



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**"Efecto de la vitamina D3 en la producción de resolvina E1 por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con periodontitis crónica"**

Rodrigo Alberto Torrez Velasco  
Viviana Salinas Herrera

DIRECTORA TRABAJO FINAL

Dra. Lina Suarez Londoño

Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Odontología  
Posgrado de Periodoncia  
Bogotá, Colombia  
2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**“Efecto de la vitamina D3 en la producción de resolvinas E1 por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con periodontitis crónica”**

Rodrigo Alberto Torrez Velasco  
Viviana Salinas Herrera

Trabajo final para optar al título de: **Especialista en Periodoncia**

**Directora:** Dra. Lina Suarez Londoño

**Codirectora:** Dra. Luz Stella Rodríguez

**Codirectora:** Dra. Sindy Maryuri Muñoz

**Grupo de investigación:** Gerodontología

**Línea de investigación:** Inmunopatogenia de la enfermedad periodontal

## **DEDICATORIA**

Dedicamos de manera especial este trabajo a nuestros pacientes, ya que por ellos tenemos la responsabilidad de investigar e innovar nuevas opciones terapéuticas para así brindarles la mejor opción de tratamiento y por consiguiente limitar las consecuencias que trae la enfermedad periodontal a sus vidas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestros agradecimientos van dirigidos a Dios quien suplió cada necesidad, haciendo posible la realización de este proyecto. Gracias a nuestros maravillosos padres por su amor incondicional y apoyo en esta etapa importante de nuestra carrera. A la directora del proyecto, Dra. Lina Suárez por guiarnos en el desarrollo del mismo y motivarnos a buscar la excelencia, a las co-directoras Dra. Luz Stella Rodríguez por su colaboración y dedicación al trabajo científico, Dra. Sindy Muñoz quien nos brindó dirección en cada paso de la realización del proyecto. Por último a los pacientes quienes colaboraron de manera desinteresada, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. Siempre estaremos agradecidos con cada uno de ustedes.

## **RESUMEN**

**Antecedentes:** Las enfermedades periodontales comprenden una amplia gama de afecciones inflamatorias que afectan las estructuras de soporte de los dientes y contribuyen a mantener una inflamación sistémica de baja magnitud (low grade inflammation) (1). Según el IV Estudio Nacional de Salud Bucal- ENSAB IV, la mayor parte de la población (61.8%) presenta periodontitis en sus diferentes grados de severidad (2). Recientes investigaciones han propuesto el uso de mediadores lipídicos pro resolutorios como la Resolvina E1 (RvE1) con el objetivo de devolverle la salud a los tejidos periodontales; estos agonistas de las vías de resolución reducen el número de neutrófilos en el exudado inflamatorio entre otras funciones (17). La vitamina D3 [1,25 (OH) 2D3], regula la homeostasis del calcio y el fosfato en el organismo, y adicionalmente ejerce importantes funciones inmunomoduladoras, favoreciendo así un ambiente adecuado para la resolución del daño (8).

Se ha evidenciado que la RvE1 y la vitamina D3 pueden reducir la expresión del factor nuclear kappa B (NF-κB), por lo que se ha considerado la opción de investigar si la vitamina D3 podría incrementar la producción de RvE1 (10)(11).

Basados en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la vitamina D3, en la inflamación mediada por la producción de anti inflamatorios naturales en células mononucleares de sangre periférica extraídas de pacientes sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.

**Materiales y Métodos:** Se analizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 8 pacientes adultos voluntarios sistémicamente sanos, entre 30 y 50 años de edad, de los cuales 4 pacientes presentaban periodontitis crónica y 4 eran periodontalmente sanos o con gingivitis. Las CMSP fueron estimuladas por

24 horas con lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*, en ausencia y presencia de Vitamina D3. Finalmente se midieron los niveles de resolvina E1 (RvE1) mediante ELISA en el sobrenadante del cultivo.

**Resultados:** Se encontró que las CMSP de pacientes con periodontitis, activadas con LPS de *Porphyromonas gingivalis* producen mayor cantidad de RvE1 que las células de pacientes periodontalmente sanos, bajo el efecto del mismo activador. Las CMSP de pacientes con periodontitis crónica activadas con LPS en presencia de VD3, mostraron un incremento en la producción de RvE1 al ser comparadas con las células obtenidas de controles sanos activadas bajo iguales condiciones (LPS + VD3). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los niveles de producción de RvE1 por CMSP de pacientes con periodontitis crónica y pacientes sanos activadas solo con VD3.

**Conclusiones:** El LPS de *P. gingivalis* aumenta significativamente la producción de RvE1 por CMSP, tanto en pacientes sanos como en pacientes con periodontitis crónica. La producción es significativamente mayor en el paciente afectado.

La VD3, no aumenta de manera significativa la producción de RvE1 por CMSP, previamente activadas con LPS de *P. gingivalis*, independientemente del diagnóstico periodontal. A pesar de la ausencia de significancia, se observa una tendencia al aumento de producción de RvE1 en las células activadas con VD3 tanto en presencia como en ausencia del activador.

**Palabras clave:**

Resolvina E1, Enfermedad periodontal, Vitamina D3, Inmunomodulación.

**Abstract:** Periodontitis is a dysbiotic inflammatory disease with an adverse impact on systemic health. The use of resolutive lipid mediators such as Resolvin E1 (RvE1) has been proposed with the aim of restoring health to periodontal tissues through an early resolution of the acute inflammatory process. On the other hand, vitamin D3 (VD3) is responsible for the regulation of calcium homeostasis in the body and also has a role as an immunomodulator. Evidence has shown that it plays an important role in the response against infections. This study evaluated the effect of VD3 on the production of RvE1 by peripheral blood mononuclear cells (CMSP) of patients with chronic periodontitis. The CMSP were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis*, in the absence and presence of VD3.

We conclude the LPS of *P. gingivalis* significantly increases the production of RvE1 by PBMC, both in healthy patients and in patients with chronic periodontitis and VD3 does not significantly increase the production of RvE1 by PBMC, previously activated with LPS of *P. gingivalis*, independently of the periodontal diagnosis.

### **Background:**

Periodontal diseases comprise a wide range of inflammatory conditions that affect the supporting structures of the teeth and contribute to maintaining a low-grade systemic inflammation (1). According to the IV National Study of Oral Health - ENSAB IV, the majority of the population (61.8%) presents periodontitis in its different degrees of severity (2). Recent researches has proposed the use of resolutive lipid mediators such as Resolvin E1 (RvE1) with the aim of restoring health to periodontal tissues; These agonists of the resolution pathways reduce the number of neutrophils in the inflammatory exudate among other functions (17).

Vitamin D3 [1,25 (OH) 2D3], regulates the homeostasis of calcium and phosphate in the body, but exerts important immunomodulatory functions, thus favoring a favorable environment for the resolution of damage (8).

It has been shown that RvE1 and vitamin D3 can reduce the expression of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), so the option of investigating whether vitamin D3 could increase the production of RvE1 (10) has been considered (11).

Based on the above, the objective of this work was to determine the effect of vitamin D3 on inflammation mediated by the production of natural anti-inflammatory in peripheral blood mononuclear cells extracted from systemically healthy patients with and without periodontal disease.

**Materials and Methods:** Peripheral blood mononuclear cells CMSP were analyzed from 8 systemically healthy adult patients, between 30 and 50 years of age, of which 4 patients had chronic periodontitis and 4 were periodontally healthy or with gingivitis. The PBMC were stimulated for 24 hours with LPS of *Porphyromonas gingivalis*, in the absence and presence of Vitamin D3. Finally, the levels of RvE1 were measured by ELISA in the culture supernatant.

**Results:** We found that the (peripheral blood mononuclear cells) PBMCs of patients with periodontitis, activated with LPS of *Porphyromonas gingivalis* produce a higher amount of RvE1 in compare with cells of periodontally healthy patients, under the effect of the same activator. The CMSP of patients with chronic periodontitis activated with LPS in the presence of VD3, showed an increase in the production of RvE1 when compared with the cells obtained from healthy controls activated under the same conditions (LPS + VD3). However, there were no statistically significant differences when the production levels of RvE1 were compared by PBMC of patients with chronic periodontitis and healthy patients activated only with VD3.

**Conclusions:** The LPS of *P. gingivalis* significantly increases the production of RvE1 by PBMC, both in healthy patients and in patients with chronic periodontitis. The production is significantly higher in the affected patient.

VD3 does not significantly increase the production of RvE1 by PBMC, previously activated with LPS of *P. gingivalis*, independently of the periodontal diagnosis. Despite the absence of significance, there is a tendency to increase the production of RvE1 in the cells activated with VD3 both in the presence and absence of the activator.

**Key words:**

Resolvin E1, Periodontal disease, Vitamin D3, Immunomodulation.

## **CONTENIDO**

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Etiopatogenia de la enfermedad periodontal.....	6
3.1.2. El proceso inflamatorio en la Periodontitis.....	6
2.2. El origen infeccioso de la enfermedades periodontales.....	13
2.2.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	14
2.2.2. Factores de virulencia.....	15
2.2.3 Rol del lipopolisacárido como inductor de la enfermedad periodontal.....	16
2.3 Agentes pro-resolutorios.....	19
2.3.1 Resolvina E1.	
2.4 Vitamina D3.....	22

3. METODOLOGÍA.....31

    3.1. Objetivo general.....31

        3.1.1 Objetivos específicos.....31

    3.2 Población y Muestra.....32

    3.3 Criterios de inclusión y exclusión.....32

    3.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....33

    3.5 Medición de Resolvina E1.....34

    3.6 Análisis estadístico.....35

4. RESULTADOS.....35

    4.1 Evaluación clínica de los pacientes.....35

        4.1.1 Análisis de parámetros periodontales.....35

    4.2 Análisis de la producción de resolvina.....37

5. DISCUSIÓN.....42

6. CONCLUSIONES.....45

7. RECOMENDACIONES.....46

**LISTAS ESPECIALES**

**Tabla 1.** CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PERIODONTALES.

**Gráfica 1.** EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA CON LPS EN LA PRODUCCIÓN DE RESOLVINA E1.

**Gráfica 2.** EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA CON LPS Y CON LPS + VITAMINA D3 EN LA PRODUCCIÓN DE RESOLVINA E1.

**Gráfica 3.** EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA CON VITAMINA D3 EN LA PRODUCCIÓN DE RESOLVINA E1.

**Gráfica 4.** EFECTO DE LA ESTIMULACION DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA CON VITAMINA D3 Y CON VITAMINA D3 + LPS EN LA PRODUCCIÓN DE RESOLVINA E1.

## GLOSARIO

**EICOSANOIDES:** Son moléculas de señalización producto de la oxidación enzimática de ácido araquidónico u otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (13).

**ENDOTOXINA:** Componente de la pared celular de las bacterias gramnegativas, también llamado lipopolisacárido (LPS), que se libera de las bacterias muertas y estimula muchas respuestas inmunitarias innatas, como la secreción de citocinas, la inducción de actividades microbicidas de los macrófagos y la expresión de moléculas de adhesión del leucocito en el endotelio. La endotoxina contiene componentes lipídicos y glucídicos (polisacáridos) (12). Consiste en tres subunidades: Lípido A, core o núcleo polisacárido y cadena de polisacárido O. Posee un gran número de actividades biológicas, por ejemplo la activación del sistema del complemento (15).

**FACTOR NUCLEAR  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B):** Una familia de factores de transcripción compuestos de homodímeros o heterodímeros de proteínas homólogos a la proteína c-Rel. Las proteínas NF- $\kappa$ B son necesarias para la transcripción inducible de genes los cuales codifican para citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1  $\alpha$ ., TNF- $\alpha$  principalmente (90).

**RECEPTOR DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA B - RANK:** Proteína de membrana perteneciente a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, una vez unido a su ligando (RANKL) promueven la diferenciación de precursores de osteoclastos y la activación y supervivencia de estos. Se encuentra en células precursoras de osteoclastos y osteoclastos maduros (16).

**LIGANDO DEL RECEPTOR DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA B RANKL:**

Ligando del RANK, el cual una vez unido al receptor ambos son capaces de promover la diferenciación, activación de osteoclastos (16).

**OSTEOPROTEGERINA (OPG):** También conocida como factor inhibitorio de la osteoclastogénesis, es la proteína perteneciente a la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral. Esta es producida por células estromales de la medula ósea, osteoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal, dentro de sus funciones principales está inhibir la diferenciación y activación de osteoclastos mediante la unión competitiva con el RANKL (16).

**LIPOXINAS:** Moléculas naturales producidas a partir de ácidos grasos endógenos. Derivadas del ácido araquidónico, tienen potentes propiedades antiinflamatorias y acciones de resolución. Su síntesis se da a través de tres vías. En la primera vía, en tejidos mucosos humanos, como el tejido gastrointestinal, vías respiratorias y la cavidad oral. En la segunda vía, en los vasos sanguíneos, la 5-lipoxigenasa biosintetiza la lipoxina A4 y la 12-lipoxigenasa en las plaquetas produce la lipoxina B4. La lipoxina A4 regula las funciones celulares mediante la activación de receptores específicos expresados por neutrófilos y monocitos. Una tercera vía sintética es activada por la aspirina (17).

**MARESINAS:** Se identifican como moléculas producidas por macrófagos con propiedades homeostáticas. La fagocitosis realizada por macrófagos de las células apoptóticas desencadena la biosíntesis de maresina-1, esta estimula eficazmente la eferocitosis en células humanas y también tiene funciones regenerativas (17).

**PROTECTINAS:** Moléculas derivadas del ácido ecosapentaenoico, biosintetizadas a través de la vía de la lipooxigenasa. Su nombre explica las acciones protectoras observadas en los tejidos neuronales y dentro del sistema

inmunológico. Las protectinas reducen la transmigración de los polimorfonucleares neutrófilos a través del endotelio y mejoran la fagocitosis realizada por macrófagos de células apoptóticas (17).

**RESOLVINAS:** Moléculas que se biosintetizan a partir de dos ácidos grasos poliinsaturados: ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, derivados de la dieta. Los dos grupos principales de la familia de las resolvinas tienen estructuras químicas distintas: serie E, derivada del ácido eicosapentaenoico; y la serie D, derivada del ácido decosahexaenoico. Incluyen la resolvina D1 (RvD1 7S,8R,17S-trihidroxi-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z- ácido decosahexaenóico) y la resolvina E1 (RvE1, 5S,12R, 18R-trihidroxi-6Z,8E,10E,14Z,16E-ácido eicosapentaenóico). Promueven la resolución de la inflamación, entre otros, reduciendo el número de neutrófilos en el exudado inflamatorio (17).

## **1. INTRODUCCION**

La enfermedad periodontal es una entidad inflamatoria, la cual se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte del diente; es importante destacar que la periodontitis es actualmente un problema de salud pública en Colombia y a nivel mundial, con múltiples consecuencias, entre ellas, la pérdida de dientes (21). Algunos estudios epidemiológicos respaldan la idea planteada anteriormente; tal es el caso del ENSAB IV (Estudio Nacional de Salud Bucal, 2014), el cual concluyó que personas mayores de 18 años presentan periodontitis en un 61,8% en sus diferentes grados de severidad, siendo la más frecuente la periodontitis moderada (2).

La destrucción observada en la enfermedad periodontal, es iniciada por la respuesta inmunitaria del huésped contra el biofilm microbiano (1), sin embargo, su desarrollo no solo depende de la presencia e interacciones con un biofilm, si no de la influencia de factores de riesgo ambientales, de comportamiento, genéticos y efectos epigenéticos que alteren la respuesta a la infección (23). La respuesta inflamatoria en el periodonto se caracteriza, de acuerdo a los estadios de progresión de la enfermedad, por la infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos en los tejidos, los cuales tienen la capacidad de generar una alta concentración local de citocinas, eicosanoides y otros mediadores, que en el proceso de mantener la salud, actúan como promotores de la defensa del huésped (40,45); sin embargo por ser producidas de una manera indiscriminada en el contexto de la enfermedad, promueven la destrucción de los tejidos periodontales (18,87).

Los mediadores químicos que son producidos durante los procesos infecciosos e inflamatorios, reflejan una pérdida de regulación de la respuesta dando como resultado la alteración del metabolismo y una pérdida de la homeostasis en los tejidos periodontales blandos y duros, lo que conlleva a la destrucción de los mismos. Adicionalmente se han descrito alteraciones de la función de fagocitos,

especialmente neutrófilos, los cuales o bien son incapaces de controlar la presencia de microorganismos o tienen un fenotipo caracterizado por una hiper respuesta inflamatoria, que puede relacionarse con el avance de la enfermedad (22).

Uno de los principales activadores de la respuesta inflamatoria en la enfermedad periodontal, basados en su actividad biológica es el lipopolisacárido (LPS). Este es un importante factor patogénico de muchas bacterias periodontopáticas. Varias investigaciones han revelado la capacidad de dicho componente de la membrana externa para activar las respuestas inflamatorias del huésped (25,26). Como ejemplos de ello tenemos, la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, inhibición de la diferenciación osteoblástica de las células madre del ligamento periodontal y estimulación de la migración de monocitos, macrófagos y neutrófilos, influyendo así en la respuesta inmune a la infección (25,27).

Basados en los mecanismos etiopatogénicos de la periodontitis, la alternativa terapéutica clásica para la enfermedad periodontal es la remoción mecánica de la placa dentobacteriana (28). Sin embargo, la estrategia para el tratamiento periodontal, debería reenfocarse, debido a que no todos los pacientes responden favorablemente al tratamiento convencional (29,30), esto ha sido observado especialmente en aquellos individuos con diagnóstico de periodontitis agresiva (31). Por lo mencionado anteriormente y teniendo en cuenta el entendimiento de la patogénesis y los resultados poco exitosos en el tratamiento de la enfermedad periodontal, los cuales se quedan en el ámbito de la reparación de los tejidos, recientes investigaciones han propuesto el uso de moléculas denominadas mediadores lipídicos de la inflamación (17), con el objetivo de devolverle la salud a los tejidos periodontales, mediante una resolución temprana del proceso inflamatorio agudo (28,32).

Dentro del grupo de estos mediadores se encuentran las denominadas protectinas, lipoxinas, resolvinas y maresinas (17). Dichas moléculas son producidas por células pertenecientes al sistema inmune, principalmente por monocitos, macrófagos (17), células dendríticas, neutrófilos, linfocitos T y células de la microglia (33,34).

Las resolvinas en particular, actúan como agentes anti inflamatorios y como pro-resolutivos reduciendo la destrucción de los tejidos y estabilizando la respuesta inflamatoria sin suprimir el sistema inmune (34,35). Dentro de este grupo encontramos la resolvina D1 (RvD1) y la resolvina E1 (RvE1) las cuales adicionalmente participan en otros procesos como la disminución en el infiltrado de células inflamatorias, la activación de la fagocitosis de células apoptóticas y la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (33). La resolvina E1, es derivada del omega 3, ácido eicosapentaenoico, el cual es un ácido graso poliinsaturado. Para esta resolvina, se han descrito funciones específicas como la disminución de eicosanoides proinflamatorios, citocinas, especies reactivas del oxígeno y expresión de moléculas de adhesión como la P-selectina en modelos animales y VCAM-1 en estudios *in vitro* (91,92). En modelos animales con enfermedad periodontal inducida, se ha demostrado que la aplicación de RvE1 tiene impacto en la reducción de la pérdida ósea e incluso induce a la regeneración de los tejidos periodontales (32,36,37).

Por otra parte, la vitamina D3, es la encargada de la regulación de la homeostasis del calcio en el organismo y también posee un rol como inmunomodulador. Esta evidencia surge de múltiples investigaciones en las que se ha demostrado que cumple un papel importante en la respuesta contra la infección mediada por monocito-macrófago, la estimulación de la diferenciación de precursores de células mononucleares en células maduras y la inducción de la producción de citocinas anti inflamatorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$  (8).

En contexto, se ha evidenciado que la RvE1 y la vitamina D3 pueden atenuar la expresión del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (1,11), lo cual indica que podría activar vías de señalización celular similares, por lo que se sugiere que la vitamina D3 podría incrementar la producción de RvE1 o RvD1 y/o potenciar su acción.

Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la vitamina D3, en la inflamación mediada por la producción de anti inflamatorios naturales en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) extraídas de pacientes sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Etiopatogenia de la enfermedad periodontal**

#### **2.1.2. El proceso inflamatorio en la Periodontitis**

El periodonto es definido como aquellas estructuras que soportan y rodean al diente, está compuesto por cemento en la porción de la raíz, tejido óseo que rodea a la estructura radicular, un tejido conectivo altamente especializado denominado ligamento periodontal ubicado en la interfase del cemento y el hueso y por la unión dentogingival la cual está compuesta por la lámina propia que se encuentra rodeada por un epitelio. Cada uno de estos componentes del periodonto es una estructura altamente especializada que interactúa con las otras para mantener su propia integridad y homeostasis (16). Estos tejidos pueden ser afectados por diversas bacterias y sus productos, las cuales son capaces de interactuar con el epitelio que une al diente con la lámina propia, el epitelio de unión y penetrar al tejido conectivo subyacente llegando a producir un proceso inflamatorio que afecta a los tejidos del periodonto y conduce a la pérdida de la homeostasis lo que causa enfermedad (31). De esta manera podemos afirmar que la enfermedad periodontal incluye un grupo de lesiones

que afectan los tejidos circundantes que soportan al diente en sus alveolos (6), esta patología que incluye a la gingivitis y periodontitis constituye un verdadero problema de salud pública a nivel mundial (21) y Colombia no es la excepción, así lo demuestra el último Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB IV 2014) el cual revela los siguientes datos: personas mayores a 18 años presentan periodontitis en un 61,8% en sus diferentes grados de severidad, siendo más frecuente la periodontitis moderada la cual está presente en 43,46%, seguida por la periodontitis avanzada con una tasa igual al 38,20% (2). ERROR ES 10,62%

Diversos autores han descrito el desarrollo de la enfermedad periodontal con el objetivo de comprender de mejor manera cada una de las etapas del proceso inflamatorio en el periodonto, así *Page y Schroeder en 1976*, fueron los primeros en formular un concepto de la patogénesis de la enfermedad periodontal, ellos establecieron cuatro fases o estadios de la enfermedad; el mismo es un esquema que divide cada uno de estas etapas de acuerdo al tiempo, presencia de grupos celulares y características histológicas. Estas etapas serán descritas a continuación (38):

- **Lesión inicial:** Se observan una gran cantidad de leucocitos en el epitelio de unión, en el plexo sub epitelial se observan pequeñas cantidades de linfocitos y células plasmáticas, presencia de infiltrado inflamatorio agudo. La lesión inicial es localizada en la región del surco gingival, se observan vasos dilatados, presencia de polimorfonucleares y pocos linfocitos. El colágeno perivascular desaparece y se llena de proteínas de tipo inflamatorio.
- **Lesión temprana:** No hay una división clara con la lesión previa, esta comienza de 4 a 7 días después de la acumulación de placa bacteriana, las células linfoides ocupan casi el 75 % de la población infiltrada, la mayoría

de fibroblastos parecen estar alterados debido a que se observan fibroblastos 3 veces más grandes de lo normal, además se observa exudado inflamatorio agudo en el líquido crevicular, presencia de micro abscesos y una gran cantidad de neutrófilos y leucocitos como infiltrado mononuclear.

- **Lesión establecida:** Se distinguen una gran cantidad de células plasmáticas que afectan al tejido conectivo, esta lesión comienza de 2 a 3 semanas posterior a la acumulación de placa bacteriana, esta se caracteriza por la presencia predominante de células plasmáticas, además se observan clusters formados alrededor de los vasos sanguíneos y fibras de colágeno. Se evidencia cantidades significativas de inmunoglobulinas: IgG, IgM e IgA, adicionalmente se observan complejos antígeno anticuerpo. Esta lesión puede durar muchas semanas incluso mantenerse en este estadio.
- **Lesión avanzada:** Las características de este estadio se han descrito en relación a las características clínicas, estas incluyen la formación de una bolsa periodontal la cual muestra ulceración del epitelio de unión, fibrosis, destrucción del hueso alveolar y el ligamento periodontal. Esta lesión puede ocurrir en varias semanas o meses. Las características histológicas son similares a la lesión establecida, con infiltrado denso de células plasmáticas, linfocitos, macrófagos con formación de clusters de células plasmáticas, adicionalmente se observa tejido conectivo con zonas de fibrosis e intento de reparación de tejidos.

Varios años más tarde *Kornmann, Page y Tonetti 1999*, describieron características de la enfermedad periodontal de una manera más detallada, evidenciando la presencia de mediadores moleculares involucrados en este proceso patológico, dando un panorama más claro y complejo de las

alteraciones de los tejidos periodontales los cuales han sido sometidos a un proceso infeccioso inflamatorio (31,85). Estos autores dividieron en escenas el proceso patológico de la enfermedad periodontal para un mejor entendimiento del lector:

- **Escena 1:** Se caracteriza por la presencia de patógenos e inflamación de los tejidos pero no se observan manifestaciones clínicas. El epitelio de unión se encuentra intacto, se evidencian grandes cantidades de fluido crevicular y de saliva que proveen aglutininas y anticuerpos contra los microorganismos presentes, se observa activación del sistema del complemento y presencia de poblaciones de células B que se acumulan en la pared del surco gingival. Los leucocitos se caracterizan por la producción de PGE<sub>2</sub>, IL-1 y MMPs, también se evidencia histamina producida por los mastocitos. En cuanto al epitelio de unión posee una función protectora, presenta un recambio rápido y constante de las células evitando la colonización de los microorganismos.
- **Escena 2:** Se observa un incremento de 1 o 2 % de infiltrado celular, en el cual se observa un aproximado de 30 mil neutrófilos por minuto, también se evidencian linfocitos, células de Langerhans y células apoptóticas. En cuanto a los mediadores químicos se ha evidenciado la presencia de moléculas de adhesión como ICAM-1 y citocinas en grandes cantidades principalmente IL-8 y IL-1 $\beta$ .
- **Escena 3:** Se observa predominio de linfocitos T y B y células plasmáticas, también se evidencia la presencia de IL-1 $\beta$  y PGE-2, TNF- $\alpha$  e IFN-  $\gamma$ . En cuanto al fluido crevicular se observa la presencia de anticuerpos tipo IgG, además de la presencia de otros mediadores anti inflamatorios como TGF- $\beta$  y proteínas del complemento C3a y C5a.

- **Escena 4:** Se cree que el desafío microbiano altera de gran manera la respuesta del huésped causando la destrucción de los tejidos periodontales. Las células más afectadas podrían ser los neutrófilos, esta alteración es una de las causantes de la destrucción severa de los tejidos periodontales. El fenotipo celular en esta escena se observa por un predominio de células B y una disminución de fibroblastos productores de MMPs, además de la presencia de macrófagos.

La presencia de citocinas y otras moléculas proinflamatorias dan como resultado una modificación del metabolismo del tejido óseo, pérdida de la homeostasis del tejido conectivo y la alteración de la respuesta inmune del huésped generando así la destrucción de los tejidos periodontales.

Existen una variedad de moléculas relacionadas con el desarrollo de la enfermedad periodontal, entre las cuales figuran citocinas, quimiocinas proinflamatorias y metaloproteinasas de la matriz (MMPs); estas últimas son encargadas de la regulación y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, sin embargo en la enfermedad periodontal existe una alteración de la regulación en la producción y función de estas moléculas, lo anterior se ha descrito en múltiples ocasiones; por ejemplo *Hughes en 1995* mencionó que estos mediadores químicos son fundamentales en el proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal (39), adicionalmente la susceptibilidad del huésped en respuesta al biofilm bacteriano juegan un rol fundamental en este proceso. Todo esto será explicado a continuación (40).

Toda respuesta inflamatoria se caracteriza por la infiltración de células de defensa, entre las cuales se destacan los neutrófilos, macrófagos y linfocitos, los cuales son capaces de generar una alta concentración local de citocinas, eicosanoides y otros mediadores destructivos como metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (40).

Las citocinas son proteínas solubles que se unen a receptores específicos de células blanco y desencadenan cascadas de señalización intracelular, lo cual resulta en cambios fenotípicos y funcionales en las células alterando la regulación de diversos genes. Algunas de estas funciones han sido descritas anteriormente, por ejemplo *Dewhirst en 1985* mencionó que la IL-1 $\beta$  es la citocina que posee la mayor capacidad de activación osteoclástica, posteriormente Birkedal-Hansen en 1993 confirmó que la IL-1 $\beta$  es un potente inductor de la resorción ósea y degradación del tejido conectivo mediante la activación de MMPs las cuales degradan el colágeno. Se ha mencionado también que el TNF $\alpha$  y la PGE-2 son capaces de promover la destrucción del tejido óseo por actividad osteoclástica (39,41,42). Además se ha mencionado que dentro de la diversidad de citocinas y mediadores químicos producidos en la enfermedad periodontal las más representativas de este proceso son; IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, TNF- $\alpha$ , PGE-2, MMPs (9,31,40,42,7,44). Todas estas moléculas provocan un vínculo entre la inflamación y el proceso de destrucción ósea y de tejido blando, ya que también son capaces de actuar en la maduración de células precursoras de osteoclastos modulando el sistema RANK-RANKL y osteoprotegerina (OPG). Este sistema juega un rol esencial en la regulación del metabolismo óseo, debido a que es crítico para el desarrollo y función de osteoclastos (45,46). Muchas citocinas conducen al incremento de la expresión del RANKL, como la IL-1 $\beta$  la cual estimula la liberación de PGE-2 de células como fibroblastos y osteoblastos lo cual a su vez estimula la expresión de RANKL y la disminución de OPG, la cual es reguladora negativa del proceso ya que se une al RANKL evitando así que este se una con su receptor RANK en las células precursoras de osteoclastos (40). *Walsh* en 2005 mencionó que las acciones del RANKL, TNF- $\alpha$ , IL-1 y PGE-2 son las principales responsables de la resorción ósea en la enfermedad periodontal, sin embargo, existe un mecanismo que trata de contrarrestar esta destrucción, este tiene como objetivo devolver la homeostasis y promover los procesos reparativos y regenerativos en los tejidos,

dicho mecanismo es llevado a cabo por lo general por moléculas antiresortivas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ , (TGF- $\beta$ ), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidermoide (EGF), IL-12 y IL-18, entre otros (47,48).

Por otro lado las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), son un grupo importante de enzimas que pertenecen al grupo de las endopeptidasas, estas son dependientes de calcio y zinc para su funcionamiento y son producidas por una gran variedad de células del huésped entre ellas, leucocitos, fibroblastos, macrófagos, células epiteliales, osteoclastos, osteoblastos y células endoteliales. Estas proteasas están involucradas en un gran número de eventos fisiológicos como el desarrollo embriológico, involución del útero post-parto, remodelación de los tejidos y morfogénesis dental y de glándulas salivales. También han sido relacionadas con procesos patológicos como cáncer, artritis, aterosclerosis, diabetes, osteoporosis y enfermedad periodontal (18). Las MMPs juegan un rol crítico en la degradación de la matriz extracelular y membrana basal. Los neutrófilos y macrófagos son la mayor fuente de MMPs, además se ha observado que fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal así como queratinocitos, células endoteliales, osteoblastos y osteoclastos incrementan la producción en la enfermedad periodontal (46); además citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  entre otras, han demostrado cierta capacidad de incrementar la producción de MMPs. Al ser incrementadas estas moléculas son capaces de contribuir a la destrucción del tejido conectivo periodontal (18,47).

Para que se desencadene la liberación de todos estos mediadores químicos de la inflamación en grandes cantidades, las células deben estar sometidas a un estímulo constante, por lo general este está dado por los microorganismos que son capaces de formar un biofilm que desencadena dicha liberación; una de las estructuras responsables de que ocurra este proceso es el lipopolisacárido

bacteriano (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*; además existe evidencia de que los niveles de LPS de *Porphyromonas gingivalis* están incrementados hasta 4 veces a nivel sistémico en pacientes con periodontitis agresiva localizada (LAP) comparados con pacientes periodontalmente sanos, esto se debe a que la destrucción local es perpetuada por la presencia de mediadores pro inflamatorios activos como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e INF- $\gamma$  (24).

## 2.2. El origen infeccioso de las enfermedades periodontales

La enfermedad periodontal se inicia con la presencia de una comunidad compleja microbiana también llamada biofilm el cual suele tener cientos de especies bacterianas. Este biofilm a su vez puede expresar un mecanismo bastante sofisticado de comunicación intraespecie y/o entre especies bacterianas, el cual está basado en la expresión de diversos genes y vías de señalización; de esta manera facilitan una coordinada respuesta ante sus diversas necesidades (38,44,49). Estas especies bacterianas han sido clasificadas como colonizadores primarios o iniciales, los cuales son predominantemente **anaerobios** facultativos Gram positivos como *Streptococcus* y colonizadores tardíos que en su mayoría son anaerobios Gram negativos. *Socransky en 1998*, dividió estas bacterias en complejos asignados con un color el cual representa la relación que tiene con la enfermedad de esta manera: complejo amarillo: especies de *Streptococcus* orales, con capacidad para coagregarse entre especies del mismo género, complejo púrpura: *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula* (único gram-negativo y anaerobio entre los colonizadores primarios), complejo azul: todas las especies de *Actinomyces* excepto *A. viscosus*, complejo verde: bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos, complejo naranja: complejo puente. Primeros colonizadores secundarios. Todos anaerobios y mayormente gram-negativos (excepto *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus micros* y *Eubacterium nodatum*, que son gram-positivos) y por último el complejo rojo el cual es el más relacionado con el desarrollo de la enfermedad, dicho complejo está formado por

*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Bacteroides forsythus*, a este último actualmente se le asignó el nombre de *Tannerella forshytia* (50,44,86). Estas tres bacterias representan los tres principales periodonto patógenos.

### **2.2.1. *Porphyromonas gingivalis***

*Porphyromonas gingivalis* es una bacteria perteneciente al reino: Eubacterias, clase: Bacteriodes, género: *Porphyromonas* y especie: *gingivalis*. Anteriormente se llamaba *Bacteroides gingivalis* antes de su reclasificación como nuevo género, *Porphyromonas* (Nisengard y Newman, 1994) (25). Esta bacteria Gram-negativa, es un cocobacilo no-móvil, asacarolítico, mide aproximadamente 0.5 - 0.8  $\mu\text{m}$  x 1 - 3.5  $\mu\text{m}$ , no formador de esporas y anaerobio estricto. Tiene un requisito absoluto para el hierro en su crecimiento. El nombre *Porphyromonas* viene del adjetivo griego *porphyreos* que significa púrpura y el sustantivo griego *monas* que significa unidad, ya que forma colonias negro pigmentadas sobre agar sangre. Una serie de estudios han intentado clasificar a *P. gingivalis* en grupos serotípicos basados en antisueros que se unen a la cápsula, fimbrias o antígenos de la membrana externa de la bacteria. Dichos grupos son: (W5O, W83, HG184, A7A1-28 (ATCC 53977), ATCC 49417, HG1690, HG1691, 381, 2561 (ATCC 33277), FAY19m-1. 9-14K1) (25,27). *P. gingivalis* es el principal agente etiológico en el desarrollo y progresión de la periodontitis crónica, incluyendo la destrucción de tejidos blandos y óseo (25,51). Este colonizador secundario expresa muchos de factores de virulencia involucrados en la colonización de la placa subgingival y la modulación de respuestas inmunes por parte de las células del huésped. Con el fin de aumentar su supervivencia dentro del huésped, *P. gingivalis* es capaz de invadir localmente el tejido periodontal evitando la vigilancia inmunológica (25).

Es importante resaltar que la enfermedad periodontal no es el resultado de una única bacteria. Por lo tanto, *P. gingivalis* actúa en conjunto con otros microorganismos presentes en la microbiota oral para inducir una condición

inflamatoria dentro de la bolsa periodontal (25). El hábitat principal de *P. gingivalis* es el surco gingival de la cavidad oral humana. Se basa en la fermentación de aminoácidos para la producción de energía, es un colonizador secundario del biofilm bacteriano, se adhiere a colonizadores primarios como *Streptococcus gordonii* y *P. intermedia* (25).

Se ha demostrado que el número de *P. gingivalis* aumenta sustancialmente en sitios con periodontitis, donde puede alcanzar un porcentaje muy significativo dentro de la microbiota y es bajo o no detectable en sitios con salud periodontal o gingivitis (52,53). Se encuentra en aproximadamente el 40-100% de los pacientes adultos con periodontitis (25).

### **2.2.2. Factores de virulencia**

*P. gingivalis* produce un repertorio de factores de virulencia que pueden penetrar los tejidos gingivales y causar su destrucción directa o indirecta por inducción de inflamación. Los factores de virulencia pueden definirse como constituyentes o metabolitos de un organismo que son esenciales en varias etapas del ciclo de vida para causar daño en el huésped. La capacidad de un organismo de colonizar y evadir mecanismos de defensa anti-bacteriana del huésped, así como para producir sustancias que podrían iniciar la destrucción tisular son características integrales de un patógeno exitoso (25).

Para que un factor de virulencia ejerza sus efectos en un huésped, la bacteria debe encontrar primero un nicho ecológico apropiado dentro de ese huésped (o sitio de actividad), establecerse y eventualmente crecer y multiplicarse. Este establecimiento dentro de un sitio adecuado es esencial para la supervivencia de la bacteria y la producción de la actividad biológica máxima dentro de ese micro ambiente (52). La colonización de los tejidos del huésped por parte de *P. gingivalis* sólo podría ocurrir en presencia de factores de virulencia tales como

fimbrias, cápsula, lipopolisacárido (LPS), ácidos lipoteicoicos, hemaglutininas, gingipainas, proteínas y vesículas de la membrana externa.

### **2.2.3 Rol del lipopolisacárido como inductor de la enfermedad periodontal**

El lipopolisacárido es la macromolécula principal encontrada en la superficie externa de bacterias Gram-negativas. El sello de una bacteria Gram-negativa es su pared, que consta de dos membranas (una membrana interna y una externa) con un espacio periplásmico intermedio. Cada membrana es una bicapa lipídica. La membrana interna, que rodea el citoplasma, se compone de fosfolípidos. La membrana externa es una bicapa asimétrica que consiste en fosfolípidos y en el lípido dominio de anclaje del lipopolisacárido, el lípido A (26).

El lipopolisacárido es una gran molécula, con estimaciones de tamaño que van desde 10 kDa (52), consiste en un polisacárido distal o antígeno O (componente exterior del LPS, variable y altamente inmunogénico), un oligosacárido no repetitivo "core" (conecta el antígeno O al extremo hidrófobo de la molécula o lípido A) y un dominio hidrófobo conocido como lípido A o endotoxina (componente más interno del LPS) (25). El lípido A, es la región activa biológica del LPS que causa alteraciones del sistema inmune innato de los mamíferos al interactuar con receptores Toll 2 y 4 (25). En las bacterias Gram-negativas, el LPS juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular y estructural, así como un control de la entrada de moléculas hidrófobas y químicos tóxicos. De hecho, el plegado y la inserción de proteína de membrana no podrían tener lugar en ausencia de LPS. Conociendo estas importantes funciones del LPS, no es sorprendente afirmar que el lipopolisacárido es esencial para la supervivencia de casi todas las bacterias Gram-negativas (26).

Basado en su actividad biológica el LPS es un importante factor patogénico de muchas bacterias periodontopáticas. Varias investigaciones han revelado la capacidad de este componente de la membrana externa para activar las respuestas inflamatorias del huésped y alterar el proceso de remodelación ósea ya que es reconocido por el huésped humano como una molécula extraña, provocando una respuesta que está diseñada para la eliminación del intruso (25,26). Un posible papel del LPS en *P. gingivalis* es interrumpir la vigilancia innata del huésped al interferir con la distribución de los leucocitos en la zona de la colonización bacteriana. De hecho, el LPS de *P. gingivalis* es mal reconocido por la defensa innata del huésped comparado con el LPS de otras especies Gram-negativas como *Escherichia coli*. Aparte de eso, la capacidad de las células epiteliales gingivales para secretar IL-8 se altera, y la activación de neutrófilos, eosinófilos y basófilos se afecta. Este fenómeno, conocido como parálisis de quimiocinas resulta en la resistencia a la muerte causada por explosión oxidativa de los neutrófilos. En ausencia de una respuesta inmune innata eficaz, el número de bacterias podría aumentar notablemente, este aumento de la población bacteriana en la zona, además del fracaso del sistema de defensa del huésped para eliminarla es la etiología observada de la enfermedad periodontal. Además de inducir la síntesis de citocinas proinflamatorias por parte de diversas células. Fibroblastos gingivales humanos secretan citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 como respuesta a la acción del LPS. Se ha demostrado que el lípido A es el componente más activo en provocar la producción de IL-6 por parte de fibroblastos y macrófagos. El LPS de *P. gingivalis* inhibe la diferenciación osteoblástica de las células madre del ligamento periodontal que participan en la regeneración del tejido periodontal. Aparte de esto, el LPS estimula la producción de trombospondina-1, una proteína de la matriz extracelular secretada por monocitos humanos que estimula la migración de macrófagos y modula la respuesta inflamatoria del huésped (25,27).

Aunque el Lípido A puede encontrarse en todas las bacterias Gramnegativas, el de *P. gingivalis* es único ya que exhibe heterogeneidad estructural. Se han identificado cuatro subgrupos de lípido A estructuralmente distintos que pueden ser estimulantes, inertes o antagónicos con respecto a la interacción con los receptores Toll 4 (26). Ahora bien la interacción del LPS con los receptores Toll es un proceso complejo y de bastante interés dentro de la patogénesis de la enfermedad periodontal, el cual será descrito a continuación.

En los últimas décadas se han descubierto receptores capaces de desencadenar una serie de respuestas del huésped, a estos se los ha denominado receptores Toll (TLR). El descubrimiento de estos receptores fue a mediados del año 1990, esto demostró que los patógenos podían ser reconocidos por el sistema inmune innato de forma específica, este sistema era dependiente de unos receptores de reconocimiento codificados de manera específica. Se evidenció que estos receptores estaban involucrados en la detección de componentes moleculares de distintos patógenos, a los que se ha denominado; patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs).

Los PAMPs reconocidos por los (TLRs) incluyen; lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos estos son derivados de una amplia variedad de microorganismos, como bacterias, parásitos y hongos. Los TLRs han sido divididos en dos subgrupos, los cuales son dependientes de su localización a nivel celular y por sus ligandos en este caso los PAMPs. Los receptores Toll han sido clasificados con una numeración de acuerdo a su ligando y su ubicación ya sea esta intracelular o extracelular, estos son: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 los cuales son expresados sobre la superficie celular y reconocen principalmente componentes de la membrana de microorganismos, como lípidos, lipoproteínas y proteínas. Por otro lado, los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son expresados exclusivamente en vesículas intracelulares, así como vesículas del

retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y endolisosomas, además de ácidos nucleicos microbianos (54,55).

Uno de los receptores Toll de mayor importancia en nuestra área es el TLR4 debido a que es capaz de responder al lipopolisacárido bacteriano de *P. gingivalis*. Este depende de la formación de un homodímero con una proteína denominada MD2 (factor de diferenciación mieloide 2), estos dos forman un complejo sobre la superficie celular, que al estar en contacto con LPS desencadena una cascada de señalización dependiente de la proteína Myd88 a través de la cual se activa el factor de transcripción (NF- $\kappa$ B) , lo que genera el correspondiente proceso de transcripción y traducción de proteínas, en este caso de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  entre otras (54,56,57).

### **2.3 Agentes pro-resolutorios**

Publicaciones recientes han descrito un nuevo género denominado mediadores lipídicos endógenos relacionados con la resolución de la inflamación (17). Estos pertenecen a una gran familia de mediadores bioactivos, los cuales hacen parte de los llamados eicosanoides y a su vez estos están involucrados en todos los procesos fisiológicos incluyendo aquellos asociados con la defensa del huésped y la inflamación.

Estos mediadores lipídicos derivan del ácido araquidónico el cual es un precursor endógeno común para la biosíntesis de eicosanoides ubicados en la posición sn-2 de la membrana celular fosfolipídica y son activados a través de la acción de la enzima fosfolipasa A2, la cual produce ácido araquidónico; este es producido también por la mayoría de células fagocíticas del sistema inmune y es rápidamente metabolizado en varios mediadores lipídicos, como ciclooxigenasa, lipooxigenasa o epoxigenasa, para dar origen a prostaglandinas, leucotrienos y endoperoxidasas. Sin embargo estos mediadores lipídicos son solo sintetizados

cuando las células son estimuladas por situaciones como trauma y presencia de otras citocinas, por lo tanto su excesiva producción está íntimamente relacionada con la progresión de una inflamación aguda a una inflamación crónica así como ocurre en muchas enfermedades; sin embargo hoy se sabe que esto favorece la autolimitación de los procesos inflamatorios, lo cual implica la existencia de vías pro resolutorias y antiinflamatorias endógenas capaces de regular la respuesta inflamatoria del huésped (17).

Estos mediadores lipídicos se han clasificado de la siguiente manera: Lipoxinas, Maresinas, Protectinas y Resolvinas, todas derivadas de ácidos grasos de la dieta excepto las lipoxinas las cuales derivan directamente del ácido araquidónico. Las resolvinas son las moléculas de interés de este estudio y serán explicadas más adelante de manera detallada.

Las lipoxinas son producidas por ácidos grasos endógenos derivados del ácido araquidónico, estas poseen una gran capacidad antiinflamatoria y acción resolutoria (17). Estas moléculas son capaces de disminuir el infiltrado de células polimorfonucleares y estimular la función de macrófagos (fagocitosis de neutrófilos que ya cumplieron su función en el sitio de la lesión para facilitar el proceso de reparación de los tejidos) (32,37), actúan inhibiendo la producción de IL-6, IL-8, IL-1 y MMP-3 por parte de células epiteliales en respuesta al TNF- $\alpha$ . Adicionalmente se ha descrito su capacidad de estimular la producción de IL-4 la cual se ha demostrado que posee propiedades anti-angiogénicas en modelos *in vivo* (58). La síntesis de lipoxinas puede ser desencadenada por la aspirina (59).

El segundo grupo de moléculas son las Maresinas, llamadas mediadores de macrófagos encargadas de la resolución de la inflamación, estas son moléculas primordiales recientemente identificadas, producidas por macrófagos las cuales poseen funciones hemostáticas (17,33). La biosíntesis de estas moléculas esta mediada por la acción de la enzima 14-lipooxigenasa. La vía de la 14-lipooxigenasa

rápidamente convierte a este compuesto en una molécula bioactiva con capacidad funcional lo cual ocurre dentro de los macrófagos. Dentro de sus funciones podemos mencionar la estimulación de la eferocitosis inclusive más potente que la de la resolvina D1, también se ha descrito su potencial regenerativo (17). Adicionalmente *Serhan et al.* en el año 2012 observaron que la Maresina-1 reduce dramáticamente el dolor neuropático iniciado por la vincristina (fármaco usado como medicación en quimioterapias para diferentes tipos de leucemia), demostrando así que esta molécula posee un potente efecto analgésico, además de coadyuvar con la resolución y control de la inflamación local en modelos *in vivo* e *in vitro* (43).

La protectina D1-neuroprotectina o 10R, 17S- Ácido dihidroxidocosa-4Z, 7Z, 11E, 13, E, 15Z, 19Z- hexaenoico (10,17S-dihidroxidocosatieno) es un importante mediador lipídico en el sistema nervioso el cual es producido principalmente por células neurales, sin embargo, también se ha descrito que puede ser producida por células mononucleares de sangre periférica como células T helper 2 (Th2) (33). Esta molécula pertenece a una familia de productos bioactivos generados a partir del ácido decosahexaenoico (33,60,61). Dentro de sus funciones principales, se han descrito la capacidad antiinflamatoria y su potente rol en la protección neural, además de poseer funciones relacionadas con el bloqueo de la migración de células T *in vivo*, la reducción en la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , así como la inducción de apoptosis de células en desuso (33,62). Adicionalmente en el año 2006 se demostró que son capaces de atenuar la transmigración de neutrófilos hasta en un 50% en modelos *in vitro* (61). Esta molécula es generada durante la fase resolutoria de una respuesta inflamatoria aguda específica. Otros autores han mencionado que la protectina D1 interviene en la reparación de heridas, estimulación a la supervivencia de células neurales y supresión de la neurotoxicidad (61,60).

### 2.3.1 Resolvina E1

Las resolvinas, incluyen la resolvina D1 (RvD1 7S,8R,17S-trihidroxi-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z- ácido decosahexaenóico) y las resolvinas E1 y E2 (5S,12R, 18R-trihidroxi-6Z,8E,10E,14Z,16E-ácido eicosapentaenóico, EPA) (37). Estas moléculas son miembros de una familia de mediadores lipídicos que controlan la magnitud y duración de los procesos inflamatorios (63).

La resolvina E1 (RvE1), como ya se mencionó, es derivada de ácidos grasos dietarios y es biosintetizada de la siguiente manera; las células productoras convierten EPA en 18R- ácido hidroxiperoxieicosapentaenoico (18R-HPEPE) compuesto que posteriormente es transformado en 18R-ácido hidroxieicosapentaenoico (18R-HEPE) el cual es rápidamente consolidado como resolvina, mediante un proceso enzimático mediado por la lipooxigenasa-5; dicho proceso ha sido identificado principalmente en neutrófilos (30).

Por otra parte, existe evidencia muy interesante acerca de la función de ciertas drogas moduladoras de la respuesta del huésped en la producción de resolvinas y otros proresolutorios, por acción sobre los substratos a partir de los cuales son producidas. Estudios recientes han mostrado que EPA y DHA (omega 3 PUFAS), en presencia de aspirina, sufren un proceso metabólico transcelular en células humanas, produciendo una variedad de potentes antiinflamatorios, proresolutorios, mediadores lipídicos, llamados 18S- resolvinas. La aspirina es crítica en el aumento de la actividad de estos esteroisómeros, a través de sus acciones que modifican la actividad y especificidad de la ciclooxigenasa 2 (10).

La función de la RvE1 está vinculada con la interacción de diferentes receptores transmembranales ubicados en macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y polimorfonucleares. Esta interacción desencadena una vía de señalización cascada abajo dentro de la célula (64).

Los principales receptores vinculados con esta molécula incluyen el receptor de proteína G acoplada (GPCRs) el cual ha sido pobremente descrito para RvE1 y actualmente está más vinculado con la resolvina D1, el ChemR23, el cual depende de la fosforilación del Akt activando una vía de señalización cascada abajo que a su vez activa al complejo enzimático fosfatidilinositol 3 kinasa PI3K/Akt y Raf/ERK, lo cual inhibe la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en células polimorfonucleares humanas. Por último, está el receptor LTB4 el cual al unirse con la RvE1 inhibe la activación de adenilato-ciclasa, complejo enzimático relacionado con la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en células polimorfonucleares (64).

La RvE1 posee un gran número de funciones, muchas de las cuales comparte con otras moléculas homólogas como RvD1; algunas de estas funciones son: reducir la respuesta pro-inflamatoria de células microgliales estimuladas con LPS bacteriano bloqueando la producción y liberación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS, así como la inhibición del factor de transcripción de NF- $\kappa$ B (59,65). También contribuye a la regulación del proceso inflamatorio, inhibiendo la transmigración de polimorfonucleares neutrófilos lo cual ha sido demostrado en modelos *in vivo* (61,30), donde se evidencia que detienen el reclutamiento de neutrófilos, conduciéndolos a la apoptosis y al mismo tiempo atraen monocitos al sitio de la lesión para fagocitar a estos neutrófilos sin causar o contribuir al daño a los tejidos, dado que este tipo de fagocitosis no conduce a la producción de IL-8 o TNF- $\alpha$  (28,66,67).

Las principales células involucradas en la producción de RvE1 son monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos T y células de la microglía (17,33,34).

### 2.3.2. Papel de la RvE1 en enfermedad periodontal

Por otro lado, partiendo de la hipótesis de que la suplementación con Omega 3, tiene el potencial de inducir resultados clínicamente medibles y de interrumpir farmacológicamente la cascada de la inflamación, ejerciendo un efecto protector a través de la producción de mediadores endógenos (resolvinas y docosatrienos), particularmente cuando dichos PUFAS son ingeridos concomitantemente con aspirina, *El-Sharkawy et al.* reportan un estudio realizado en pacientes con periodontitis agresiva sometidos a terapia periodontal, basada en raspaje y alisado radicular, junto con la aplicación en bajas dosis de aspirina y la prescripción de suplementos dietéticos ricos en omega 3 (PUFAs). Observaron una mayor ganancia en cuanto al nivel de inserción clínico y una disminución en la destrucción de los tejidos periodontales en comparación con los grupos de control (10,83).

*Hasturk, et al.*, realizaron un estudio en humanos diagnosticados con periodontitis agresiva localizada pareados por edad, raza y sexo, en los cuales se midió en neutrófilos de sangre periférica previamente estimulados con FMLP (péptido quimiotáctico bacteriano), la producción de anión superóxido en presencia de RvE1; el estudio demostró que la RvE1 disminuye más del 90% de la generación de anión superóxido de los neutrófilos. Estos hallazgos son importantes debido a que actualmente se sabe que la inflamación local juega un rol crítico a nivel sistémico, ya que existe incremento en la producción de mediadores pro inflamatorios tanto en periodontitis crónica como agresiva, así como en muchas enfermedades sistémicas incluyendo, aterosclerosis, asma, peritonitis, y enfermedad cardiovascular, (63,24,29,93). Además en este estudio se demostró la capacidad de la RvE1 a nivel tisular de inhibir la diferenciación y crecimiento de osteoclastos hasta en un 95% usando conejos neozelandeses. A los animales les fue inducida la enfermedad periodontal mediante el uso de ligaduras y

aplicaciones locales de *Porphyromonas gingivalis*. Este descubrimiento puede dar un nuevo enfoque para el tratamiento de la periodontitis agresiva y enfermedades óseas mediadas por la presencia de osteoclastos (63).

Así también en 2010 *Fredman, et al.*, en un estudio en el cual usaron células polimorfomucleares obtenidas de sujetos con periodontitis agresiva observaron que en presencia de resolvina E1 y lipoxina A4 disminuyó la producción de anión superóxido, el cual posee capacidad destructiva en los tejidos (11).

Un estudio reciente realizado en ratas a las cuales se les indujo periodontitis con ligaduras, demostró que la RvE1 presenta una potente actividad anti osteoclástica y media un cambio aparente en la microbiota subgingival, en la cual se observa mayor presencia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, los cuales no son característicos en el desarrollo de la periodontitis; al parecer la RvE1 genera un medio ambiente menos propicio para las bacterias del biofilm subgingival (94).

## **2.4 Vitamina D3**

Diversos estudios han mencionado que existe otra molécula fuertemente vinculada con la inmunomodulación del huésped, la 1,25 dihidroxivitamina D3 (1,25 (OH) 2D3), este es el metabolito activo de la vitamina D. La vitamina D3 es una hormona pleiotrópica que regula la homeostasis del calcio en el organismo, sin embargo también le han sido descritas otras funciones a nivel sistémico como la inhibición de la hormona paratiroidea, promoción de la secreción de insulina, estimulación de la proliferación y la diferenciación celular y también se ha descrito que posee un rol importante en la respuesta inmune del huésped (9). Se han asociado niveles alterados de vitamina D3, con una mayor susceptibilidad a trastornos y enfermedades inflamatorias (9,71).

La deficiencia/insuficiencia de calcio y vitamina D son hoy en día condiciones "cotidianas" en el mundo occidental debido a costumbres y estilos de vida. Alteraciones del tejido conectivo y de los huesos que culminan en raquitismo, debilidad muscular, dolores generalizados, alteraciones inmunológicas y fatiga crónica inexplicable, combinada con trastornos funcionales, se describen como síndromes dependientes de vitamina D. Siempre que la 25(OH)D3 sea abundante, la producción local de 1,25(OH)2D3 se dará según necesidades celulares especiales. Sin embargo, en el caso de reservas bajas de 25(OH)D3, dicha producción local en los tejidos disminuye y altera la homeostasis tisular, generando especies reactivas de oxígeno y producción de óxido nítrico, especialmente en regiones corporales metabólicamente activas (20,72).

Se supone que la deficiencia de calcio en todo el cuerpo resulta de la deficiencia de vitamina D; cuando los niveles de 25 (OH) D3 son menores a 40 ng / ml (100 nmol / L) se compromete la absorción adecuada del calcio. Debido a esta deficiencia se activan mecanismos compensatorios como la secreción de PTH, por ejemplo y otros mecanismos en los huesos que pueden contribuir a la proinflamación incluso cuando las reservas de vitamina D vuelven a la normalidad (72).

La mayor fuente de vitamina D3 proviene de la exposición de la piel a la acción catalítica de los rayos UV, que inducen una reacción fotoquímica convirtiendo el 7 deihidroxi-colesterol en secosteroide vitamina D3 (colecalfiferol). Sin embargo para que se logre la forma activa debe ocurrir primero un proceso de hidroxilación. La vitamina D3 es hidroxilada en la posición 25 por hidroxilasas hepáticas de vitamina D3 (CYP2R1) a hidroxivitamina D-25 (hidroxicolecalciferol- 25) la forma principal de vitamina D en la circulación (73,74).

La vitamina D3 como molécula bioactiva es capaz de ejercer una acción inhibitoria sobre el sistema inmune, suprime la proliferación de linfocitos y producción de inmunoglobulinas, retarda la diferenciación de células B hacia células plasmáticas,

inhibe la proliferación de células T, en particular las células Th1 principales productoras de IFN- $\gamma$  y activadoras de macrófagos. Estas acciones previenen la futura presentación antigénica, así como el reclutamiento y proliferación de linfocitos T (papel de IFN- $\gamma$ ), (función de IL-2). En contraste la producción de IL-4, IL-5 y IL-10 puede verse incrementada desplazando el equilibrio a un fenotipo de células Th 2 (75).

La 1,25 (OH) 2D3 se une a una proteína receptora, llamada Receptor de vitamina D (VDR). Este complejo actúa como factor de transcripción y regula la expresión de una gran variedad de genes.

Otros estudios mostraron que la acción de la vitamina D3 tiene relación con la supresión de la vía de señalización NF- $\kappa$ B en células T, monocitos y macrófagos (9,78), mecanismo reportado también para la RvE1 (32). NF- $\kappa$ B es conocido como un factor de transcripción que promueve la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (79).

La activación de NF- $\kappa$ B es un mecanismo de defensa esencial en el sistema inmune innato que altera la síntesis de proteínas, expresión genética antes durante y después de la transcripción, así como crecimiento, diferenciación y apoptosis celular. La activación de NF- $\kappa$ B induce la producción de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido y óxido nítrico con la generación resultante de peroxinitrito, lo que conduce a alteración de estructuras y funciones celulares. 1,25 (OH) 2D3 regula la respuesta al estrés celular de cualquier tipo como calor, inflamación, estrés oxidativo e IFN y el metabolito activo 1,25 (OH) 2D3 en sí mismo, es capaz de inducir proteínas de choque térmico 70 (Hsp-70), llamadas proteínas intracelulares de unión a vitamina D (IDBP). El complejo de Hsp-70 con 25OHD3 o 1,25 (OH) 2D3 interactúa con el receptor TLR2 lo que conduce a la activación de NF- $\kappa$ B como parte de un mecanismo de defensa contra el estrés celular. Por lo tanto, la vitamina D mejora

la respuesta temprana al estrés. Sin embargo, la activación de NF- $\kappa$ B también induce la expresión génica de CYP27B1, promoviendo así la síntesis aumentada de 1,25 (OH) 2D3 que inhibe la expresión génica de múltiples productos de la activación de NF- $\kappa$ B, como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, iNOS y TNF- $\alpha$  y regula negativamente la activación de NF- $\kappa$ B directamente por inhibición de varias proteínas relacionadas con este factor. El resultado neto es una inhibición potente de respuestas que limitarán la inflamación crónica. Por lo tanto, 1,25 (OH) 2D3 es capaz de suprimir respuestas tardías proinflamatorias al estrés (72,84).

1,25 (OH) 2D3 induce la regulación inmune y la tolerancia. 1,25 (OH) 2D3 contrarresta la inflamación a través de muchos mecanismos inmunes indirectos. Por ejemplo, inhibe la I-12 por parte de los macrófagos y células dendríticas mieloides (CDm) que dan como resultado una maduración inmune con inhibición posterior de respuestas autoinmunes. Además, 1,25 (OH) 2D3 mitiga la respuesta inmune en la presentación del antígeno y las células T al influir diferencialmente en la expresión génica de ligandos como citocinas, quimiocinas, múltiples receptores inmunes y proteínas de membrana coestimuladoras, receptores de MHC II y otras proteínas inmuno-reguladoras. Además, 1,25 (OH) 2D3 inhibe en las células T la expresión del ligando Fas (CD95L) lo cual es una señal coestimuladora para la maduración inmune y la polarización en células CD8 +, células Th1 y CDm (72).

1,25 (OH) 2D3 participa en la defensa innata contra microorganismos. 1,25 (OH) 2D3 aumenta la maduración de monocitos en macrófagos, así como la captación de antígenos por células presentadoras, expresión de citocinas y NADPH-oxidasa, aumentando así la eliminación de patógenos. Además, 1,25 (OH) 2D3 mejora la síntesis de catelicidina, un agente con potencia antimicrobiana inherente contra virus, bacterias y hongos, secretada localmente en células presentadoras de antígeno y queratinocitos.

En resumen, aumentar los niveles de 1,25 (OH) 2D3 después de una respuesta inicial al estrés inflamatorio o inespecífico puede reducir las respuestas inmunes proinflamatorias mediante mecanismos específicos:

(1) Disminución de la actividad del NF- $\kappa$ B

(2) Reducción de la inducción de iNOS

(3) Inhibición de IL-6

(4) Inhibición de IL-2

(5) Disminución de IFN- $\gamma$

(6) Disminución de la síntesis de IL-12

#### **2.4.1 VitD3 y enfermedad periodontal**

Estudios han demostrado una relación inversa entre indicadores de enfermedad periodontal y niveles de vitamina D; se ha asociado la ingesta de >800 IU/día de vitamina D con menores probabilidades de enfermedad periodontal y menor pérdida de hueso alveolar de moderada a severa en comparación con una ingesta de <400 UI / día. También fue observado que bajos niveles séricos de vitamina D afectan adversamente el proceso de cicatrización después de procedimientos quirúrgicos. Concentraciones séricas de vitamina D >20 ng / ml antes de la cirugía periodontal en pacientes con periodontitis crónica severa fueron asociadas con mejores ganancias de nivel de inserción clínico y reducción de profundidad de sondaje a los 12 meses de la cirugía. En otras observaciones se asoció un nivel más alto de vitamina D sérica en pacientes periodontales con pérdidas menos graves de la inserción clínica. (76).

Así también se conoce que la vitamina D3 puede modificar el curso de la periodontitis debido a sus propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas o a

través de sus efectos sobre el metabolismo óseo. La producción local de 1,25 (OH) 2D por varias células inmunes es un factor clave en la regulación de la respuesta inmune innata y adquirida en los sitios locales de inflamación. Los resultados de estudios *in vitro* y experimentos *in vivo* han mostrado la capacidad de 1,25 (OH) 2D3 para inhibir la producción de citocinas pro inflamatorias como IL – 1 $\beta$  y TNF - $\alpha$  por parte de monocitos, ambas citocinas juegan un papel importante en la patogénesis de la periodontitis al afectar la cicatrización de heridas e inducir la reabsorción ósea (76,84). También se ha mostrado que células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3, son más productoras de citocinas anti inflamatorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$  (77).

Los resultados de modelos experimentales han confirmado el papel de la vitamina D como modificador de la respuesta inmune en el periodonto. Se ha encontrado que suplementos de vitamina D reducen la pérdida de hueso alveolar, los niveles séricos de TNF- $\alpha$  y la expresión de NF- $\kappa$ B en el epitelio gingival de ratones diabéticos. Así también se evidenció que existe un incremento en la expresión de VDR y reducción en la de TLR-4 en el epitelio gingival (75,76).

Hoy en día existe muy poca evidencia que relacione la función de Vitamina D3 y RvE1, en su capacidad de potenciar la respuesta antiinflamatoria a nivel de las células del sistema inmune.

En un estudio usando la vitamina D3 y la RvD1 de manera conjunta como moduladores inmunes en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Alzheimer, se concluyó que estas dos moléculas inducen el equilibrio de la inflamación e incrementan la fagocitosis de las placas  $\beta$ -Amieloides por macrófagos. También se observó un descenso global en la regulación de genes inflamatorios y autoinmunes. Tanto la RvD1 como la 1,25 OH D3 inhibieron la secreción de citocinas como IL1- $\alpha$ , IL6, IL10, GMCSF y TNF- $\alpha$ . Se sugirió que una ingesta baja de vitamina D3 y de ácido docosahexaenoico

y / o una producción anabólica deficiente de 1,25OHD3 / RvD1 podrían contribuir a la aparición y patología de la Enfermedad de Alzheimer. Este estudio *in vitro* demostró la capacidad de 1,25OHD3 y RvD1 para equilibrar la fagocitosis de  $\beta$  amiloide y la inflamación y se sugirió que la suplementación con vitamina D3 y DHA podría ser efectiva contra el deterioro cognitivo en sujetos sanos y mejoraría el estado de los pacientes con dicha patología (37).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de la vitamina D3, en la inflamación mediada por la producción de anti inflamatorios naturales en células mononucleares de sangre periférica extraídas de pacientes sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.

##### **3.1.1 Objetivos específicos**

- Comparar la producción de Resolvina E1 (RvE1) por células mononucleares de sangre periférica de adultos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal estimuladas con LPS de *Porphyromonas gingivalis*.
- Determinar la diferencia en la producción de Resolvina E1 (RvE1) por células mononucleares de sangre periférica de adultos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal estimuladas con LPS de *Porphyromonas gingivalis* en ausencia y presencia de vitamina D3.

### **3.2 Población y Muestra**

La población para el estudio la constituyeron los pacientes que asistieron a la clínica del posgrado de periodoncia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, durante el primer semestre de 2017, con diagnóstico de salud periodontal/ gingivitis y periodontitis crónica severa generalizada. Los pacientes con la enfermedad debían ser pareados en edad y sexo con sus correspondientes controles.

### **3.3 Criterios de inclusión y exclusión**

Previa firma del consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia, se incluyeron 8 adultos voluntarios, sistémicamente sanos al interrogatorio, entre 30 y 50 años de edad, de los cuales 4 pacientes tuvieron diagnóstico de periodontitis crónica y 4 pacientes se encontraban periodontalmente sanos o con gingivitis. Se excluyeron pacientes que se encontraban en estado de inmunosupresión, con enfermedad autoinmune, embarazo, que hubieran recibido tratamiento periodontal o con terapia antibiótica en los últimos 6 meses.

Para determinar los parámetros de salud o enfermedad, los pacientes fueron sometidos a un examen clínico periodontal, el cual constó de las siguientes pruebas: índice de placa bacteriana tomando en cuenta el método O'Leary, índice gingival de Lóe y Silness, porcentaje de sitios con sangrado al sondaje, profundidad al sondaje medida en milímetros, mediciones del nivel de inserción clínico, los cuales fueron realizados con una sonda periodontal tipo Carolina del Norte (UNC-15). Los pacientes que presentaron bolsas periodontales mayores a 4 mm y en quienes a la vez fue identificada una pérdida del nivel de inserción clínico igual o mayor a 1mm fueron sometidos a un examen radiográfico, el cual constó de un juego periapical, esto con el fin de determinar el porcentaje de

pérdida ósea. Posteriormente los pacientes fueron clasificados de acuerdo al diagnóstico establecido por el Workshop de Periodoncia realizado por la American Academy of Periodontology en 1999 (79,80).

### **3.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica**

Se obtuvo una muestra de sangre total en dos tubos heparinizados cada uno de 4 ml de sangre, posteriormente se separaron las células mononucleares de sangre periférica mediante gradiente de densidad usando Ficoll®-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences corp, Piscataway, NJ, USA). Las células fueron lavadas y resuspendidas en RPMI suplementado con antibióticos, 20 mM HEPES más 10% de suero fetal bovino (medio completo).

La muestra se centrifugó a 1400 rpm/10 minutos, posteriormente se retiró el plasma el cual fue almacenado a -20°C. Las muestras de los dos tubos de sangre obtenidos de cada paciente se unificaron en 1 tubo Falcon de 15 ml; se realizó la dilución de la sangre con PBS hasta completar 7ml (3ml de sangre/4ml de PBS).

Posteriormente se adicionaron los 7 ml de sangre diluida a un tubo Falcon que contenía 3 ml de Ficoll®-Hypaque, el cual fue posteriormente centrifugado nuevamente a 1400 x g por 30 minutos y se retiró el anillo de células mononucleares. Se depositaron las células mononucleares en un tubo Falcon y se adicionó RPMI hasta completar 10 ml, luego se centrifugó a 1400 rpm/10 minutos (Centrifuga Beckman Coulter Allegra® X-15R). Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células adicionando RPMI hasta completar 5 ml. Finalmente se realizó dilución al medio de la suspensión celular con azul de tripan para realizar el conteo de las CMSP en la cámara de Neubauer. Las células fueron lavadas con medio completo y resuspendidas a 1 millón/ml según el número de células obtenido. Para el cultivo celular, se depositaron  $1 \times 10^6$  de

células /ml en placas de cultivo de 24 pozos con 4 condiciones por cada muestra de los pacientes.

Para evaluar el papel del LPS en la producción de RvE1, las células fueron estimuladas con LPS de *Porphyromonas gingivalis* (1µg/ml) a concentración óptima previa estandarización (81). Para evaluar el efecto de la vitamina D3 en la producción de RvE1, esta fue adicionada a concentración de 100nM y como control negativo se usó etanol. Por último a uno de los pozos se le adicionó vitamina D3 y LPS de *Porphyromonas gingivalis* (1µg/ml) (81).

Se cultivaron las células a 37°C durante 24 horas y 5% CO<sub>2</sub>. Cumplido el tiempo estipulado, los sobrenadantes fueron recolectados, congelados y conservados a -20°C hasta su uso.

### **3.5 Medición de Resolvina E1**

La resolvina E1 se midió en los sobrenadantes de cultivo por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante usando un estuche comercial My biosource (MBS269927, San Diego, CA 92195-3308 USA). se añadieron 100µl de la curva estándar previamente preparada o de las muestras de cada una de las condiciones en pozos ya cubiertos con anticuerpo de captura antiresolvina E1. Se sellaron los pozos y se incubaron a 37°C por 90 minutos, posteriormente se siguió con el proceso de lavado con solución buffer y se adicionaron 100µl de anti-resolvina E1 acoplado a biotina (anticuerpo de detección) a cada uno de los pozos, estos sellaron y se incubaron a 37°C por 60 minutos, una vez cumplido el tiempo, se lavaron los pozos con una solución buffer y se incubaron con 100ul de estreptavidina peroxidasa por 30 min a 37°C. Finalmente se realizó el lavado de los pozos y se reveló el ELISA, adicionando 100 µl de solución previamente preparada de TMB + peróxido de hidrógeno. Se adicionaron 100µl ácido sulfúrico para parar la reacción. La placa fue leída en espectrofotómetro a una longitud de onda 450 nm

La curva del ELISA se encontró entre 20ng/ml y 0,312ng/ml, está última concentración, límite de detección del ELISA. A cada muestra se le realizó una dilución previa según experimentos de estandarización.

### **3.6 Análisis estadístico**

Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron mediante pruebas no paramétricas usando el software Graphpad prism 5.0. Una  $P \leq 0.05$  se consideró significativa. Para todas las comparaciones se usó la prueba de Mann Whitney.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Evaluación clínica de los pacientes**

#### **4.1.1 Análisis de parámetros periodontales**

Se evaluaron cuatro pacientes sanos con edad promedio de 36 años de edad y cuatro pacientes con periodontitis crónica con edad promedio de 36,4 años de edad. Todos los pacientes que participaron en este estudio fueron mujeres, sistémicamente sanas al interrogatorio.

El índice de placa bacteriana (O'Leary) mostró un porcentaje de 33% en los pacientes sanos/gingivitis comparado con 69,3% de los pacientes con periodontitis crónica, el índice gingival de Lóe y Silness, mostró para los pacientes sanos un promedio de 1 y de 3 para los pacientes sanos y con periodontitis crónica respectivamente. El porcentaje de sangrado para los pacientes sanos fue de 46% y de 93% para pacientes comprometidos periodontalmente (88,89).

En cuanto a la profundidad al sondaje y el nivel de inserción clínica, el promedio obtenido para los pacientes sanos fue de 2,3 mm y 0,9 mm respectivamente, comparado con los pacientes con periodontitis crónica en los cuales fue de 5 mm y 4,25 mm respectivamente.

---

<b>Diagnóstico</b>	<b>IPB (O'Leary) %</b>	<b>IG (Lóe y Silness)</b>	<b>ISG %</b>	<b>PB mm</b>	<b>NIC mm</b>	<b>Ep</b>
<b>Periodontalmente sanos</b>	33%	1	46%	2,3	5	36
<b>Periodontitis crónica</b>	69,3%	3	93%	3	4,25	36,4

---

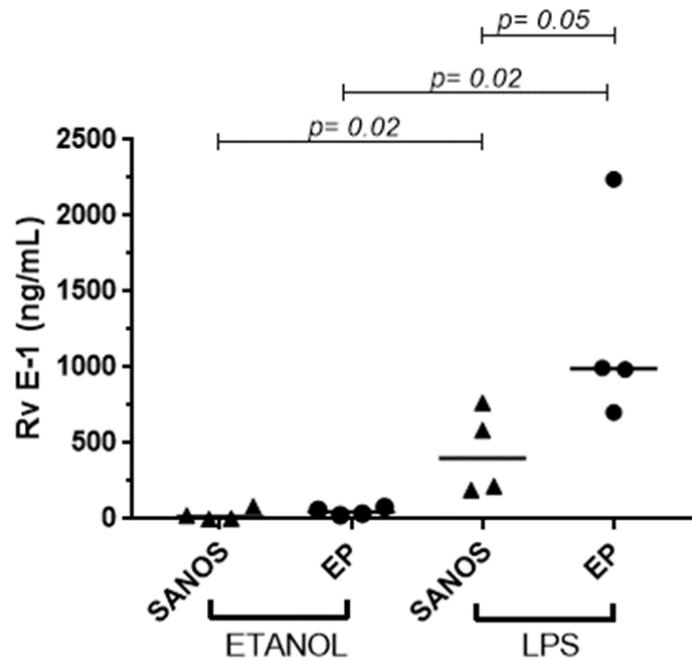
Tabla 1. Parámetros clínicos periodontales: Se observan los promedios de las características clínicas periodontales; IPN: Índice de placa bacteriana, IG: Índice gingival, ISG: Índice de sangrado gingival, PB: Profundidad al sondaje, NIC: Nivel de inserción clínica, Ep: Edad de los pacientes.

## 4.2 Análisis de la producción de resolvina

Con relación al papel del LPS de *P. gingivalis* sobre células mononucleares de sangre periférica obtenidas de pacientes sanos y con periodontitis crónica, en la producción de RvE1 (gráfica 1), los resultados muestran que se detectó un incremento estadísticamente significativo ( $P=0.02$ ) en la producción de RvE1 en los dos grupos experimentales presencia del LPS al ser comparados en ausencia del estímulo (control). (Mediana de 401,5ng/ml con rangos de (191,7 - 765 ng/ml) vs 15ng/ml (0,156 – 85ng/ml), respectivamente.

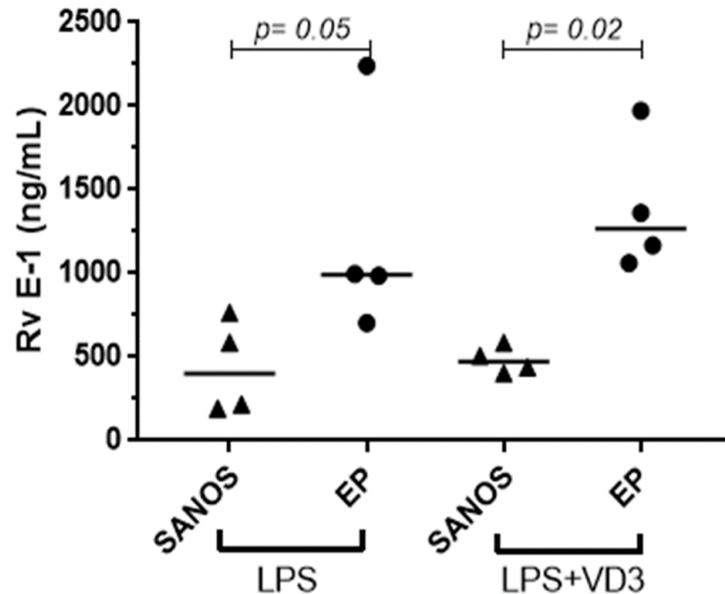
Para los pacientes con Periodontitis crónica los valores de producción de RvE1 en presencia del activador tuvieron una mediana de 991,45 ng/ml con rangos (703,2 - 2240,9ng/ml) vs 48,9 ng/ml (26,4 – 80,5 ng/ml) en el experimento de control sin activar (ETOH) con un incremento igualmente significativo,  $P= 0,02$ .

Al comparar la producción de RvE1 por CMSP entre los pacientes periodontalmente sanos y los pacientes con periodontitis en presencia de LPS, la diferencia también fue estadísticamente significativa,  $P= 0,05$ , detectándose un incremento en las CMSP de los pacientes.



**Gráfica 1:** Efecto de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con LPS en la producción de Resolvin E1. La gráfica representa cuatro experimentos independientes. Las diferencias se determinaron con la prueba de Mann-Whitney. El valor de  $p \leq 0.05$  se consideró significativo.

Respecto al efecto de la VD3 sobre CMSP obtenidas de pacientes sanos/gingivitis y con periodontitis crónica, activadas con LPS de *P. gingivalis*, en la producción de RvE1 (gráfica 2), los resultados muestran que no existieron diferencias significativas al comparar el grupo de pacientes sanos/gingivitis y el grupo de pacientes con periodontitis crónica. Sin embargo, existe una tendencia al aumento en la producción de resolvin E1 al adicionar VD3 a CMSP estimuladas con LPS en ambos grupos de pacientes, 1.2 veces para los pacientes sanos y 1.3 veces para los pacientes con periodontitis crónica.

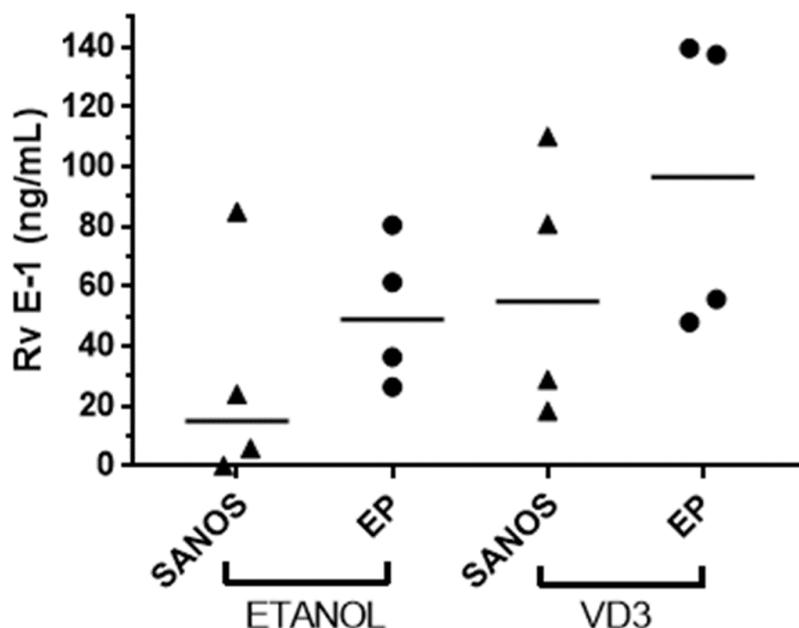


**Gráfica 2:** Efecto de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con LPS y con LPS + VITAMINA D3 en la producción de Resolvina E1. La gráfica representa cuatro experimentos independientes. Las diferencias se determinaron con la prueba de Mann-Whitney. El valor de  $p \leq 0.05$  se consideró significativo.

Con relación al papel de la VD3 sobre células mononucleares de sangre periférica obtenidas de pacientes sanos y con periodontitis crónica, en la producción de RvE1, sin ningún otro tipo de activación, en la (gráfica 3), los resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre la mediana de producción de RvE1 en los pacientes sanos/gingivitis al agregar la VD3 en comparación con su respectivo control. Sin embargo, se detecta una tendencia a aumentar la producción de resolvina al adicionar VD3. Mediana de 54,9 ng/ml (18,4 - 110,2 ng/ml), para las CMSP tratadas con VD3 vs 15ng/ml (0,156 - 85ng/ml) para las CMSP tratadas con el control (ETOH).

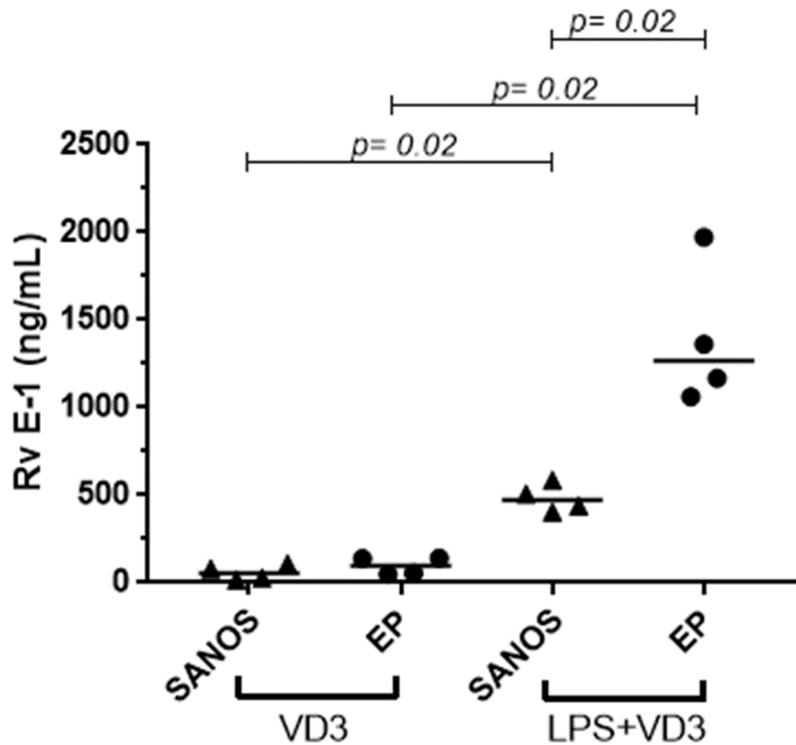
Para los pacientes con Periodontitis crónica tampoco se detectó un incremento significativo. Valores de producción de RvE1 en presencia de VD3 de 96,65 ng/ml (48,1 - 139,7 ng/ml) vs 48,9 ng/ml (26,4 – 80,5 ng/ml) en el experimento de control (ETOH).

Al comparar los niveles de resolvin E1 de CMSP tratadas con VD3 entre pacientes sanos/gingivitis y pacientes con periodontitis crónica no se detectaron diferencias.



**Gráfica 3:** Efecto de la VD3 en la producción de RvE-1 en pacientes con enfermedad periodontal. La gráfica representa cuatro experimentos independientes. Mediante la prueba de Mann-Whitney se determinó que no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Para corroborar el papel del LPS en el aumento de la producción de RvE1 se comparó la producción del proresolutorio solamente en presencia de VitD3 vs VitD3 +LPS. (Gráfica 4) En ambos grupos de pacientes se detectó un aumento significativo ( $P= 0,02$ ), al comparar CMSP tratadas solo con VD3 respecto a las tratadas con LPS + VD3. Mediana de 54,9 ng/ml (18,4 - 110,2 ng/ml) vs 473,35 ng/ml (402,3 – 586,2 ng/ml) para el grupo de pacientes sanos y mediana de 96,65 ng/ml (48,1 -139,7 ng/ml) vs 1264,75 ng/ml (1060,8 – 1971,8 ng/ml) para los pacientes con periodontitis crónica.



**Gráfica 4:** Efecto de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica con VD3 y LPS (*P. gingivalis*)+ VD3 en la producción de RvE-1 en pacientes con enfermedad periodontal. La gráfica representa cuatro experimentos independientes. Las diferencias se determinaron con la prueba de Mann-Whitney. El valor de  $p \leq 0.05$  se consideró significativo.

## **5. DISCUSION**

La importancia que tiene hoy en día la ocurrencia de inflamación sistémica en respuesta a enfermedades inflamatorias locales como la periodontitis, es la base para explicar las relaciones existentes entre infecciones de la cavidad oral y complicaciones en enfermedades inflamatorias de otros sistemas, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes y artritis reumatoide principalmente. En el presente trabajo se evaluó la respuesta a nivel sistémico medida por producción de RvE1 en pacientes sanos periodontalmente y con periodontitis, para a partir de ella evaluar si la adición de VD3 a cultivos de CMSP potencializaba la producción de este proresolutorio, en presencia de activación con LPS de *P. gingivalis*.

Se encontró que la producción basal de resolvina por CMSP, aunque tiende a ser mayor en el paciente con periodontitis que en el paciente periodontalmente sano /gingivitis, no es estadísticamente significativa. Esto podría deberse a que la respuesta sistémica se encuentra regulada, aun en presencia de inflamación de baja magnitud y solo se necesitaría una “sobre” activación de mecanismos proresolutorios y antiinflamatorios ante la presencia de un reto (en este caso bacteriano) adicional.

Correa et al, en 2008, realizaron un estudio para medir los marcadores de inflamación séricos en pacientes con periodontitis crónica y los compararon con pacientes periodontalmente sanos. Sus resultados muestran, para los marcadores antiinflamatorios y reguladores, IL-4, IL-5, IL-10, un aumento en los pacientes con

periodontitis que no es estadísticamente significativo al compararlo con los niveles en pacientes periodontalmente sanos (95), lo cual podría corroborar la idea expresada para explicar los presentes resultados.

Al activar las CMSP con LPS de *P. Gingivalis*, la producción de RvE1 aumenta significativamente respecto al control en los grupos sanos/gingivitis y periodontitis crónica. La producción es significativamente mayor en las células obtenidas de pacientes con periodontitis. Esto podría explicarse desde el origen infeccioso de las enfermedades periodontales y el efecto que ellas tienen a nivel sistémico. Tanto las periodontitis crónicas como las agresivas se inician por una infección; la cronicidad de esta infección, es determinante en las características inmunopatológicas de la lesión, tanto a nivel local como sistémico. La persistencia de una microflora oral disbiótica, media una patología inflamatoria tanto a nivel local como en sitios distantes (96). Las bacterias periodontopáticas especialmente la *P. gingivalis* producen LPS, que está directamente relacionado con las manifestaciones sistémicas de la enfermedad. La ulceración en el epitelio de las bolsas periodontales, facilita la translocación de bacterias a la circulación sistémica causando una bacteriemia que está bien documentada en pacientes con periodontitis y que puede proveer un estímulo inflamatorio (96); por otro lado en estos pacientes, se producen a nivel local, citocinas proinflamatorias que pueden entrar a la circulación sistémica e inducir una respuesta de fase aguda en el hígado. Esto está claramente establecido y se fundamenta en que, en pacientes con periodontitis crónica y agresiva, se observa incremento de la inflamación sistémica indicada por niveles elevados de citocinas y marcadores de fase aguda como IL-6 y PCR (96,97)

En ratas con periodontitis inducida, también se ha observado que los cambios clínicos e histológicos en el periodonto, se correlacionan con un aumento notable de la respuesta inflamatoria sistémica (98).

El origen oral de la bacteriemia puede ser debido a actividades orales diarias como cepillado dental, masticación o procedimientos dentales. (99)

Diferentes estudios han reportado una correlación entre la diseminación sistémica del LPS bacteriano y la enfermedad periodontal. (24); Así en el contexto de la periodontitis, los niveles elevados de bacterias Gram (-) que pueden conducir a un incremento en los niveles de LPS en circulación.

En primates, el modelo más similar posible al humano, los hallazgos acerca de inflamación a nivel sistémico en presencia de periodontitis crónica son comparables a los ya citados; los niveles de LPS detectados a nivel del suero en este modelo, varían entre 5 UE (unidades de endotoxina) para individuos sanos y 16UE para periodontitis (100).

Todo lo anterior podría explicar el por qué de la necesidad de aumentar los mecanismos de control de la inflamación a nivel sistémico en pacientes con infecciones locales en el periodonto, tanto a nivel de citocinas reguladoras e inmunomoduladoras como la IL-10 (95) y agentes proresolutorios como la resolvina E1, respuesta encontrada en el presente trabajo.

En otras enfermedades inflamatorias, como artritis reumatoide e infecciosas tal como la infección sistémica por *S. Aureus*, el organismo intenta regular la respuesta, aumentando la producción de IL-10, potente antiinflamatorio que juega un papel crucial, limitando la inmunopatología del huésped durante infecciones bacterianas, controlando la activación de las células T efectoras (101,102). Basados en lo anterior, podríamos deducir que el paciente periodontalmente sano, necesitaría activar mecanismos proresolutorios al encuentro con un agente infeccioso, para resolver de manera temprana la inflamación y el periodontalmente afectado, en el cual las células se encuentran previamente activadas por el paso constante a la circulación de LPS, necesitaría una respuesta más agresiva de estos mecanismos, +

Partiendo, de que en presencia del LPS las CMSP producen significativamente más resolvina que las células en el experimento control, tanto en sanos como en enfermos, se quiso determinar si la adición de VITD3 potencializaba dicha producción. Al respecto se observó que en presencia de LPS +VD3 las células de

los pacientes enfermos producen significativamente más RvE1 que las de los sanos, sin embargo, al mirar si esta producción difiere de la observada ante la activación solo con LPS en ambos grupos, se halló que no hay diferencias significativas sugiriendo que el LPS es el responsable principal de inducir la producción de la resolovina. Por otra parte, la activación de CMSP con VD3 en ausencia de estimulación con LPS, presenta una tendencia al aumento, tanto en los pacientes sanos al compararlos con el nivel basal (ETOH) (15ng/ml Vs 54,9ng/ml), como en los pacientes con periodontitis (48,9 ng/ml Vs 96,65ng/ml), sin embargo. el aumento no es estadísticamente significativo. No existen reportes en la literatura a nuestro conocimiento del posible efecto de la VD3 en la producción de RvE1 en enfermedades infecciosas por lo que se sugiere que la tendencia al aumento encontrada en este trabajo pueda corroborarse aumentando el número de pacientes evaluados.

## **6. CONCLUSIONES**

El LPS de *P. gingivalis* aumenta significativamente la producción de RvE1 por CMSP, tanto en pacientes sanos como en pacientes con periodontitis crónica. La producción es significativamente mayor en el paciente afectado.

La VD3, no aumenta de manera significativa la producción de RvE1 por CMSP, previamente activadas con LPS de *P. gingivalis*, independientemente del diagnóstico periodontal. A pesar de la ausencia de significancia, se observa una tendencia al aumento de producción de RvE1 en las células activadas con VD3 tanto en presencia como en ausencia del activador.

## **7. RECOMENDACIONES**

El presente trabajo soporta la idea de que el mayor aumento en la producción de RvE1 en CMSP de pacientes sanos/gingivitis y pacientes con periodontitis crónica,

en el modelo utilizado, está mediado por la presencia de LPS y no por la adición de VD3; a pesar de ello en la búsqueda de coadyuvantes en la producción de agentes proresolutorios, se recomienda aumentar la muestra, dada la tendencia observada al aumento de RvE1 con la activación de CMSP en presencia de VD3.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

1. Kinane D. F, Stathopoulou P. G, Papapanou P. N., Periodontal diseases. Primer Nature Reviews. 2017; 3(17038):1-14.
2. Ministerio de Salud y Protección Social, MINSALUD, IV Estudio Nacional de Salud Bucal-ENSAB IV. Bogotá, Colomb. 2014;3:381.
3. Slots J., Jorgensen M. G. Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet?. Periodontology 2000. 2002; 28:298–312.
4. McFall W. T. Jr. Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study. J Periodontol. 1982; 53(9): 539-49.
5. Pearlman B. A. Long-term periodontal care: a comparative retrospective survey. J Periodontol. 1993; 64(8): 723-9.
6. Greenstein G. Nonsurgical periodontal therapy in 2000: a literature review. J Am Dent Assoc. 2000; 131(11): 1580-92.
7. Gemmell E, Seymour M. G. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontology 2000, Vol 14, 1997;112-143.
8. Walmsley A. D, Lea S. C, Landini G., Moses A. J. Advances in power driven pocket/root instrumentation. J Clin Periodontol. 2008;35 (8): 22-8.
9. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. Immunology. 2011; 134(2):123

10. El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M, Darweesh M, Alshahat M, Kantarci A., Hasturk H, Van Dyke T. E. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega 3 Fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol.* 2010; 81(11): 1635-43.
11. Fredman G, Oh S. F, Ayilavarapu S, Hasturk H, Serhan C. N, Van Dyke T. E. Impaired phagocytosis in localized aggressive periodontitis: rescue by Resolvin E1. *PLoS One.* 2011;6(9): e24422.
12. Abbas A. K, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular.* Séptima edición. España: Elsevier; 2012.
13. Edwards I, Joseph T. O'Flaherty T. *Omega-3 Fatty Acids and PPAR $\gamma$  in Cancer.* Hindawi Corporation PPAR; Vol - 2008.
14. Charles A. Janeway Jr, Paul Travers, Mark Walport, Mark J Shlomchik. *The Immune System in Health and Disease.* Séptima edición. México D.F. .Mc Graw Hill. 2008.
15. American Academy of Periodontology. *Glossary of Periodontal Terms.* Chicago: American Academy of Periodontology; 2001.
16. Nanci A, Bosshardt D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000.* 2006; 40: 11–28.
17. Freire M. O, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000.* 2013; 63(1):149-64.
18. Ryan M. E, Golub L. M. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol 2000.* 2000; 24:226-38.
19. Thomas E. Van Dyke. The Management of Inflammation in Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2008;79:1601-1608.
20. Cao Y, Mori S, Mashiba T, Kaji Y, Manabe T, Iwata K, Miyamoto K, Komatsubara S, Yamamoto T., Kaji A , Takeshi Manabe A , Ken Iwata A. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-2 $\beta$ (3-hydroxypropoxy)vitamin D3 (ED-71) suppressed callus remodeling but did not interfere with fracture healing in rat femora. *Bone.* 2007;40(1):132-9.
21. Petersen P. E. *The World Oral Health Report 2003: continuous*

- improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003; 31(1):3-23.
22. Ryder M. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontology 2000.* 2010; 53:124–137.
  23. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000.* 2015; 69:7-17.
  24. Shaddox L, Wiedey J, Calderon N, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell J, Zapert E, Aukhil I, Wallet M. Local Inflammatory Markers and Systemic Endotoxin in Aggressive Periodontitis. *J Dent Res.* 2011; 90(90): 1140-1144.
  25. Kah Yan How. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology.* 2016;7(53).
  26. Yasuhara R, Miyamoto Y, Roles of Gingipains in Periodontal Bone Loss, *J. Oral Biosci.* 2011; 53(3):197–205.
  27. O'Brien-S. Antigens of bacteria associated with Periodontitis. *Periodontology 2000.* 2004; 35: 101-134.
  28. Chiang N, Arita M, Serhan C. N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature.* 2007; 447(7146):869-74.
  29. Loe H. Periodontal diseases: a brief historical perspective. *Periodontol 2000.* 1993; 2:7-12.
  30. Serhan C. N, Clish C. B, Brannon J, Colgan S. P, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2- nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med.* 2000; 192(8):1197-204.
  31. Kornman K. S, Page R. C, Tonetti M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997;14: 33-53.

32. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis N. A, Serhan C. N. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med*. 2005; 201(5): 713-22.
33. McFall W. T Jr. Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study. *J Periodontol*. 1982; 53(9): 539-49.
34. Pearlman B. A. Long-term periodontal care: a comparative retrospective survey. *J Periodontol*. 1993; 64(8): 723-9.
35. Herrera B. S, Ohira T, Gao L, Omori K, Yang R, Zhu M, Muscara MN, Serhan CN, Van Dyke TE, Gyurko R. An endogenous regulator of inflammation, resolvin E1, modulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Br J Pharmacol*. 2008; 155(8): 1214-23.
36. Ambili R, Santhi W. S, Janam P, Nandakumar K, Pillai M. R. Expression of activated transcription factor nuclear factor-kappaB in periodontally diseased tissues. *J Periodontol*. 2005; 76(7):1148-53.
37. Mizwicki M. T, Liu G, Fiala M, Magpantay L, Sayre J, Siani A, Mahanian M, Weitzman R, Hayden E. Y, Rosenthal M. J, Nemere I, Ringman J, Teplow D. B.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and resolvin D1 retune the balance between amyloid- $\beta$  phagocytosis and inflammation in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis*. 2013; 34(1): 155-70.
38. Page R. C, Schroeder H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976; 34 (3):235-49.
39. Hughes, F. J. Cytokines and cell signalling in the periodontium. *Journal of Oral Diseases*. 1995; 1:259–265.
40. Preshaw P. M, Taylor J. J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses affected our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol* 2011; 38(11): 60–84.
41. Birkedal-Hansen, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of Periodontol* 1993; 64: 474–484.

42. Rishi D, Pathirana, Neil M. O'brien M, Reynolds E. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology* 2000. 2010; 52: 218–237.
43. Serhan C. N, Systems approach to inflammation resolution: identification of novel antiinflammatory and pro-resolving mediators. *J Thromb Haemost.* 2009; 7 Suppl 1:44-8.
44. Anne C. R, Tanner, Jacques Z. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontology* 2000. 2006; 42: 88–113.
45. Nussbaum G, Shapira L: How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol.* 2011; 38: 49–59.
46. Uitto V. J, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins E. E, Firth J. D, Salonen J, López-Otín C, Saarialho-Kere U, Kähäri V. M. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol.* 199; 152 (6):1489-99.
47. Walsh, N. C., Crotti, T. N., Goldring, S. R, Gravalles, E. M. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunological Reviews.* 2005; 208: 228–251.
48. Smith P, Martinez C, Caceres M, Martinez J. Research on growth factors in periodontology. *Periodontology* 2000. 2015: 67: 234–250.
49. Han J. S, Donald R, D Emuth. Quorum sensing regulation of biofilm growth and gene expression by oral bacteria and periodontal pathogens. *Periodontology* 2000. 2010; 52: 53–67.
50. Socransky S. S. Haffajee A. D. Cugini M. A, Smith C, Kent Jr. RL: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.
51. Bengtsoon T. Secreted gingipains from *P. gingivalis* colonies exert potent immunomodulatory effects on human gingival fibroblasts. *Microbiological Research.* 2015; 178: 18-26.

52. Stanlec Y. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000. 1999; 20: 168-238.
53. Amano A. Prevalence of specific genotypes of *P. Porphyromonas gingivalis* *fimA* and Periodontal Health Status. *J Dent Res.* 2000; 79(9): 1664-1668.
54. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology.* 2010; 11(5).
55. Akashi-Takamura S, Miyake K. TLR accessory molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20:420–425.
56. Akira, S, Uematsu S, Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124(4): 783–801.
57. Van Dyke T. E, Kornman K. S. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *J Periodontol.* 2008; 79: 1503–1507.
58. Hachicha M, Pouliot M, Petasis, N.A, Serhan C.N. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 1923-1929.
59. Rey C, Nadjar A, Buaud B, Vaysse C, Aubert A, Pallet V, Layé S, Joffre C. Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells in vitro. *Brain Behav Immun.* 2016; 55: 249-259.
60. Serhan C. N, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, Yang R, Colgan S. P, Petasis N. A. Anti-Inflammatory Actions of Neuroprotectin D1/Protectin D1 and Its Natural Stereoisomers: Assignments of Dihydroxy-Containing Docosatrienes<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology.* 2006; 176: 1848–1859.
61. Charles N. Serhan N. Resolvins and protectins: novel lipid mediators in anti-inflammation and resolution. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition* 2006; 50 (S2): 68-78.
62. Mukherjee P. K, Marcheselli V. L, Serhan C. N, Bazan N. G. Neuroprotectin D1: a docosa-hexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 8491–8496.
63. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis N.

- A, Levy B. D, Serhan C. N, Van Dyke T. E. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast- mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J.* 2006; 20 (2): 401-3.
64. Keinan D, Leigh N , Nelson J , De Ole L, Olga J. Baker. Understanding Resolvin Signaling Pathways to Improve Oral Health. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 5501-5518.
65. Min-Xuan Xu, Bing-Chang Tan, Wei Zhou, Ting Wei, Wei-Hong Lai, Jing-Wang Tan, Jia-Hong Dong. Resolvin D1, an Endogenous Lipid Mediator for Inactivation of Inflammation-Related Signaling Pathways in Microglial Cells, Prevents Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses. *CNS Neuroscience & Therapeutics.* 2013; 19: 235–243.
66. Serhan C. N, Dalli, J, Karamnov S, Choi A, Park, C-K, Xu Z. Z, Ji R. R, Zhu M, Petasis N. A. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J.* 2012; 26: 1755–1765.
67. Bannenberg G. L, N. Chiang A. A, Arita M, E. Tjonahen K. H. Gotlinger S. Hong, Serhan C, N. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol.* 2005; 174: 4345–4355.
68. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan C. N, Van Dyke TE. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol.* 2007; 179(10): 7021-9.
69. Gronert K, Kantarci A, Levy B. D. Clish C. B, Odparlik S, Hasturk H, Badwey J. A, Colgan, S. P, Van Dyke T. E. Serhan C. N. A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. *J. Immunol.* 2004; 172: 1856–1861.
70. Serhan C. N, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(5): 349-61.

71. Svensson D, Nebel D, Nilsson B. O. Vitamin D3 modulates the innate immune response through regulation of the hCAP-18/LL-37 gene expression and cytokine production. *Inflamm Res.* 2016; 65(1):25-32.
72. Hoeck A, Pall M. Will vitamin D supplementation ameliorate diseases characterized by chronic inflammation and fatigue? *Medical Hypotheses.* 2011; 76: 208–213
73. Amano Y, Komiyama K, Makishima M. Vitamin D and Periodontal Disease. *Journal of Oral Science.* 2009 ; 51(1):11.
74. Schwalfenberg G. A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011; 55: 96–108.
75. Bikle D. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 2008; 17:348–352.
76. Slebioda Z, Szponar E, Dorocka-Bobkowska B. Vitamin D and Its Relevance in the Etiopathogenesis of Oral Cavity Diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2016; 64(5): 385-397.
77. Muñoz S, Rodríguez L. S. Dendritic cells generated in the presence of vitamin D3 and stimulated with LPS secrete IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10 and induce relatively low levels of CD4+CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. *Biomédica* 2016; 36: 239-50.
78. Yu XP, Bellido T, Manolagas SC. Down-regulation of NF-kappa B protein levels in activated human lymphocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(24): 10990-4.
79. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 32-8.
80. Armitage G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1):1-6.
81. Gualtero D, Porras J, Bernau S, Buitrago D, Castillo D, Lafaurie G. Purification and characterization of lipopolysaccharide from *Eikenella corrodens* 23834 and *Porphyromonas gingivalis* W83. *Rev. Colomb.*

- Biotechnol. 2014; XVI (1): 34-44.
82. Herová M, Schmid M, Gemperle C, Hersberger M. ChemR23, the receptor for chemerin and resolvin E1, is expressed and functional on M1 but not on M2 macrophages. *J Immunol.* 2015; 194 (5):2330-7.
83. Van Dyke T. E. Control of inflammation and periodontitis. *Periodontology* 2000. 2007; 1(45): 158–166.
84. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology.* 2011; 134(2): 123-39.
85. Page R. C, Offenbacher S, Schroeder H. E, Seymour G. J, Kornman K. S. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000. 1997; 14:216-48.
86. Anne C. R, Tanner, Jacques Z. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontology* 2000. 2006 42: 88–113.
87. Chapple I, Matthews J. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology* 2000. 2007; 43: 160–232.
88. O'Leary T. J, Drake R. B, Naylor J. E. The plaque control record. *J Periodontol.* 1972; 43(1):38.
89. Loe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol.* 1967; 38(6): 610-6.
90. Nishikori M. Classical and Alternative NF- $\kappa$ B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *J Clin. Exp. Hematopathol.* 2005; 45-1.
91. Fredman G, Van Dyke T, Serhan C. Resolvin E1 Regulates ADP of Human Platelets. *Artioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(10): 2005-13.
92. Tian H, Lu Y, Sherwood A, Hongqian D, Hong S. Resolvins E1 and D1 in Choroid-Retinal Endothelial Cells and Leukocytes: Biosynthesis and Mechanisms of Anti-inflammatory Actions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(8):3613-20.
93. Fitzsimmons TR, Sanders AE, Bartold PM, Slade GD. Local and Systemic biomarkers in gingival crevicular fluid increase odds of periodontitis. *J Clin*

- Periodontol 2010; 37:30-36.
94. Lee CT, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Star JR, Neves Brito L, Paster BJ, Van Dyke TE. Resolvin E1 Reverses Experimental Periodontitis and Dysbiosis. *J Immunol*. 2016; 197: 2796-2806.
  95. Corrêa A, Taba Jr. M, O'connell P y Cols. Inflammation Markers in Healthy and Periodontitis Patients. A Preliminary Data Screening. *Braz Dent J*. 2008; 19(1): 3-8.
  96. Hajishengallis G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(1): 30-44.
  97. Loos B. Systemic Markers of Inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2005; 76:2106-2115.
  98. Ionel A, Lucaciu O, Tăbăran F, Berce C, Toader S, Hurubeanu L *et al*. Histopathological and clinical expression of periodontal disease related to the systemic inflammatory response. *Histol Histopathol*. 2017; 32(4):379-384.
  99. Carrillo P, Larcher P, Kawamoto D, Hisse G, Pinto M, Alexandre G *et al*. Bacteremia after chewing in a patient with severe chronic periodontitis and diabetes mellitus type 2: A brief report.
  100. Ebersole JL, Cappeli D, Mott G, Kesavalu L, Holt SC, Singer RE. Systemic manifestations of periodontitis in the non-human primate. *J Periodont Res*. 1999; 34: 358-362.
  101. Cush J, Splawski J, Thomas R, McFarlin J, Schulze-Koops H, Davis L *et al*. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38(1):96-104.
  102. Leech J, Lacey K, Mulcahy M, Medina E, McLoughlin R. IL-10 Plays opposing roles during *Staphylococcus aureus* systemic and localized infections. *J Immunol*. 2017; 198(6):2352-2365.

