos asociados a una membrana celular. Cuando los linfocitos B reconocen el antígeno, se activan y se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos (11). Con respecto a los linfocitos T, estas células tienen como receptor de antígeno el complejo TCR formado por un heterodímero que contiene el sitio de unión al antígeno y las moléculas CD3 (gamma, delta, epsilon y dos zetas o etas) que transmiten señales

intracelulares. En el 95% de los linfocitos T de circulación sanguínea, el heterodímero del TCR es una cadena alfa y una beta (TCR alfa/beta), mientras que el 5% restante presentan el heterodímero con cadenas gamma y delta independientemente de las moléculas CD3 (11). Existen dos tipos de poblaciones de linfocitos T con TCR alfa/beta: los cooperadores (CD4+) que reconocen al antígeno presentado por moléculas MHC de clase II y los citolíticos o citotóxicos (CD8+) que reconocen el complejo formado por el antígeno y el MHC de clase I (11). Los linfocitos T reconocen antígenos peptídicos presentados mediante moléculas de histocompatibilidad (MHC) en la membrana de células presentadoras de antígeno (APC) (11). Sin embargo, hay linfocitos T con TCR alfa/beta y TCR gamma/delta que reconocen lípidos propios y extraños, como glicolípidos, fosfolípidos, sulfoglicolípidos, glicoesfingolípidos, diacilglicerol, carbohidratos acilados, policetidos, esfingolípidos, gangliósidos, sulfatidos, fosfatidilinositoles, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcolinas, micolatos, pequeñas moléculas no lipídicas y lipopéptidos presentados por moléculas CD1 (12-14), las cuales tienen una estructura similar a las moléculas del MHC-I (15). Los linfocitos T alfa/beta reconocen lípidos presentados por moléculas CD1a, CD1b y CD1c, mientras que los linfocitos T alfa/beta con fenotipo de células NK (denominados NKT) reconocen característicamente alfa-galactosilceramida en moléculas CD1d (15,16). Con respecto a los linfocitos T gamma/delta son generalmente de fenotipo CD8+ y se encuentran en mayor proporción (~10%) en epitelios y mucosas (11) y reconocen lípidos presentados por moléculas CD1c (15). Por otra parte, cuando se activan los linfocitos T CD4+ se diferencian en cooperadores tipo 1 (Th1) o en tipo 2 (Th2); los linfocitos Th1 característicamente producen IL-2, factor beta de necrosis tumoral (TNF- $\beta$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), mientras que los Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (11). Los linfocitos Th1 dirigen una respuesta inmunitaria de tipo celular porque activan macrófagos, linfocitos T citotóxicos y células NK e inducen la producción de IgG, mientras que los linfocitos Th2



generan una respuesta inmunitaria de tipo humoral porque la mayoría de las citocinas que producen, son factores de crecimiento y diferenciación para linfocitos B (11).

La presencia de linfocitos T y B en la enfermedad periodontal ha sido asociada con los conceptos de lesión estable y de lesión progresiva. La lesión estable está favorecida por una respuesta inmunitaria celular determinada por citocinas producidas por linfocitos Th1, mientras que la lesión progresiva está dada por la respuesta inmunitaria humoral controlada por citocinas producidas por los linfocitos Th2 (17). Esto explica el establecimiento de una respuesta tipo Th2 con la producción de inmunoglobulinas (Igs) principalmente IgG, IgA e IgM con un aumento significativo de IgG en periodontitis de tipo crónico (18). Por otra parte, se ha visto que los niveles de células B con inmunoglobulina G4 (IgG4+) se encuentran aumentados con respecto a los de IgG2+ en estadios inflamatorios avanzados indicando la influencia de IL-4 y disminución de IFN- $\gamma$  en zonas de grandes infiltrados celulares con lesión periodontal (19). La disminución de IFN- $\gamma$  también se ha observado junto con el aumento en la relación de IL-10:IL-12 en cocultivos de linfocitos TCD4+ con células dendríticas derivadas de monocitos (MDDCs) estimuladas con antígeno de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica (20).

### Linfocitos T autorreactivos

Recientemente, se ha demostrado que hay mimetismo molecular entre la proteína humana de choque térmico 60 (Hsp60) y la proteína homóloga de *P. gingivalis* (GroEl). Este mimetismo ha sido la causa de una respuesta autoinmune por parte de linfocitos T (21). Yamazaki y colaboradores (22) evaluaron la respuesta proliferativa, el perfil de citocinas y clones de linfocitos T de sangre periférica en pacientes con periodontitis, los resultados mostraron una alta proliferación de linfocitos T frente a Hsp60 en comparación a GroEl de *P. gingivalis*. La expresión de IFN- $\gamma$  fue encontrada en células mononucleadas de sangre

venosa reactivas a Hsp60 mientras que ningún tipo de citocinas fue producido en respuesta a GroEL de *P. Gingivalis*. Estos datos sugieren que la presencia de bacterias periodontopatogénicas induce la activación de linfocitos T reactivos frente a Hsp60 endógena con producción de citocinas tipo Th1 (22).

### Reabsorción Ósea y Pérdida de Tejido Conectivo

Los linfocitos T activados expresan la molécula denominada Receptor Activador del Ligando del Factor Nuclear kappa-B (RANKL), que puede ser liberada como proteína soluble o quedar unida a la membrana celular. RANKL también se conoce como osteoprotegerina-L (OPGL) y actúa directamente sobre las células precursoras que expresan RANK, induciendo la formación y activación de osteoclastos. Por otra parte, los linfocitos T activados producen TNF- $\alpha$  e IL-17 que estimulan la expresión de RANKL en osteoblastos; esta vía es regulada por la osteoprotegerina (OPG) soluble (23). En este sentido, se han encontrado concentraciones elevadas de RANKL y disminución de OPG en el fluido crevicular gingival y en los sitios activos en donde existe destrucción ósea en comparación con las zonas de tejido en donde la lesión permanece inactiva (24,25). Los resultados sugieren que el desequilibrio en las concentraciones de RANKL y OPG, influyen en la destrucción ósea alveolar característica de la enfermedad periodontal. Con respecto a las metaloproteinasas (MMPs), enzimas encargadas de la degradación de tejido conectivo, se han encontrado aumentadas en la enfermedad periodontal; la elevación en la expresión de MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 es característica en la patología (26). Estos datos se correlacionan con la pérdida total de colágeno tipo I y tipo III que se ha observado por medio de microscopía electrónica en biopsias de pacientes con periodontitis rápidamente progresiva y periodontitis crónica (27).

## Bacterias que participan en la enfermedad Periodontal

Generalmente, los agentes causales de esta patología son bacterias anaerobias Gram negativas dentro de las cuales se encuentran *P. gingivalis*, *T. forsythia*, y *A. actinomycetemcomitans* (28), siendo *P. gingivalis* la principal bacteria que expresa factores de virulencia como fimbrias, lipopolisacáridos, proteasas y hemaglutininas (29). Los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria por parte de *P. gingivalis* son múltiples, por ejemplo, los lipopolisacáridos (LPS) derivados de esta bacteria pueden estimular la producción de prostaglandina E dos ( $PGE_2$ ) por parte de monocitos en tejido gingival sin lesión periodontal (30). Repetidas estimulaciones con LPS de *P. gingivalis* a células presentadoras de antígeno (APCs) en cultivo disminuyen la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, CD83 (marcador de maduración de células dendríticas) y de las quimiocinas CCL3 y CCL5 (31). Las cisteína proteasas de *P. gingivalis* pueden hidrolizar IL-12 y reducir la expresión de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4+ (32). En otro estudio similar, se mostró que los LPS y las cisteína proteasas de *P. gingivalis* pueden aminorar la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  en condiciones *in vitro* disminuyendo así la respuesta inmunitaria de tipo celular (33). De igual forma, en estudios *in vitro* con células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVECs), las cisteína proteasas de *P. gingivalis* pueden degradar moléculas como CD99 y en consecuencia disminuir la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1 en el endotelio vascular (34). Asimismo, estas cisteína proteasas también pueden promover la respuesta Th2, ya que inducen la activación de linfocitos B humanos, incrementan la expresión del IL-4R y muestran una limitada hidrólisis sobre su ligando IL-4 en presencia de suero (35).

## ANTECEDENTES

### Linfocitos T CD57+

Hace dos décadas que se describió por primera vez una subpoblación de linfocitos T con expresión de CD57+, un marcador de células NK (36). CD57 es un polisacárido sulfatado conocido como HNK-1 o Leu78 (37). Se ha demostrado, que los linfocitos T CD57+ están presentes en sangre venosa y aumentan con la edad hasta en un 18% (38). Se ha encontrado que este incremento se debe a una expansión oligoclonal de linfocitos T con limitado repertorio V $\beta$  en su TCR (39). Sin embargo, esta población celular también se ha encontrado aumentada en condiciones patológicas con persistencia del antígeno, por ejemplo: en un estudio realizado en pacientes adultos con trasplante de médula ósea, se encontró en sangre una subpoblación de linfocitos T CD4+ CD57+ en un 30%, comparado con el 1% en individuos sanos (40). De manera interesante, estas células tanto de los pacientes transplantados como de los individuos sanos, presentaron una baja producción de IL-2 cuando fueron tratadas con un estimulador policlonal (40). Okada y colaboradores estudiando pacientes con cáncer colorectal encontraron un 30% de linfocitos T CD57+ en el infiltrado tumoral (41). Pacientes con cirrosis biliar primaria también presentan porcentajes similares de linfocitos T CD3+CD57+ en el tejido de sus tractos portales (42). En el caso de infecciones virales como las generadas por citomegalovirus humano (HCMV), se ha encontrado que un porcentaje importante de linfocitos T CD57+ tienen el marcador de células de memoria (CD45RO+) y que las células T CD8+CD57+ muestran una rápida inducción para sintetizar TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en respuesta a péptidos del HCMV (43). Koike y colaboradores encontraron que la producción de IFN- $\gamma$  fue proporcional a la presencia de linfocitos T CD57+ en la respuesta alogénica de un cultivo mixto (44). En cultivo de leucocitos de pacientes con virus de inmunodeficiencia humana y sujetos no

infectados, después de activar con anticuerpos anti-CD3 se halló mayor producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8+CD57+ con respecto a los linfocitos T CD8+CD57- (45). También se ha observado en linfocitos T CD8+CD57+ mayor producción del FAS-ligando (FAS-L) soluble comparado con linfocitos T CD8 convencionales, así como una alta actividad citotóxica contra la línea celular K562 sensible a células NK (39). En otro estudio se observó que los linfocitos T CD57+ mostraron mayor susceptibilidad a la apoptosis mediada con anticuerpos anti-CD3 y mayor coexpresión de FAS y FASL así como actividad de la caspasa 3 (46). Por otra parte, los linfocitos T CD4+ CD57+ en pacientes con tuberculosis expresan un fenotipo de células memoria-efectoras (CD28<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) con alta producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 (47). Los linfocitos T CD8+CD57+ de estos pacientes muestran también un fenotipo de células activadas, abundante expresión de perforinas y granzima-A, mayor citotoxicidad contra a monocitos autólogos en ausencia de antígeno y niveles de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  superiores con respecto a las células correspondientes de individuos sanos (48). Los linfocitos T CD4+ CD57+ constituyen la mayor subpoblación de linfocitos T cooperadores en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios humanos. Estas células inducen el cambio de isotipo en los linfocitos B y ayudan a la síntesis de inmunoglobulinas principalmente IgG1-3 e IgA1 (49). Con respecto a los linfocitos denominados NKT, éstos expresan en su TCR cadenas invariables; la cadena V $\alpha$ 24 y principalmente la cadena V $\beta$ 11, las cuales reconocen glicolípidos presentados por moléculas CD1d (16). Las moléculas CD1 son semejantes al complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) pero se clasifican como moléculas presentadoras de antígeno no clásicas (16). Las moléculas de la familia CD1 son expresadas en células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) y presentan 5 proteínas que son: CD1a, CD1b, CD1c, CDd y CD1e, las cuales están codificadas en el cromosoma 1 (15,50). Estas proteínas son clasificadas en dos grupos: grupo I constituido

por CD1a, CD1b, CD1c y el grupo II contiene CD1d (15). Estos dos grupos son expresados en la superficie celular, mientras que CD1e tiene una localización intracelular (51). El grupo I presenta lípidos propios y de *M. tuberculosis* que son reconocidos por linfocitos T que expresan el TCR  $\alpha\beta$ , mientras que el grupo II con CD1d presenta lípidos exógenos y endógenos que sólo son reconocidos por los linfocitos T  $V\alpha 24$  denominados iNKT (15).

Se ha reportado en pacientes con periodontitis crónica que la frecuencia de linfocitos T que expresan el TCR  $V\alpha 24$ - $J\alpha Q$  (iNKT) es mayor en los tejidos periodontales que en los tejidos con gingivitis o de sangre venosa (52). Yamasaki y colaboradores en otro estudio, también demostraron por medio de inmunohistoquímica mayor porcentaje de linfocitos tipo NKT en los infiltrados de tejido con periodontitis crónica y mayor expresión de CD1d en el tejido conectivo en comparación con las muestras de gingivitis utilizadas como controles (53). En virtud de los estudios de Yamasaki y colaboradores (52,53), es posible que linfocitos T tipo NK reconozcan antígenos glicolipídicos presentados por moléculas CD1 en células presentadoras de antígeno.

## **JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad periodontal presenta una de las mayores prevalencias dentro de las patologías que se manifiestan a nivel de cavidad oral en las poblaciones de países en vías de desarrollo. Los mecanismos inmunológicos de respuesta frente a este tipo de enfermedad, aún no han sido esclarecidos totalmente. Por ejemplo, la función de marcadores como el CD57 en los linfocitos T que posiblemente interaccionan con antígeno glicolipídico presentado por moléculas CD1, aún no ha sido explorada, siendo posible que esta respuesta pueda ser importante como mecanismo de defensa adicional contra patógenos periodontales.

## HIPÓTESIS

**Los linfocitos T CD57+ reconocen antígenos glicolipídicos a través de CD1 expresado en células presentadoras de antígeno en pacientes con periodontitis crónica.**



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Demostrar la activación de los linfocitos T CD57+ con base al reconocimiento antigénico de glicolípidos en células presentadoras de antígeno que expresan moléculas CD1 en pacientes con periodontitis crónica.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de linfocitos T CD57+ y células CD1+ en biopsias de tejido gingival y sangre de pacientes con periodontitis crónica.
2. Obtener y clonar linfocitos T de sangre de pacientes con periodontitis crónica.
3. Inducir *in vitro* la expresión de moléculas CD1 en monocitos obtenidos de sangre de pacientes con periodontitis crónica.
4. Obtener antígeno soluble a partir de cultivo bacteriano de *Porphyromonas gingivalis*.
5. Realizar cocultivos de linfocitos T autólogos con las células CD1+ inducidas *in vitro* (células dendríticas derivadas de monocitos, MDDCs) estimulando con antígeno de *P. gingivalis*.
6. En los cocultivos de linfocitos T/células CD1+ bloquear alternativamente moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II o moléculas CD1 en MDDCs para determinar poblaciones celulares activadas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MUESTRAS BIOLÓGICAS

Para fines de estandarización, se obtuvieron 10 ml de sangre de paquete leucocitario obtenido de donadores del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER).

Con previa autorización bajo consentimiento informado por escrito se obtuvieron 10 ml de sangre venosa en tubos estériles con  $k_3$  EDTA y una biopsia de tejido gingival bajo previa anestesia local. Las muestras fueron obtenidas de pacientes con periodontitis crónica en la clínica de Periodoncia del Posgrado de Odontología de la UNAM.

### CÉLULAS MONONUCLEADAS

Las muestras de paquete leucocitario y sangre venosa de paciente se diluyeron en un volumen igual de amortiguador salino fosfato (PBS: 0.15M de NaCl y 0.05M de fosfato de sodio a pH 7.2). Las células mononucleadas se separaron por centrifugación a 1700 rpm en un gradiente de Ficoll-Hypaque (1.077 de densidad) durante 30 min a 16°C (54). Después de la centrifugación, se colectaron las células de la interfase, se lavaron 2 veces por centrifugación (1500 rpm durante 5 min a 4°C); descartando el sobrenadante cada vez. El botón celular se resuspendió en 2 ml de PBS y se cuantificaron las células en un hemocitómetro. La viabilidad celular fue valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripano.

### PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T

Con el fin de estandarizar las técnicas para purificar poblaciones de linfocitos T CD3+, se obtuvieron linfocitos T provenientes de paquete leucocitario que se aislaron mediante columnas magnéticas de separación utilizando anticuerpos unidos a microperlas

magnéticas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Sunnyvale California). Las células fueron lavadas y resuspendidas en amortiguador de separación (PBS con BSA al 0.5% y EDTA a 2 mM). Luego, la suspensión celular fue incubada con anticuerpos conjugados a un hapteno y dirigidos contra CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56 durante 20 min a 4°C. Las células fueron lavadas e incubadas por otros 20 min a 4°C con el anticuerpo secundario dirigido contra el hapteno, conjugado a perlas magnéticas. Después, las células fueron lavadas y resuspendidas en un volumen total de 1.5 ml de amortiguador de separación. La suspensión celular se colocó en la columna de separación magnética, en la cual la fracción celular no retenida corresponde a los linfocitos T. Las células retenidas se recuperaron mediante el siguiente procedimiento: la columna de separación se retiró del imán donde estaba y se agregó 1 ml de amortiguador de separación y se presionó con un émbolo eluyendo así las células retenidas. Tanto las células retenidas como no retenidas fueron cuantificadas en un hemocitómetro y la viabilidad celular fue valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripano. Para determinar la pureza de la población celular no retenida de la columna de separación, las células se incubaron con anticuerpos anti-CD3 unidos al fluorocromo PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo. La fracción celular retenida en la columna correspondió a células CD3<sup>-</sup> que fueron recuperadas para cultivarlas e inducir la expresión de CD1.

## CULTIVOS CELULARES

Los linfocitos T CD3<sup>+</sup> ( $2 \times 10^5$ ) y las células retenidas CD3<sup>-</sup> ( $2 \times 10^5$ ) fueron cultivadas independientemente en placas de 96 pozos con 200µl de RMPI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor, 1% de L-glutamina, 1mM de piruvato

de sodio, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100µg/ml), gentamicina (50µg/ml), 10mM de HEPES y 2-mercaptoetanol (50µM) a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>.

## CLONACIÓN DE LINFOCITOS T

Con el fin de mantener la viabilidad, al cultivo de linfocitos T ( $2 \times 10^5$  células/pozo), se les cambió el medio de cultivo y se les agregó 100ng/ml de IL-2 recombinante humana (Gibco BRL) cada tercer día (39). Las células fueron recuperadas a los 10 días para determinar su viabilidad mediante la exclusión del colorante de yoduro de propidio (PI) a la dilución 1:100 a partir de una concentración de 1mg/ml (Sigma). La viabilidad celular fue analizada por citometría de flujo realizando una gráfica en base al tamaño y la complejidad celular.

## INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD1 EN MONOCITOS

Para inducir la expresión de CD1, la fracción de células CD3- ( $2 \times 10^5$ ) fueron cultivadas en pozos con 200µl de RMPI-1640 suplementado, durante 5 días con 100 ng/ml del factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF) (Biosource) y 25 ng/ml de IL-4 (BD Pharmingen). Al tercer día de cultivo, se realizó el cambio de medio de cultivo y nuevamente se agregó a los pozos GM-CSF e IL-4 a la misma concentración (55). Después del quinto día de cultivo, las células fueron lavadas 5 veces con PBS a temperatura ambiente. Posteriormente para desprender las células adherentes, se adicionó a cada pozo 200µl de PBS con EDTA al 0.05 mM a 0°C durante 10 minutos (56). Las células desprendidas y las del sobrenadante recolectado de los pozos, fueron centrifugadas a 1500 rpm/10 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 1 ml de PBS y se cuantificaron las células en un hemocitómetro. La viabilidad celular fue valorada por el método de exclusión del colorante azul de tripano.

## CITOMETRÍA DE FLUJO

Tanto los linfocitos T CD3<sup>+</sup> y las células CD3<sup>-</sup> cultivadas, como las células mononucleadas obtenidas de paciente, fueron previamente fijadas con *p*-formaldehído (PFA) al 1% en PBS. Para la inmunofluorescencia, las células se lavaron en PBS con albúmina de suero bovina al 0.2% y azida de sodio al 0.2% (PBA). Los linfocitos T se incubaron con el anticuerpo anti-CD3 conjugado a PerCP-Cy5.5 y las células CD3<sup>-</sup> cultivadas con IL-4 y GM-CSF fueron incubadas con el anticuerpo contra CD1a conjugado a fluoresceína (FITC) (Biosource). Las células mononucleadas de paciente fueron incubadas con anticuerpos anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmigen) o anti-CD8-PE-Cy5 (BD Pharmigen), anti-CD56-PE (BD Pharmigen) o con anti-CD57-PE (Santa Cruz Biotechnology) y anti-TCR V $\alpha$ 24-FITC (Immunotech) o anti-CD19-FITC (Serotec). Para todos los ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron como controles de isotipo, anticuerpos unidos a FITC, PE o a PerCP-Cy5.5 pero dirigidos contra moléculas irrelevantes. Todas las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y después se lavaron con PBA. El análisis de las muestras por citometría de flujo se llevó a cabo en un aparato Excalibur de Becton & Dickinson (FACS, Mountain View, CA) con el programa Cellquest. Se adquirieron 10<sup>4</sup> eventos en cada ensayo y se analizaron las regiones correspondientes a los linfocitos y a los monocitos, construyendo gráficas de puntos correspondientes a granularidad contra tamaño celular así como gráficas de células fluorescentes.

## HISTOQUÍMICA CON ANTICUERPOS CONJUGADOS A ENZIMAS

La biopsia de tejido gingival de paciente fue embebida en PFA al 10%, la muestra fue incluida en parafina y se realizaron cortes histológicos seriados a 5 $\mu$ m de espesor. Como testigos positivos, se utilizaron cortes histológicos de amígdala humana. Todos los cortes

fueron procesados en laminillas sobrecargadas positivamente (Biocare Medical). Para eliminar la parafina de las muestras, se utilizó en forma secuencial Xilol absoluto, alcohol absoluto, alcohol al 70% y agua. Para exponer los sitios de reconocimiento antigénico, los cortes histológicos fueron sumergidos en amortiguador de citratos 10 mM (Dako) durante 15 minutos en baño María a temperatura de ebullición. Todas las muestras fueron procesadas con el kit Dakocytomation (Dako Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se describe a continuación: Todas las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para las muestras histológicas que se revelaron mediante la reacción de la fosfatasa alcalina, todos los lavados fueron por 5 min con TBS-Tween 20 al 0.05%. La primera incubación fue con levamisol 0.2 mM por 5 min para inhibir la fosfatasa endógena. Luego, las muestras se lavaron y se incubaron con el anticuerpo IgM anti-CD57 (Zymed) por 20 min. Después de lavar, una segunda incubación fue realizada con el anticuerpo anti-IgM conjugado con biotina (Serotec) por 20 min. Previo lavado una tercera incubación se realizó con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina durante 15 min. Por último, los cortes histológicos se lavaron y se revelaron mediante incubación con fucsina al 0.5% en HCL (hidrocloruro de dianilina al 0.1-1%), nitrato de Sodio al 5% en el amortiguador de sustratos (fosfato de naftol en Tris 0.1M) del kit (DAKO) por 10 min, deteniendo la reacción con un lavado final. Para las muestras histológicas que se revelaron mediante la reacción de la peroxidasa, los lavados se realizaron con PBS-Tween 20 al 0.05% por 5 min. Inicialmente se incubó con peróxido de hidrógeno al 3% con azida de Sodio 15 mM por 5 min para bloquear la peroxidasa endógena. Inmediatamente, las muestras se lavaron e incubaron individualmente con los anticuerpos anti-CD3 (Dako), anti-CD20 (Dako) y anti-CD68 (Dako) durante 20 min. Enseguida, los cortes histológicos fueron lavados e incubados con el reactivo denominado multilink universal biotinilado (kit de Dako) por 20 min. Las muestras fueron después lavadas y se incubaron con estreptavidina conjugada a

peroxidasa durante 15 min en las condiciones mencionadas. Finalmente, los cortes histológicos fueron lavados y revelados mediante incubación durante 5 min con 3,3'-diaminobencidina (DAB) diluida en el amortiguador de sustratos (Imidazol-HCl, pH 7.5 con peróxido de hidrógeno) del kit (DAKO). La reacción de revelado fue detenida lavando con PBS-Tween. Para descartar la reacción inespecífica se utilizaron como controles negativos los cortes de tejido gingival y de amígdala humana, incubados solo con el anticuerpo secundario Multilink biotinilado (Kit de Dako) durante 20 min en las mismas condiciones. Para identificar los núcleos celulares, todas las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayers. Para preservar y analizar en el microscopio, todas las laminillas fueron cubiertas con resina.

## HISTOQUÍMICA CON ANTICUERPOS CONJUGADOS A FLUOROCROMOS

Se realizaron cortes seriados de 3µm de tejido gingival obtenido de paciente, los cuales fueron desparafinados y sometidos a recuperación antigénica con un kit de Dako como se describe en el párrafo anterior. Las muestras fueron lavadas con PBS conteniendo albúmina bovina al 0.2% y azida de Sodio al 0.2% e incubadas con anticuerpos contra CD1a conjugado a fluoresceína (FITC) (Biosource) durante 20 min en oscuridad en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se lavaron y los núcleos de los tejidos fueron identificados mediante contrateñimiento con yoduro de propidio (PI) dilución 1:5000 (Sigma). Finalmente, las muestras se analizaron en un microscopio equipado con epifluorescencia. Para el control negativo se utilizó un corte histológico de pulmón humano, el cual se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG1 murino-FITC (BD PharMingen) durante 20 min en oscuridad en las mismas condiciones. De igual forma los núcleos celulares fueron revelados por contrateñimiento con PI y la muestra histológica fue analizada en un microscopio de epifluorescencia. Para el control positivo de células

CD1a+, se utilizó tejido de pulmón de paciente con tuberculosis, procesado en las mismas condiciones del tejido gingival.

## CULTIVOS BACTERIANOS Y OBTENCIÓN DE ANTÍGENO

Con el fin de obtener antígeno bacteriano, se cultivó la cepa 33277 de *Porphyromonas gingivalis* proveniente de la ATCC (KWIK-STIK Canister. Mca Microbiologics) y la cepa 35218 de *Escherichia coli* utilizada como control (donada por el Laboratorio de Microbiología clínica del INER). La cepa 33277 de *P. gingivalis* se sembró en cajas de agar CDC (centro de control de enfermedades) anaerobio con 5% de sangre de carnero (BD. BBL) durante 7 días en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Transcurrido el tiempo se determinaron las unidades formadoras de colonias (CFU) de la placa para sembrarlas en caldo de tioglicolato e incubarlas durante 7 días en las mismas condiciones. La cepa 35218 de *E. coli* se cultivó en tioglicolato bajo condiciones de aerobiosis a 37°C durante 48hrs. La concentración de las dos cepas de bacterias necesarias para el homogeneizado se determinó en base a la turbidez equivalente al 0.5 de la escala estándar Mac-Farland (0.5 de cloruro de bario 1% y 9.5 de ácido sulfúrico 1%) que corresponde a una concentración bacteriana de  $1.5 \times 10^8$ /ml en cada cepa cultivada. Para obtener la masa bacteriana, los caldos de cultivo de ambas bacterias fueron centrifugados a 12,400 rpm durante 20 minutos. Los botones bacterianos fueron recuperados y lavados con amortiguador (10 mM HEPES-NaOH pH 7.4 con 0.15M NaCl). Posteriormente, las bacterias fueron resuspendidas en amortiguador de HEPES (10 mM HEPES-NaOH pH 7.4) (57) suplementado con inhibidores de proteasas: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), aprotinina, inhibidor I calpaina, inhibidor II calpaina, E-64,  $\alpha_2$ -macroglobulina, pefabloc SC, cimostatina, bestatina, pestatina, leupeptina, floruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), *N* $\alpha$ -*p*-tosil-L-lisina clorometilcetona-HCL (TLCK-HCl) e inhibidor de tripsina del kit



Complete, Mini Roche. Luego, las bacterias fueron colocadas en viales estériles que contenían perlas de vidrio con 1 ml de amortiguador de HEPES y fueron sometidas a vibración (2500 revoluciones/min) en un agitador MSJ Minishaker (IKA Works Inc.) durante 4 ciclos de 20 segundos para generar la lisis bacteriana. Para comprobar el lisado bacteriano se utilizó el Kit para tinción de Gram de Becton & Dickinson (BD) que contenía las soluciones de cristal violeta, lugol, decolorante y safranina, utilizadas cada una por un minuto, alternando con lavados entre cada solución. Posteriormente, se tomó una muestra del extracto crudo del lisado para determinar la concentración de proteínas en base a una concentración estándar de 1mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) con la técnica de Lowry modificada (kit de Bio-Rad Labs.) siguiendo las instrucciones del fabricante. De los lisados bacterianos obtenidos, se aplicaron 15µl conteniendo 6µg de proteína, la cual se diluyó en 15 µl del regulador de muestra 2x (ver anexo III) por carril para ser sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida (PAGE) al 10% en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato de Sodio (SDS) (58) y se utilizaron marcadores de amplio peso molecular entre el rango de 205 y 29 kilodaltons (Sigma). El gel se reveló mediante la técnica de tinción de plata amoniaca de la siguiente manera: El gel se colocó en isopropanol 10% y ácido acético 10% durante 20 min, luego se colocó en isopropanol 10% por 20 min. Posteriormente, se incubó con glutaraldehído al 3.5% y se lavó con agua desionizada, después se incubó con una solución compuesta de nitrato de plata al 10%, hidróxido de sodio al 0.36% y hidróxido de amonio (0.3 ml), durante 30 min en agitación. El gel se lavó nuevamente y se reveló con ácido cítrico (50mg en 100ml) diluido 1:10 en agua desionizada con 50µl de formaldehído al 37%, finalmente la reacción de revelado se detuvo con ácido acético al 10% (59).

## COCULTIVOS DE LINFOCITOS T AUTÓLOGOS CON MDDCs

Leucocitos de sangre de pacientes con periodontitis crónica y de individuos sanos utilizados como controles, serán purificados para obtener células CD3<sup>-</sup> y linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Las células CD3<sup>-</sup> se utilizarán para inducir la expresión de CD1 y así obtener las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDCs) al 5<sup>o</sup> día de cultivo (método estandarizado previamente). Transcurrido ese tiempo estas MDDCs serán lavadas, cuantificadas y colocadas en pozos de una microplaca ( $2 \times 10^5$  células/pozo), adicionando 200µl de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor (56°C durante 20 min). Para obtener la concentración óptima de antígeno, a las MDDCs se les agregará el extracto crudo soluble de *P. gingivalis* en concentraciones desde 1 hasta 10µg/ml (60) así como los linfocitos T CD3<sup>+</sup> autólogos ( $2 \times 10^5$  células/pozo) que fueron mantenidos en cultivo con IL-2 (método estandarizado previamente) a una relación de 5:1 (linfocito T/MDDC) (60). También se establecerá una cinética de activación celular del cocultivo en intervalos de 24 hrs durante 3 días mediante triple inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra el marcador fenotípico celular (CD3, CD4, CD8, CD1, CD14, CD19, CD56, CD57, CD161, etc) y anticuerpos contra el marcador temprano de activación CD69 con la finalidad de identificar poblaciones celulares activadas. Como control positivo se utilizará el mitógeno Concanavalina A para  $2 \times 10^5$  linfocitos T /pozo (previamente estandarizado). Otros controles del ensayo serán MDDCs con linfocitos T cultivados en presencia o ausencia de antígeno de *P. gingivalis*, los cuales serán analizados por citometría de flujo.

## BLOQUEO DE MOLÉCULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN LOS COCULTIVOS

En estos ensayos, los cocultivos se realizarán en presencia de anticuerpos bloqueadores (5-10µg/ml) (61) dirigidos contra moléculas MHC-I y MHC-II. Previo al cocultivo, las MDDCs se incubarán con los anticuerpos bloqueadores por 15 min para determinar la concentración y asegurar el bloqueo, el cual será evaluado por citometría de flujo. Para asegurar el bloqueo con la presentación de antígenos lipídicos por moléculas CD1, se utilizarán anticuerpos contra estas moléculas. Los cocultivos de linfocitos T/MDDCs se realizarán en presencia de los anticuerpos bloqueadores previa estandarización para determinar la concentración óptima.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de las medianas en los experimentos serán analizados usando la prueba de *U* de Mann-Whitney, utilizando un software STATA™ 8.0. El valor de  $p < 0.05$  será considerado como estadísticamente significativo.

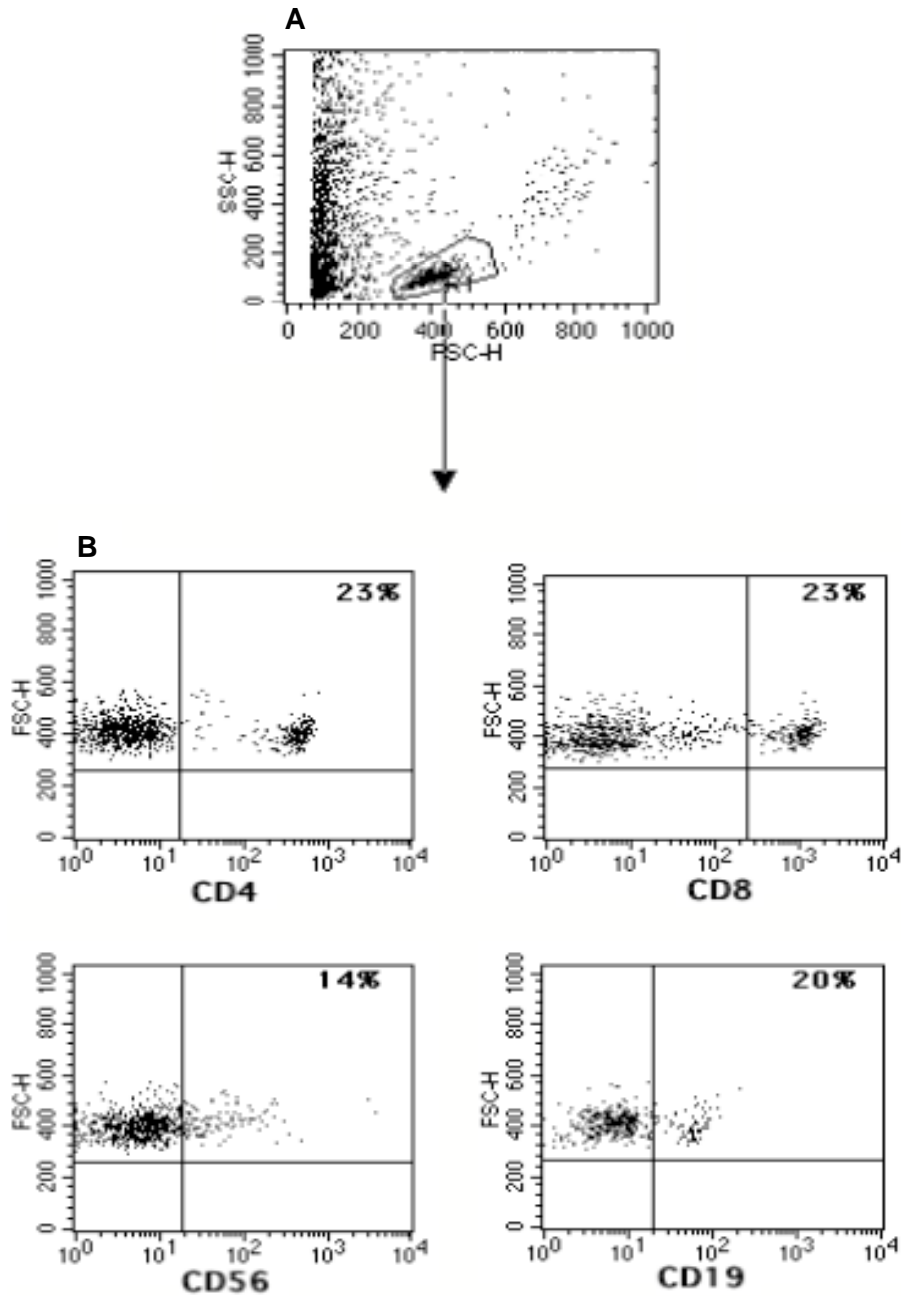
## RESULTADOS PRELIMINARES

### EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS FENOTÍPICAS EN SANGRE VENOSA EN PACIENTE CON PERIODONTITIS CRÓNICA

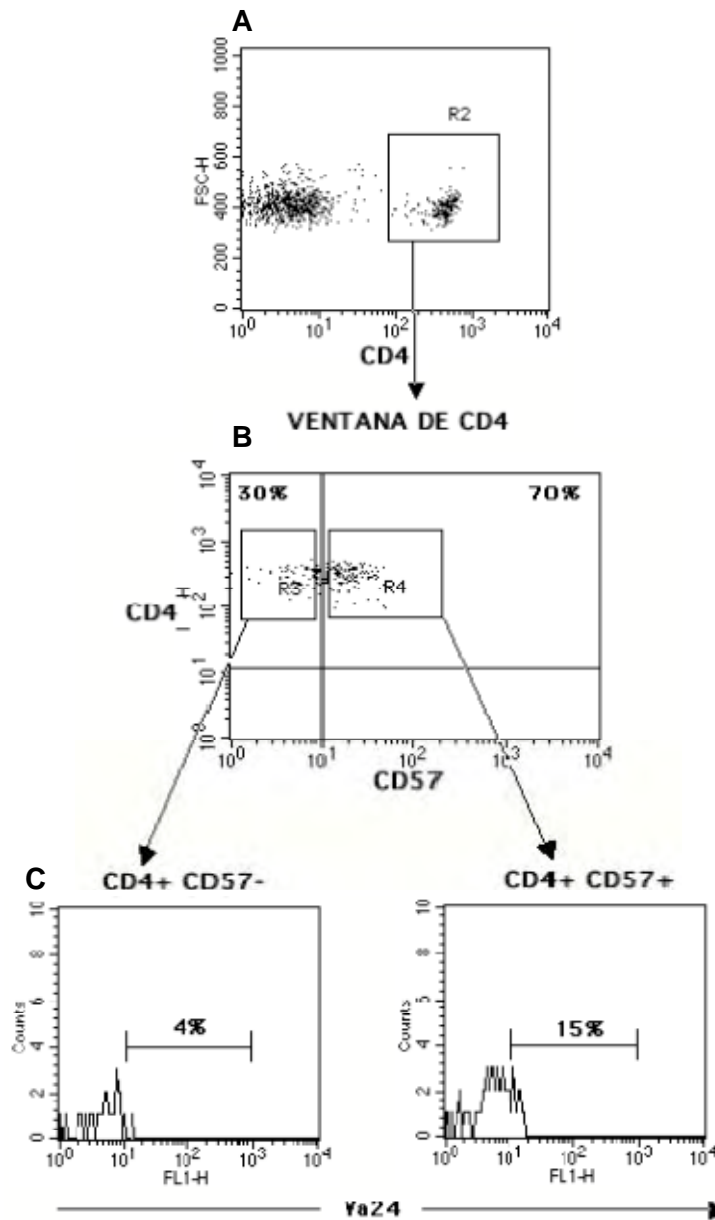
Las moléculas CD4, CD8, CD19 y CD56 se expresan en la superficie de células mononucleadas, cada marcador identifica una población de leucocitos específica. CD4 y CD8 se expresa en linfocitos T, CD19 en linfocitos B y CD56 en células NK. En sangre venosa de paciente con periodontitis crónica, se evaluó el porcentaje de expresión de estas poblaciones. Los resultados se muestran en la **Fig. 1**.

### EXPRESIÓN DE $V\alpha 24$ EN LINFOCITOS T CD4+CD57- Y CD4+CD57+ EN PACIENTE CON PERIODONTITIS CRÓNICA

Se realizó triple inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD57 y anti- $V\alpha 24$  en células mononucleadas obtenidas de sangre venosa y se analizaron por citometría de flujo. La subpoblación de linfocitos T CD4+CD57-  $V\alpha 24$  se comparó con los linfocitos T CD4+CD57+  $V\alpha 24$  (**Fig. 2**). Los resultados mostraron que en la subpoblación de linfocitos T CD4+, la expresión de CD57 fue del 70% (**Fig. 2B**). Por otra parte, el análisis comparativo de la cadena  $V\alpha 24$  en linfocitos T CD4+CD57+ mostró una expresión del 15% con respecto al 4% obtenido en células T CD4+CD57- (**Fig. 2C**).



**Figura 1. Expresión de moléculas fenotípicas en sangre venosa de paciente con periodontitis crónica.** Células mononucleadas fueron obtenidas de sangre venosa y se marcaron con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 y anti-CD19, los porcentajes de cada población fueron analizados por citometría de flujo. **A)** Gráfica de tamaño contra granularidad donde se muestra la región de células mononucleadas. **B)** Expresión de marcadores CD4, CD8, CD56 y CD19 en las diferentes poblaciones de linfocitos. Los números indican el porcentaje de células positivas en cada cuadrante.



**Figura 2. Expresión de la V $\alpha$ 24 en linfocitos T CD4+CD57- y CD4+ CD57+ de paciente con periodontitis crónica. A) Se seleccionó la subpoblación de linfocitos T mediante su expresión de CD4 en la región R2. B) Expresión del CD57 en linfocitos T CD4+ en las regiones R3 y R4. C) Presencia de la cadena V $\alpha$ 24 en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+CD57- y CD4+CD57+. Los números en cada figura representan los eventos positivos al marcador correspondiente. Los datos provienen de un experimento representativo de 3 que se realizaron en la muestra del paciente.**

## POBLACIONES LINFOIDES EN TEJIDO GINGIVAL

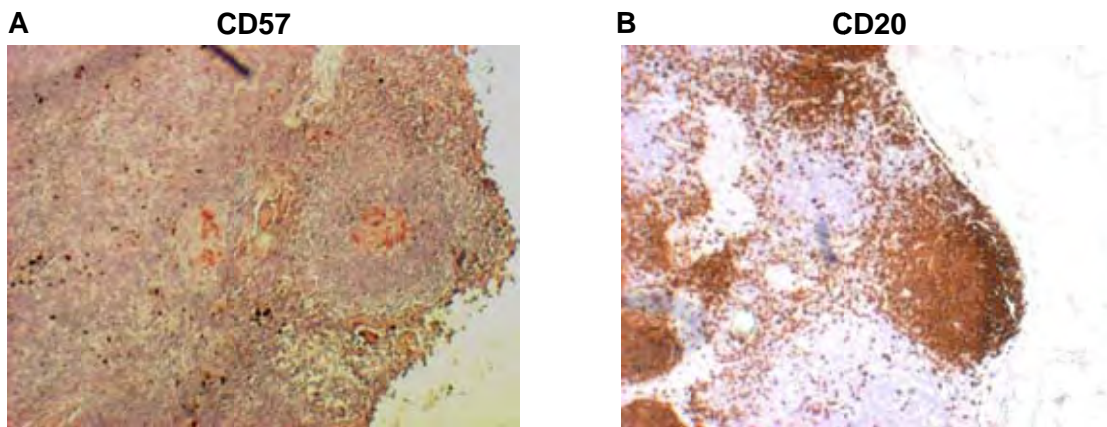
Para determinar la molécula CD57 en las poblaciones celulares linfoides se realizó inmunohistoquímica en los cortes histológicos obtenidos de tejido gingival que fueron revelados mediante la reacción de la peroxidasa o fosfatasa alcalina. Los núcleos fueron identificados mediante contratinción con hematoxilina, las muestras se observaron en microscopio con campo claro.

Se utilizó como control positivo cortes histológicos de amígdala humana, los cuales se incubaron con anticuerpos anti-CD57 (**Fig. 3A**) y anti-CD20 (marcador de linfocitos B) (**Fig. 3B**) con el propósito de demostrar la presencia de CD57 a nivel de folículos de centros germinales (49, 62). Como control negativo se utilizaron cortes de tejido gingival incubados con el anticuerpo secundario biotinilado (**Fig. 4A**). El grupo experimental que consistió en la muestra obtenida del paciente, fue incubada con anticuerpos anti-CD57, anti-CD3, anti-CD20 y anti-CD68 (marcador de macrófagos). El análisis comparativo de los cortes seriados mostró que las células marcadas con anti-CD57 (**Fig. 4B**) de la lámina propia no correspondieron a las mismas células marcadas con anti-CD3 en los cortes seriados (**Fig. 4C**). Los resultados también mostraron que la población celular más abundante correspondió a los linfocitos B presentes en la lámina propia (**Fig. 4D**). La población celular de macrófagos fue menor en comparación a los linfocitos B y se observaron tanto en epitelio como en tejido conectivo (**Fig. 4E**).

## EXPRESIÓN DE CD1a EN CÉLULAS DE TEJIDO GINGIVAL

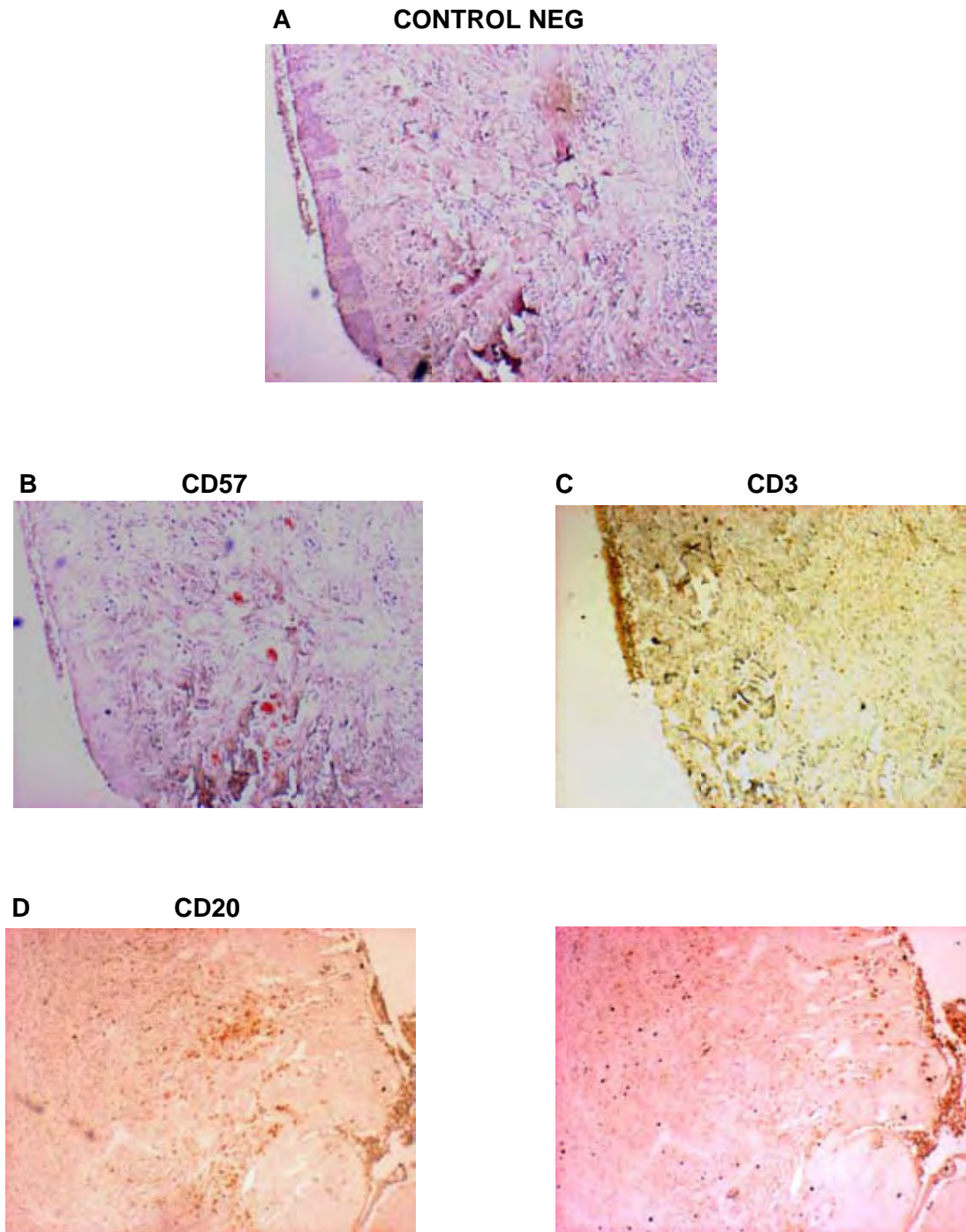
Se realizó inmunohistoquímica con inmunofluorescencia directa para evaluar la expresión de CD1a en células de tejido gingival (**Fig. 5**). Como control positivo se incluyeron cortes histológicos de pulmón obtenidos de un paciente con tuberculosis (**Fig. 5A**). La reacción inespecífica se descartó utilizando un control de isotipo IgG1-FITC en los cortes de pulmón (**Fig. 5B**). El control positivo y el tejido gingival fueron incubados con el anticuerpo

anti-CD1a conjugado a FITC. Todos los cortes histológicos fueron contrateñidos con yoduro de propidio (PI) y se observaron en un microscopio equipado con epifluorescencia. Los resultados mostraron expresión de la molécula CD1a en la zona externa del epitelio oral, probablemente la marca fenotípica corresponda a células de Langerhans. Cabe mencionar que también se observó reacción inespecífica acentuada para eritrocitos (**Fig. 5C**).



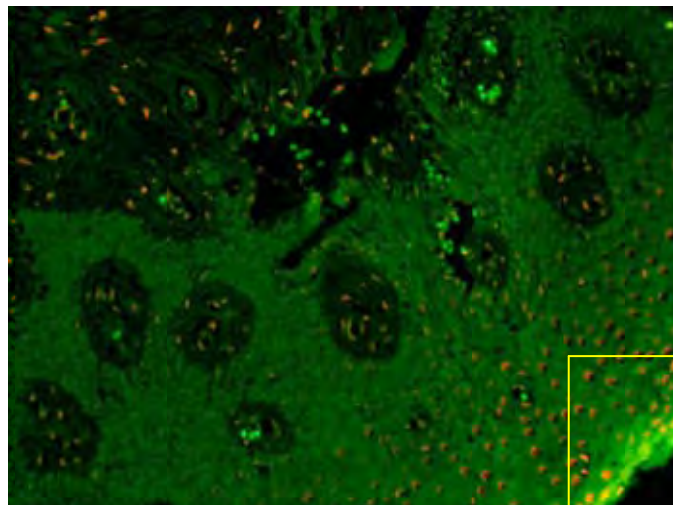
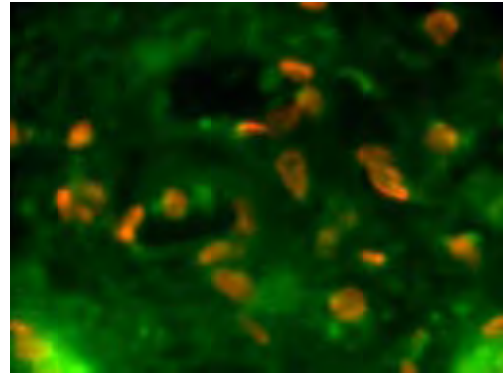
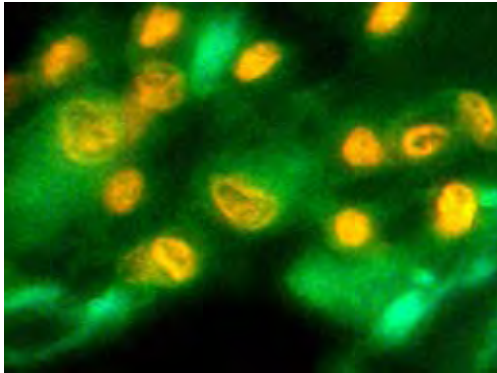
**Figura 3. Expresión de células CD57+ y células CD20+ en folículo de amígdala humana.** Controles positivos de amígdala para la molécula CD57 **A**) y CD20 **B**). Las muestras fueron observadas en un campo de 4x.





**Figura 4. Poblaciones linfoides en tejido gingival.** Los cortes de tejido gingival fueron procesados y revelados mediante la reacción de la peroxidasa o fosfatasa alcalina. **A)** Control negativo. Muestras positivas a los marcadores CD57 **B)**, CD3 **C)**, CD20 **D)** y CD68 **E)**. Las figuras se observaron en un campo de 4x.

**A** CONTROL POS



**Figura 5. Expresión de CD1a en células de tejido gingival. A)** Control positivo de corte histológico de pulmón marcado con el anticuerpo contra CD1a. **B)** Control negativo de corte de pulmón. **C)** Muestra de tejido gingival marcada con el anticuerpo anti-CD1a. Las figuras **A** y **B** se observaron en un campo de 40x. La figura **C** se observó en un campo de 10x. Se aprecian los núcleos celulares contrateñidos con PI (tinción naranja).

## ANÁLISIS DE PUREZA DE LINFOCITOS T

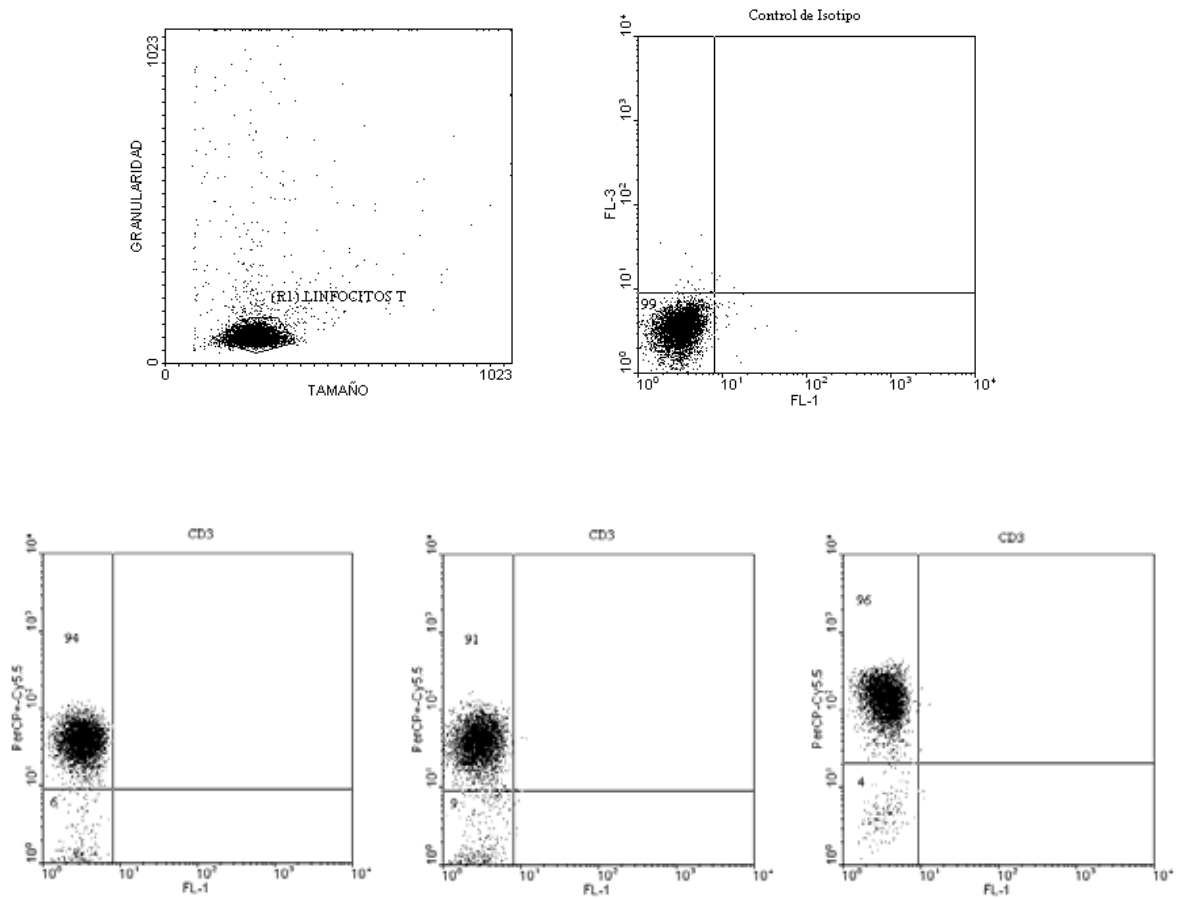
Las células mononucleadas obtenidas de paquete leucocitario para fines de estandarización, fueron purificadas y analizadas en gráficas de puntos por citometría de flujo. Los resultados muestran que más del 90% de células obtenidas fueron CD3+ (**Fig. 6**).

## VIABILIDAD EN LINFOCITOS T CULTIVADOS POR 10 DÍAS

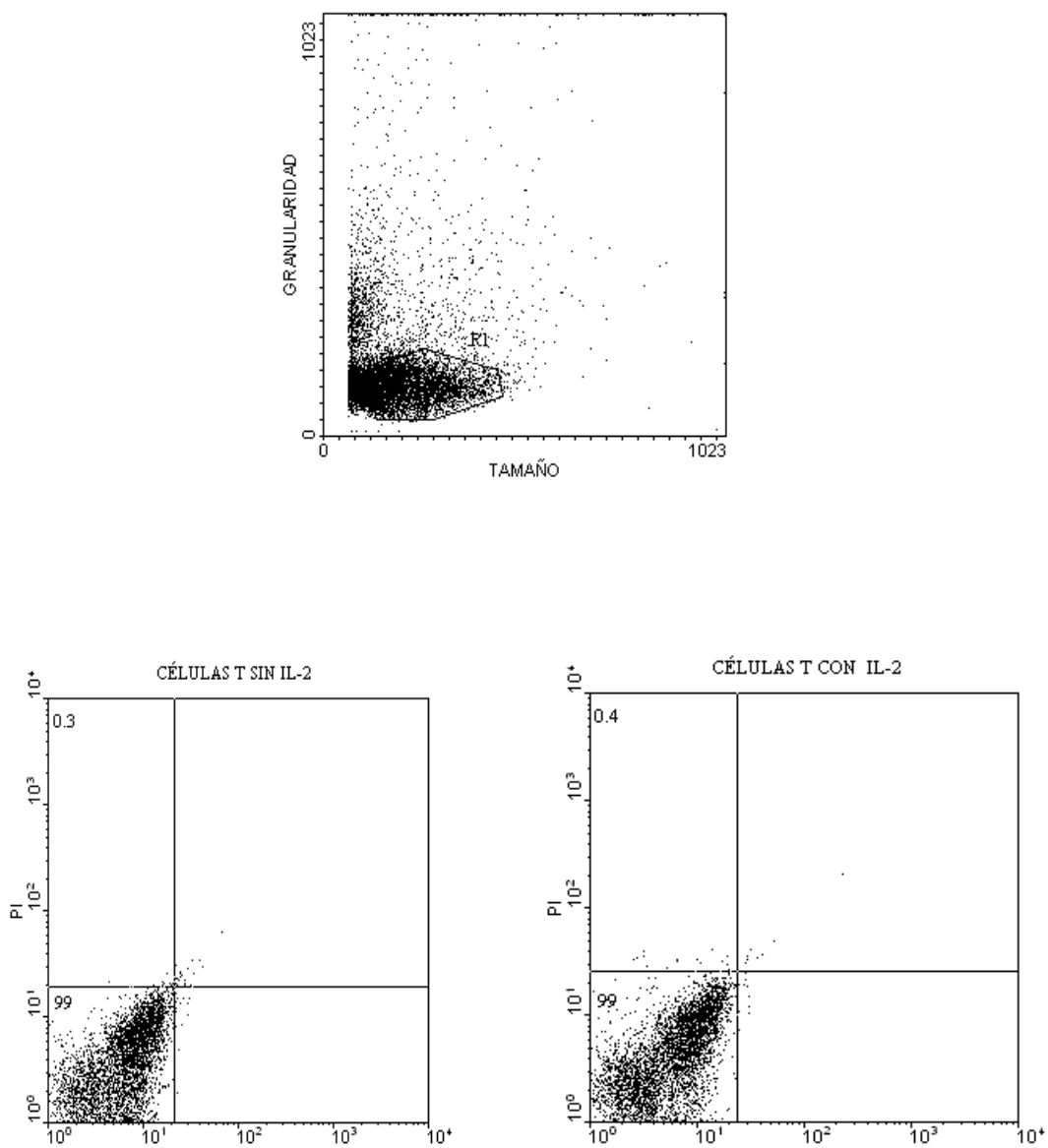
Los linfocitos T purificados fueron cultivados durante 10 días con IL-2, al cabo de ese tiempo se determinó su viabilidad con el colorante yoduro de propidio (PI) (**Fig. 7**). Las células cultivadas sin IL-2 (**Fig. 7B**) mantuvieron porcentajes de viabilidad casi iguales que los comparados con las células cultivadas con IL-2 a 10 días (**Fig. 7C**), indicando que los linfocitos pueden llegar a mantenerse viables durante este tiempo sin la presencia de una citocina con capacidad proliferativa como IL-2.

## EXPRESIÓN DE CD1a EN CÉLULAS CD3- OBTENIDAS DE CULTIVO

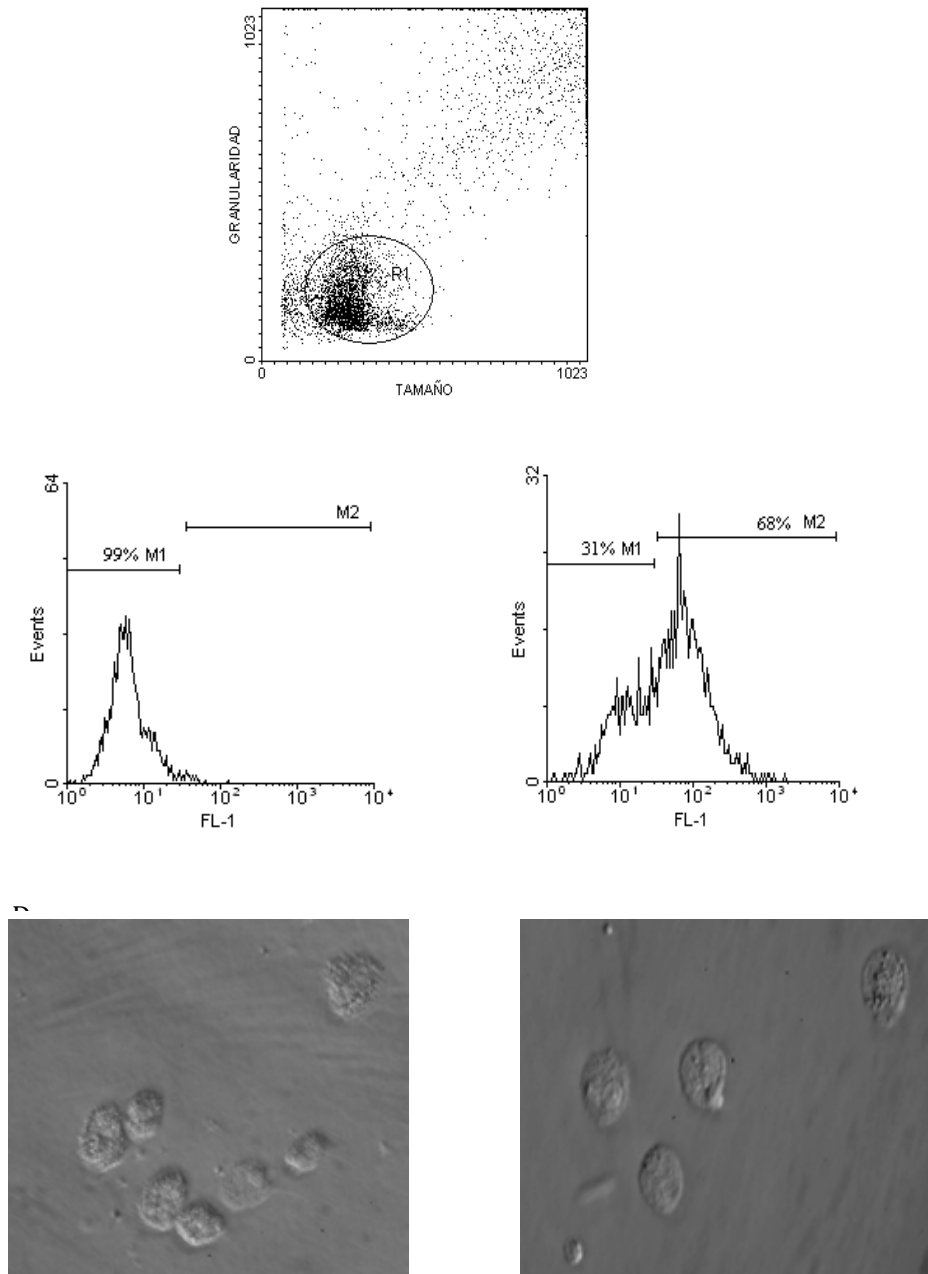
Las células CD3- correspondientes a la fracción retenida en la columna fueron recuperadas durante el procedimiento de purificación de linfocitos T CD3+ (ver material y métodos). Estas células fueron cultivadas por 5 días con IL-4 y GM-CSF para inducir la expresión de CD1a (**Fig. 8**). Los resultados fueron analizados por citometría de flujo y en el análisis del histograma mostró que el 68% de las células CD3- obtenidas de los pozos en las placa de cultivo expresaron CD1a (**Fig. 8C**). Las fotografías tomadas de células CD3- cultivadas sin citocinas y de las estimuladas para inducir la expresión de CD1a, no mostraron diferencias en su aspecto morfológico (**Fig. 8D y 8E**).



**Figura 6. Análisis de pureza de linfocitos T.** Células mononucleadas provenientes de paquete leucocitario fueron purificadas por selección negativa e incubadas con los anticuerpos anti-CD3 conjugados a PerCP-Cy5.5. **A)** Gráfica de tamaño contra granularidad donde se muestra la región de linfocitos. **B)** control de isotipo. **C)** Linfocitos T marcados con anticuerpos anti-CD3-PerCP-Cy5.5. Los números indican el porcentaje de células positivas en cada cuadrante. Los datos son representativos de tres experimentos realizados.



**Figura 7. Viabilidad en linfocitos T cultivados por 10 días.** Los linfocitos T fueron mantenidos durante 10 días en cultivo y su viabilidad se valoró con el colorante yoduro de propidio. En **B** y **C**, las células fueron marcadas con yoduro de propidio. **A)** Gráfica de tamaño contra granularidad donde se delimita la región R1 de linfocitos T. **B)** Células cultivadas sin IL-2 durante 10 días. **C)** Células cultivadas con IL-2 por 10 días. Los números indican el porcentaje de células positivas en cada cuadrante.

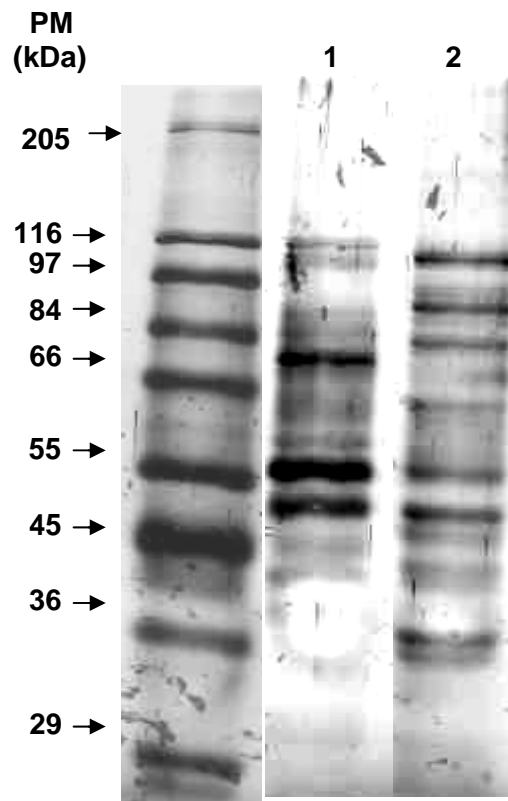


**FIGURA 8. Expresión de CD1a en células CD3- obtenidas de cultivo. A)** Gráfica de tamaño contra granularidad que muestra la región de células CD3-. **B) y C)** Células CD3- en M1 y M2: marcadores 1 y 2 presentes en las gráficas de histogramas. **B)** Control de isotipo en M1 para FL-1(FITC). **C)** Células marcadas con el anticuerpo contra CD1a conjugado a FITC, en donde M1 representa el porcentaje de expresión de células negativas al marcador y M2 representa el porcentaje de células positivas para CD1a. **D)** Células cultivadas sin IL-4 y GM-CSF. **E)** Células cultivadas con IL-4 y GM-CSF.

## PERFIL ELECTROFORÉTICO DE EXTRACTOS PROTEICOS DE *Porphyromonas gingivalis* y *Escherichia coli*

Con el fin de obtener antígeno bacteriano, para los cocultivos de linfocitos T autólogos con MDDCs CD1+, las cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Escherichia coli* (utilizada como control) se cultivaron y lisaron para obtener un extracto crudo al cual se le determinó la concentración de proteínas que fue de 0.42 mg/ml para *P. gingivalis* y de 0.44 mg/ml para *E. coli*. (ver material y métodos).

Posteriormente, para verificar que el procedimiento del lisado bacteriano fuera efectuado correctamente y tuviera un control de calidad adecuado, se realizó una electroforesis en donde se colocaron 6µg de proteína por carril de cada uno de los lisados. La **Fig. 9** muestra el resultado del corrimiento en un gel de poliacrilamina en condiciones reductoras donde observamos en el carril **1** (*P. gingivalis*) tres bandas mayoritarias que se encuentran dentro del rango de 84 y 45kDa, también se observan varias bandas minoritarias entre el rango de 116 y 36kDa. En el carril **2** (*E. coli*) se aprecian seis bandas mayoritarias entre el rango de 166 y 36 kDa, y bandas minoritarias dentro del rango de 116 y 29 kDa. El análisis del gel mostró mayor cantidad de bandas obtenidas del extracto de *E. coli*.



**Figura 9. Perfil electroforético de extractos proteicos de *P. gingivalis* y *E. coli*.** La figura muestra un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras de las proteínas obtenidas mediante un lisado de **1) *P. gingivalis***, y **2) *E. coli***. El gel se reveló mediante la técnica de tinción de plata. Como marcadores de peso molecular se utilizaron: miosina de músculo de conejo (205 Kda);  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. (116 kDa); fosforilasa b de músculo de conejo (97 kDa); fructosa-6-fostato cinasa de músculo de conejo (84 kDa); albúmina de suero bovino (66 kDa); deshidrogenasa glutámica de hígado bovino (55kDa); ovoalbúmina de huevo de pollo (45kDa), gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36kDa) y anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29kDa).



## DISCUSIÓN

En patologías de tipo crónico como cáncer colorectal, cirrosis biliar primaria, infecciones virales como HMCV, tuberculosis, o bien en pacientes con trasplante de médula ósea, se ha visto que aumenta la población de linfocitos T CD57+ (40-43,48). En estos estudios se ha sugerido que juegan un papel importante en base al tipo de citocinas producidas y por sus funciones efectoras (39,43-45,47-48). Como parte de este estudio preliminar nosotros valoramos la presencia de este marcador en linfocitos T de sangre periférica y en biopsia de tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica. Los resultados preliminares demostraron que en sangre venosa de un paciente, el 70% de los linfocitos T CD4+ expresaron CD57; este resultado coincide con los hallazgos de otros autores como Kurumagawa (63), que reportó un 74% de linfocitos T CD4+CD57+ con TCR $\alpha\beta$  en muestras obtenidas de fluido de lavado broncoalveolar en pacientes con sarcoidosis pulmonar. Sin embargo, los porcentajes obtenidos en otros estudios no han sido equivalentes con nuestro resultado, en donde estos linfocitos también obtenidos de sangre se encontraron en un promedio de 9% en pacientes con tuberculosis pulmonar (47). Por otra parte, cuando se analizó la expresión de la cadena V $\alpha$ 24 encontramos que los linfocitos TCD4+CD57+ presentaban un 15% de la cadena en comparación al 4% de los T CD4+CD57-. Este resultado posiblemente indicaría que la población de linfocitos T con la cadena V $\alpha$ 24 estaría participando de forma más activa durante la enfermedad con respecto a los linfocitos T CD4+CD57- V $\alpha$ 24, los cuales podrían corresponder a linfocitos T tipo NK con marcador CD56 (39,64). Respecto a la presencia del marcador CD57 *in-situ* en células de la biopsia, se encontró que las células positivas a CD57 no correspondían a los linfocitos T CD3+ observados en la misma zona de los cortes seriados, a diferencia de lo reportado en otras patologías como la cirrosis biliar primaria donde se ha encontrado un aumento en la población de linfocitos T CD3+CD57+ a nivel de tejido con respecto a otras

enfermedades hepáticas (42). Aunque la presencia de la población T CD57+ no se observó en nuestro estudio, es necesario aumentar el tamaño de muestra para obtener resultados que nos permitan hacer análisis y conclusiones. La familia de moléculas CD1 se caracteriza por presentar una variedad de antígenos lipídicos a los linfocitos T (12-14). En la periodontitis crónica se ha descrito la presencia de las cuatro isoformas de CD1 (CD1a, CD1b, CD1c y CD1d) (53). Nosotros en este estudio preliminar, analizamos la expresión de una de las isoformas (CD1a) *in situ*; en donde observamos la expresión del marcador en células de la zona externa del epitelio oral. Estos datos concuerdan con los hallados por Cirrincione y colaboradores en donde describen la expresión de CD1a en células de Langerhans del epitelio oral en pacientes con periodontitis crónica (65), mientras que Cutler y colaboradores reportaron en esta patología la presencia de CD1a junto con CD83 en células de Langerhans entre el límite del epitelio y el tejido conectivo (66), al igual que en las células dendríticas de la lámina propia. Estos datos sugieren que la participación de las CPAs como las células dendríticas con moléculas de CD1 reconocidas por linfocitos T, también pueden ejercer un papel importante durante el transcurso de la enfermedad periodontal.

Por otra parte se evaluó la expresión de CD1a en células CD3- mononucleadas obtenidas de paquete leucocitario. Nuestros resultados mostraron que bajo condiciones de cultivo en presencia de IL-4 y GM-CSF, el 68% de las células CD3- expresaron CD1a al quinto día de cultivo, este porcentaje es similar a lo reportado en otro estudio en donde monocitos obtenidos de sangre de individuos sanos, cultivados con IL-4 y GM-CSF, expresaron entre 66 y 69% de CD1a al tercer y séptimo día de cultivo (55). Sin embargo, en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos de sangre en pacientes con periodontitis crónica se ha reportado 90 y 95% de células CD1a+ a los 6 días de cultivo (60,20). La variación en estos porcentajes puede depender de las condiciones de cultivo establecidas en cada estudio y porque en el primer caso, las células provienen de individuos sanos,

mientras que en el segundo caso, las células se derivan de pacientes con periodontitis crónica, lo cual sugiere que la enfermedad puede ser un factor importante para la inducción de esta molécula.

Como parte de este trabajo, también se realizó el cultivo y la obtención de antígeno soluble de *P. gingivalis*. El análisis electroforético mostró un patrón de bandas proteicas no degradadas que fueron obtenidas del lisado bacteriano, las cuales presentan pesos moleculares con un rango de distribución que se puede encontrar dentro de los perfiles electroforéticos realizados con la misma bacteria en otros estudios (57). Esto es importante porque es el antígeno que se utilizará en los cocultivos de linfocitos T con MDDCs.

Aunque no se concluyó el proyecto, las estandarizaciones realizadas y los resultados preliminares hacen factible que esta tesis se lleve a cabo en un futuro inmediato.

## **Conclusión**

Los resultados preliminares sugieren que las células CD57+ podrían jugar un papel importante puesto que se encontraron infiltradas en el tejido gingival de un paciente con periodontitis crónica.

# ANEXO I

## HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA GRUPO PROBLEMA

**Investigador Responsable: Dr. Ricardo Lascurain Ledesma**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORÍAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”**  
**(INER)**  
**Teléfono: 56664539 ext: 230**

**Propósito del estudio.** Es Investigar la manera como se genera y desarrolla la respuesta inmunitaria durante la Periodontitis crónica en seres humanos, por medio del estudio de tejido y de las células de la sangre. El protocolo de investigación que tiene como objetivo lo anterior se titula “Reconocimiento antigénico de glicolípidos por linfocitos T CD57+ en pacientes con periodontitis crónica”

**Procedimiento:** Se tomará una pequeña muestra de tejido bucal correspondiente a la encía del sitio diagnosticado con la patología; previa anestesia local. Se tomará de la vena del antebrazo una muestra de sangre venosa de aproximadamente 10ml. Tanto la muestra de tejido gingival como la extracción de sangre es un procedimiento que no pone en riesgo la salud, ni la vida y no interfiere con el tratamiento. Generalmente no hay complicaciones, si llegaran a ocurrir, lo más frecuente será: en el sitio de la toma de muestra de sangre se puede presentar hematoma y dolor leve, que se resolverán en pocos días.

**Confidencialidad:** Los datos que se obtengan de este estudio serán estrictamente confidenciales y su uso sólo será para fines de este protocolo.

**Derecho a abandonar:** Queda el o la paciente en absoluta libertad para abandonar el estudio en cualquier momento que él o ella lo desee, sin que ello repercuta en la atención de su patología.

Después de ser informado(a), y no tener ninguna duda al respecto de este protocolo de investigación, autorizo toma de tejido gingival y de muestra sanguínea.

Nombre y firma del Paciente\_\_\_\_\_

Nombre y firma del tutor y/o alumno Responsable\_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo\_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo\_\_\_\_\_

Basado en las normas éticas internacionales para la investigación Biomédica con sujetos humanos, Organización Panamericana de la Salud. OPS, 1996 (OPS publicaciones científicas,563)

## ANEXO II

### HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA GRUPO CONTROL

**Investigador Responsable: Dr. Ricardo Lascurain Ledesma**  
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORÍAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”**  
**(INER)**  
**Teléfono: 56664539 ext: 230**

**Propósito del estudio.** Es Investigar la manera como se genera y desarrolla la respuesta inmunitaria durante la Periodontitis crónica en seres humanos, por medio del estudio de tejido y de las células de la sangre. El protocolo de investigación que tiene como objetivo lo anterior se titula “Reconocimiento antigénico de glicolípidos por Linfocitos T CD57+ en pacientes con Periodontitis crónica”

**Procedimiento:** Se tomará una pequeña muestra de tejido bucal correspondiente a la encía del sitio donde se realizará la extracción dental; previa colocación de anestesia. Se tomará de la vena del antebrazo una muestra de sangre venosa de aproximadamente 10 ml. Tanto la muestra de tejido gingival como la extracción de sangre es un procedimiento que no pone en riesgo la salud, ni la vida y no interfiere con el tratamiento. Generalmente no hay complicaciones; si llegaran a ocurrir, las más frecuentes serán: en el sitio de la toma de muestra de sangre se puede presentar hematoma y dolor leve, que se resolverán en pocos días.

**Beneficios:** Se realizará adicionalmente un perfil inmunológico celular de la muestra de sangre venosa obtenida, y los resultados se le darán a conocer a la persona.

**Confidencialidad:** Los datos que se obtengan de este estudio serán estrictamente confidenciales y su uso sólo será para fines de este protocolo.

**Derecho a abandonar:** Queda el o la persona en absoluta libertad para abandonar el estudio en cualquier momento que él o ella lo desee, sin que ello repercuta en la atención del procedimiento que se le realizará en la clínica.

Después de ser informado(a), y no tener ninguna duda al respecto de este protocolo de investigación, autorizo toma de tejido gingival y de muestra sanguínea.

Nombre y firma del Paciente\_\_\_\_\_

Nombre y firma del tutor y/o alumno Responsable\_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo\_\_\_\_\_

Nombre y firma del testigo\_\_\_\_\_

Basado en las normas éticas internacionales para la investigación Biomédica con sujetos humanos, Organización Panamericana de la Salud. OPS, 1996 (OPS publicaciones científicas, 563)

## ANEXO III

### Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10% con 1.0 mm de grosor en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de Sodio (SDS)

#### Gel separador

Acril (Bis) 30/08%	2.66 ml
Lower Tris(4X) pH 8.8	2.0 ml
Agua desionizada	3.34 ml
TEMED	15 $\mu$ l
Persulfato de amonio 10%	45 $\mu$ l
SDS 10%	
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10g	
Aforar con agua desionizada	100ml

#### Regulador de corrimiento

Trizma base	3.03g
Glicina	14.41g
SDS 10%	1g
Agua desionizada hasta	1L
Sin ajustar el pH	

#### Regulador de corrimiento

Trizma base	3.03g
Glicina	14.41g
SDS 10%	1g
Agua desionizada hasta	1L
Sin ajustar el pH	

#### Gel concentrador

Acril (Bis) 30/08%	0.33 ml
Upper Tris(4X) pH 6.8	0.5 ml
Agua desionizada	1.17 ml
TEMED	15 $\mu$ l
Persulfato de amonio 10%	45 $\mu$ l

Se divide en alícuotas de 1ml. Al momento de usarse se agregan 100 $\mu$ l de  $\beta$  mercaptoetanol por cada ml del regulador y unos cristales de azul de bromofenol

## BIBLIOGRAFÍA

1. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997; 14:216-248.
2. Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in United States population. *J Periodontol* 1998; 69:269-278.
3. Consensus report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Ann periodontol* 1996; 1:926-932.
4. Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003; 32: 36-49.
5. Golub L.M, Payne J.B, Reinhardt R.A, Nieman G. Can systemic diseases co-induce (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical "two-hit" model. *J Dent Res* 2006; 85:102-105.
6. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994; 65:260-267.
7. Ebersole J.L. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000*. 2003; 31:135-166.
8. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004; 34: 9-21.
9. Teng Y.-T.A. Protective and Destructive Immunity in the Periodontum: part 1-Innate and Humoral Immunity and the Periodontum. *J Dental Res* 2006; 85:198-208.
10. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2004; 34: 109-119.
11. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular Immunology*, 5th edn. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 2003.
12. Lawton AP, Kronenberg M. The Third Way: Progress on pathways of antigen processing and presentation by CD1. *Immunol Cell Biol* 2004; 82:295-306.
13. Van Rhijn I, Zajonc DM, Wilson IA, Moody DB. T-cell activation by lipopeptide antigens. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:222-229.
14. Moody DB. TLR gateways to CD1 function. *Nat Immunol*. 2006; 7:811-817.
15. De Libero G, Mori L. Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 485-496.
16. De Libero G, MacDonald HR, Dellabona P. T cell recognition of lipids: quo vadis? *Nat Immunol* 2007; 8: 223-227.



17. Gemmell E, Yamazaky K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000*. 2007; 43:14-40.
18. Kinane D. F, Lappin D. F, Kouloury O, Buckley A. Humoral immune responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune features. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:534-541.
19. Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Mast Cells in human periodontal disease. *J Dent Res* 2004; 83:384-387.
20. Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D, Banchereau J, Cutler CW. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: *in situ*, *in vivo*, and *in vitro* studies. *J Immunol* 2001.167; 8: 4693-4700.
21. Tabeta K, Yamazaki K, Hotokezaka H, Hoshie H, Hara K. Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (Hsp60) family in periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:285-293.
22. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K, Itoh H, Ueki, Oda T, Yoshie H, Seymour GJ. Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. *Infect Immun* 2002; 70:2492-2501.
23. Yamazaki K, Nakajima T. Antigen specificity and T-cell clonality in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004; 35:75-100.
24. Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83:166-189.
25. Bernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor KappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2004; 75:1586-1591.
26. Segulier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol* 2001; 72:1398-1406.
27. Hillmann G, Krause S, Ozdemir A, Dogan S, Geurtsen W, Immunohistological and morphometric analysis of inflammatory cells in rapidly progressive periodontitis and adult periodontitis. *Clin Oral Investig* 2001; 5:227-235.
28. Consensus report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Ann periodontol* 1996; 1:926-932.
29. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003; 32:24-35.
30. Noguchi K, Yanai M, Shitashige M, Nishijara T, Ishikawa I. Cyclooxygenase-2-Dependent Prostaglandin Production by peripheral Blood Monocytes Stimulated with

- Lipopolysaccharides isolated from Periodontopathogenic Bacteria. J Periodontol 2000; 71: 1575-1582.
31. Cohen N, Morisset J, Emilie D. Induction of tolerance by *Porphyromonas gingivalis* on APCs: a mechanism implicated in periodontal infection. J Dent Res 2004; 83: 429-433.
  32. 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. Infect Immun 2001; 69: 5650-5660.
  33. Yun PL, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Modulation of an interleukin-12 and gamma interferon synergistic feedback regulatory cycle of T-cell and monocyte cocultures by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in the absence or presence of cysteine proteinases. Infect Immun 2002; 70:5695-5705.
  34. Yun PL, Decarlo AA, Hunter N. Gingipains of *Porphyromonas gingivalis* modulate leukocyte adhesion molecule expression induced in human endothelial cells by ligation of CD99. Infect Immun 2006; 74:1661-1672.
  35. Yun LW, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Enhancement of Th2 pathways and direct activation of B cells by the gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. Clin Exp Immunol 2003; 134:295-302.
  36. Brando B, Civati G, Busnach G, Broggi ML, Belli LS, Brunati C, Seveso M, Sommaruga E, Minetti L. The Leu-2+7+ cell subset as a marker of immune activation in renal transplant recipients. Transplant Proc. 1987; 19 (1 Pt 2):1611-2.
  37. Warren HS. CD57. J Biol Regul Homeost Agents 2000; 14:322-323.
  38. Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K, Hiraide H, Sekine I. Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. Immunology 2001; 103: 281-290.
  39. Takayama E, Koike Y, Ohkawa T, Majima T, Fukasawa M, Shinomiya N, Yamaguchi T, Konishi M, Hiraide H, Tadakuma T. Functional and Vbeta repertoire characterization of human CD8+ T-cell subsets with natural killer cell markers, CD56+ CD57- T cells, CD56+ CD57+ T cells and CD56- CD57+ T cells. Immunology 2003; 108:211-219.
  40. Muller J, Dickmeiss E, Ryder LP, Jacobsen N and Svejgaard A. Increase frequencies of the CD29 and CD57 markers and decreased frequency of CD45RA within CD4+ and CD8+ subsets after allogeneic bone marrow transplantation in man. Scand J Immunol 1991; 33:499-506.
  41. Okada T, Iai T, Kawachi Y, Moroda T, Takii Y, Hatakeyama K, Abo T. Origin of CD57+ T cells which increase at tumour sites in patients with colorectal cancer. Clin Exp Immunol 1995; 102:159-166.
  42. Harada K, Isse K, Tsuneyama K, Ohta H, Nakayama Y. Accumulating CD57+ CD3 + natural killer T cells are related to intrahepatic bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. Liver Int 2003; 23:94-100.

43. Florian K, Khatamzas E, Surel I, Frömmel C, Reinke P, Waldrop SL, Picker LJ, Volk HD. Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2098-2915.
44. Koike Y, Seki S, Ohkawa T, Kaneko, Kogawa K, Fujitsuka S, Hiraide H, Sekine I. CD57+ T cells augment INF- $\gamma$  production in a one-way mixed lymphocyte reaction and their expansion after stem cell transplantation in pediatric patients. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:162-168.
45. Le Priol Y, Puthier D, Lécureuil C, Combadière C, Debré P, Nguyen C, Combadière B. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol* 2006; 177:5145-5154.
46. Shinomiya N, Koike Y, Koyama H, Takayama E, Habu Y, Fukasawa M, Tanuma S, Seki S. Analysis of the susceptibility of CD57 T cells to CD3-mediated apoptosis. *Clin Exp Immunol* 2005; 139:268-278.
47. Jiménez MC, Linares M, Baez R, Montaña LF, Martínez S, Gorocica P, Chávez R, Zenteno E, Lascurain R. Intracellular expresión of interleukin-4 and interferon- $\gamma$  by a *Mycobacterium Tuberculosis* antigen-stimulated CD4+CD57+ T-cell subpopulación with memory phenotype in tuberculosis patients. *Immunology* 2004; 111:100-106.
48. Sada-Ovalle I, Bouscoulet T, Valdez-Vázquez R, Martinez-Cairo S, Zenteno E, Lascurain L. Characterization of a cytotoxic CD57+ T cell subset from patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Immunol* 2006; 121:314-323.
49. Kim JR, Lim HW, Kang SG, Hillsamer P, Kim CH. Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination. *BMC Immunol* 2005; 6:3.
50. [Bricard G, Porcelli SA](#). Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64:1824-1840.
51. De Libero G, Mori L. Mechanisms of lipid-antigen generation and presentation to T cells. *Trends Immunol* 2006; 27:485-492.
52. Yamazaki K, Ohsawa Y, Yoshie H. Elevated proportion of natural killer T cells in Periodontitis lesions. *Am J of Pathol* 2001; 158:1391-1398.
53. Amanuma R, Nakajima T, Yoshie H, Yamasaky K. Increased infiltration of CD1d and natural killer T cells in periodontal disease tissues. *J Periodont Res* 2006; 41: 73-79.
54. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* 1976; 5:9-15.
55. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 2000; 1:510-514.

56. Kumagai K, Itoh K, Hinuma S, Tada M. Pretreatment of plastic Petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J Immunol Methods* 1979; 1: 17-25.
57. Murakami Y, Masuda T, Imai M, Iwami J, Nakamura H, Noguchi T, Yoshimura F. Analysis of major virulence factors in *Porphyromonas gingivalis* under various culture temperatures using specific antibodies. *Microbiol Immunol* 2004; 48:561-569.
58. Gallagher SR. One-Dimensional SDS gel Electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol* 2006; chapter 10:10.2A.1-10.2A.37.
59. Sasse J, Gallagher SR. Staining proteins in gels. *Curr Protoc Mol Biol* 2003; chapter 10:10.6.1-10.6.25.
60. Aroonrerk N, Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Wisetchang M, Sa-Ard-Iam N, Sirisinha S, Mahanonda R. Generation of gingival T cell lines/clones specific with *Porphyromonas gingivalis* pulsed dendritic cells from periodontitis patients. *J Periodont Res* 2003; 38:262-268.
61. [Nashar TO](#), [Drake JR](#). Dynamics of MHC class II-activating signals in murine resting B cells. *J Immunol* 2006; 176:827-838.
62. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, Mackay CR. T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help For B Cells. *J Immunol* 2004; 173:68-78.
63. Kurumagawa T, Seki S, Kobayashi H, koike Y, Kanoh S, Hiraide H, Motoyoshi K. Characterization of bronchoalveolar lavage T cell subsets in sarcoidosis on the basis of CD57, CD4 and CD8. *Clin Exp Immunol* 2003; 133:438-447.
64. [Godfrey DI](#), [MacDonald HR](#), [Kronenberg M](#), [Smyth MJ](#), [Van Kaer L](#). NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004; 4:231-237.
65. Cirrincione C, Pimpinelli N, Orlando L, Romagnoli P. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. *J Periodontal* 2002; 73:45-52.
66. Cutler CW, Jotwani R. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *J Dent Res* 2003; 82:736-741.