



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DEL EFECTO DEL
SUPLEMENTO ALIMENTICIO CON ÁCIDOS GRASOS
OMEGA-3 EN UN MODELO MURINO DE
PERIODONTITIS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

PRESENTAN

MARTÍNEZ MILLÁN MARCOS GILBERTO

PÉREZ ORTEGA ANA LAURA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. GARCÍA HERNÁNDEZ ANA LILIA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido una labor muy difícil para un novato en la ciencia básica como yo. He tenido que aprender como un niño que comienza a leer pero en la edad adulta. Por esta razón quiero agradecer todas las enseñanzas y explicaciones pacientes de Dra. Ana Lilia García Hernández, mi tutora, quien me ha ayudado a superarme como estudiante y como persona, pero sobre todo agradezco su apoyo en los instantes de desaliento y frustración dentro y fuera del laboratorio. Gracias doctora, por fomentar en mí el interés por la ciencia, es usted un excelente ejemplo como investigadora y una gran persona.

Agradezco al Dr. Isaac Obed Pérez Martínez por darme ánimo, consejos y por brindarme su apoyo como científico ayudándome a mejorar como alumno y ser humano.

Quiero agradecer con mucho afecto a mi compañera Ana Laura Pérez Ortega, quien además de recorrer junto conmigo el camino en la elaboración de esta tesis, me ayudó a comprender temas difíciles de entender para mí y por estar ahí incondicionalmente cuando más lo necesité.

Agradezco a mis sinodales el Dr. Eduardo F. Llamosas Hernández, al Dr. Eduardo Stein Gemora, al Esp. Abel Gómez Moreno y a la Esp. Luisa A. López Osuna por sus valiosas aportaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Estoy profundamente agradecido con mi familia por reconfortarme e impulsarme en mis estudios para que este trabajo se llevara a cabo.

Marcos Gilberto Martínez Millán

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, que con amor, trabajo y esmero ha hecho posible mi formación profesional, te amo mamá, gracias por toda tu ayuda y cuidados, sin tu amor y apoyo llegar a este punto habría sido poco posible.

A Gil, por caminar a mi lado y aprender juntos durante la carrera, por colaborar siempre conmigo con amor y paciencia, por ser mi cómplice de sueños y motivarme día a día para perseguir mis metas, gracias por todo Gil, seguramente este no sería mi presente de no haberte conocido.

A la doctora Ana Lilia García Hernández, doctora le agradezco desde mi corazón el haberme permitido conocer un mundo nuevo, el enseñarme a investigar y razonar, gracias por su confianza y por guiarme con paciencia en mis primeros pasos en la ciencia, mi forma de ver la vida ahora es muy diferente. Es usted un hermoso ser humano, gracias por comprendernos y apoyarnos en la adversidad.

A Fer y Karen, mis hermanitas, gracias por todo su apoyo y amor, sepan que valoro mucho su ayuda y sacrificios.

A Cristina Millán, muchas gracias por motivarme por medio del ejemplo a superarme, a sonreírle a la vida, y vivir el hoy con alegría y amor, es para mi un ejemplo de vida.

A mis sinodales, el Esp. Mario Quiroz Reyes, el Dr. Juan Ángel Martínez Loza, la Esp. Rossana Sentfés Castellá, y en especial a la Dra. Leticia Moreno Fierros, ya que sus observaciones han sido de gran ayuda para este trabajo.

A mi papá, a mi familia Ortega, a Diana Martínez, Marcos Martínez, y todas las personas que con su apoyo, consejos y ayuda han hecho posible que termine mi educación universitaria.

Ana Laura Pérez Ortega

ÍNDICE

ACRÓNIMOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
CAPÍTULO I	7
LA PERIODONTITIS	7
TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA PERIODONTITIS	12
AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS PARA LA MODULACIÓN DEL HUÉSPED EN LA PERIODONTITIS.....	14
PROPIEDAD DE LOS OMEGA-3 COMO ANTIINFLAMATORIOS	17
CAPÍTULO II	20
ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y LA PERIODONTITIS	20
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
CAPÍTULO III	26
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
ANIMALES.....	27
SUPLEMENTACIÓN ALIMENTICIA CON OMEGA-3	27
INDUCCIÓN DE PERIODONTITIS	28
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS	28
INMUNOIDENTIFICACIÓN CELULAR EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS CERVICALES	29
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS Th1 Y Th2 EN SUERO.....	30
DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgG1 E IgG2 EN SUERO.....	31
MEDICIÓN DE LA PÉRDIDA ÓSEA ALVEOLAR	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
CAPÍTULO IV	33
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	47

ACRÓNIMOS

AA	Ácido araquidónico
CD	Cúmulo de diferenciación
COX	Ciclooxigenasa
CPA	Células presentadoras de antígeno
DC's	Células dendríticas
DHA	Ácido docosahexanoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
GLC	Ganglios linfáticos cervicales
HMT	Tratamiento de modulación del hospedador
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
INFγ	Interferón gamma
LB	Linfocitos B
LOX	Lipoxigenasa
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Linfocito T
LT CD4	Linfocitos T CD4
LT CD8	Linfocitos T CD8
LTB4	Leucotrieno B4
LTB5	Leucotrieno B5
LTC4	Leucotrieno C4
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MMP's	Metaloproteínas
NK	Natural Killer
PC	Periodontitis crónica
PG	Prostaglandinas
PMN	Polimorfonucleares
SSD	Doxiciclina de dosis antimicrobiana
TCR	Receptor de linfocitos T
Th	T helper
TNF	Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

Introducción: La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica en la que su etiopatogenia no se conoce bien, se sabe que las bacterias son responsables de su iniciación y progresión, pero el daño de los tejidos es mediado por la respuesta inmune del hospedador, por lo tanto, el desarrollo de la periodontitis y destrucción de los tejidos periodontales se debe a la interacción entre microorganismos bacterianos del biofilm y la respuesta inmunológica exacerbada del hospedador. Durante la periodontitis, existe una sobreproducción en los niveles de mediadores proinflamatorios principalmente de PGE2, IL-2, IFN- γ , IL-6 y TNF- α , lo que ocasiona alteraciones en el metabolismo óseo además de generar enzimas degradantes del tejido conectivo. El uso de Omega-3 presentes de forma natural en el aceite de pescado, se ha propuesto como terapia adjunta a los tratamientos convencionales ya que tienen un efecto benéfico en la modulación de mediadores inflamatorios y ejercen efectos inmunosupresores, por lo que es importante estudiar su efecto en la inflamación periodontal con la finalidad de buscar terapias capaces de regular la respuesta inmunológica. **Objetivo:** Evaluar el efecto de suplementar la dieta con ácidos grasos Omega-3 en la pérdida ósea alveolar y en algunos parámetros inmunológicos en un modelo murino de periodontitis. **Método:** 24 ratones C57BL/6 fueron divididos en 4 grupos: Sanos, con suplemento alimenticio con Omega-3, con Periodontitis crónica (PC) y con PC y suplemento alimenticio con Omega-3 (PC+Omega-3), a los ratones que les correspondía el suplemento alimenticio se les administró ácidos grasos Omega-3 (DHA+EPA) por 70 días, a los grupos correspondientes se les indujo PC realizando una ligadura en los segundos molares superiores adjunto con la inoculación 1×10^9 de *Porphyromonas Gingivalis*. Se analizó la destrucción de hueso alveolar por medio de tinción con azul de metileno y el microCT Imaging System. Por medio de citometría de flujo se analizó la producción de citocinas pro y anti inflamatorias en suero, así como las poblaciones de LT, LB y células presentadoras de antígeno presentes en los ganglios linfáticos cervicales. **Resultados:** El suplemento alimenticio con ácidos grasos Omega-3 en ratones con PC, disminuyó significativamente la pérdida ósea alveolar, disminuyó la producción de TNF- α e IFN- γ e incrementó la producción de IL-5. En los ganglios linfáticos cervicales (GLC) no hubo diferencias en las poblaciones de linfocitos B (LB) y linfocitos T (LT), ni tampoco en la población celular CD103⁺ CD11c⁻, pero disminuyó la población de células dendríticas (DC's) CD103⁺ CD11c⁺ así como su expresión de MCHII. **Conclusiones:** El suplemento alimenticio con ácidos grasos Omega-3 disminuye la inflamación por medio de la disminución de los niveles de citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ y aumenta la concentración de IL-5 de tipo antiinflamatorio, es probable que debido a este mecanismo disminuya la pérdida ósea alveolar. En los GLC, los ácidos grasos Omega-3 reducen las poblaciones de DC's CD103⁺ CD11c⁺ y aminora la expresión de MCHII, lo que indica que los ácidos grasos Omega-3 son capaces de regular la respuesta inmunológica a través de la movilización de las DC's.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is a chronic inflammatory disease in which its etiopathogenesis is not well known, it is known that the bacteria are responsible for its initiation and progression, but the damage of the tissues is mediated by the immune response of the host, therefore, the development of periodontitis and destruction of periodontal tissues is due to the interaction between bacterial microorganisms of the biofilm and the exacerbated immune response of the host. During periodontitis, there is an overproduction in the levels of proinflammatory mediators mainly of PGE₂, IL-2, IFN- γ , IL-6 and TNF- α , which causes alterations in the bone metabolism in addition to generating degrading enzymes of the connective tissue. The use of Omega-3 naturally present in fish oil has been proposed as adjunctive therapy to conventional treatments since they have a beneficial effect on the modulation of inflammatory mediators and exert immunosuppressive effects, so it is important to study their effect on periodontal inflammation in order to find therapies capable of regulating the immune response. **Objective:** To evaluate the effect of supplementing the diet with Omega-3 fatty acids on alveolar bone loss and on some immunological parameters in a murine model of periodontitis. **Methods:** 24 C57BL / 6 mice were divided into 4 groups: healthy, with dietary supplement with Omega-3, with chronic Periodontitis (PC) and with PC and dietary supplement with Omega-3 (PC + Omega-3) mice (DHA + EPA) for 70 days, the corresponding groups were induced by PC ligation in the upper second molars attached with the 1×10^9 inoculation of Porphyromonas Gingivalis. The destruction of alveolar bone was analyzed by means of staining with methylene blue and the microCT Imaging System. By means of flow cytometry the production of pro and anti-inflammatory cytokines in serum was analyzed, as well as the populations of LT, LB and antigen presenting cells in the cervical lymph nodes. **Results:** The dietary supplement with omega-3 fatty acids in mice with CP significantly decreased alveolar bone loss, decreased TNF- α and IFN- γ production and increased the production of IL-5. In cervical lymph node (GLC) there were no differences in B lymphocyte (LB) and T lymphocyte (LT) populations, nor in CD103⁺ CD11c⁻ cell population, but the CD103⁺ CD11c⁺ dendritic cell population (DC's) decreased as well as its MCHII expression. **Conclusions:** The dietary supplement with omega-3 fatty acids decreases inflammation by decreasing the levels of proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ and increases the concentration of antiinflammatory type IL-5, it is probable that due to this mechanism reduces alveolar bone loss. In GLCs, Omega-3 fatty acids reduce DC's CD103⁺ CD11c⁺ populations and decrease MCHII expression, indicating that Omega-3 fatty acids are able to regulate the immune response through the mobilization of DC's.

CAPÍTULO I

LA PERIODONTITIS

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a las estructuras de soporte de los dientes, que son: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, teniendo como consecuencia la movilidad y pérdida dental (Pihlstrom, Michalowicz, & Johnson, 2005).

De acuerdo a la última estadística realizada por la OMS en el año 2012, se reporta que la periodontitis afecta del 15-20 % de la población adulta de entre 35 y 44 años de edad y es considerada un factor de riesgo que puede complicar el cuadro clínico de enfermedades tales como la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y que además puede conllevar a resultados adversos en el embarazo. (Genco & Van Dyke, 2010), (Lundberg, Wegner, Yucel-Lindberg, & Venables, 2010), (Lalla & Papapanou, 2011), (Kebschull, Demmer, & Papapanou, 2010), (Madianos, Bobetsis, & Offenbacher, 2013).

La periodontitis se caracteriza por la falta de resolución de la inflamación del periodonto, esta inflamación es causada por bacterias y sus productos localizadas en el biofilm subgingival (Sima & Glogauer, 2013) y pese a que más de 700 especies de bacterias pueden colonizar la cavidad oral (Aas, Paster, Stokes, Olsen, & Dewhirst, 2005), solo unas cuantas participan potencialmente en la propagación de la periodontitis (Paster, Olsen, Aas, & Dewhirst, 2006), tal es el caso de *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas Gingivalis* (Bodet, Chandad, & Grenier, 2007), que en conjunto forman un complejo bacteriano denominado "complejo rojo", este complejo es esencial para la iniciación y progresión de la periodontitis, aunque el daño del tejido periodontal es mediado principalmente por la

respuesta inmune del hospedador (Gemmell, Carter, Hart, Drysdale, & Seymour, 2002).

Hasta el momento, el proceso inmunológico en la etiopatogenia de la periodontitis no se conocen bien (Schmidt, Jentsch, Stingu, & Sack, 2014), debido a que el sistema inmune del hospedador está en continuo contacto con las bacterias bucales, desarrollando así mecanismos de tolerancia a las bacterias comensales, y al mismo tiempo se encarga de vigilar y prevenir la infección causada por patógenos, (Hovav, 2014) es así como el huésped se vuelve más susceptible a los efectos prolongados de la interrupción de la homeostasis inmune que se refleja en algunos trastornos inflamatorios autoinmunes y crónicos, incluyendo la periodontitis (Tlaskalova-Hogenova et al., 2004), por eso se dice que la respuesta inmunitaria hacia los microorganismos patógenos del biofilm dental puede ser de protección, destrucción o ambos (Van Dyke & Serhan, 2003).

En la respuesta inmune ante los periodontopatógenos son de gran importancia las células presentadoras de antígeno (CPA), en especial las células dendríticas (DC's), estas células se encuentran dispuestas en la piel y mucosas; en el caso de la encía que no presenta submucosa, sino lámina propia, la mayor parte de DC's que se encuentran en ella expresan principalmente CD11c⁺ CD11b⁺, en menor cantidad expresan CD11b⁺CD11c⁻, (Hovav, 2014) y una población menor del 5% expresa la integrina CD103 (Arizon et al., 2012).

Después de la presentación del antígeno el tipo de respuesta inmune que se genera (proinflamatoria o reguladora), esta determinada por el fenotipo de célula dendrítica que presente la información (Bernardo, 2013), por ejemplo las CD103⁺ por medio de la producción de IL-2, dependiente de la señalización NFAT, producen una respuesta Th 17 considerada como

protectora, por estar asociada a la inflamación de bajo grado (Zelante et al., 2015)

Para que las DC's anteriormente mencionadas se activen, deben captar y procesar el periodontopatogeno que haya penetrado el epitelio, una vez captado en antígeno las DC's se dirigen a los vasos linfáticos más cercanos, en donde estas DC's maduran en el camino hacia a los ganglios linfáticos cervicales (GLC), donde presentan el antígeno a los LT (Hovav, 2014).

Cuando las DC's llevan a cabo la presentación antigénica a los LT en el ganglio linfático más cercano, lo hacen por medio de los MCH del tipo I o II (en el caso de ser por el MCHI se llevará a cabo una presentación cruzada o subrogada a los LT CD8 (Alfaro et al., 2013), en caso de ser por el MCHII el antígeno será presentado a los LT CD4 (Wilensky et al., 2014)) que presentan el péptido del antígeno a los receptores de linfocitos T (TCR) de los LT.

Para que la presentación de antígeno sea eficaz y produzca una respuesta inmune adaptativa contra el inmunogeno, las DC's también expresan moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 que al unirse con el CD28 de los LT produce la activación y replicación de los LT, dividiéndose en LT efectoras y de memoria (posteriormente se realizará la activación de los LB para comenzar la respuesta humoral, los LB al igual que los LT se replican y se dividen en LB efectoras y LB de memoria, los LB efectoras pasan a la circulación sanguínea para producir anticuerpos que ayudaran a la eliminación del antígeno por medio del reconocimiento, neutralización y opsonización del antígeno), por otro lado si CD80 o CD86 se unen al CD152 del LT produce una inactivación y por lo tanto una tolerancia al antígeno por medio de una anergia clonal.

En el proceso de la presentación de antígeno las DC's inducen la expresión de homing markers o marcadores de migración apropiados en los LT efectores, para dirigirlos a los tejidos diana donde encontrarán al antígeno.(Stagg, Kamm, & Knight, 2002).

De acuerdo a la información proporcionada por las DC's por medio de los MCHII a los LT, los LT CD4 se diferencian en fenotipos de LT helper (Th) denominados Th1, Th2 y Th17 (Sallusto & Lanzavecchia, 2009).

En este sentido, debido al proceso complejo de la periodontitis es complicado saber definitivamente el rol de los distintos fenotipos de LT helper, así como de sus citocinas frente a la destrucción en la periodontitis, aunque es sabido que el fenotipo Th1 considerado proinflamatorio secreta IFN (el IFN propicia una señal de retroalimentación positiva reforzando el desarrollo del fenotipo Th1 por la regulación del receptor de IL-12 (Weaver & Murphy, 2007) activando macrófagos, células natural killer (NK), y LT CD8 por medio de la síntesis de otras citocinas como el TNF- α , IL-1 e IL-6.

Por otra parte, el fenotipo Th2 considerado antiinflamatorio secretan IL-5, IL-13 (Yamashita, Onodera, & Nakayama, 2007) e IL-4, esta última propicia un refuerzo positivo ayudando la expansión del fenotipo Th2 (Weaver & Murphy, 2007),

Las citocinas liberadas una vez establecida la periodontitis ayudan a aglutinar infiltrado inflamatorio en el periodonto, el cual está constituido por diferentes tipos de células de defensa como neutrófilos, macrófagos y linfocitos que también producen distintas citocinas activando a su vez a otras células inmunológicas (Bendyk, Marino, Zilm, Howe, & Bartold, 2009) que liberan sustancias mediadoras de la inflamación como IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , PGE2, leucotrienos B4 (LTB4).

L α L-1 β es quimiotáctica (atrae otras células de defensa al lugar de la infección), favorece la reabsorción del hueso y estimula la liberación de metaloproteinasas (enzimas que degradan el colágeno de los tejidos residuales que ya no sirven) y es abundante en sitios de infección periodontal.

La IL-6 posee quimiotaxis y capacidad para inducir a las células plasmáticas y/o LB activados a secretar anticuerpos. La IL-17 regula la coordinación entre la inmunidad natural y específica, también regula a la IL-6, la PCR (Proteína C reactiva) y favorece la remodelación ósea (Paster et al., 2006) (Pihlstrom et al., 2005).

También está el TNF- α que favorece la proliferación y diferenciación celular, citotoxicidad o apoptosis. La PGE2 en la respuesta inflamatoria produce vasodilatación, aumento de la permeabilidad de los tejidos permitiendo el paso de los leucocitos, es antiagregante plaquetario y estimula las terminaciones nerviosas del dolor.

Todas las sustancias mencionadas y otras mas desencadenan y favorecen la inflamación inducida por las acciones de los microorganismos que son responsables de la destrucción de los tejidos periodontales, que contribuyen de forma importante en la destrucción del tejido conectivo periodontal (Page & Kornman, 1997).

Por otra parte se sabe que los LT representan el tipo de célula predominante en el periodonto en la etapa temprana de la enfermedad periodontal, mientras que los LB y células plasmáticas predominan en lesiones periodontales avanzadas y crónicas (Offenbacher, 1996) (Mikhaleva, Barkhina, Shapovalov, Luss, & Il'ina, 2001).

En estudios anteriores se determinó que los linfocitos tienen una participación importante en el desarrollo y severidad de la periodontitis,

esto se demostró en modelos murinos inmunodeficientes de LB y LT, en los que se observó que después de la infección con *Porphyromonas Gingivalis* hubo una menor pérdida de hueso alveolar en los ratones inmunodeficientes de linfocitos que la observada en ratones inmunocompetentes, lo que sugiere que la pérdida ósea puede ocurrir en ausencia de la inmunidad adaptativa, en el mismo estudio se realizó una comparación entre ratones inmunodeficientes de LT CD4 y ratones inmunodeficientes de LT CD8, se observó que las células T CD4 promueven la pérdida de hueso por medio de la producción de IFN- γ e IL-6, mientras que células T CD8 no tiene algún papel aparente (Baker et al., 1999).

TRATAMIENTOS ACTUALES PARA LA PERIODONTITIS

En la actualidad existen diversos procedimientos para combatir la periodontitis, los cuales se encuentran divididos en dos grupos: tratamientos no quirúrgicos y tratamientos quirúrgicos (Khalaf F. Al-Shammari, 2002).

Los tratamientos no quirúrgicos se fundamentan en la reducción y supresión de los factores etiológicos de la periodontitis para lograr eliminar la inflamación periodontal, esto se consigue mediante la eliminación total del biofilm y calculo que se encuentran adheridos a las superficies dentales (Cobb, 1996).

Hoy en día se disponen de numerosas tecnologías que ayudan a eliminar con mayor eficacia el cálculo dental, como lo son las curetas, escariadores o instrumentos ultrasónicos utilizados para realizar raspado y alisado radicular (Apatzidou, 2012).

También se lleva a cabo un control mecánico del biofilm, enseñando a los pacientes las técnicas de cepillado adecuadas que cubran sus

necesidades así como el uso correcto del cepillos eléctricos, (Robinson et al., 2005) hilo dental, (Sambunjak et al., 2011) dentífricos, (Hioe & van der Weijden, 2005) irrigadores bucales, (Husseini, Slot, & Van der Weijden, 2008) instrumentos de limpieza interdental, (Slot, Dorfer, & Van der Weijden, 2008) y agentes quimioterapéuticos (habitualmente antibacterianos de administración local o sistémica) (Berchier, Slot, & Van der Weijden, 2010) o cualquier otro método complementario necesario que ayude a eliminar con mayor eficacia la actividad microbiana del biofilm dental.

Otro procedimiento que se realiza es la reparación o remplazo de las restauraciones dentales con márgenes desbordantes, en especial aquellas que están más próximas a la encía, ya que suelen servir como nichos para bacterias periodontopatógenas (Rodríguez-Ferrer, Strahan, & Newman, 1980) (JM, 1995); y en caso de ser necesario se tienen que arreglar los dispositivos protésicos defectuosos (Xie et al., 2016).

Incluso es ineludible tratar las lesiones cariosas, en especial aquellas situadas en las zonas cervicales y radiculares de los dientes, dado que proporcionan un albergue para las bacterias favoreciendo la repoblación bacteriana periodonto-patógena (H, 2011).

De igual forma, está indicado realizar movimiento ortodóntico para corregir la mala posición de los dientes que altera la capacidad de limpieza de los pacientes. En caso de ser necesario se pueden tratar las áreas de impacción de alimentos donde el periodonto se vea comprometido. Igualmente es recomendable el tratamiento del trauma oclusivo y extracción de los dientes con mal pronóstico (Bollen, 2008) (Gomes, Varela, da Veiga, Rosing, & Oppermann, 2007).

Todos los tratamientos que anteriormente se mencionaron integran la fase 1 del tratamiento periodontal, la cual se aplica a los pacientes

comprometidos periodontalmente que tengan o no la presencia de bolsas periodontales que serán evaluados posteriormente y de ser necesario sometidos al tratamiento quirúrgico conocido como fase 2 (Al-Shammari KF, 2002).

Los tratamientos quirúrgicos para contrarrestar la periodontitis constan de técnicas resectivas y regenerativas empleadas para (1) aumentar el acceso a la superficie radicular , haciendo posible la eliminación de todos los irritantes, (2) disminuir o eliminar la profundidad de las bolsas periodontales, haciendo posible para el paciente mantener superficies radiculares libres de placa y (3) remodelar los tejidos blandos y duros para obtener una topografía armónica, logrando corregir problemas morfológicos que mejoren la estética (Pihlstrom BL, 1983).

AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS PARA LA MODULACIÓN DEL HUÉSPED EN LA PERIODONTITIS

A pesar de que la respuesta del sistema inmune es la causa principal de la destrucción de los tejidos en la periodontitis, inconsecuentemente el control de las bacterias que infectan el periodonto sigue siendo la diana principal de los tratamientos convencionales (Karpinia & Magnusson, 2000) (Mullally, Irwin, Ziada, Allen, & Byrne, 2007), cuando realmente los tratamientos deberían estar más enfocados en la regulación del sistema inmune. Por tal motivo, es importante hallar nuevas terapias capaces de tener un control sobre la modulación del sistema inmune del hospedador para que funcionen como un determinante de la gravedad y susceptibilidad de la periodontitis.

Por lo tanto se ha propuesto el tratamiento de modulación del huésped (HMT), en el cual se emplean fármacos de administración sistémica o local

que se recetan como complementos de los tratamientos periodontales convencionales (Ryan, 2005) (P. M. Preshaw, 2008), que tienen como finalidad modificar o disminuir las características destructivas de la respuesta inflamatoria ante el biofilm dental, y que incluso pueden regular las respuestas protectoras y regenerativas del periodonto afectado (Reddy, Geurs, & Gunsolley, 2003).

Diversos agentes de modulación del huésped se han desarrollado y se están investigando actualmente. Ejemplos de estos agentes son los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), doxiciclina de dosis subantimicrobiana (SDD), anticitocinas (bloqueadores IL-1/TNF), inhibidores de metaloproteinasas de matriz (MMP's) y bifosfonatos (Karpinia & Magnusson, 2000; Oringer, Research, & Therapy Committee of the American Academy of, 2002). Todos estos agentes modulan procesos específicos de la periodontitis como la regulación de los metabolitos del ácido araquidónico (AA), la producción excesiva de MMP's y el metabolismo óseo etc.

Sin embargo, actualmente sólo existe un agente de modulación del huésped que es el único aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la periodontitis que es la administración SDD (Giannobile, 2008), debido a que tiene efectos adversos de baja incidencia, (entre los más comunes son dolor de cabeza, dispepsia, erupción cutánea y diarrea.) (Caton et al., 2000; Philip M. Preshaw et al., 2004) en comparación con los efectos adversos derivados de otros agentes de modulación del huésped, como por ejemplo, los AINES pueden originar molestias gastrointestinales, renales, insuficiencia hepática y hemorragia debido a la inhibición no selectiva de enzimas ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Velo & Milanino, 1990) (Hawkey, 1993). Aun usando AINEs de inhibición selectiva de COX-2 siguen teniendo

efectos adversos gastrointestinales aunque en menor gravedad en comparación con los AINEs no selectivos (FitzGerald & Patrono, 2001; Noguchi & Ishikawa, 2007).

El uso prolongado de bifosfonatos en periodoncia está limitado debido a sus efectos adversos tales como osteonecrosis maxilar o mandibular, inhibición de la calcificación ósea e inducción de cambios en los conteos de glóbulos blancos (Palomo, Liu, & Bissada, 2007).

Por otra parte se ha investigado el uso del antagonista del receptor de citocinas (bloqueador de IL-1 / TNF) y mostró reducción en la progresión de la enfermedad periodontal en modelos experimentales, aunque todavía tiene que hacerse más investigación para establecer su fiabilidad y efectividad (Delima et al., 2001).

La administración de IL-4 exógena e IL-11 recombinante en modelos experimentales se ha asociado con la reducción de la progresión de la enfermedad periodontal (Allen, Wong, Costa, Bienkowski, & Wahl, 1993) (Martuscelli, Fiorellini, Crohin, & Howell, 2000). Sin embargo los efectos a largo plazo de las anticitocinas empleadas para la modulación inmune no se conocen bien en este momento, además de que su administración clínica resulta muy costosa, una mayor investigación es necesaria para determinar sus efectos sistémicos, su seguridad y eficacia (Shinwari, Tanwir, Hyder, & Saeed, 2014).

Debido a las reacciones adversas de los agentes quimioterapéuticos para la modulación del huésped es necesario continuar con la búsqueda de más opciones de tratamiento, que de ser posible no tengan efectos colaterales graves y que puedan prescribirse en tiempos muy prolongados, visto que la periodontitis es una enfermedad de alta reincidencia.

PROPIEDAD DE LOS OMEGA-3 COMO ANTIINFLAMATORIOS

Los Omega-3 son una familia de ácidos grasos poliinsaturados con la peculiaridad de por poseer el último doble enlace entre el número de carbonos 3 y 4 en la cadena de hidrocarburo (acilo), contando el carbono metilo terminal como número uno. Son ácidos grasos esenciales que se pueden encontrar en el pescado magro y graso y en otros mariscos. Las cadenas de Omega-3 más largas incluyen ácido eicosapentaenoico (EPA; 20: 5 n-3), ácido docosapentaenoico (DPA; 22: 5 n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA; 22: 6 n-3)" (Calder, 2015).

El DHA y EPA pueden inhibir parcialmente algunos de los procesos presentes en la inflamación, como la quimiotaxis de leucocitos, la expresión de moléculas de adhesión, adhesión de leucocitos al endotelio, secreción de eicosanoides como las PG y leucotrienos derivados del Omega-6, y la producción de citocinas inflamatorias (Th1) (Calder, 2015).

Además producen mediadores antiinflamatorios llamados resolvinas producidos a partir de la EPA (serie E) y DHA (serie D), protectinas y maresinas producidos a partir de DHA, (Calder, 2015) sus efectos se han estudiado en cultivos celulares y modelos animales de inflamación, demostrando su efecto antiinflamatorio, ayudando a la resolución de la inflamación (Bannenberg & Serhan, 2010) (Serhan & Chiang, 2013; Serhan, Yacoubian, & Yang, 2008).

En general, los Omega-3 tienen efectos supresores sobre la inmunidad innata y adaptativa (Galli & Calder, 2009). *In vitro*, en cultivos celulares los efectos de los Omega-3 han denotado la supresión de la proliferación de de LT (Fowler, Chapkin, & McMurray, 1993), así como en la interrupción de su señalización dada por la disminución de la desfosforilación y translocación nuclear del factor de transcripción (NFAT) y contención de la

transcripción de genes involucrados en la activación de células T (Yog, Barhoumi, McMurray, & Chapkin, 2010).

En los LT CD4 se sabe que el fenotipo Th1 sintetiza citocinas proinflamatorias como IL-2, IFN- γ y TNF- β , y que los Omega-3 pueden orientar este fenotipo al fenotipo Th2 que es considerado antiinflamatorio al secretar IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Kim et al., 2010).

También se ha visto que la ingesta de Omega-3 tales como DHA y EPA resultan en su integración a los fosfolípidos de la membrana celular, esto fue encontrado en linfocitos, macrófagos, y neutrófilos recuperados de ratas y ratones alimentados con estos Omega-3, (Chapkin, Akoh, & Miller, 1991) lo que puede alterar la producción de eicosanoides después de una estimulación durante la respuesta inmune, debido a que el sustrato inicial para la síntesis de eicosanoides es un fosfolípido de membrana y al haber una mayor consumo de Omega-3, estos se encontrarán en mayor cantidad que el AA.

De modo que, el AA que es el sustrato para la producción de eicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas por medio de las enzimas COX, LOX y las enzimas del citocromo P450. El EPA compite con el AA para integrarse a los fosfolípidos de la membrana celular, ya que también es un sustrato para las enzimas encargadas de la síntesis de eicosanoides, los eicosanoides del EPA son análogos a los del AA, existiendo entre ellos diferencias estructurales (Calder, 2015).

Las diferencias de los eicosanoides del AA y el EPA fue demostrado en una comparación del efecto quimioatrayente de leucocitos por parte de un LTB5 (derivado del EPA) contra un LTB4 (derivado del AA), donde el segundo resultó ser de 10 a 100 veces más potente (Goldman, Pickett, & Goetzl, 1983; Lee et al., 1984).

Todo lo anteriormente descrito ha llevado a la propuesta de que los Omega-3 son un modulador de la inflamación que pueden reducir la gravedad de las enfermedades inflamatorias como la periodontitis (Sculley, 2014).

CAPÍTULO II

ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 Y LA PERIODONTITIS

“Hasta la fecha, los estudios que han evaluado la asociación entre los niveles de DHA/EPA y periodontitis han reportado resultados contradictorios” (B. Chee, 2015), pero como resultado del conocimiento de sus acciones antiinflamatorias y su aparente falta de efectos adversos, la suplementación con Omega-3 se ha convertido en un posible coadyuvante en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la periodontitis (Bendyk et al., 2009).

En este sentido, algunos estudios han demostrado en modelos experimentales de periodontitis realizados en roedores y conejos que la suplementación dietética con Omega-3 puede suprimir los niveles gingivales de AA, PGE2 y LTB4, (Alam SQ, 1991) disminuyendo así la inflamación.

También se ha observado que ratas alimentadas con Omega-3 presentan niveles séricos altos de DHA y EPA, teniendo una menor cantidad de pérdida ósea alveolar después de la infección con *Porphyromonas Gingivalis*, en comparación con ratones alimentados con aceite de maíz (Kesavalu et al., 2006). Siguiendo esta corriente terapéutica, se demostró en otro modelo murino con periodontitis inducida con *Porphyromonas Gingivalis*, que la dieta rica en aceite de atún que tiene un alto contenido en DHA y EPA puede reducir la pérdida ósea alveolar desde un 54% hasta un 72% (Bendyk et al., 2009).

In vitro se ha visto que los Omega-3 pueden inhibir la diferenciación, activación y función de los osteoclastos, que resulta en niveles reducidos

de RANKL (Rahman MM, 2008), lo que conlleva en una menor pérdida ósea.

Conforme a los experimentos anteriormente citados se puede entender que los estudios del efecto de los Omega-3 tanto en animales como *in vitro*, arrojan resultados positivos de la administración de Omega-3; en una menor pérdida ósea, una menor producción de citocinas proinflamatorias y hasta una inhibición de la diferenciación de monocitos en osteoclastos.

Por otra parte, los estudios de la suplementación alimenticia con Omega-3 en la periodontitis en humanos son contradictorios, ya que como a continuación se muestra, algunos estudios observan cambios clínicos significativamente benéficos, y otros estudios solo observan cambios a nivel celular sin que estos cambios celulares se expresen resultados clínicamente favorables.

Las contradicciones entre los estudios en humanos pueden deberse a la falta de control de las poblaciones a estudiar que posiblemente no lleven a cabo las indicaciones asignadas para el estudio, por lo que se necesitan más estudios en humanos que controlen efectivamente los factores que pudieran hacer variar los resultados de las investigaciones.

En un estudio con humanos se ha revisado la progresión de la enfermedad periodontal relacionándola con la administración diaria de 947,1 mg de DHA y 635.2 mg de EPA a lo largo de 5 años en 36 ancianos japoneses de ambos sexos, donde se observó que la pérdida de inserción fue 49% mayor en los sujetos con bajo consumo de DHA y EPA en relación a los sujetos con un alto consumo de DHA y EPA (Iwasaki M, 2010).

En otro estudio trasversal en el que se incluyeron 351 participantes, se encontró que a menor número de dientes (un marcador sustituto putativo

para la periodontitis), había menor cantidad de EPA en las membranas de los glóbulos rojos (Hamazaki K, 2006).

En un estudio diferente se indujo gingivitis a persona sanas a través de la interrupción de la higiene bucal durante 3 semanas, posteriormente, 37 sujetos fueron escogidos aleatoriamente de los cuales fueron divididos en dos grupos, un grupo recibió 1,8 g de Omega-3 y al otro grupo se le dio placebo (aceite de oliva) durante 21 días. Se observó que la concentración de Omega-3 fue significativamente mayor en los tejidos gingivales del grupo experimental, pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en relación a los niveles de AA, PGE2 y LTB4, aunque se encontró una disminución no significativa en la inflamación gingival en el grupo con Omega-3 (Campan, Planchand, & Duran, 1997).

En un ensayo clínico con pacientes que presentaban PC consumieron 3 g de Omega-3 o placebo, todos los pacientes recibieron instrucciones de higiene oral y fueron monitoreados durante 28 semanas. Para el grupo que tomó Omega-3, hubo un aumento significativo en la cantidad de Omega-3 totales en las membranas de glóbulos rojos a las 8 y 16 semanas, sin haber mejoras significativas en los resultados clínicos, estos resultados sugieren que los Omega-3 como monoterapia (es decir, sin la eliminación del cálculo supra e infra gingival) no mejora los resultados de la PC, o su efecto se ve disminuido por la deficiencia de la higiene oral (Parulkar M, 2009).

Con anterioridad se habló sobre los subproductos derivados de los Omega-3 como la Resolvina E1, la cual se ha utilizado tópicamente en un modelo de conejo con periodontitis inducida por *Porphyromonas Gingivalis*, el resultado fue que la Resolvina E1 impidió casi por completo la pérdida de hueso alveolar, (Hasturk H, 2007) con una reducción en la profundidad de

las bolsas periodontales y un retorno en la arquitectura de los tejidos blandos; histológicamente se reveló la regeneración del hueso por la restauración de la altura de la cresta ósea alveolar, la eliminación de los defectos intraóseos, y regeneración del cemento radicular con un ligamento periodontal organizado (Hasturk et al., 2006)

Por parte de la protectina D1, reduce la secreción de TNF- α y la secreción de IFN- γ , promueve la apoptosis de los LT (Bento, Claudino, Dutra, Marcon, & Calixto, 2011) y reduce la transmigración de PMN a través del endotelio disminuyendo así la inflamación (Shinohara, Mirakaj, & Serhan, 2012).

A pesar del gran avance en la investigación del efecto benéfico de los ácidos grasos Omega-3, aún es necesario adquirir un mejor entendimiento sobre el efecto del suplemento alimenticio con los ácidos grasos Omega-3, en la respuesta inmune e inflamatoria de los tejidos periodontales, así como la dosificación adecuada capaz de inhibir la destrucción periodontal.

JUSTIFICACIÓN

La desregulación y falta de resolución de la inflamación es considerada actualmente una de las principales causas de la progresión y severidad de la periodontitis. Convencionalmente se emplean tratamientos que se centran en el control y eliminación bacteriana, dejando de lado la modulación de la respuesta inflamatoria, por lo tanto se deben buscar tratamientos adyuvantes que sean factibles y capaces de modular los mecanismos inmunológicos que destruyen el periodonto. En ese sentido se ha visto que los Omega-3 disminuyen la inflamación y por ende la destrucción periodontal, sin embargo no se conoce por completo el mecanismo de acción por el cual tienen estos efectos a nivel inmunológico. Por lo que en esta investigación se analizaron sus efectos inmunomoduladores.

HIPÓTESIS

Los ratones con PC alimentados con ácidos grasos Omega-3 tendrán disminución de la inflamación y por lo tanto menor pérdida ósea alveolar.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de suplementar la dieta con ácidos grasos Omega-3 en la pérdida ósea alveolar y en algunos parámetros inmunológicos en un modelo murino de periodontitis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En ratones C57BL/6 con o sin enfermedad periodontal inducida con *Porphyromonas Gingivalis*, y con o sin suplemento alimenticio con ácidos grasos Omega-3:

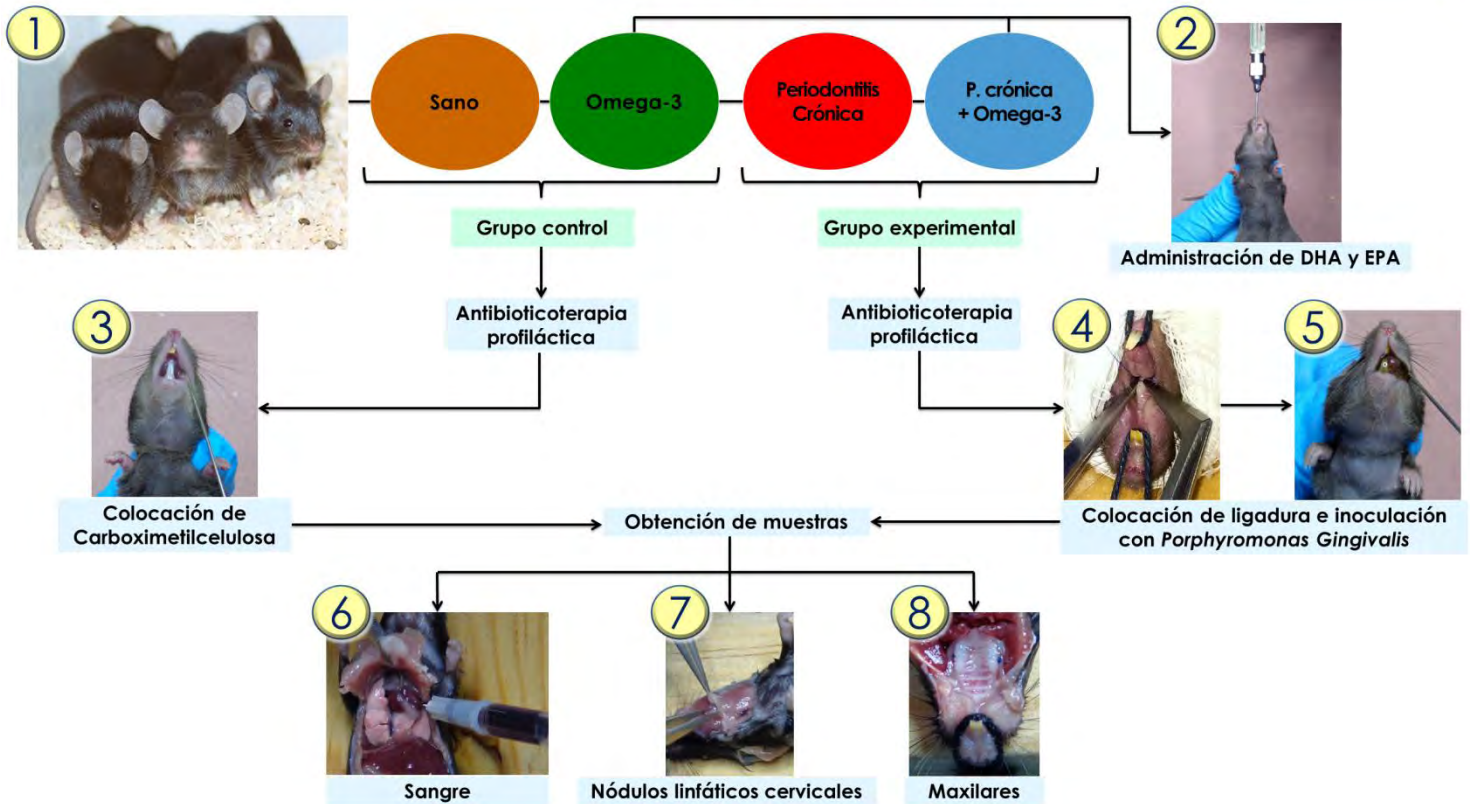
- Evaluar la pérdida ósea alveolar.

- Determinar la concentración de citocinas Th1 y Th2 en suero.
- Determinar la producción de anticuerpos IgG específicos contra *Porphyromonas Gingivalis*.
- Inmunoidentificar poblaciones de linfocitos y células presentadoras de antígeno en ganglios cervicales.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

Metodología



Esquema 1. Esquema que resume la metodología utilizada.



Esquema 2. Cronología experimental

ANIMALES

Se adquirieron 24 ratones C57BL/6 hembras de 6 semanas de edad, que se mantuvieron en ambientes estériles, fueron divididos en 4 grupos de 6 ratones cada uno, 2 grupos con PC y 2 grupos sin PC (sanos); los cuales fueron alimentados de la siguiente manera:

- PC + Rodent Diet 5001+ DHA, EPA.
- PC + Rodent Diet 5001.
- Sano + Rodent Diet 5001 + DHA, EPA.
- Sano + Rodent Diet 5001.

SUPLEMENTACIÓN ALIMENTICIA CON OMEGA-3

Tanto un grupo con PC como un grupo sano recibieron suplemento alimenticio con 352.7mg/kg peso de ratón de DHA+EPA (Bendyk et al., 2009), equivalente a 2g/kg peso en humano. El suplemento fue administrado cada 24 horas vía intragástrica desde el inicio del

experimento hasta 12 horas antes del sacrificio, teniendo un total de 70 dosis (Esquema 2).

INDUCCIÓN DE PERIODONTITIS

Al día 48 del experimento se les realizó la antibioticoterapia profiláctica (Baker, Evans, & Roopenian, 1994) a todos los ratones colocándoles en sus bebederos 15 ml de sulfametazol con trimetoprim de 400mg/ 80mg/ 5ml en 300ml de agua en un periodo de 12 días, transcurrido este tiempo se dejaron cuatro días para la eliminación del fármaco del organismo de los ratones. Al día 63 se comenzó con la inducción de la PC realizando una ligadura en los segundos molares superiores a los ratones de los grupos asignados para la inducción de PC con sutura de polipropileno 6-0 (Esquema 2) (Abe & Hajishengallis, 2013) .

Al día 64 del experimento se comenzó a inocular 1×10^9 de *Porphyromonas Gingivalis* (Baker, Dixon, & Roopenian, 2000) resuspendida en 100 μ l de carboximetilcelulosa al 2%, colocando 50 μ l en la zona del pliegue mucogingival adyacente a cada la ligadura, dejando pasar 48 horas entre la primera y segunda inoculación, 24 horas entre la segunda y tercera, 24 horas entre la tercera y cuarta y 24 horas entre la cuarta y quinta (días 64, 66, 67, 68 y 69)(Esquema 2).

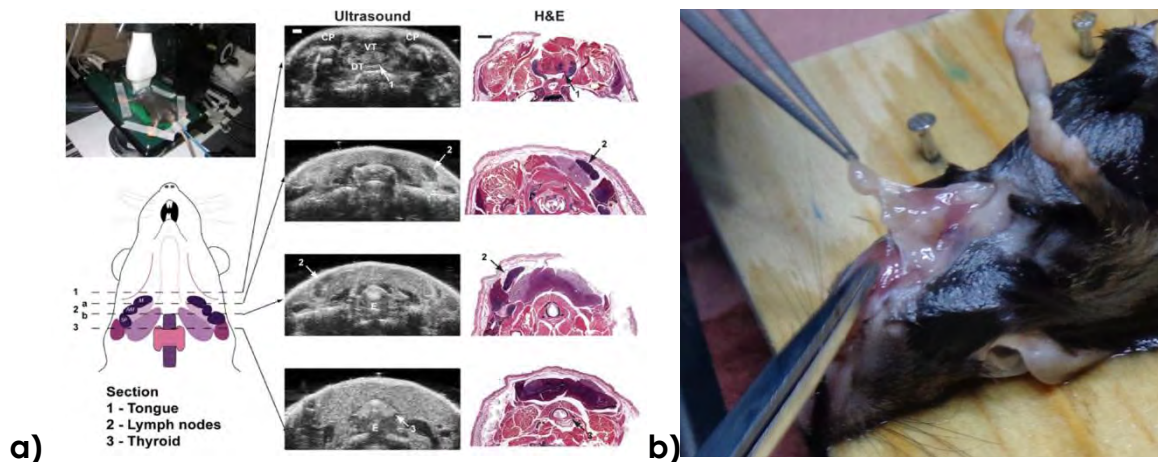
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Se sacrificaron todos los ratones pasados 71 días de la suplementación alimenticia con DHA y EPA. Se recuperaron los sueros para la detección de anticuerpos y citocinas por medio del centrifugado de la sangre obtenida por punción intracardiaca, se recuperaron los maxilares para determinar la pérdida ósea por tinción de azul de metileno y eosina (Abe &

Hajshengallis, 2013), también se obtuvieron los ganglios linfáticos cervicales para su análisis celular por medio de citometría de flujo (Esquema 2).

INMUNOIDENTIFICACIÓN CELULAR EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS CERVICALES

Se disectaron los GLC (Esquema 3) y fueron colocados sobre hielo en RPMI enriquecido con 200 μ l de suero fetal bovino, estos ganglios se maceraron y las células fueron colocadas en un tubo falcón de 15 ml y filtradas en tela de organza, cada tubo falcón se aforo a 10 ml y se centrifugo durante 10 minutos a 1500 RPM, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con 1 ml de RPMI limpio y se pasó a un tubo eppendorf, se llevó a la centrifuga y se centrífugo durante 5 minutos a 1500 RPM, se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 1ml de RPMI limpio.



Esquema 3. **a)** Mapeo de los ganglios linfáticos cervicales y de sus estructuras adyacentes por medio de ultrasonido de alta frecuencia y tinción H y E (Walk, 2014). **b)** Se observa la localización de un ganglio linfático cervical.

La solución se dividió en 2 tubos eppendorf debidamente rotulados para su posterior tinción, todos los tubos se aforaron a 1ml con RPMI y se centrifugaron a 1500 RPM durante 10 minutos, se les retiro el sobrenadante, posteriormente se les agrego a todos los tubos 10 μ l de anticuerpo CD16/32

y se incubaron en hielo durante 10 minutos, posteriormente se les colocó 25µl de anticuerpo de la tinción que le correspondía a cada tubo, teniendo en total 2 tinciones:

- Tinción 1: Identificación de linfocitos: CD3-FITC, CD4-PECy5, CD8-APC y CD19-PE.
- Tinción 2: Identificación de MCH en células presentadoras de antígeno: MCHI-FITC, MCHII-PECy5, CD11c-APC y CD103-PE.

Un tubo se dejó sin tinción como control de isótopo y auto fluorescencia. Todos los tubos se dejaron 30 minutos incubados en hielo, después se lavaron las células con 1ml de PBA y se centrifugaron por 7 minutos a 1500 RPM, se les retiró el sobrenadante y se fijaron con 300µl de paraformaldehído al 1%, se resuspendieron y fueron colocados en tubos para citometría previamente rotulados y fueron guardados en la oscuridad a 4° C hasta su lectura.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS Th1 Y Th2 EN SUERO

Para la determinación de citocinas Th1, Th2 se obtuvieron los sueros de los ratones de cada grupo al momento del sacrificio. La sangre se obtuvo por punción intracardiaca, una vez que el ratón fue sacrificado por sobredosis de anestesia. La sangre obtenida fue centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos para separar el suero, que fue guardado a -20°C hasta su análisis.

Se usaron 50 µl de suero de cada animal control y experimental para la detección de IFN-γ, IL-2, TNF-α, IL-4 e IL-5 con el kit CBA's mouse Th1, Th2 de BD por medio de citometría de flujo. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgG1 E IgG2 EN SUERO

Se realizó una prueba de ELISA indirecta para la determinación de títulos de IgG1 e IgG2. Se recubrieron pozos con lisados de *Porphyromonas Gingivalis*, se les colocó diferentes diluciones del suero obtenido de los diferentes grupos de estudio, y se puso un anticuerpo peroxidado anti mouse IgG. La reacción se reveló con el uso de ABTS con peróxido de hidrógeno al 10%. Los resultados se obtuvieron mediante absorbancia a 700nm. Se calcularon los títulos de anticuerpo mediante la ecuación de la curva.

MEDICIÓN DE LA PÉRDIDA ÓSEA ALVEOLAR

Después que se obtuvieron los hemimaxilares, fueron descarnados, se colocaron durante 10 minutos en cloro concentrado para aclararlos, se dejaron 1 minuto en agua para eliminar el exceso de cloro, posteriormente se sumergieron 15 minutos en azul de metileno al 1% y 0.5% de eosina, se colocaron 5 minutos en agua y 5 segundos en agua corriente para eliminar el exceso del colorante. Técnica modificada de (Abe & Hajishengallis, 2013).

Posterior al procesamiento de los hemimaxilares, la pérdida ósea fue medida desde la unión amelocementaria hasta la cresta ósea alveolar con ayuda de un explorador de conductos insertándole un tope de silicón, transportando esta distancia a un calibrador vernier con una precisión de 0.02 mm, tomando como referencia de sondeo todos los surcos y cúspides presentes en los tres molares tanto por vestibular como por palatino, dando un total de 18 sitios de sondeo:

- En el primer molar 10 sitios (cúspide mesiopalatina – cúspide mesiovestibular, surco mesiopalatino - surco mesiovestibular, cúspide palatina – cúspide vestibular, surco distopalatino – surco distovestibular y cúspide distopalatina – cúspide distovestibular).
- En el segundo molar 6 sitios (cúspide mesiopalatina - cúspide mesiovestibular, surco palatino – surco vestibular, cúspide distopalatina – cúspide distovestibular).
- En el tercer molar 2 sitios (cúspide palatina – cúspide vestibular) (Abe & Hajishengallis, 2013).

Se verificaron las medidas a través de tomografía computarizada donde se midió la pérdida ósea horizontal y vertical por medio de la identificación de las densidades óseas, del esmalte y dentina (Figura 1).

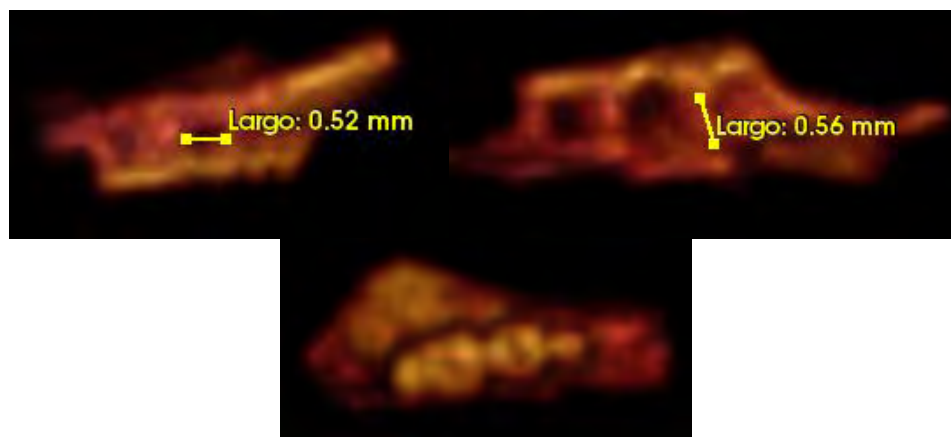


Figura 1. Determinación de pérdida de hueso alveolar por medio de tomografía computarizada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron con una n de 6 y los resultados fueron analizados con ayuda del programa Graph Pad, mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA LA *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*

Con el objetivo de verificar que se llevó a cabo la infección con *Porphyromonas Gingivalis*, se tomaron muestras sanguíneas 7 días después de la última inoculación bacteriana y se midieron los títulos de anticuerpos específicos IgG contra *Porphyromonas Gingivalis*. Observamos que los grupos que fueron infectados tenían anticuerpos específicos anti IgG *Porphyromonas Gingivalis*. Lo que nos permitió validar el modelo murino de PC con esta bacteria. (Figura 2)

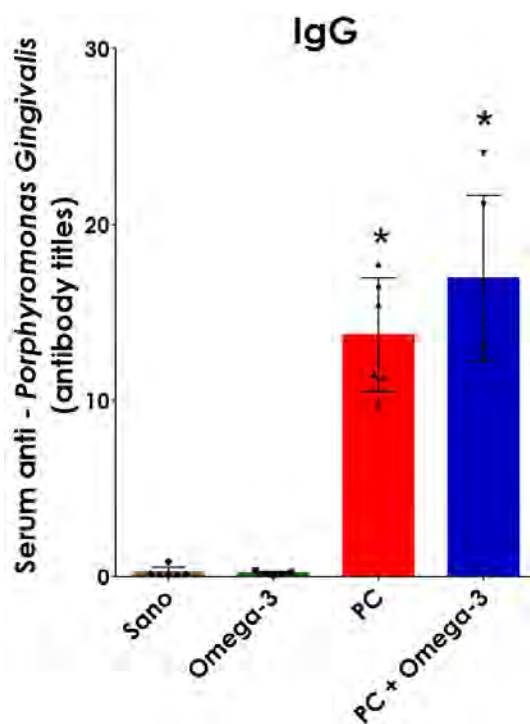
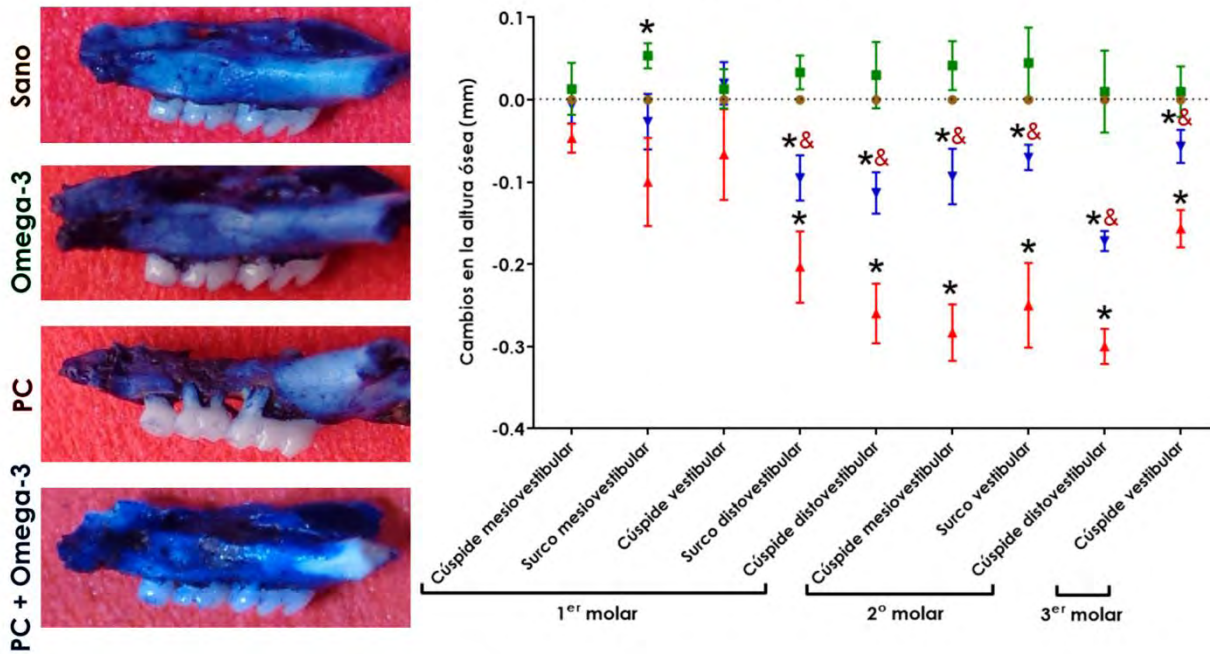


Figura 2. Altas concentraciones de anticuerpos específicos anti- *Porphyromonas Gingivalis* fueron encontradas en los grupos a los que se les indujo PC. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. ** $p \leq 0.01$ vs control ; * $p \leq 0.05$ vs control.

LOS OMEGA-3 DISMINUYEN LA PÉRDIDA ÓSEA ALVEOLAR EN LA PC

Es notable en la tomografía computarizada y en las mediciones realizadas, que la PC en conjunto con la administración de Omega-3 disminuye la pérdida ósea alveolar, en comparación con el grupo de PC sin suplemento alimenticio con Omega-3. (Figura 3)

Superficie vestibular



Superficie palatina

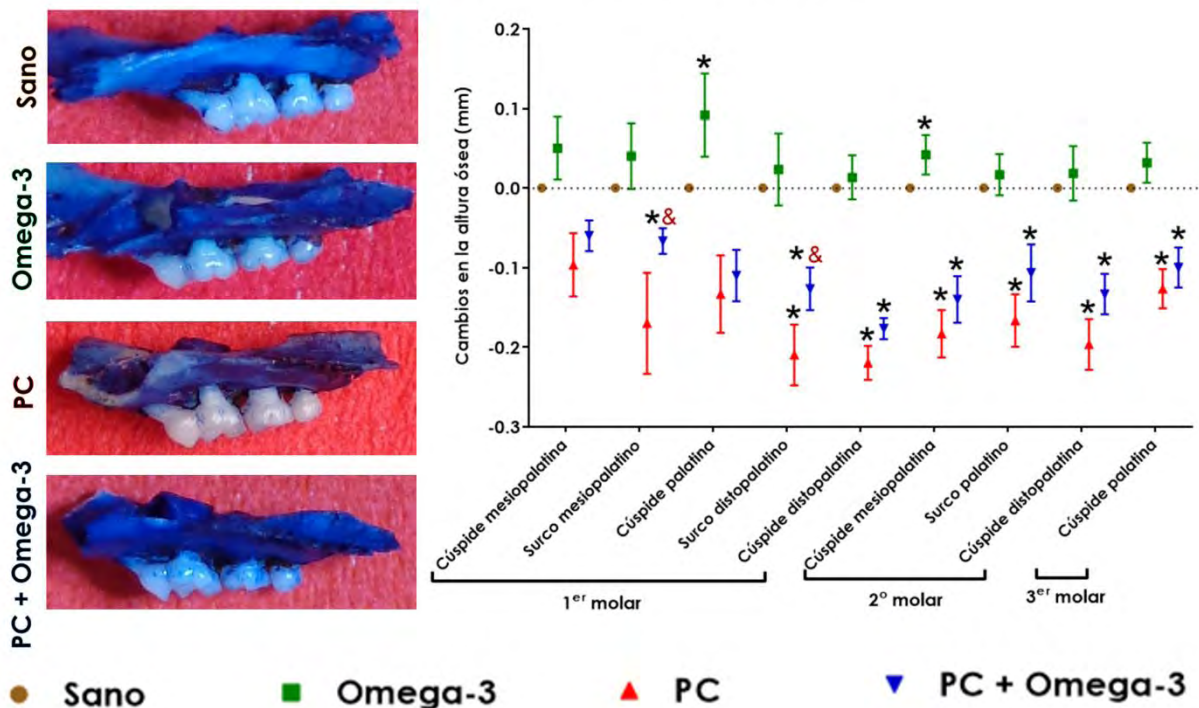


Figura 3. Comparación del nivel óseo entre los cuatro grupos. a) en las superficies vestibulares es notable una mayor pérdida ósea alveolar en el grupo con PC, especialmente en el segundo y tercer molar, se observa menor pérdida ósea alveolar en

los ratones con PC + Omega-3 en comparación a los de PC. También se aprecia que los ratones sanos con suplementación alimenticia con Omega-3 tienen mayor nivel óseo alveolar que los ratones sanos, presentando una diferencia significativa solo en el surco mesiovestibular del primer molar. En la superficie palatina se puede corroborar que los ácidos grasos Omega-3 disminuyen la pérdida ósea alveolar. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. ** $p \leq 0.01$ vs control; * $p \leq 0.05$ vs control.

LOS OMEGA-3 DISMINUYEN SIGNIFICATIVAMENTE LAS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS IL-2 Y TNF α PRESENTES EN EL PLASMA

Con el fin de determinar la concentración de citocinas proinflamatorias en el plasma sanguíneo se realizó el análisis por medio de citometría de flujo, donde es notable que los ratones con PC + Omega-3 tienen una menor concentración de IL-2 y TNF- α en comparación con los ratones con PC sin la suplementación alimenticia, esto también es visible con respecto al IFN- γ , pero no es representativo (Figura 4).

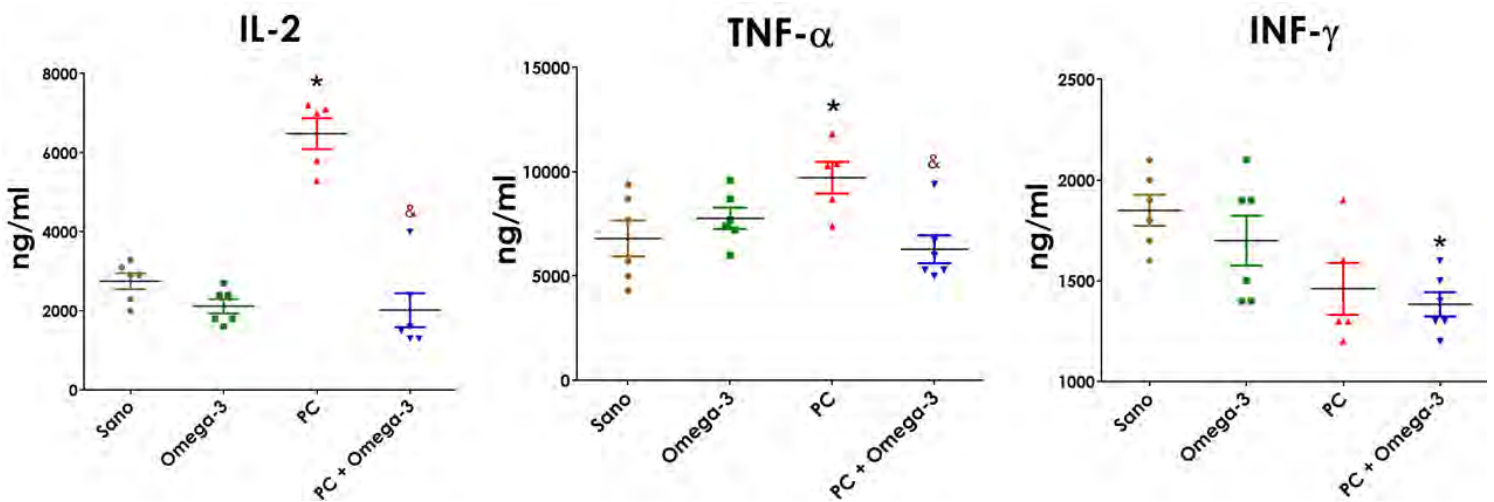


Figura 4. Bajas concentraciones de citocinas proinflamatorias IL-2 y TNF- α en ratones con PC+Omega-3 en relación con los ratones con PC sin suplementación alimenticia.

No se observan diferencias significativas en IFN- γ . Los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. ** $p \leq 0.01$ vs control; * $p \leq 0.05$ vs control.

LOS OMEGA-3 AUMENTAN LAS CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS PRESENTES EN EL PLASMA COMO LA IL-5.

Con el fin de determinar la concentración de citocinas antiinflamatorias en el plasma sanguíneo se realizó el análisis por medio de citometría de flujo, donde es notable que los ratones con PC + Omega-3 tuvieron una mayor concentración de IL-5 en comparación con los ratones con PC, esto también es observable en la IL-4 pero no es significativo (Figura 5).

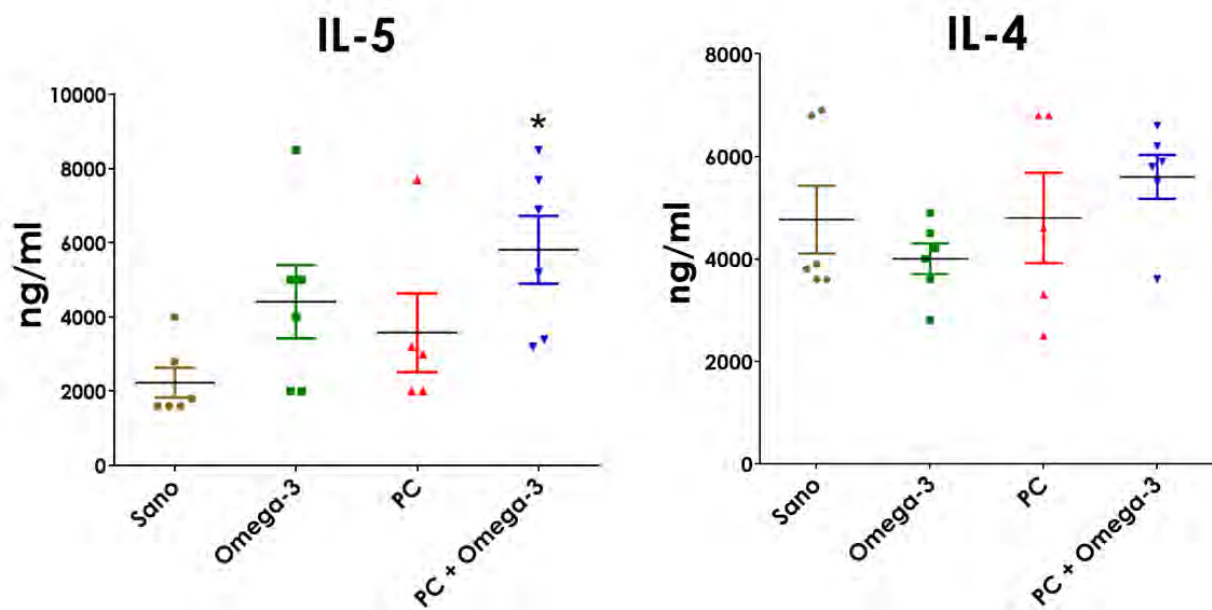


Figura 5. Altas concentraciones de la citocina antiinflamatoria IL-5 en ratones con PC+Omega-3 en relación con los ratones con PC sin suplementación alimenticia. No se observan diferencias significativas en la concentración de IL-4. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. ** $p \leq 0.01$ vs control; * $p \leq 0.05$ vs control.

LOS OMEGA-3, NO INDUCEN UN CAMBIO EN LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS PRESENTES EN LOS GLC EN LA PC.

Con el objetivo de observar los cambios en las poblaciones celulares de linfocitos en los GLC se realizó el análisis mediante citometría de flujo. Se observó una menor concentración de LT en los ratones enfermos con PC en relación a los sanos, sin observarse una diferencia significativa entre el grupo de PC y el grupo de PC + Omega-3. No se encontraron diferencias entre las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ entre los grupos. Se observó una mayor concentración de LB en los ratones enfermos con PC en comparación a los sanos, pero no existen diferencias significativas entre el grupo de PC y el grupo de PC + Omega-3 (Figura 6).

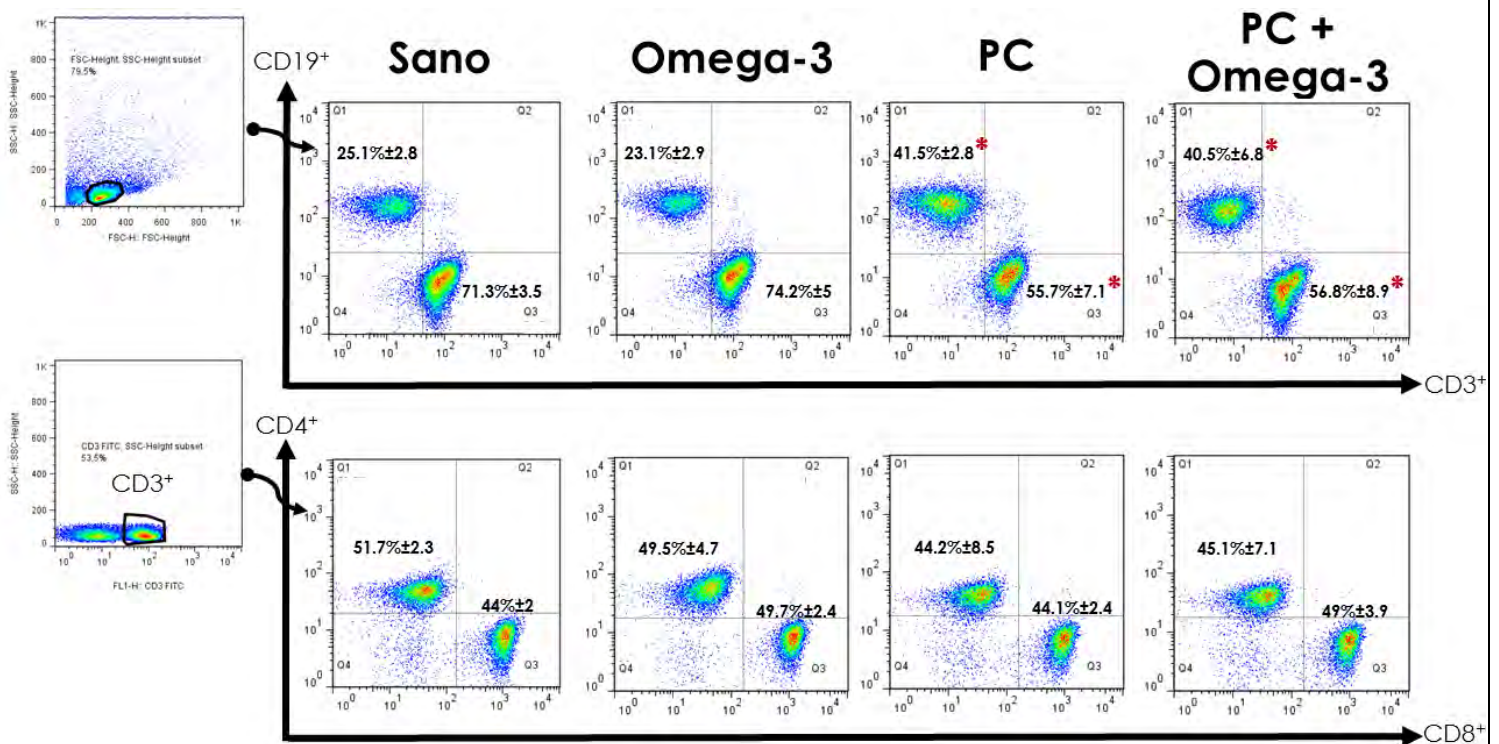


Figura 6. Identificación de linfocitos en GLC de los cuatro grupos de estudio. Las células fueron teñidas y analizadas por citometría de flujo. En presencia de PC con o sin suplementación con Omega-3 existe una menor cantidad de LT y mayor cantidad de LB en comparación con los GLC de los ratones sanos. Los resultados fueron analizados

mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. ** $p \leq 0.01$ vs control; * $p \leq 0.05$ vs control.

LAS CÉLULAS 103^+ $CD11c^-$ DISMINUYEN EN LA PC CON O SIN LA SUPLEMENTACIÓN ALIMENTICIA DE OMEGA-3. LOS OMEGA-3 DISMINUYEN LA CANTIDAD DC'S $CD103^+$ $CD11c^+$ EN LOS GLC, EN LA PC

Con el propósito de observar los cambios en las poblaciones de células presentadoras de antígeno, se analizó el nódulo linfático cervical por medio de citometría de flujo. Se encontró que las DC's $CD103^+$ $CD11c^+$ se encuentran en mayor concentración en los ganglios de los ratones que tienen PC en comparación con los ratones sanos, y que disminuye la concentración de estas células en ratones con PC + Omega-3 en comparación con los ratones con PC.

Las células $CD103^+$ $CD11c^-$ disminuyen en los ratones con PC y los ratones con PC + Omega-3 con respecto a los controles, sin haber diferencias entre los dos grupos de PC. (Figura 7).

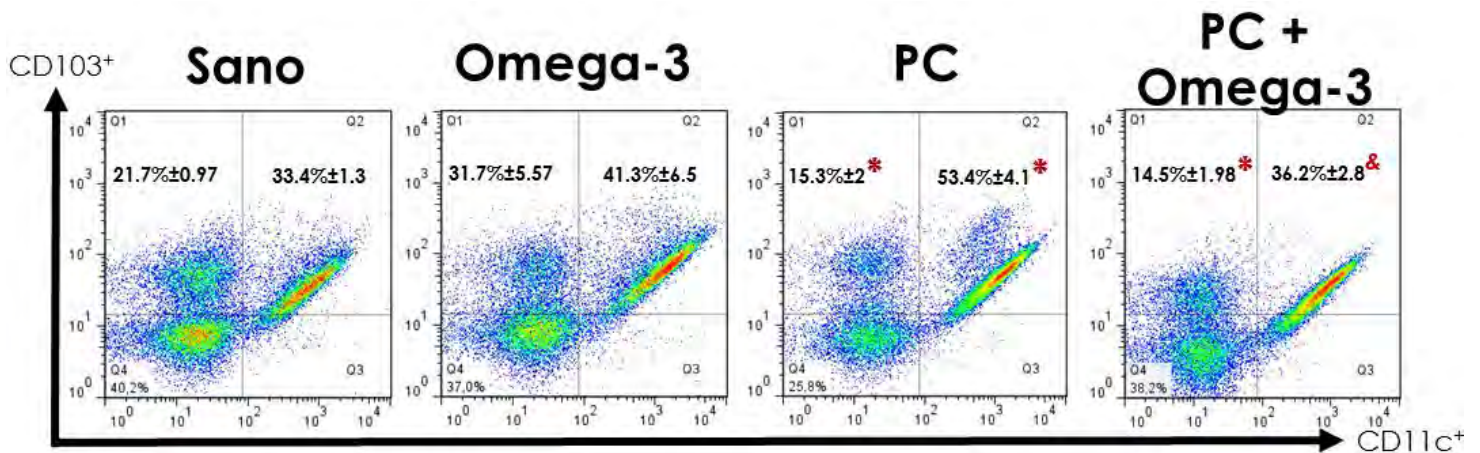


Figura 7. Identificación de células $CD103^+$ $CD11c^-$ y DC's $CD103^+$ $CD11c^+$ en los GLC de los cuatro grupos de estudio. Las células fueron teñidas y analizadas por citometría de flujo. Los ratones con PC presentaron un mayor porcentaje de $CD103^+$ $CD11c^+$ comparados con los ratones sanos, por otra parte, los ratones con PC + Omega-3 tuvieron menor cantidad de $CD103^+$ $CD11c^+$ en comparación con los ratones con PC. Las células $CD103^+$ $CD11c^-$

disminuyen en la PC con o sin suplementación de Omega-3. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. ** $p \leq 0.01$ vs control; * $p \leq 0.05$ vs control.

LAS DC's CD103⁺ CD11c⁺ DE LOS RATONES CON PC + OMEGA-3 EXPRESAN MENOR CANTIDAD DE MCHII EN COMPARACIÓN A LOS RATONES CON PC.

Con la finalidad de determinar la activación de la población de DC's CD103⁺ CD11c⁺ se midió la intensidad media de fluorescencia (MFI) del MCHII por medio de citometria de flujo.

La expresión de MCHII disminuyó considerablemente en las DC's de los ratones con PC+ Omega-3 en relación a los ratones con PC y a las de los sanos con suplementación alimenticia de Omega-3. (Figura 8)

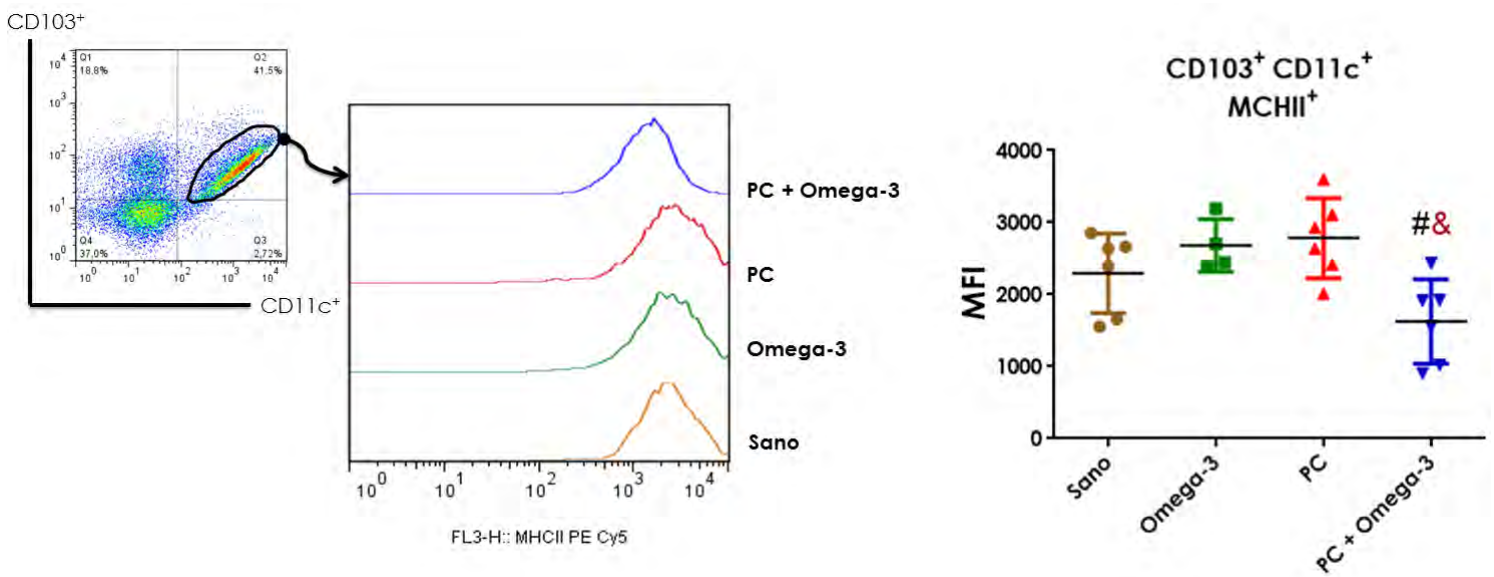


Figura 8. Análisis de la MFI del MCHII de las DC's CD103⁺ CD11c⁺ por medio de citometria de flujo.

Los ratones con PC + Omega-3, expresan significativamente menor cantidad de MCHII, que los ratones con PC y los ratones sanos con suplementación alimenticia con Omega-3; inclusive su expresión de MCHII es menor que el expresado por las DC's CD103⁺ CD11c⁺ de los ratones sanos. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. ** $p \leq 0.01$ vs control; * $p \leq 0.05$ vs control.

LAS CÉLULAS CD103⁺ CD11c⁻ DE LOS RATONES CON PC + OMEGA-3 EXPRESAN MENOR CANTIDAD DE MCHII EN COMPARACIÓN A LAS DE LOS RATONES CON PC.

Con la finalidad de determinar la activación de la población de células CD103⁺ CD11c⁻, se observó el porcentaje y se midió la MFI del MCHII por medio de citometria de flujo.

Las células CD103⁺ CD11c⁻ de los ratones con PC expresan mayor cantidad de MCHII en comparación con las de los ratones sanos y omega-3. La expresión de MCHII en las células de los ratones con PC+ Omega-3 fue menor en comparación con la de las células de los ratones con PC y es similar a la de los ratones sanos. (Figura 9)

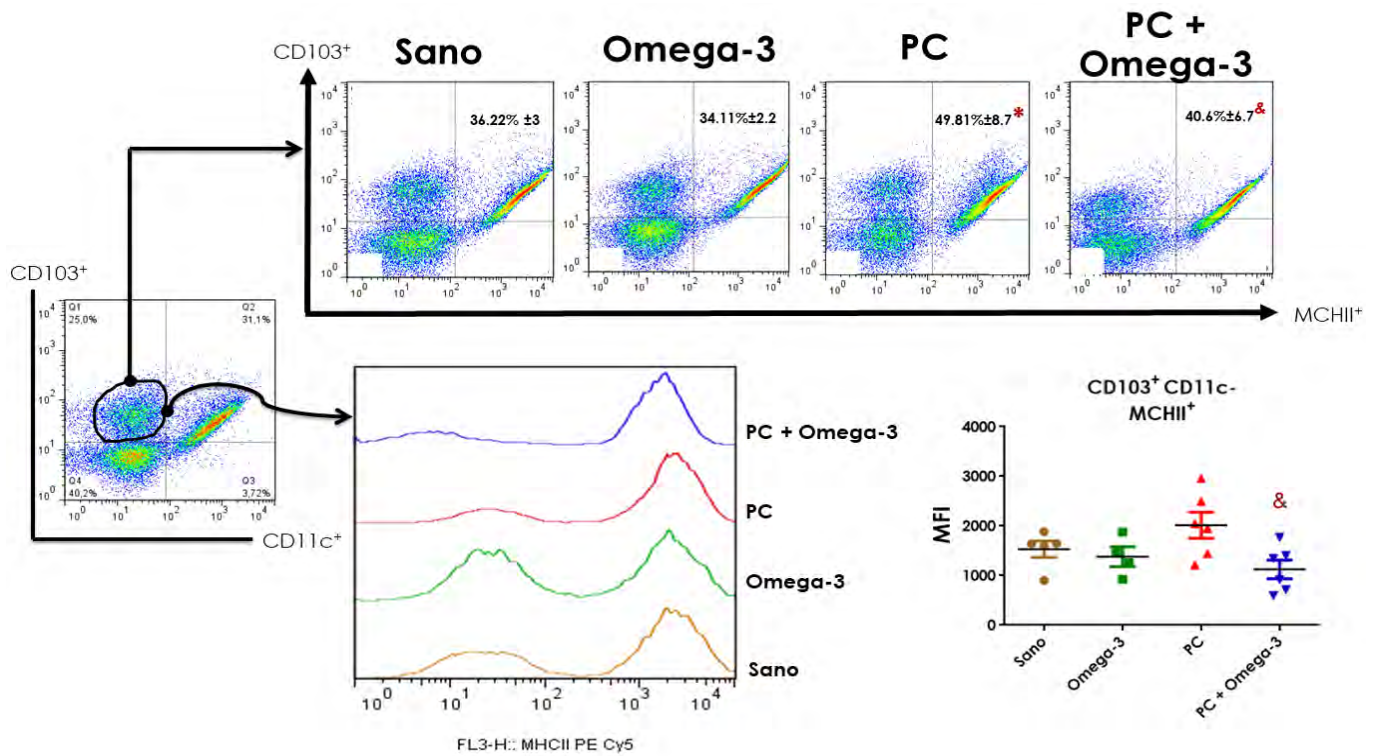


Figura 9. Análisis del porcentaje y de la MFI del MCHII de las células CD103⁺ CD11c⁻ por medio de citometria de flujo. Las células CD103⁺ CD11c⁻ de los ratones con PC + Omega-3, expresan significativamente menor cantidad de MCHII, que los ratones con PC. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey. **p ≤ 0.01 vs control; *p ≤ 0.05 vs control.

DISCUSIÓN

En esta investigación hemos revisado la respuesta inmunológica de ratones con PC y suplementación alimenticia con ácidos grasos Omega-3 en comparación a ratones con PC sin suplementación alimenticia y con ratones sanos. Para ello se determinó la concentración de anticuerpos para anti-*Porphyromonas Gingivalis*, se midió la pérdida ósea alveolar, se analizaron los ganglios linfáticos cervicales por citometría de flujo, y se realizó la determinación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en suero.

Los resultados demuestran que hubo una menor pérdida ósea alveolar en el grupo con PC+Omega-3 en comparación con el grupos con PC, este resultado es comparable con el obtenido en un estudio de PC en un modelo murino alimentado con aceite de atún, donde observaron que estos ratones presentaban pérdida ósea alveolar entre un 54% a 72% menos respecto a los controles (Bendyk et al., 2009).

Encontramos que los ácidos grasos Omega-3 disminuyen la concentración de citocinas proinflamatorias en el plasma como la IL-2 y TNF- α , pero no en IFN- γ , esto también fue observado en otro estudio donde los LT de ratón alimentados con una dieta rica en DHA y EPA disminuye la secreción de IL-2 y la expresión de IL-2 mRNA (Jolly, McMurray, & Chapkin, 1998).

También es mencionado en otros escritos que la protectina D1 derivada de Omega-3 inhibe el TNF- α , (Bannenberg & Serhan, 2010) (Serhan, Yacoubian, et al., 2008) (Serhan, Chiang, & Van Dyke, 2008) (Serhan & Chiang, 2013), igualmente *in vitro* se observó que el EPA inhibe la producción de TNF inducida por endotoxina por monocitos cultivados (T.E. Novak, 2003) (Zhao, Joshi-Barve, Barve, & Chen, 2004).

Un estudio *in vivo* reportó que la alimentación con aceite de pescado en un modelo murino disminuía la producción de TNF, IL-1 β e IL-6 por los macrófagos estimulados con endotoxina (Billiar et al., 1988) (Renier, Skamene, DeSanctis, & Radzioch, 1993). También en macrófagos tratados *in vitro* con DHA y EPA se reducen la secreción de citocinas proinflamatorias (Calder, 2009).

Igualmente ha sido reportado que la posible respuesta a la disminución de citocinas proinflamatorias Th1 en presencia de Omega-3 es por la muerte celular inducida por activación (AICD), como se observó en esplenocitos murinos, donde después de su incorporación en las balsas de lípidos, indujo AICD en células Th1 (Switzer, McMurray, Morris, & Chapkin, 2003) (Switzer, Fan, Wang, McMurray, & Chapkin, 2004). Otros autores explican que la disminución de citocinas proinflamatorias se debe al cambio del fenotipo Th1 al Th2 producido por los Omega-3 (Liblau, Singer, & McDevitt, 1995).

Vimos que los ácidos grasos Omega-3 aumentan la concentración de citocinas antiinflamatorias en el plasma como la IL-5, esto puede deberse a que como ya se mencionó los Omega-3 pueden orientar el fenotipo Th1 al fenotipo Th2, considerado como anti-inflamatorio, secretando IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Liblau et al., 1995). Esto coincide con otro estudio en el que observaron que el aceite de pescado en la dieta aumentó significativamente el porcentaje de células Th2 polarizadas y suprimió el número de células Th1 (Kleemann, Scott, Worz-Pagenstert, Nimal Ratnayake, & Kolb, 1998).

Observamos que los ácidos grasos Omega-3, no produjeron cambios en las poblaciones de linfocitos presentes en los GLC en la PC, puesto que hay una mayor concentración de LT en los ratones sanos que en los enfermos con PC y no se observan diferencias significativas entre el grupo de PC y el grupo de PC+ Omega-3, esto puede deberse a que después de ser

activados los LT comienzan su clonación, y posteriormente migran al sitio de infección. Nuestros resultados son diferentes a los resultados reportados en experimentos *in vitro*, donde se observó que el DHA y EPA pueden inhibir la proliferación de células T (Calder, Bond, Bevan, Hunt, & Newsholme, 1991) (P.C. Calder, 1992).

No encontramos diferencias significativas de LT CD4 y LT CD8 entre los grupos, sin embargo, se observó una mayor concentración de LB en los ratones enfermos con PC en comparación a los sanos, pero sin haber diferencias significativas entre el grupo de PC y el grupo de PC + Omega-3, quizá sea resultado de la clonación que se da después de que los LT activan a los LB.

En la PC se observó un aumento de las DC's CD103⁺ CD11c⁺ y también un aumento de MCHII en estas células, en la PC + Omega-3 disminuyeron las DC's CD103⁺ CD11c⁺ así como su expresión de MCHII. Se observó una disminución de las células CD103⁺ CD11c⁻ en los ratones con PC con o sin suplementación alimenticia con Omega-3, observando una reducción en la expresión de MCHII en las células de los ratones con PC + Omega-3; estos resultados son parecidos a los reportados en un experimento donde las DC's expuestas a DHA se mantienen inmaduras después de su estimulación con LPS, ya que se caracterizan por una falta o baja expresión de MHCII, CD40, CD80, CD86, y CCR7, así como la falta de producción de citocinas proinflamatorias, (Kong et al., 2010) (Wang, 2007) (Zapata-Gonzalez, 2008) (Zeyda et al., 2005) (Kong, Yen, & Ganea, 2011)

De la misma manera se reportó en otro experimento donde se purificaron de la médula ósea DC's que derivaron a CD11c, expuestas a DHA durante 24 h y estimuladas con LPS 24 horas después, que la expresión de MCHII es

inhibida por el DHA, tanto en términos de porcentaje de células positivas para MCHII, como en la intensidad de fluorescencia. (Kong et al., 2011)

CONCLUSIONES

El suplemento alimenticio con Omega-3:

- Disminuye la inflamación por medio de la disminución de los niveles de citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-2.
- Incrementa la concentración de IL-5 de tipo antiinflamatorio.
- Disminuye la pérdida ósea alveolar.
- En el ganglio linfático cervical reduce las poblaciones de células dendríticas CD103⁺ CD11c⁺.
- Reduce la expresión de MCHII en las DC's CD103⁺ CD11c⁺ y en las células CD103⁺ CD11c⁻.

Nuestros resultados indican que el suplemento alimenticio con Omega-3 es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria en el periodonto y por lo tanto la destrucción periodontal.

REFERENCIAS

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5721-5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
- Abe, T., & Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*, 394(1-2), 49-54. doi: 10.1016/j.jim.2013.05.002
- Al-Shammari KF, N. R., Hill R, Wang H. . (2002). Surgical and non-surgical treatment of chronic periodontal disease. . *Int Chin J Dent.*, 2, 15–32.
- Alam SQ, B. B., Alam B. . (1991). Arachidonic acid, PGE2 and Leukotriene C4 levels in gingiva and submandibular salivary glands of rats fed diets containing n3 fatty acids. *Lipids*, 26, 895–900.
- Alfaro, C., Onate, C., Rodriguez, A., Perez-Gracia, J. L., Fernandez de Sanmamed, M., & Melero, I. (2013). [Specialized dendritic cells in cross-presentation of exogenous antigens to cytotoxic T lymphocytes]. *An Sist Sanit Navar*, 36(3), 519-537.
- Allen, J. B., Wong, H. L., Costa, G. L., Bienkowski, M. J., & Wahl, S. M. (1993). Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis. *J Immunol*, 151(8), 4344-4351.
- Apatzidou, D. A. (2012). Modern approaches to non-surgical biofilm management. *Front Oral Biol*, 15, 99-116. doi: 10.1159/000329674
- Arizon, M., Nudel, I., Segev, H., Mizraji, G., Enekave, M., Furmanov, K., . . . Hovav, A. H. (2012). Langerhans cells down-regulate inflammation-driven alveolar bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(18), 7043-7048. doi: 10.1073/pnas.1116770109
- B. Chee, B. P., T. Fitzsimmons, A. M. Coates, P. M. Bartold (2015). Omega-3 fatty acids as an adjunct for periodontal therapy—a review. *Clin Oral Invest*.
- Baker, P. J., Dixon, M., Evans, R. T., Dufour, L., Johnson, E., & Roopenian, D. C. (1999). CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*, 67(6), 2804-2809.
- Baker, P. J., Dixon, M., & Roopenian, D. C. (2000). Genetic control of susceptibility to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun*, 68(10), 5864-5868.
- Baker, P. J., Evans, R. T., & Roopenian, D. C. (1994). Oral infection with Porphyromonas gingivalis and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol*, 39(12), 1035-1040.
- Bannenberg, G., & Serhan, C. N. (2010). Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta*, 1801(12), 1260-1273. doi: 10.1016/j.bbailip.2010.08.002
- Bendyk, A., Marino, V., Zilm, P. S., Howe, P., & Bartold, P. M. (2009). Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *J Periodontal Res*, 44(2), 211-216. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01108.x

- Bento, A. F., Claudino, R. F., Dutra, R. C., Marcon, R., & Calixto, J. B. (2011). Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol*, *187*(4), 1957-1969. doi: 10.4049/jimmunol.1101305
- Berchier, C. E., Slot, D. E., & Van der Weijden, G. A. (2010). The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol*, *37*(9), 829-839. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01575.x
- Bernardo, D. (2013). Human intestinal dendritic cells as controllers of mucosa immunity. *REVISTA ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES DIGESTIVAS*, *105*, 279-290.
- Billiar, T. R., Bankey, P. E., Svingen, B. A., Curran, R. D., West, M. A., Holman, R. T., . . . Cerra, F. B. (1988). Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery*, *104*(2), 343-349.
- Bodet, C., Chandad, F., & Grenier, D. (2007). [Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol (Paris)*, *55*(3-4), 154-162. doi: 10.1016/j.patbio.2006.07.045
- Bollen, A. M. (2008). Effects of malocclusions and orthodontics on periodontal health: evidence from a systematic review. *J Dent Educ*, *72*(8), 912-918.
- Calder, P. C. (2009). Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, *91*(6), 791-795. doi: 10.1016/j.biochi.2009.01.008
- Calder, P. C. (2015). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*, *1851*(4), 469-484. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.08.010
- Calder, P. C., Bond, J. A., Bevan, S. J., Hunt, S. V., & Newsholme, E. A. (1991). Effect of fatty acids on the proliferation of concanavalin A-stimulated rat lymph node lymphocytes. *Int J Biochem*, *23*(5-6), 579-588.
- Campan, P., Planchand, P. O., & Duran, D. (1997). Pilot study on n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*, *24*(12), 907-913.
- Caton, J. G., Ciancio, S. G., Blieden, T. M., Bradshaw, M., Crout, R. J., Hefti, A. F., . . . Walker, C. (2000). Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol*, *71*(4), 521-532. doi: 10.1902/jop.2000.71.4.521
- Cobb, C. M. (1996). Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol*, *1*(1), 443-490. doi: 10.1902/annals.1996.1.1.443
- Chapkin, R. S., Akoh, C. C., & Miller, C. C. (1991). Influence of dietary n-3 fatty acids on macrophage glycerophospholipid molecular species and peptidoleukotriene synthesis. *J Lipid Res*, *32*(7), 1205-1213.
- Delima, A. J., Oates, T., Assuma, R., Schwartz, Z., Cochran, D., Amar, S., & Graves, D. T. (2001). Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, *28*(3), 233-240.
- FitzGerald, G. A., & Patrono, C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*, *345*(6), 433-442. doi: 10.1056/NEJM200108093450607

- Fowler, K. H., Chapkin, R. S., & McMurray, D. N. (1993). Effects of purified dietary n-3 ethyl esters on murine T lymphocyte function. *J Immunol*, *151*(10), 5186-5197.
- Galli, C., & Calder, P. C. (2009). Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann Nutr Metab*, *55*(1-3), 123-139. doi: 10.1159/000228999
- Gemmell, E., Carter, C. L., Hart, D. N., Drysdale, K. E., & Seymour, G. J. (2002). Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiol Immunol*, *17*(6), 388-393.
- Genco, R. J., & Van Dyke, T. E. (2010). Prevention: Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat Rev Cardiol*, *7*(9), 479-480. doi: 10.1038/nrcardio.2010.120
- Giannobile, W. V. (2008). Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*, *79*(8 Suppl), 1592-1600. doi: 10.1902/jop.2008.080174
- Goldman, D. W., Pickett, W. C., & Goetzl, E. J. (1983). Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, *117*(1), 282-288.
- Gomes, S. C., Varela, C. C., da Veiga, S. L., Rosing, C. K., & Oppermann, R. V. (2007). Periodontal conditions in subjects following orthodontic therapy. A preliminary study. *Eur J Orthod*, *29*(5), 477-481. doi: 10.1093/ejo/cjm050
- H, F. (2011). Root caries and risk profiles using the Cariogram in different periodontal disease severity groups. *Acta Odontol Scand*, *69* (2), 118-124.
- Hamazaki K, I. M., Sawazaki S, Hamazaki T (2006). Fish oil reduces tooth loss mainly through its anti-inflammatory effects? . *Med Hypotheses*, *67*, 868-870.
- Hasturk H, K. A., Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, Van Dyke T (2007). Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol*, *179*, 7021-7029
- Hasturk, H., Kantarci, A., Ohira, T., Arita, M., Ebrahimi, N., Chiang, N., . . . Van Dyke, T. E. (2006). RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J*, *20*(2), 401-403. doi: 10.1096/fj.05-4724fje
- Hawkey, C. J. (1993). Gastrointestinal problems associated with non-steroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Scand J Gastroenterol Suppl*, *200*, 94-95.
- Hioe, K. P., & van der Weijden, G. A. (2005). The effectiveness of self-performed mechanical plaque control with triclosan containing dentifrices. *Int J Dent Hyg*, *3*(4), 192-204. doi: 10.1111/j.1601-5037.2005.00150.x
- Hovav, A. H. (2014). Dendritic cells of the oral mucosa. *Mucosal Immunol*, *7*(1), 27-37. doi: 10.1038/mi.2013.42
- Husseini, A., Slot, D. E., & Van der Weijden, G. A. (2008). The efficacy of oral irrigation in addition to a toothbrush on plaque and the clinical parameters of periodontal inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg*, *6*(4), 304-314. doi: 10.1111/j.1601-5037.2008.00343.x
- Iwasaki M, Y. A., Moynihan P, Watanabe R, Taylor GW, Miyazaki H. . (2010). Longitudinal relationship between dietary omega-3 fatty acids and periodontal disease. *Nutrition*, *26*, 1-5
- JM, A. (1995). Caries lesions and dental restorations as predisposing factors in the progression of periodontal diseases in adolescents. A 3-year longitudinal study. *JPeriodontol.*, *66* (4), 249-254.

- Jolly, C. A., McMurray, D. N., & Chapkin, R. S. (1998). Effect of dietary n-3 fatty acids on interleukin-2 and interleukin-2 receptor alpha expression in activated murine lymphocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 58(4), 289-293.
- Karpinia, K., & Magnusson, I. (2000). Recent approaches to periodontal therapy. *Expert Opin Pharmacother*, 1(6), 1219-1226. doi: 10.1517/14656566.1.6.1219
- Kebschull, M., Demmer, R. T., & Papapanou, P. N. (2010). "Gum bug, leave my heart alone!"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res*, 89(9), 879-902. doi: 10.1177/0022034510375281
- Kesavalu, L., Vasudevan, B., Raghu, B., Browning, E., Dawson, D., Novak, J. M., . . . Ebersole, J. L. (2006). Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. *J Dent Res*, 85(7), 648-652. doi: 10.1177/154405910608500713
- Khalaf F. Al-Shammari, D., MS, Rodrigo F. Neiva, DDS, Roger W. Hill, DDS, MS, and Hom-Lay Wang, DDS, MSD. (2002). Surgical and non-surgical treatment of chronic periodontal disease. *Int Chin J Dent*, 2, 15-32.
- Kim, W., Khan, N. A., McMurray, D. N., Prior, I. A., Wang, N., & Chapkin, R. S. (2010). Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Prog Lipid Res*, 49(3), 250-261. doi: 10.1016/j.plipres.2010.01.002
- Kleemann, R., Scott, F. W., Worz-Pagenstert, U., Nimal Ratnayake, W. M., & Kolb, H. (1998). Impact of dietary fat on Th1/Th2 cytokine gene expression in the pancreas and gut of diabetes-prone BB rats. *J Autoimmun*, 11(1), 97-103. doi: 10.1006/jaut.1997.0179
- Kong, W., Yen, J. H., & Ganea, D. (2011). Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*, 25(5), 872-882. doi: 10.1016/j.bbi.2010.09.012
- Kong, W., Yen, J. H., Vassiliou, E., Adhikary, S., Toscano, M. G., & Ganea, D. (2010). Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. *Lipids Health Dis*, 9, 12. doi: 10.1186/1476-511X-9-12
- Lalla, E., & Papapanou, P. N. (2011). Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*, 7(12), 738-748. doi: 10.1038/nrendo.2011.106
- Lee, T. H., Menica-Huerta, J. M., Shih, C., Corey, E. J., Lewis, R. A., & Austen, K. F. (1984). Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B5 and the double lipooxygenase product. *J Biol Chem*, 259(4), 2383-2389.
- Liblau, R. S., Singer, S. M., & McDevitt, H. O. (1995). Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today*, 16(1), 34-38.
- Lundberg, K., Wegner, N., Yucel-Lindberg, T., & Venables, P. J. (2010). Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*, 6(12), 727-730. doi: 10.1038/nrrheum.2010.139
- Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A., & Offenbacher, S. (2013). Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Periodontol*, 84(4 Suppl), S170-180. doi: 10.1902/jop.2013.1340015

- Martuscelli, G., Fiorellini, J. P., Crohin, C. C., & Howell, T. H. (2000). The effect of interleukin-11 on the progression of ligature-induced periodontal disease in the beagle dog. *J Periodontol*, 71(4), 573-578. doi: 10.1902/jop.2000.71.4.573
- Mikhaleva, L. M., Barkhina, T. G., Shapovalov, V. D., Luss, L. V., & Il'ina, N. I. (2001). [Ultrastructure of cell populations of gingival soft tissue in chronic inflammatory processes]. *Arkh Patol*, 63(6), 15-21.
- Mullally, B., Irwin, C., Ziada, H., Allen, E., & Byrne, P. J. (2007). Periodontics: 3. Non-surgical periodontal therapy in general dental practice. *Dent Update*, 34(6), 326-328, 330-322, 335-326.
- Noguchi, K., & Ishikawa, I. (2007). The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 43, 85-101. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00170.x
- Offenbacher, S. (1996). Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*, 1(1), 821-878. doi: 10.1902/annals.1996.1.1.821
- Oringer, R. J., Research, S., & Therapy Committee of the American Academy of, P. (2002). Modulation of the host response in periodontal therapy. *J Periodontol*, 73(4), 460-470. doi: 10.1902/jop.2002.73.4.460
- P.C. Calder, S. J. B., E.A. Newsholme. (1992). The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism. *Immunology*, 108-115.
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14, 9-11.
- Palomo, L., Liu, J., & Bissada, N. F. (2007). Skeletal bone diseases impact the periodontium: a review of bisphosphonate therapy. *Expert Opin Pharmacother*, 8(3), 309-315. doi: 10.1517/14656566.8.3.309
- Parulkar M, D. D., Kryscio R, Novak MJ, Ebersole JL, Boissonneault GB. (2009). Lack of effect of omega-3 fatty acid PUFA dietary supplement on clinical measures of periodontitis in humans. *FASEB J*, 23.
- Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, 42, 80-87. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00174.x
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366(9499), 1809-1820. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8
- Pihlstrom BL, M. R., Oliphant TH, Ortiz-Campos C. . (1983). Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease A review of current studies and additional results after 6 1/2 years. *J Clin Periodontol*, 10, 524-541.
- Preshaw, P. M. (2008). Host response modulation in periodontics. *Periodontol 2000*, 48, 92-110. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00252.x
- Preshaw, P. M., Hefti, A. F., Jepsen, S., Etienne, D., Walker, C., & Bradshaw, M. H. (2004). Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31(9), 697-707. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00558.x
- Rahman MM, B. A., Fernandes G (2008). Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid. *J Cell Physiol*, 214, 201-209.
- Reddy, M. S., Geurs, N. C., & Gunsolley, J. C. (2003). Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A

- systematic review. *Ann Periodontol*, 8(1), 12-37. doi: 10.1902/annals.2003.8.1.12
- Renier, G., Skamene, E., DeSanctis, J., & Radzioch, D. (1993). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb*, 13(10), 1515-1524.
- Robinson, P. G., Deacon, S. A., Deery, C., Heanue, M., Walmsley, A. D., Worthington, H. V., . . . Shaw, W. C. (2005). Manual versus powered toothbrushing for oral health. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD002281. doi: 10.1002/14651858.CD002281.pub2
- Rodriguez-Ferrer, H. J., Strahan, J. D., & Newman, H. N. (1980). Effect of gingival health of removing overhanging margins of interproximal subgingival amalgam restorations. *J Clin Periodontol*, 7(6), 457-462.
- Ryan, M. E. (2005). Nonsurgical approaches for the treatment of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*, 49(3), 611-636, vii. doi: 10.1016/j.cden.2005.03.010
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2009). Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*, 39(8), 2076-2082. doi: 10.1002/eji.200939722
- Sambunjak, D., Nickerson, J. W., Poklepovic, T., Johnson, T. M., Imai, P., Tugwell, P., & Worthington, H. V. (2011). Flossing for the management of periodontal diseases and dental caries in adults. *Cochrane Database Syst Rev*(12), CD008829. doi: 10.1002/14651858.CD008829.pub2
- Sculley, D. V. (2014). Periodontal disease: modulation of the inflammatory cascade by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Periodontal Res*, 49(3), 277-281. doi: 10.1111/jre.12116
- Schmidt, J., Jentsch, H., Stingu, C. S., & Sack, U. (2014). General immune status and oral microbiology in patients with different forms of periodontitis and healthy control subjects. *PLoS One*, 9(10), e109187. doi: 10.1371/journal.pone.0109187
- Serhan, C. N., & Chiang, N. (2013). Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr Opin Pharmacol*, 13(4), 632-640. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.012
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, 8(5), 349-361. doi: 10.1038/nri2294
- Serhan, C. N., Yacoubian, S., & Yang, R. (2008). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol*, 3, 279-312. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409
- Shinohara, M., Mirakaj, V., & Serhan, C. N. (2012). Functional Metabolomics Reveals Novel Active Products in the DHA Metabolome. *Front Immunol*, 3, 81. doi: 10.3389/fimmu.2012.00081
- Shinwari, M. S., Tanwir, F., Hyder, P. R., & Saeed, M. H. B. (2014). Host modulation therapeutics in periodontics: role as an adjunctive periodontal therapy. *J Coll Physicians Surg Pak*, 24, 676-684.
- Sima, C., & Glogauer, M. (2013). Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontol 2000*, 63(1), 80-101. doi: 10.1111/prd.12032

- Slot, D. E., Dorfer, C. E., & Van der Weijden, G. A. (2008). The efficacy of interdental brushes on plaque and parameters of periodontal inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg*, 6(4), 253-264. doi: 10.1111/j.1601-5037.2008.00330.x
- Stagg, A. J., Kamm, M. A., & Knight, S. C. (2002). Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur J Immunol*, 32(5), 1445-1454. doi: 10.1002/1521-4141(200205)32:5<1445::AID-IMMU1445>3.0.CO;2-E
- Switzer, K. C., Fan, Y. Y., Wang, N., McMurray, D. N., & Chapkin, R. S. (2004). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids promote activation-induced cell death in Th1-polarized murine CD4+ T-cells. *J Lipid Res*, 45(8), 1482-1492. doi: 10.1194/jlr.M400028-JLR200
- Switzer, K. C., McMurray, D. N., Morris, J. S., & Chapkin, R. S. (2003). (n-3) Polyunsaturated fatty acids promote activation-induced cell death in murine T lymphocytes. *J Nutr*, 133(2), 496-503.
- T.E. Novak, T. A. B., D.H. Jho, W.S. Helton, N.J. Espat. (2003). NF- κ B inhibition by ω -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription. *Am. J. Physiol*, 284 L84-L89.
- Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., . . . Kokesova, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*, 93(2-3), 97-108. doi: 10.1016/j.imlet.2004.02.005
- Van Dyke, T. E., & Serhan, C. N. (2003). Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, 82(2), 82-90.
- Vardar, S., Buduneli, E., Baylas, H., Berdeli, A. H., Buduneli, N., & Atilla, G. (2005). Individual and combined effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*, 76(1), 99-106. doi: 10.1902/jop.2005.76.1.99
- Velo, G. P., & Milanino, R. (1990). Nongastrointestinal adverse reactions to NSAID. *J Rheumatol Suppl*, 20, 42-45.
- Walk, E. L., McLaughlin, S., Coad, J., & Weed, S. A. (2014). Use of High Frequency Ultrasound to Monitor Cervical Lymph Node Alterations in Mice. *PLoS One*, 9. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0100185>
- Wang, H., Hao, Q., Li, Q.R., Yan, X.W., Ye, S., Li, Y.S., Li, N., Li, J.S., . (2007). ω -3 Polyunsaturated fatty acids affect lipopolysaccharide-induced maturation of dendritic cells through mitogen-activated protein kinases p38. *Nutrition* 23, 474-482
- Weaver, C. T., & Murphy, K. M. (2007). T-cell subsets: the more the merrier. *Curr Biol*, 17(2), R61-63. doi: 10.1016/j.cub.2006.12.015
- Wilensky, A., Segev, H., Mizraji, G., Shaul, Y., Capucha, T., Shacham, M., & Hovav, A. H. (2014). Dendritic cells and their role in periodontal disease. *Oral Dis*, 20(2), 119-126. doi: 10.1111/odi.12122
- Xie, Y., Meng, H., Han, J., Pan, S., Zhang, L., & Shi, D. (2016). [Technical complications rates and plaque control of fixed dental prostheses in patients treated for periodontal disease]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 51(2), 69-75. doi: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2016.02.002

- Yamashita, M., Onodera, A., & Nakayama, T. (2007). Immune mechanisms of allergic airway disease: regulation by transcription factors. *Crit Rev Immunol*, 27(6), 539-546.
- Yog, R., Barhoumi, R., McMurray, D. N., & Chapkin, R. S. (2010). n-3 polyunsaturated fatty acids suppress mitochondrial translocation to the immunologic synapse and modulate calcium signaling in T cells. *J Immunol*, 184(10), 5865-5873. doi: 10.4049/jimmunol.0904102
- Zapata-Gonzalez, F., Rueda, F., Petriz, J., Domingo, P., Villarroya, F., Diaz-Delfin, J., de Madariaga, M.A., Domingo, J.C. (2008). Human dendritic cell activities are modulated by the omega 3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR (gamma): RXR heterodimers: comparison with other polyunsaturated fatty acids. *J. Leukoc. Biol*, 84, 1172-1182.
- Zelante, T., Wong, A. Y., Ping, T. J., Chen, J., Sumatoh, H. R., Viganò, E., . . . Ricciardi-Castagnoli, P. (2015). CD103(+) Dendritic Cells Control Th17 Cell Function in the Lung. *Cell Rep*, 12(11), 1789-1801. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.030
- Zeyda, M., Saemann, M. D., Stuhlmeier, K. M., Mascher, D. G., Nowotny, P. N., Zlabinger, G. J., . . . Stulnig, T. M. (2005). Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 280(14), 14293-14301. doi: 10.1074/jbc.M410000200
- Zhao, Y., Joshi-Barve, S., Barve, S., & Chen, L. H. (2004). Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J Am Coll Nutr*, 23(1), 71-78.