

Linfocitos T Reguladores y Periodontitis

Regulatory T Cells and Periodontal Disease

Carré L¹, Dutzan N², Lavandero S³, Gamonal J⁴

RESUMEN

La enfermedad periodontal requiere de un hospedero susceptible para su desarrollo y progresión. Dentro de las características del hospedero se encuentra la respuesta de células T reguladoras, que proveen de tolerancia frente antígenos propios, pero a la vez, participa durante las enfermedades infecciosas y tumorales como mecanismos de evasión de la respuesta inmune efectora. En infecciones virales, parasitarias y bacterianas se ha visto que los linfocitos T reguladores (Tregs) generan la persistencia de la infección en el tiempo y son responsables de muchos de los cambios patológicos de estas. Investigaciones recientes en enfermedad periodontal indican que se encuentran presentes en gran cantidad, pero su rol en la patogénesis de la enfermedad se encuentra en estudio. Esta revisión muestra los resultados de los estudios publicados en el área de periodoncia, que señalan una posible asociación entre los Tregs y la infección periodontal.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 2(2); 86-90, 2009.

Palabras clave: L Linfocitos T reguladores, periodontitis, tolerancia.

ABSTRACT

Periodontal disease requires a susceptible host for its development and progression. One of the characteristics of the host is the regulatory response that give tolerance against own antigens, but at the same time, is used during infectious and tumoral diseases as a mechanism of evasion of the immune response. In viral, parasitic and bacterial infections regulatory T cells (Tregs) cause persistence of the infection, and they are responsible of many of the pathologic changes. Recent investigations in periodontal disease show that Tregs are present in a great quantity, but its role is in current study. This review shows the results of published studies in periodontics that lead to a possible association between Tregs and periodontal infection.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 2(2); 86-90, 2009.

Key words: Regulatory T cells, periodontal disease, tolerance.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad de etiología infecciosa y de naturaleza inflamatoria que afecta a los tejidos de inserción del diente, involucrando la destrucción del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, la cual se manifiesta clínicamente con la formación de sacos periodontales y pérdida de inserción de los tejidos periodontales^(1,2). Para el desarrollo de la periodontitis necesitamos no solo de patógenos periodontales específicos sino también de un hospedero susceptible⁽²⁾.

Los periodontopatógenos son los agentes etiológicos de la enfermedad periodontal, sin embargo, un importante determinante de la progresión y desarrollo de la enfermedad es la respuesta inmune del hospedero⁽³⁾, es decir, la naturaleza de la respuesta inflamatoria influye en el carácter destructivo de la enfermedad⁽⁴⁾.

Se han propuesto muchos modelos que intenten explicar la patogénesis de la enfermedad que concuerde con la histología presente abundante en linfocitos⁽⁴⁾, entre ellas el balance entre las respuestas autoinmunes y los mecanismos regulatorios⁽³⁾. Los linfocitos T reguladores (Tregs) migran y se acumulan a nivel de tejidos inflamados, como en los tejidos gingivales en periodontitis donde existe un infiltrado inflamatorio⁽⁵⁾.

Existe una pequeña cantidad de estudios que investigan la presencia Tregs y su relación con enfermedades periodontales⁽³⁻⁶⁾. Estos han analizado en un número reducido de pacientes con periodontitis crónica, muestras de sangre periférica y biopsias de tejido gingival, analizándolas mediante citometría de flujo, reacción de la cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) e inmunohistoquímica.

Se ha observado que existe un patrón diferencial tanto a nivel de células como de citoquinas (IL-10, TGF- β) entre la periodontitis crónica

y agresiva, con resultados disímiles⁽⁷⁻⁹⁾, no existiendo aún información acerca de la presencia de Tregs en periodontitis agresiva. De lo cual se desprende que esta es un área del conocimiento que aún está en desarrollo, tanto en los métodos más adecuado para su detección así como las implicancias de su posible acción en la patogénesis de la periodontitis.

En la presente revisión, se muestran los resultados de los estudios publicados en el área de periodoncia, que apuntan a una posible asociación entre la respuesta inmune generada por los Tregs y la infección periodontal.

Tregs Y SU FUNCIÓN

El sistema inmune tiene el potencial de destruir a los microorganismos invasores, controlar el crecimiento de células tumorales y proveer de una auto-tolerancia⁽¹⁰⁾, con estrategias centrales y periféricas⁽¹¹⁾.

En los años ochenta se propuso la existencia de una célula T supresora que restringe la inducción o expresión de las células efectoras, para prevenir y controlar la respuesta inmune dañina y el desarrollo de enfermedades autoinmunes, la que se denomina actualmente linfocito T regulador.⁽¹⁰⁾

Durante las infecciones, un control estricto de la respuesta inmune debe estar presente, protegiendo al huésped a través de mecanismos que reconozcan y eliminen los invasores, y minimicen el daño colateral en los tejidos que podría causarse por una respuesta exacerbada. El control del daño está a cargo de los Tregs naturales (nTregs) y adaptativos (iTregs)⁽¹⁰⁾.

1. Cirujano-Dentista, Alumna Magister en Cs. Odontológicas mención Periodontología, Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

2. Cirujano-Dentista, Magister en Cs. Odontológicas mención Periodontología, Profesor asistente Área de Periodoncia, Laboratorio de Biología Periodontal, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

3. Químico Farmacéutico, Doctor en Bioquímica, Profesor Titular, Centro de Estudios Moleculares de la Célula, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Chile.

4. Cirujano-Dentista, Especialista en Periodoncia, Magister y Doctor en Cs. Odontológicas, Director del Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

Los Tregs son cruciales en el control de las enfermedades autoinmunes y la mantención de la homeostasis inmunológica y la tolerancia a lo propio^(10,12) tanto en estados fisiológicos como el embarazo⁽¹²⁾ y patológicos como la presencia de tumores⁽¹³⁻¹⁷⁾ e infecciones⁽¹⁸⁻²⁰⁾, lo cual ha sido demostrado *in vitro* e *in vivo*. Experimentalmente se ha publicado que constituyen el 1-3%⁽¹²⁾ ó 5 - 15% de los linfocitos T CD4⁺ circulantes en sangre periférica⁽²¹⁾.

Además, se ha establecido que distintos tipos celulares son capaces de realizar actividades regulatorias, como las células CD4⁺ secretoras de IL-10 (Tr1), células Th3 CD4⁺ secretoras de TGF- β , células NKT, células CD8⁺CD28-Foxp3⁺, células γ/δ TCR⁺ y células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (nTregs)⁽¹⁰⁾.

GENERACIÓN DE Treg NATURALES

Los nTregs son células T *helper* (CD4⁺) que se desarrollan y maduran en el timo por selección negativa^(11,22), ejercen su función regulatoria durante la vigilancia de los auto-antígenos, sin embargo, se propone su participación en enfermedades infecciosas⁽¹⁰⁾. En sujetos sanos, representan el 5 a 10% de la población de los linfocitos T CD4⁺ periféricos, se caracterizan por la expresión constitutiva de altos niveles del receptor de IL-2 ó CD25 independiente de su estado de activación y bajos de CD45RB (CD4⁺ CD25^{alto} CD45RB^{bajo})⁽¹⁰⁾.

Existen otras moléculas asociadas con nTregs, sin ser exclusivas, como el antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CD152 ó CTLA-4), CD103 ($\alpha\epsilon$ -integrina) y dos miembros de la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral TNF CD134 (OX40; TNFRSF4) y GITR (proteína similar al receptor de TNF inducida por glucocorticoides; TNFRSF18)⁽¹⁰⁾.

Se propone que la generación de nTregs en el timo ocurre al entrar en contacto el receptor del linfocito T (TCR) del timocito con MHC-péptido propio transcrito por el células que expresan AIRE (factor de transcripción regulador auto inmune) en el contexto de moléculas de co-estimulación B7- 1/B7-2, lo que determina la expresión del receptor del factor de transcripción NF κ B (RANK) y, lo cual permite que se exprese el factor de transcripción Foxp3⁽¹¹⁾.

Foxp3, miembro de los factores de transcripción "forkhead", se considera regulador maestro del programa de los Tregs, siendo esencial para su desarrollo y función⁽²²⁾. La forma en que Foxp3 expresa y promueve el fenotipo regulatorio es escasamente comprendida⁽²²⁾. Se ha determinado que timocitos pueden diferenciarse en precursores tipo-Treg Foxp3⁺, resultando en la sobrevivencia, estabilización y mantención de estas células pero sin la propiedad supresiva⁽²³⁾.

El TGF- β en acción conjunta con IL-2 juegan un rol protagónico en la activación, maduración, expansión y función efectora, mediante la activación de Foxp3. IL-2 por sí sola no es capaz de generar activación de Foxp3 y el TGF- β por sí solo no puede generar multiplicación. TGF- β tiene un rol positivo en la generación, función y sobrevivencia de los linfocitos reguladores aunque no es requerido para la generación de estas células *in vivo* a nivel del timo, pero sí en los Tregs periféricos⁽²⁴⁾.

La formación de linfocitos T reguladores se ha postulado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que ocurre por la presencia de INF- γ y TGF- β ^(21,24). La falta de INF γ reduce la función y frecuencia de Tregs en un modelo murino de encefalitis independiente de la co-estimulación de otras citoquinas o TCR⁽²¹⁾.

GENERACIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES PERIFÉRICOS (iTregs)

Los iTregs se desarrollan fuera del timo por múltiples mecanismos, en estos podemos incluir ignorancia, anergia, derivación Th1/Th2 e inmunosupresión activa. Los factores críticos *in vitro* de la generación periférica son la presencia de células dendríticas(DCs) inmaduras y la presencia de IL-10 y/o TGF- β durante la activación de linfocitos T vírgenes, sin requerir de co-estimulación para su desarrollo y función⁽¹⁰⁾.

Estos Tregs son células T CD4⁺ CD25⁻ periféricas vírgenes que adquieren su actividad regulatoria durante su activación, con expresión variable de CD25. *In vitro*, poseen limitada proliferación y requieren estimulación vía TCR para inducir sus funciones regulatorias. Los iTregs incluyen a células Tr1, Th3 y que expresen Foxp3, ejercen su función a través de la secreción de las citoquinas, IL-10 y/o TGF- β , sin estar claro aún si es antígeno específico⁽¹⁰⁾.

MECANISMOS EFECTORES DE Treg

Los Tregs son capaces de suprimir la proliferación y/o la producción de citoquinas por células T efectoras mediante múltiples mecanismos de acción⁽¹⁾ afectando a células T CD4⁺ y T citotóxicas (CD8⁺)⁽¹⁸⁾. Los nTregs podrían actuar directamente en las interacciones célula-célula con las células presentadoras de antígenos y células T efectoras, según estudios *in vitro*, en cambio, las citoquinas IL-10 y/o TGF- β son importantes *in vivo* para la acción de nTregs e iTregs⁽¹⁰⁾.

La modulación de DCs mediante Tregs es a nivel de maduración y función; previene que las DCs inmaduras se vuelvan inmunogénicas, sintetizando grandes cantidades de IL-10 y expresando bajos niveles de CD80, CD83, CD86. Otro mecanismo, es la expresión de CTLA-4 que induce a las células presentadoras de antígeno a expresar la enzima IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa), que degrada al triptófano, aminoácido esencial para la activación de células T, promoviendo su apoptosis⁽¹⁰⁾.

Se propone una posible función citotóxica, por su capacidad de liberar perforinas y granzima B en cultivo⁽¹⁸⁾. Se ha propuesto que existiría un efecto directo de nTreg en la producción de INF- γ o de la expresión de PD-1 o molécula de muerte programada que mandaría una señal a las células con las que toma contacto⁽¹⁸⁾. Las citoquinas cruciales en el control de la inflamación son IL-10 y TGF- β , cada una con su respectiva función⁽¹⁰⁾.

TGF- β se enfoca directamente en las células T y DCs para asegurar la tolerancia a los antígenos propios. Los Tregs poseen TGF- β unidos a su superficie, sin embargo, la supresión célula-célula es dependiente del TGF- β soluble⁽¹⁰⁾.

Los Tregs son los principales productores de IL-10 que regula la interfase entre la inmunidad innata y adaptativa, limitando la magnitud de la respuesta inmune en respuesta a los antígenos microbianos. También limita la producción de citoquinas inflamatorias e inhibe la expresión de moléculas MHC-II y moléculas co-estimuladoras en DCs. Se ha demostrado que ratones deficientes de IL-10 muestran una mayor activación de células T y una severa inmunopatología luego de una infección⁽¹⁰⁾.

El papel de la IL-10 es muy importante en la presentación antigénica por parte de los tejidos alterados por infección o cáncer⁽²⁵⁾. Por ejemplo, con respecto a las células tumorales esta citoquina disminuye la expresión de MHC clase I en cáncer mamario⁽²⁶⁾ y *down-* regula los MHC tipo I y II y la molécula de adhesión intercelular tipo I (ICAM-1) en melanomas⁽²⁷⁾. En infecciones existe el mismo efecto, el virus Epstein Barr (EBV) induce la producción de IL-10 que *down-*regula TAP-1 en los linfocitos B⁽²⁸⁾, al igual que inhibe MHC-I, ICAM-1 y B7 en linfocitos humanos⁽²⁹⁾. La *Clamidia pneumonia* induce la expresión de IL-10 y disminuye la expresión de MHC-I⁽³⁰⁾.

Debido a que los nTregs expresan constitutivamente CD25, se ha sugerido que la IL-2 podría tener algún rol en la actividad reguladora de los Tregs, pero eso es aún controversial ya que ratones con Tregs con delección de su gen son capaces de suprimir la proliferación de células T *in vitro*. Otras moléculas con posible contribución en la acción supresora de los Tregs son cAMP, desacetilasa histona/proteína (HPDA) 7 y 9, hemo-oxigenasa 1, galectinas, IL-9 e IL-35⁽¹⁰⁾.

Tregs E INFECCIONES

Recientemente se ha discutido si la acción de los Tregs es protectora frente a una respuesta inflamatoria exagerada o causa mayor daño al permitir la persistencia microbiana disminuyendo la respuesta inmune, además, se ha observado que pueden interferir con la magnitud y duración de algunas vacunas⁽¹⁸⁾.

Existen mecanismos de microorganismos y parásitos invasores que utilizan los mecanismos de tolerancia a lo propio como formas de evadir la respuesta inmune y de causar daño al hospedero. Durante la infección microbiana pueden existir cambios en la identidad molecular y reacción cruzada con antígenos microbianos, la alteración de moléculas propias producto de la infección, la inducción de expresión de HLA y co-estimuladores en forma desregulada y la activación policlonal de linfocitos⁽¹⁰⁾.

Existe abundante evidencia acerca de la capacidad de los Tregs para inhibir la función de las células T efectoras en los sitios de infección, con diferentes agentes microbianos, no pudiendo descartar su posible función en la mayoría de las infecciones ocasionando la persistencia de la infección⁽¹⁸⁾.

La especificidad de los iTregs se asocia con antígenos microbianos, la naturaleza de los antígenos reconocidos por los nTregs durante una infección aguda es contra auto-antígenos liberados por el

tejido dañado, mientras que en las infecciones crónicas son capaces de reconocer también antígenos microbianos⁽¹⁰⁾.

En el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha demostrado que en etapas iniciales los Tregs contribuirían a la replicación viral, debido por supresión de la proliferación celular de células T CD4+ y CD8+ en respuesta a los antígenos del VIH, pero existe una disminución progresiva de Tregs en sangre periférica y aumento en los tejidos linfoides. En pacientes afectados con el virus de la hepatitis B y C, virus linfotrópico tipo 1 y citomegalovirus, los Tregs contribuirían a los cambios patológicos⁽¹⁰⁾.

Los Tregs están presentes en todas las infecciones parasitarias investigadas a la fecha, donde estos patógenos se benefician de la tolerancia generada para sobrevivir sin causar mayores daños al hospedero y así transmitirse a otros. Esto se confirmaría con el hecho de que nTregs se acumulan, producen grandes cantidades de IL-10 y/o TGF- β y persisten en el sitio de la infección evitando que células inmunes efectoras sean capaces de eliminar el parásito, como en el caso de *Plasmodium falciparum*, *Leishmania viannia braziliensis*. Lo mismo ocurre en infecciones fúngicas con *paracoccidioidomycosis*, donde se ha encontrado mayor frecuencia y actividad supresora de nTregs en sangre periférica⁽¹⁸⁾.

En una infección bacteriana crónica como la tuberculosis, se ha observado aumento de nTregs en sangre periférica y en el sitio de infección activa. En el líquido pleural y en sangre, este aumento de frecuencia se correlaciona con la cantidad IL-10 y la síntesis de TGF- β inducida por el *Mycobacterium tuberculosis*, sugiriendo que los Tregs suprimen la respuesta inmune contra el agente infeccioso permitiendo la persistencia de este en humanos⁽¹⁰⁾.

Los Tregs aislados de los pacientes infectados crónicamente con *Helicobacter pilory*, fueron capaces de suprimir las células T CD4+ específicas para esta bacteria pero no la respuesta a antígenos no relacionados, sugiriendo el control de los Tregs en este tipo de infección en forma antígeno específica⁽¹⁰⁾.

En la gran mayoría de los estudios, al depletar la población de Tregs se ha visto respuestas inmunes de mayor magnitud, sin saber exactamente el mecanismo. En que condiciones se genera la inducción de Treg y su participación en la inmunidad contra microbios es muy discutido aun, existiendo muchas teorías. Una de ellas incluye la posibilidad de la activación de los receptores tipo toll (TLR) en forma inespecífica por los patógenos y otra que sea antígeno específico⁽¹⁸⁾.

Tregs Y ENFERMEDAD PERIODONTAL

En el año 2005, Ito y cols⁽⁴⁾ estudiaron la expresión génica de los linfocitos T CD4 encontrando patrones simultáneos de expresión para respuesta del tipo Th1, Th2 y regulatoria en muestras tejidos gingivales y sangre periférica de pacientes con periodontitis crónica. Fueron los primeros en aislar y clonar células CD4+ que expresen simultáneamente CD25+ ó CTLA-4 provenientes de tejido gingivales, utilizando citometría de flujo, concluyendo que existe presencia de Tregs en periodontitis crónica. Además determinan la presencia de Foxp3 en tejido gingival, mediante PCR.

También durante el año 2005, Nakajima y cols⁽³⁾ propusieron que los Tregs juegan un rol importante en presencia de inflamación en las gingivitis y periodontitis crónica. Mediante inmunohistoquímica de biopsias determinaron que en periodontitis crónica, su cantidad está aumentada en relación con gingivitis sin presentar un patrón de distribución, además de una mayor cantidad de linfocitos B, y más aun en las cercanías del tejido conjuntivo al diente. También se estudió la expresión génica de Foxp3, TGF- β e IL-10, encontrando mayores niveles y una correlación positiva entre ellos, en periodontitis crónica. La desventaja de este estudio es que carece de sujetos controles y cuantifica en forma semi-cuantitativa la expresión de los marcadores de superficie por lo tanto sus resultados deben ser tomados con precaución y como un inicio de esta área de investigación.

Posteriormente, Okui et al (2008)⁽⁵⁾ caracterizaron los clones de células T CD4+ Foxp3+ tomados a partir de lesiones inflamatorias crónicas en pacientes con periodontitis crónica. En esta investigación se confirmó la presencia de Foxp3 con inmunohistoquímica, encontrando su expresión en algunas células CD4+ y CD25+ pero no en CD8+. Los clones fueron obtenidos de 3 pacientes con periodontitis avanzada mediante separación con esferas magnéticas, presentan características diferentes a las células obtenidas directamente de tejidos y de sangre, mostrando una mayor expresión de CD25+ y una menor expresión de

Foxp3, a pesar de la estimulación realizada en su cultivo. De manera, que los Tregs infiltrantes poseen una alta capacidad efectora por su alta expresión de Foxp3, la cual es mayor que la que presentan los Tregs de sangre periférica que no han sido reclutados ni estimulados mediante TCR aún por un tejido inflamado e infectado, por lo tanto, son funcionalmente diferentes.

En el estudio de Cardoso et al (2008)⁽⁶⁾ se caracterizaron los nTregs en el infiltrado inflamatorio de pacientes con periodontitis crónica, mediante su factor de transcripción, marcadores de superficie, citoquinas y quimioquinas. Las células CD3+ (Linfocitos T) se encuentran en cantidades significativamente mayores en enfermos que en sanos, en cambio, los Linfocitos B (CD19+), macrófagos (CD14+) y DCs(CD11c) no se observó ninguna diferencia relevante entre encía sana y con periodontitis crónica evaluado mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo. La presencia de células CD4+CD25+ es mucho mayor en periodontitis, evaluado mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia. Se evaluó el fenotipo de los nTregs de sacos periodontales, encontrándose que la mayoría son efectores ya que expresan Foxp3, CTLA-4, GITR, CD45RO y CD103; y a la vez existen células CD4+CD25- que también los expresan pero en menor cantidad; de manera que existe mayor cantidad de nTregs que iTregs en las lesiones periodontales.

La investigación acerca de los Tregs ha estado enfocada hacia su generación y funcionamiento, sin embargo, existen pocos estudios del reclutamiento a nivel de tejidos periféricos o *homing* de estos. Debido a que estos linfocitos son capaces de inhibir la imprimería y la fase efectora de la respuesta inmune, la supresión puede ocurrir en los tejidos linfoides y en los sitios periféricos durante las reacciones inmunes⁽³¹⁾.

Los Tregs migran usualmente atraídos por las quimioquinas CCL1, CCL17 y CCL22, ya que expresan los receptores CCR4 y CCR8⁽³¹⁻³³⁾. Cardoso et al(2008)⁽⁶⁾ confirmaron que en biopsias de saco periodontal hay un aumento significativo de estas 5 moléculas comparado con un control sano, y que por lo tanto, existe un *homing* de Tregs hacia estos sitios. Mediante inmunohistoquímica, pudieron determinar que CCL17 está principalmente asociado con epitelio, células endoteliales, fibroblastos y linfocitos, mientras que CCL22 aparentemente es producido por células con morfología compatible con grandes leucocitos como los histocitos.

Garlet et al (2003)⁽⁷⁾, mediante la técnica de RT-PCR caracterizaron los patrones de citoquinas, quimioquinas y sus receptores en periodontitis crónica y agresiva. En periodontitis agresiva hay mayor expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α o CCL3) y de la proteína inducible por interferón gama (IP-10 o CXCL10), y de sus respectivos receptores CCR5 y CXCR3; junto con una mayor presencia de INF- γ y una menor expresión de IL-10 que en periodontitis crónica. En periodontitis crónica se observa una mayor expresión de la proteína quimio-atrayente de monocitos (MCP-1 o CCL2) y su receptor CCR4. Esto lleva a la hipótesis que la localización apropiada es indispensable para la función de los Tregs *in vivo* y su comportamiento migratorio de sus subtipos influencia su capacidad supresora⁽³¹⁾.

De lo anterior se deduce que en periodontitis crónica podría existir mayor *homing* de Tregs, debido a la mayor expresión de CCR4 que también tiene como ligando CCL22, lo cual estaría en concordancia con los resultados encontrados por Cardoso et al (2008)⁽⁶⁾. Además se observa una mayor cantidad de IL-10⁽⁷⁾ citoquina clave en la acción supresora de Tregs.

Cardoso et al (2008)⁽⁶⁾ evaluaron la expresión de las citoquinas supresoras, IL-10, TGF- β , y Foxp3 mediante RT-PCR en periodontitis crónica, en biopsias de tejidos sanos y enfermos, demostrando que los pacientes tienen un aumento significativo de todas las moléculas analizadas en comparación con los controles. De manera que proponen que la respuesta de los tejidos en periodontitis crónica es determinado por moléculas relacionadas con los Tregs y podrían estar mediando a latencia y/o inflamación multifactorial en estos pacientes.

Finalmente, para verificar que los leucocitos que expresan CD25 son de hecho células regulatorias, Cardoso et al realizaron microscopía confocal en biopsias de tejido gingival, visualizando la co-expresión de CD25/ Foxp3 y CD25/ TGF- β . Experimentalmente se han aplicado varias técnicas de laboratorio, sin embargo, aún no se ha propuesto un protocolo universalmente aceptado para detectar y tipificar Tregs en muestras de sangre periférica y biopsias, en enfermedades periodontales, por lo que este estudio nos muestra diferentes enfoques para buscar a los Tregs en estos casos⁽⁶⁾.

Suarez y cols (2004)⁽⁸⁾ estudiaron las proporciones de las células T y citoquinas que median y regulan la respuesta inmune en pacientes con periodontitis agresiva comparándolos con individuos sanos. Encontrando que existe una menor cantidad de células CD3+ en el total

de células mononucleares, y que dentro de estas existen más CD8+ que CD4+ en periodontitis agresiva. Además de una cantidad similar entre ambos grupos de IL-2 e INF- β por lo que no serían de importancia en la patogénesis de la enfermedad. Se observó una mayor presencia de IL-5, 10, 13 y TGF- β en los sanos por lo que podrían considerarse citoquinas protectoras y que el rol de las células citotóxicas sería limitado. Estos autores resaltan el rol de la IL-10 en el balance entre salud y periodontitis agresiva, ya que su presencia generaría la mantención de la salud gingival al inhibir la respuesta Th1, disminuir IL-1, TNF- α e IL6, reducir los metabolitos tóxicos y aumentar la producción de IL-1ra.

La presencia de polimorfismos de TGF- β fue investigado por Atila *et al* (2006)⁽⁹⁾, determinando que existen leves diferencias en el genotipo +915C entre la periodontitis crónica y el grupo control encontrando una correlación con una mayor severidad de la enfermedad, pero no se observan diferencias para periodontitis agresiva.

Por otra parte, Gürkan y cols (2006)⁽³⁴⁾ observaron que existe un aumento en la presencia de TGF- β en el fluido crevicular de pacientes con periodontitis crónica y agresiva en comparación con pacientes sanos. En cambio, al analizar la concentración de TGF- β es menor en periodontitis agresiva, luego en periodontitis crónica, y luego en gingivitis, por el contrario los sanos presentan una menor cantidad total pero una mayor concentración en el fluido. Además, indican que existe una correlación entre la concentración de esta citoquina y parámetros clínicos, por lo que se deduce que a mayor concentración TGF- β mejores parámetros clínicos.

Por lo tanto, existe un patrón diferencial tanto a nivel de células como de citoquinas entre ambos tipos de periodontitis con resultados disímiles, por lo que sería interesante estudiar el balance entre regulación mediante Tregs y los procesos pro-inflamatorios de la respuesta Th17.

ANTAGONISMO ENTRE Treg Y CÉLULAS Th17

Las células Th17 tienen acción altamente inflamatoria, se sugiere que promueven autoinmunidad tejido específica y son responsables de la inducción de la destrucción ósea y cartilaginosa. La presencia de IL-23 las estimula a diferenciarse, y estas a su vez producen IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-21. En resumen, todos los datos experimentales corroboran a importancia de los linfocitos Th17 en la inducción de la inflamación autoinmune de los tejidos⁽³⁵⁾.

Aunque los Tregs y células Th17 efectoras juegan diferentes roles, al menos *in vitro*, durante la patogénesis de las infecciones, se han demostrado vías recíprocas para su generación. En ausencia de injurias el TFG- β producido en el sistema inmune suprime la acción de las células T efectoras e induce a los Tregs, las células T vírgenes expuestas a TGF- β up-regulan Foxp3 y se transforman en Tregs, manteniendo la tolerancia a lo propio. Sin embargo, en presencia de inflamación o infección o cuando se cultivan células T con TGF- β e IL-6, se generan células Th17 con actividad patogénica y disminuye la generación de Tregs. Los iTregs y Th17 podrían provenir de un mismo precursor y su diferenciación selectiva dependería del microambiente de citoquinas⁽¹⁰⁾.

Las células Th17 no son afectadas por la acción supresora directa de los Tregs, sin embargo, el cambio en el nivel de citoquinas generados por los Tregs es suficiente para disminuir su vida media y su rápido agotamiento. Por lo tanto existe un antagonismo funcional entre las células Th17 y Tregs en el control de la auto-inmunidad, tanto en su generación y función efectora⁽³⁵⁾.

El potencial terapéutico de este balance podría ser explorado por la inmunoterapia basada en citoquinas y en células. Actualmente, la mayoría de las terapias anti-inflamatorias que involucran estrategias anti-citoquinas han buscado del balance IL-23/Th17⁽¹⁰⁾.

El potencial terapéutico de los Tregs ha generado mucha expectación y hay muchas publicaciones acerca de modelos experimentales posibles, incluyendo *in vitro* e *in vivo* en ratas. Se ha comprobado que los Tregs pueden suprimir la diabetes autoinmune en forma dependiente de TGF- β , que alteran el curso del lupus, previenen el rechazo de órganos trasplantados, un modelo de terapia combinada se enfoca a inducir tolerancia y restaurar la función de las células β pancreáticas durante la diabetes tipo 1 en ratas, pero es necesario un mejor entendimiento de la fisiología de los Tregs para buscar su aplicación terapéutica en humanos⁽¹⁰⁾.

Experimentalmente, el balance entre las células Th17 y los Tregs ha sido estudiado por Oukka (2007)⁽³⁵⁾ durante la encefalomiélitis autoinmune, un modelo animal para la esclerosis múltiple. Durante este

estudio se desarrolló un ratón con mutación para gen de Foxp3 y la glicoproteína mielina de los oligodendrocitos presentada MHC clase II para activar en forma antígeno-específica a los linfocitos T. Al ser inmunizados los ratones, al comienzo de la enfermedad se observó un aumento de células T efectoras específicas para esta proteína a nivel del sistema nervioso central, pero al ir en remisión persiste una población de Tregs altamente supresivos, logrando el control de la respuesta autoinmune.

DISCUSIÓN

La generación tanto de nTregs como de iTregs, está bastante dilucidada, en cuanto a las señales generadas⁽¹⁰⁾, la importancia de Foxp3 como regulador maestro del programa⁽²²⁾, la necesidad de citoquinas como IL-2, TGF- β y/o INF- γ ^(21,24) para la formación, multiplicación, sobrevivencia y función.

Existen distintos tipos celulares que son capaces de realizar actividades regulatorias⁽¹⁰⁾, de lo que se deduce que se deben considerar para la investigación tanto marcadores propios de los tipos celulares, como nTregs e iTregs, como sus quimioquinas y citoquinas que determinan su reclutamiento y actividad funcional.

Dentro de los múltiples mecanismos efectores de los Tregs, podríamos darle un papel importante, en la evasión de la respuesta inmune por parte de los microorganismos, a la acción en la modulación de DCs ya que evitan que estas se vuelvan inmunogénicas⁽¹⁰⁾ y se monte una respuesta frente a antígenos microbianos específicos⁽¹⁸⁾.

En infecciones virales, bacterianas, fungicas y parasitarias^(10,18) se ha observado una acumulación de Tregs en el sitio de la infección, relación con la carga microbiana y los cambios patológicos durante la enfermedad. Todo esto se correlaciona con un aumento de las citoquinas cruciales en el control de la inflamación IL-10 y TGF- β ⁽¹⁰⁾, previniendo que las células efectoras T CD4+ sean capaces de eliminar al patógeno⁽¹⁸⁾ y quizás de esta manera exista evasión de la respuesta inmune por exceso de regulación por parte de los Tregs.

El exceso de control del sistema inmune por parte de Tregs puede impedir el control efectivo de la infección, con lo cual se causaría más daño al hospedero. Por ejemplo, pacientes con hepatitis sufren de lesiones crónicas donde se observan Treg y una reducción de la función de linfocitos CD8+ y CD4+⁽¹⁸⁾.

El balance entre disminuir el daño colateral de la respuesta inmune frente a la infección y la perpetuación de esta en el tiempo⁽¹⁰⁾ es controversial y podría tener influencia en la presentación clínica e histológica de la periodontitis⁽³⁻⁶⁾.

Los estudios de Tregs en periodontitis comenzaron el año 2005, con descripciones de la presencia de nTregs⁽³⁾, posteriormente se ha enfocado la investigación hacia la presencia de Foxp3, citoquinas⁽⁴⁻⁶⁾ y quimioquinas⁽⁶⁾ asociados a ambos tipos de Tregs, y por ende a la respuesta regulatoria global. Todos estos estudios demuestran una gran presencia y expresión de citoquinas en periodontitis crónica, ya sea comparado con sujetos sanos o con gingivitis.

Existe un patrón diferencial de células y citoquinas (IL-10, TGF- β) entre ambos tipos de periodontitis con resultados disímiles⁽⁷⁻⁹⁾, no existiendo aún información acerca de la presencia de Tregs en periodontitis agresiva. Se puede deducir que en periodontitis agresiva hay una importante disminución de IL-10(8) y TGF- β ⁽³⁴⁾, sin cambios en citoquinas pro-inflamatorias como INF- γ ⁽⁸⁾, lo cual se ha correlacionado con una enfermedad más severa⁽³⁴⁾. Por lo tanto, podemos inferir que la alteración de la homeostasis entre regulación e inflamación está dada más por una disminución de la supresión más que por un aumento de la inflamación.

Además, no debemos olvidar que TGF- β tiene acción sobre los fibroblastos presentes en el tejido conectivo periodontal, aumentando la formación de colágeno, con correlación positiva entre la cantidad de fibras colágenas y su presencia⁽³⁶⁾. De manera que no solamente afecta a la respuesta efectora con esta citoquina sino que limita el daño estructural de este promoviendo la cicatrización⁽³⁶⁾.

La contraparte de la regulación por parte de los Tregs es la respuesta Th17, con un antagonismo funcional en el control de la auto-inmunidad, su generación y función efectora⁽³⁵⁾, información acerca de este balance en periodontitis aún no ha sido investigado. Sin embargo, la respuesta Th17 se ha visto exacerbada en periodontitis tanto en fluido gingival

crevicular, sobrenadante de cultivos de tejidos⁽³⁷⁾, y tejido pe-riodontal^(38,39).

Sería posible que una población pequeña pero funcional de células Th17 sean suficientes para inducir el quiebre en la homeostasis de tejidos, perpetuación del proceso inflamatorio, lesiones de reabsorción ósea y pérdida dentaria^(37,38). Se propone que se necesitan mayores estudios acerca de la regulación recíproca Treg/Th17 en la pato-fisiología de la enfermedad peridontal⁽³⁹⁾.

La ausencia de estudios con respecto a la respuesta pro-inflamatoria Th17 en periodontitis agresiva y más aún la ausencia de estudios acerca de la respuesta antagonista de los Tregs, deja una gran interrogante acerca de la importancia de este balance en comportamiento de esta patología, abriendo un campo de investigación aun no explorado.

Es razonable asumir que la susceptibilidad a la destrucción de

tejido está determinado, al menos en parte, por el balance entre la respuesta inmune mediada por linfocitos autorreactivos y los mecanismos regulatorios mediados por Tregs⁽²¹⁾, sin existir aun un estudio con este enfoque en periodontitis que nos muestre un desbalance que podría explicar el quiebre de la homeostasis.

Se necesitan más estudios en relación a los Tregs y como su función puede ir cambiando las respuestas inmunes en enfermedad periodontal, según el tipo de microorganismos presentes y presentación clínica, para poder llegar a alguna aplicación práctica que pueda servir para el diagnóstico y/o tratamiento de diferentes patologías.

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1090046.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J periodontol* 1992; 63(4): 322-331.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.
- Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T et al. Regulatory T-cells Infiltrate Periodontal Disease Tissues. *J Dent Res* 84(7):639-643, 2005.
- Ito H, Honda T, Oda T et al. Gene expression analysis of the CD4+ T cell clones derived from gingival tissues of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:382-386.
- Okui T, Ito H, Honda T, Amanuma R, Yoshie H, Yamazaki K. Characterization of CD4+ FOXP3+ T-cell clones established from chronic inflammatory lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Feb;23(1):49-54.
- Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP et al. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol*. 2008 Jul;84(1):311-8.
- Garlet G, Martins W, Ferreira B et al. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodont Res* 2003; 38: 210-217.
- Suarez I, Ocampo A, Dueñas R, Rodríguez A. Relative proportions of T-cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with immune response in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75:1209-1215.
- Atilla G, Emingil G, Köse T et al. TGF- β 1 gene polymorphisms in periodontal diseases. *Clin Biochem* 2006; 39: 929-934.
- Vernal R, Garcia-Sanz JA. Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2008 Dec;8(4):207-20.
- Ferreira V y cols. *Inmunología Clínica*, Ed. Mediterraneo, 2004 Cap 1 y 2.
- Mjösberg J, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C. CD4+ CD25+ regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs. *Immunology*, 120, 456-466, 2007.
- Wang R, Peng G, Wang H. Regulatory T cells and Toll-like receptors in tumor immunity. *Seminars in Immunology* 2006 18: 136-142.
- Escobar A, López M, Serrano A et al. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clinical and Experimental Immunology* 2005;142(3):555-568.
- Ghiringhelli F, Me'nard C, Martin F, Zitvogel L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunological Reviews* 2006, 214: 229-238.
- Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor micro-environment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* 2008 15;122(10): 2286-93.
- Tan M, Goedegebuure P, Belt B. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 2009 1;182(3): 1746-55.
- Suvas S, Rouse B. Treg control of antimicrobial T cell responses. *Current Opinion Immunology* 2006 18:344-348.
- Anderson C, Oukka M, Kuchro V, Sacks D. CD4+CD25Foxp3 Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *JEM* 204(2): 285-297, 2007.
- McGuirk P, Mills K. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends in immunology* 23(9):450-456, 2002.
- Wang Z, Hong J, Sun W et al. Role of INF γ in induction of Foxp3 and conversion of CD4+CD25 T cells to CD4+Tregs. *The Journal of Clinical Investigation*, 116 (9): 2434-2441,2006.
- Zang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4+CD25+T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol* 2007 211: 590-597.
- Nomura T, Sakaguchi S. Foxp3 and AIRE in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nature Immunology* 2007 8(4): 333-4.
- Zheng S, Wang J, Gray J et al. IL2 is essential for TGF- β to convert naive CD4+CD25 cells to regulatory CD25+Foxp3+ T cells and for expansion of these cells. *The journal of immunology*2007,178:2018-2027.
- Corintis S, Albanesi C, la Sala A. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions *J Immunol*. 2001. 166(7):4312-8.
- Kundu N, Fulton A. Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis. *Cell Immunol* 1997, 180:55-61.
- Yue Y, Dummer R, Geertsens R. et al. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *et al. Int. J.Cancer* 1997 71:630.
- Zeidler R, Eissner G, Meissner P et al. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 1997, 90(6):2390-7.
- Salek-Ardakani S, Arrand JR, Mackett M. Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBVJ et al. *Virology*. 2002. 304(2):342-51.
- Caspar-Bauguil S, Puissant B, Nazzari D et al. Chlamydia pneumoniae induces interleukin-10 production that down-regulates major histocompatibility complex class I expression. *Inf Dis* 2000, 182:1394-401.
- Huehn J, Hamann A. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol*. 2005 26(12):632-6.
- Ahern D, Lloyd CM, Robinson DS. Chemokine responsiveness of CD4+CD25+ regulatory and CD4+CD25- T cells from atopic and nonatopic donors. *Allergy* 2009 Feb 6 online.
- Benson M, Pino-Lagos K, Rosemblatt M, Noelle R. All-trans retinoic acid mediates enhanced Treg cell growth, differentiation and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *JEM* 2004 204(8): 1765-1774.
- Gürkan A, Emingil G, Cinarcik S et al. Gingival crevicular fluid transformin growth factor- β 1 in several forms of periodontal disease. *Arch Oral Biol* 2006;51(10):906-12.
- Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis* 2007; 66 Suppl III: iii87-iii90.
- Ejeil A, Gaultier F, Igondjo-Tchen S. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol* 2003, 74:196-201.
- Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 383-9.
- Honda T, Aoki Y, Takahashi N et al. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease. *Clinica Chimica Acta* 2008, 395: 137-141.
- Cardoso C, Garlet G, Grippa G et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesion of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009, 24: 1-6.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Lisette Carré Benzi.

Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Olivos 943 – Independencia. Santiago, Chile.

Fono: (56-2) 978 18 33. Fax: (56-2) 978 18 39.

lizycarre@gmail.com

Trabajo recibido el 10/07/2009.

Aprobado para su publicación el 20/07/2009.