

Investigación

La activación de la senescencia genera una disminución en la fagocitosis de *Staphylococcus aureus*

*Senescence activation diminished *Staphylococcus aureus* phagocytosis*

AUTORES

ESTEBAN ROBLEDO ¹
CLARA GARCÍA SANTAMARINO ^{2,3}
CLAUDIO FADER KAISER ^{1,2}
MARTIN LANARDI ²
ANDREA ULLOA ²
CECILIA PORTA ²
ISRAEL VEGA ^{1,3}
MARÍA ISABEL COLOMBO ^{1,3}
MILTON OSMAR AGUILERA ^{1,2}

1 - Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), Universidad Nacional de Cuyo, CONICET

2 - Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Odontología

3 - Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Médicas.

E-mail: estebanrobledo01@gmail.com

RESUMEN

La senescencia es un estado donde las células somáticas pierden capacidad replicativa el cual se desencadena por diferentes estímulos relacionados a daño genético. Este mecanismo evita que células dañadas proliferen y generen una expansión del daño al pasar el mismo a su descendencia. Sin embargo, si la senescencia se activa en células del sistema inmune genera una disminución en la efectividad de la respuesta contra patógenos. Particularmente estamos interesados en el estudio de la respuesta a *S. aureus*, cuya infección tiene mayor incidencia en individuos longevos. Para ello utilizamos un modelo senescencia inducida por el estrés oxidativo mediante el tratamiento con H₂O₂ o la sobreexpresión transitoria de p21 (CDK1), en el que evaluamos la infección por *S. aureus*. Pudimos observar que la activación de la senescencia modifica la distribución intracelular de los microorganismos endocitados, así como el número de bacterias recuperadas por la célula a las 4 horas después de la infección.

Palabras clave: Senescencia, fagocitosis, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

*Senescence is a state where somatic cells lose replicative capacity. This is triggered by different stimuli related to genetic damage. This mechanism prevents damaged cells proliferate generating an expansion of damage by passing it to daughter cells. However, if senescence is activated in cells of the immune system it generates a decrease in the effectiveness of the response against pathogens. We are particularly interested in studying the response to *S. aureus* whose infection has a higher incidence in long-lived individuals. For this, we use a senescence model induced by oxidative stress through treatment with H₂O₂ or transient overexpression of p21 (CDK1), in which we evaluate *S. aureus* infection. We were able to observe that the activation of senescence modifies the intracellular distribution of endocytosed microorganisms, as well as the number of bacteria recovered by the cell at 4 hours after infection.*

Key words: Senescence, phagocytosis, *Staphylococcus aureus*

La activación de la senescencia genera una disminución en la fagocitosis de *Staphylococcus aureus*

Esteban Robledo; Clara García Santamarino; Claudio Fader Kaiser; Martín Lanardi; Andrea Ulloa; Cecilia Porta; Israel Vega;

Maria Isabel Colombo; Milton Osmar Aguilera

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Durante el último siglo se incrementó la expectativa de vida de las personas, sin embargo, el envejecimiento va acompañado de un conjunto de modificaciones morfológicas y funcionales que impactan sobre la respuesta del sistema inmunológico frente a diferentes patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*¹ o *Streptococcus pneumoniae*². También, en la población adulta mayor se ha observado un incremento de la susceptibilidad a infecciones por influenza^{2,3} y la reemergencia de casos de tuberculosis⁴. Además, el 40% de los pacientes que reportan bacteriemias ocurre en individuos ancianos⁵ y las sepsis severas alcanzan a 26 casos por 1000 llegando a una mortalidad del 38,4% en mayores de 85 años⁶.

El estudio de la disfunción del sistema inmune que se produce durante el envejecimiento natural de los organismos, proceso conocido como inmunosenescencia, ha tenido un importante crecimiento en los últimos años. Entre los cambios inmunológicos asociados a la edad se observa una caída notable en el número y capacidad bactericida intrínseca de los fagocitos^{7,8}, la reducción de la citotoxicidad de las células NK⁹ y de la capacidad presentadora de antígenos de las células dendríticas¹⁰.

Dentro de los elementos celulares de la respuesta inmune innata, la fagocitosis por macrófagos es un proceso evolutivamente muy conservado. Si bien en mamíferos el número de macrófagos circulantes no se ve disminuido con la edad, se puede observar un marcado descenso en el número de sus precursores en médula ósea^{11,12}. Dentro de las funciones de los macrófagos se han encontrado alteraciones de la quimiotaxis^{13,14}, la producción de quimioquinas y citoquinas¹⁵, la expresión de los receptores TLR¹⁶ y la fagocitosis^{17,18,19}. Esta disminución de la capacidad fagocítica también se ha observado

en hemocitos de *Drosophila melanogaster*²⁰. Por otro lado la capacidad degradativa se encuentra alterada ya que se ha observado que hay una disminución en la capacidad de producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno^{21,22}.

La senescencia celular es caracterizada por una disminución en la tasa de replicación celular la cual puede ser inducida a través de distintos estímulos como el estrés oxidativo, el acortamiento de los telómeros, por activación de oncogenes, o daño directo al DNA. Este fenotipo senescente se caracteriza no solo por una disminución de la división celular sino también por la adquisición de un fenotipo específico en el cual se puede observar un aumento del tamaño celular, aumento en la actividad de la beta galactosidasa asociada a senescencia, formación de focos de heterocromatina y la expresión de inhibidores de los complejos CDK-Ciclina (como son p16 y p21)^{23,24,25}.

S. aureus, una bacteria Gram positiva, es un patógeno oportunista que se encuentra presente en aproximadamente el 25% de la población humana²⁶. El rango de patologías que puede causar va desde lesiones cutáneas locales hasta afecciones más serias como osteomielitis e inclusive la muerte debida a un shock séptico^{27,28}. Comúnmente la transmisión de *S. aureus* se produce por el contacto directo con el hospedador a través de una herida en la piel o un catéter. El tipo de infecciones causadas en la piel y tejidos blandos son usualmente fácilmente tratables, pero si la bacteria alcanza el torrente sanguíneo puede diseminarse por el organismo causando cuadros más graves en otros tejidos con manifestaciones tales como abscesos, endocarditis, osteomielitis, meningitis y artritis séptica²⁹. La extravasación desde el torrente sanguíneo hacia otros tejidos es un paso crucial en la patogénesis de *S. aureus* habiéndose planteado diferentes mecanismos para el pasaje de este patógeno por la barre-

ra endotelial. Se ha comprobado que los macrófagos pueden fagocitar la bacteria y servir como medio de transporte para que la misma pueda salir del torrente sanguíneo y llegar a otros tejidos²⁹. Hasta hace algunos años se consideraba que los macrófagos y neutrófilos eran una de las herramientas con las que contaba el hospedador para limitar la invasión de la bacteria, siendo la fagocitosis la primera barrera activa del sistema inmune³⁰. Sin embargo, trabajos recientes han mostrado que estos fagocitos profesionales pueden fagocitar *S. aureus* pero sin llegar a degradarlo en algunos casos³¹. Debido a que estas células están adaptadas para recorrer el organismo y alcanzar el interior de los tejidos pueden servir de medio de transporte para que el microorganismo se disemine.

Un gran número de microorganismos son capaces de sobrevivir y replicarse dentro de células fagocíticas profesionales y para ello han desarrollado diversas estrategias que van desde la inhibición de la maduración de los fagosomas que los contienen, hasta la ruptura de los mismos y escape hacia el citoplasma³². En el caso de *S. aureus* luego de ser fagocitado hay una disminución del número de bacterias por células, observación que implica que hay una degradación de las mismas, pero las que sobreviven se mantienen dentro de un compartimento vacuolar sin afectar las funciones celulares sin afectar las funciones celulares durante tiempos que van desde las seis horas a los 3 o cuatro días dependiendo del modelo de estudio empleado. Luego de este periodo la bacteria lisa la vacuola que la contiene pasando hacia el citoplasma y posteriormente también lisa la célula, así el patógeno se disemina³¹.

Se ha observado además que esta bacteria tiene mayor incidencia en ancianos y además los cuadros que produce son de mayor severidad³³⁻³⁵.

Debido a lo exployado anteriormente es

La activación de la senescencia genera una disminución en la fagocitosis de *Staphylococcus aureus*

Esteban Robledo; Clara García Santamarino; Claudio Fader Kaiser; Martín Lanardi; Andrea Ulloa; Cecilia Porta; Israel Vega; María Isabel Colombo; Milton Osmar Aguilera

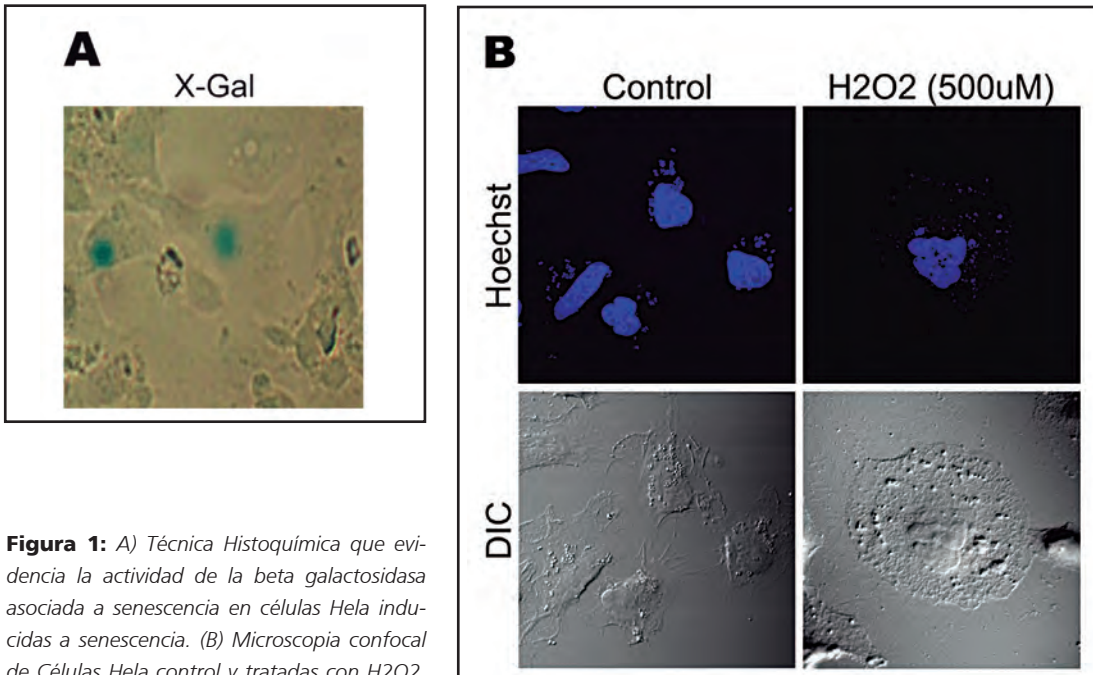
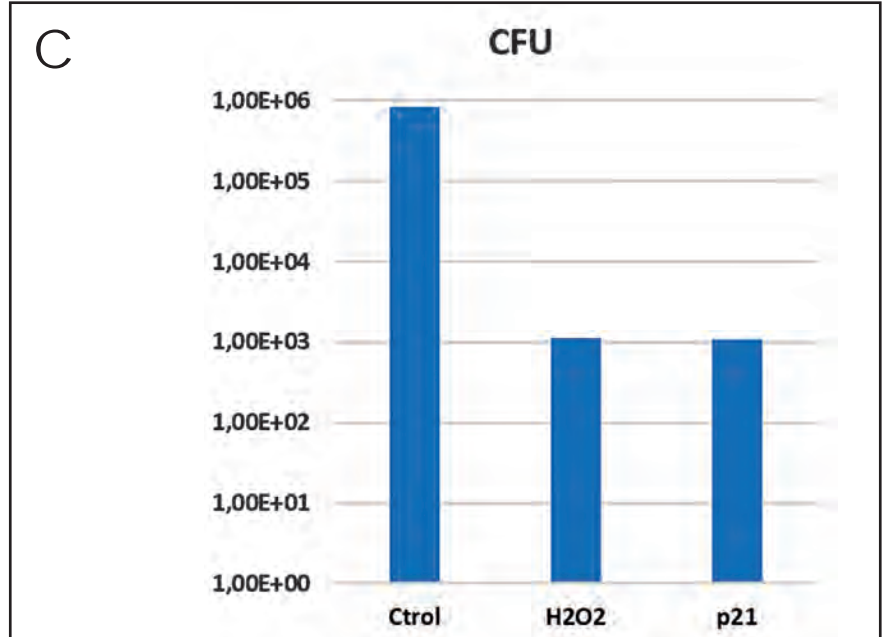


Figura 1: A) Técnica Histoquímica que evidencia la actividad de la beta galactosidasa asociada a senescencia en células HeLa inducidas a senescencia. (B) Microscopía confocal de Células HeLa control y tratadas con H₂O₂, infectadas con *S. aureus* fijadas 4 hpi. (C) Recuento de unidades formadoras de colonias de lisado de células HeLa senescentes y no senescentes recuperado a 4 hpi.

que decidimos estudiar las modificaciones que produce la activación celular de la senescencia sobre el patógeno *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular: células HeLa fueron crecidas en DMEM 10% SFB, en una estufa húmeda con una atmósfera de 5% de CO₂.
Inducción de senescencia: se utilizaron dos estrategias para activar la senescencia celular. En un caso células HeLa fueron tratadas con H₂O₂ 500 uM por 3 hs, posteriormente se las lavo con PBS y se las incubó en DMEM 10% SFB durante 5 días hasta ser analizadas o infectadas. Por otro lado, en la misma línea celular se sobreexpresó la proteína p21 unida a GFP a través de la transfección por liposomas utilizando el reactivo comercial



Lipofectamine2000 (según protocolo del fabricante).

Cultivo de *S. aureus* e infección: Los cultivos *S. aureus* se realizaron en medio LB durante 16 horas a 37°C. Luego se procedió a centrifugar dichos culti-

vos y se realizaron 3 lavados con PBS, para finalmente ser resuspendidos en PBS con una densidad óptica (DO) de 0,6 (equivalente a 10⁶ ufc). La infección se realizó a una relación de 10 bacterias por célula siguiendo los protocolos ya

La activación de la senescencia genera una disminución en la fagocitosis de *Staphylococcus aureus*

Esteban Robledo; Clara García Santamarino; Claudio Fader Kaiser; Martín Lanardi; Andrea Ulloa; Cecilia Porta; Israel Vega;

Maria Isabel Colombo; Milton Osmar Aguilera

vigentes en nuestros laboratorios.

Evaluación del número de bacterias: La cantidad de bacterias que infectaron las células en cada caso se evaluó a través de la lisis de las células infectadas y posterior siembra en placas de LB agar para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24 hs de la siembra. Se realizaron varias diluciones del lisado para encontrar un inóculo que permitiera el recuento de colonias aisladas.

Evaluación de marcadores de senescencia: El fenotipo senescente se evaluó principalmente por la actividad enzimática de la beta galactosidasa asociada a senescencia, para el cual se empleó el Kit de tinción de beta galactosidasa asociada a senescencia -Cell Signalling (siguiendo los protocolos del fabricante)

Microscopia confocal: Las muestras fueron fijadas con PAF 4% por 15 minutos, permeabilizadas con Tritón 0,1% para posterior montaje con Mowiol-Hoechst para marcar bacterias y núcleos. Finalmente se observaron en el microscopio confocal Olympus- FV 1000.

RESULTADOS

Para realizar este estudio activamos la senescencia de células HeLa mediante el tratamiento con H₂O₂ y la sobreexpresión de GFP-p21 como se describió anteriormente en materiales y métodos. En las células así tratadas pudimos observar una notable disminución de la tasa de crecimiento celular y la modificación de otros parámetros característicos de células senescentes como el aumento de tamaño celular y un incremento en la actividad de la beta galactosidasa relacionada a senescencia (Fig. 1A).

Analizando la infección por *S. aureus*, pudimos observar por microscopia confocal, una alteración en la distribución intracelular de las bacterias endocitadas. En células control la localización es mayormente perinuclear mientras que en células senescentes estas se redistribuyen mostrándose dispersas por todo el citoplasma (fig. 1B).

Por otro lado, también evaluamos la cantidad de microorganismos recuperados del lisado celular a las 4 hpi, y observamos una disminución de la cantidad unidades formadoras de colonias en aquellas condiciones en las que se indujo la senescencia (fig. 1C)

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la activación de la senescencia repercute en una menor capacidad fagocítica de *S. aureus*, al menos en células epiteliales. Tenemos planeado realizar experimentos similares con líneas celulares de fagocitos profesionales como lo son los macrófagos THP1 o los monocitos RAW. El objetivo es ver si la activación de la senescencia afecta de igual manera la fagocitosis en estas líneas que en las células epiteliales.

En el campo de la odontología los resultados de este proyecto pueden ser de gran utilidad para entender ciertos cuadros clínicos. Además de la mayor susceptibilidad a ciertos patógenos, en individuos longevos aparecen con mayor frecuencia patologías asociadas a cuadros inflamatorios crónicos, dentro de los cuales la periodontitis es un ejemplo de ellos. Se estima que el 10% de la población se encuentra afectada por periodontitis severa y este porcentaje aumenta con la edad³⁶. El periodonto incluye la gingiva, el hueso alveolar, el ligamento periodontal y la raíz (el tejido que soporta el diente)³⁷. Aquellas personas con anomalías periodontales, tanto en la integridad como en la función, se dice que poseen enfermedad periodontal. Esta comprende una variedad de fenotipos, definidos por signos clínicos y síntomas que constituyen el síndrome periodontal. El fenotipo más comúnmente observado es la inflamación de la gingiva (gingivitis) inducido por la placa dental (biofilm), que incluye cambios en el color del tejido, volumen, temperatura, exudado crevicular y sangrado posterior a una presión suave con una sonda 38. Los signos clínicos de

la gingivitis asociada a biofilm son reversibles cuando una buena higiene oral es implementada y mantenida³⁹. Aunque menos prevalente que la gingivitis, pero frecuentemente observados en muchas personas, son los síntomas clínicos de la periodontitis asociada a biofilm. Esta incluye la formación de bolsas periodontales, pérdida de adhesión, sangrado posterior a una presión y pérdida de hueso. La terapia está orientada a eliminar el agente infeccioso, lo que típicamente lleva a la disminución de los signos de inflamación, reparación del tejido y restauración de la función y estética. Los resultados del tratamiento de la enfermedad periodontal suelen ser estables por largos períodos de tiempo, pero sin embargo los signos de enfermedad suelen retornar sin poder predecir la localización, frecuencia y severidad de los mismos.

Es interesante el hecho de que, si bien la gingivitis precede a la periodontitis, no todos los pacientes con gingivitis son proclives a desarrollar periodontitis, existiendo factores individuales de predisposición que aún no están del todo claros. El hecho de que la periodontitis tenga mayor incidencia en ancianos, donde también se acumulan células senescentes en el organismo da un indicio de que podría haber una relación entre ambos procesos. Además, el estrés oxidativo, uno de los disparadores de la activación de la senescencia, se encuentra elevado en el tejido gingival de individuos ancianos^{40,41}. Otro indicativo de esta relación es la observación de que en las lesiones periodontales se han observado fibroblastos senescentes⁴² y además in vitro este tipo celular cambia su capacidad inmunomoduladora como respuesta a patógenos cuando es envejecido por pasajes seriados^{43,44}. Es por todo esto que entender cómo se modifica el sistema inmune al activarse la senescencia y si la senescencia tiene un rol preponderante en esta enfermedad puede ser la clave para generar nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento para estos cuadros.

La activación de la senescencia genera una disminución en la fagocitosis de *Staphylococcus aureus*

Esteban Robledo; Clara García Santamarino; Claudio Fader Kaiser; Martin Lanardi; Andrea Ulloa; Cecilia Porta; Israel Vega; Maria Isabel Colombo; Milton Osmar Aguilera

BIBLIOGRAFÍA

- HAZLETT LD, KREINDLER FB, BERK RS, BARRETT R. Aging alters the phagocytic capability of inflammatory cells induced into cornea. *Curr Eye Res.* 1990;9(2):129-138. doi:10.3109/02713689008995199
- BOYD AR, SHIVSHANKAR P, JIANG S, BERTON MT, ORIHUELA CJ. Age-related defects in TLR2 signaling diminish the cytokine response by alveolar macrophages during murine pneumococcal pneumonia. *Exp Gerontol.* 2012;47(7):507-518. doi:10.1016/j.exger.2012.04.004
- KAPLAN V, ANGUS DC. Community-acquired pneumonia in the elderly. *Crit Care Clin.* 2003;19(4):729-748. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14601717>. Accessed October 18, 2019.
- SMITH PW, RAJAGOPALAN S, YOSHIKAWA TT. Tuberculosis in Long-Term-Care Facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21(9):611-616. doi:10.1086/501816
- GAVAZZI G, MALLARET MR, COUTURIER P, IFFENECKER A, FRANCO A. Bloodstream infection: Differences between young-old, old, and old-old patients. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50(10):1667-1673. doi:10.1046/j.1532-5415.2002.50458.x
- VARDI M, GHANEM-ZOUBI NO, BITTERMAN H, ET AL. Sepsis in nonagenarians admitted to internal medicine departments: a comparative study of outcomes. *QJM.* 2013;106(3):261-266. doi:10.1093/qjmed/hcs221
- LORD JM, BUTCHER S, KILLAMPALI V, LASCELLES D, SALMON M. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev.* 2001;122(14):1521-1535. doi:10.1016/S0047-6374(01)00285-8
- STOUT RD, SUTTLES J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: Dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev.* 2005;205:60-71. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00260.x
- MOCCHIGIANI E, MALAVOLTA M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell.* 2004;3(4):177-184. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00107.x
- UYEMURA K, CASTLE SC, MAKINODAN T. The frail elderly: role of dendritic cells in the susceptibility of infection. *Mech Ageing Dev.* 2002;123(8):955-962. doi:10.1016/s0047-6374(02)00033-7
- TAKAHASHI I, OHMOTO E, AOYAMA S, ET AL. Monocyte chemiluminescence and macrophage precursors in the aged. *Acta Med Okayama.* 1985;39(6):447-451. doi:10.18926/AMO/31506
- OGAWA T, KITAGAWA M, HIROKAWA K. Age-related changes of human bone marrow: A histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mech Ageing Dev.* 2000;117(1-3):57-68. doi:10.1016/S0047-6374(00)00137-8
- FIETTA A, MERLINI C, DE BERNARDI PM, GANDOLA L, PICCIONI PD, GRASSI C. Non specific immunity in aged healthy subjects and in patients with chronic bronchitis. *Aging (Milano).* 1993;5(5):357-361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8123696>. Accessed October 18, 2019.
- SWIFT ME, BURNS AL, GRAY KL, DIPIETRO LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol.* 2001;117(5):1027-1035. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01539.x
- HIGASHIMOTO Y, FUKUCHI Y, SHIMADA Y, ET AL. The effects of aging on the function of alveolar macrophages in mice. *Mech Ageing Dev.* 1993;69(3):207-217. doi:10.1016/0047-6374(93)90024-L
- RENSHAW M, ROCKWELL J, ENGLEMAN C, GEWIRTZ A, KATZ J, SAMBHARA S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol.* 2002;169(9):4697-4701. doi:10.4049/jimmunol.169.9.4697
- DE LA FUENTE M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1985;81(4):935-938. doi:10.1016/0300-9629(85)90933-8
- DE LA FUENTE M, MEDINA S, DEL RIO M, FERRÁNDEZ MD, HERNANZ A. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life Sci.* 2000;67(17):2125-2135. doi:10.1016/S0024-3205(00)00799-2
- KHARE V, SODHI A, SINGH SM. Effect of aging on the tumoricidal functions of murine peritoneal macrophages. *Nat Immun.* 15(6):285-294. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523280>. Accessed October 18, 2019.
- HORN L, LEIPS J, STARZ-GAIANO M. Phagocytic ability declines with age in adult *Drosophila* hemocytes. *Aging Cell.* 2014;13(4):719-728. doi:10.1111/acel.12227
- DING A, HWANG S, SCHWAB R. Effect of aging on murine macrophages. Diminished response to IFN-gamma for enhanced oxidative metabolism. *J Immunol.* 1994;153(5):2146-2152. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7519641>. Accessed October 18, 2019.
- MCLACHLAN JA, SERKIN CD, MORREY-CLARK KM, BAKOUCHE O. Immunological functions of aged human monocytes. *Patho-*

La activación de la senescencia genera una disminución en la fagocitosis de *Staphylococcus aureus*

Esteban Robledo; Clara García Santamarino; Claudio Fader Kaiser; Martín Lanardi; Andrea Ulloa; Cecilia Porta; Israel Vega; Maria Isabel Colombo; Milton Osmar Aguilera

BIBLIOGRAFÍA

- biology. 1995;63(3):148-159. doi:10.1159/000163946
23. HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25(3):585-621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
24. DIMRI GP, LEE X, BASILE G, ET AL. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(20):9363-9367. doi:10.1073/pnas.92.20.9363
25. ACOSTA JC, BANITO A, WUESTEFELD T, ET AL. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):978-990. doi:10.1038/ncb2784
26. KLUYTMANS J, VAN BELKUM A, VERBRUGH H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):505-520. doi:10.1128/cmr.10.3.505
27. ARCHER GL. *Staphylococcus aureus*: A Well-Armed Pathogen. *Clin Infect Dis.* 1998;26(5):1179-1181. doi:10.1086/520289
28. LOWY FD. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998;339(8):520-532. doi:10.1056/NEJM199808203390806
29. EDWARDS AM, MASSEY RC. How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream? *Trends Microbiol.* 2011;19(4):184-190. doi:10.1016/j.tim.2010.12.005
30. VOYICH JM, BRAUGHTON KR, STURDEVANT DE, ET AL. Insights into Mechanisms Used by *Staphylococcus aureus* to Avoid Destruction by Human Neutrophils. *J Immunol.* 2005;175(6):3907-3919. doi:10.4049/jimmunol.175.6.3907
31. KUBICA M, GUZIK K, KOZIEL J, ET AL. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: The silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2008;3(1). doi:10.1371/journal.pone.0001409
32. FLANNAGAN RS, HEIT B, HEINRICH DE. Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathog (Basel, Switzerland).* 2015;4(4):826-868. doi:10.3390/pathogens4040826
33. KANG CI, SONG JH, KO KS, CHUNG DR, PECK KR. Clinical features and outcome of *Staphylococcus aureus* infection in elderly versus younger adult patients. *Int J Infect Dis.* 2011;15(1). doi:10.1016/j.ijid.2010.09.012
34. THORLACIUS-USSING L, SANDHOLDT H, LARSEN AR, PETERSEN A, BENFIELD T. Age-dependent increase in incidence of *staphylococcus aureus* bacteremia, Denmark, 2008–2015. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(5):875-882. doi:10.3201/eid2505.181733
35. MCCLELLAND RS, FOWLER VG, SANDERS LL, ET AL. *Staphylococcus aureus* bacteremia among elderly vs younger adult patients: Comparison of clinical features and mortality. *Arch Intern Med.* 1999;159(11):1244-1247. doi:10.1001/archinte.159.11.1244
36. KASSEBAUM NJ, BERNABÉ E, DAHIYA M, BHANDARI B, MURRAY CJL, MARCENES W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *J Dent Res.* 2014;93(11):1045-1053. doi:10.1177/0022034514552491
37. DENTINO A, LEE S, MAILHOT J, HEFTI AF. Principles of periodontology. *Periodontol* 2000. 2013;61(1):16-53. doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00397.x
38. MARIOTTI A. Dental Plaque-Induced Gingival Diseases. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):7-17. doi:10.1902/annals.1999.4.1.7
39. LOE H, THEILADE E, JENSEN SB. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *J Periodontol.* 1965;36:177-187. doi:10.1902/jop.1965.36.3.177
40. YONEDA T, TOMOFUJI T, EKUNI D, ET AL. Anti-aging effects of co-enzyme Q10 on periodontal tissues. *J Dent Res.* 2013;92(8):735-739. doi:10.1177/0022034513490959
41. KIM HK, PARK HR, LEE JS, CHUNG TS, CHUNG HY, CHUNG J. Down-regulation of iNOS and TNF- α expression by kaempferol via NF- κ B inactivation in aged rat gingival tissues. *Biogerontology.* 2007;8(4):399-408. doi:10.1007/s10522-007-9083-9
42. STAHL SS, TONNA EA, WEISS R. The effects of aging on the proliferative activity of rat periodontal structures. *J Gerontol.* 1969;24(4):447-450. doi:10.1093/geronj/24.4.447
43. OGURA N, MATSUDA U, TANAKA F, SHIBATA Y, TAKIGUCHI H, ABIKO Y. In vitro senescence enhances IL-6 production in human gingival fibroblasts induced by lipopolysaccharide from *Campylobacter rectus*. *Mech Ageing Dev.* 1996;87(1):47-59. doi:10.1016/0047-6374(96)01701-0
44. TAKIGUCHI H, YAMAGUCHI M, OKAMURA H, ABIKO Y. Contribution of IL-1 beta to the enhancement of *Campylobacter rectus* lipopolysaccharide-stimulated PGE2 production in old gingival fibroblasts in vitro. *Mech Ageing Dev.* 1997;98(1):75-90. doi:10.1016/s0047-6374(97)00068-7