UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
POSGRADO DE PERIODONCIA

Producción De Ácidos Grasos De Cadena Corta Por Microorganismos Periodontopáticos En Una Población Colombiana.

Pasantía De Investigación Instituto UIBO – Universidad Del Bosque

Sección De Microbiología

LAURA VIVIANA CALDERÓN MUÑOZ

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
BOGOTA
2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
POSGRADO DE PERIODONCIA

INFORME DE PASANTÍA

Producción De Ácidos Grasos De Cadena Corta Por Microorganismos Periodontopáticos En Una Población Colombiana.

Pasantía De Investigación Instituto UIBO – Universidad Del Bosque

Sección De Microbiología

LAURA VIVIANA CALDERÓN MUÑOZ
Residente Posgrado Periodoncia

Trabajo final presentado como requisito parcial para optar al título de: Especialista en Periodoncia

Directora:
DRA. LINA JANETH SUAREZ LONDOÑO

Tutores académicos Universidad El Bosque
DRA. GLORIA INES LAFAURIE VILLAMIL
DRA. DIANA CASTILLO

Bogotá

Noviembre 2017

Resumen

El papel de los ácidos grasos volátiles producidos por bacterias ha sido estudiado ampliamente en el microbioma intestinal, encontrando que podrían regular de manera importante la función del sistema inmune a nivel local e incluso en sitios distantes al intestino. El papel de los ácidos grasos de cadena corta producidos por bacterias del microbioma oral no ha sido evaluado a gran profundidad. Para hacerlo, inicialmente es necesario determinar el tipo de ácidos grasos producidos por las bacterias orales más prevalentes en una población colombiana. El objetivo de este trabajo fue evaluar a partir de la exploración de diferentes métodos de investigación y desde la teoría, el papel que juegan las bacterias periodontopatógenas en la regulación de la respuesta inmune mediante la producción de ácidos grasos volátiles. De esta manera, se llevó a cabo una pasantía en el laboratorio de microbiología de la Unidad de Investigación de El Bosque, UIBO, con la participación en proyectos de investigación donde fueran evaluadas bacterias periodontopatógenas y la realización de una revisión de la literatura donde se analizara la bibliografía existente con referencia al tema de la regulación de la respuesta inmune por parte de microorganismos periodontopáticos.

Los resultados de este trabajo determinan la importancia de llevar a cabo un proyecto en el que se determinen los ácidos grasos volátiles producidos por bacterias periodontopatógenas en población colombiana para posteriormente evaluar el papel de los mismos específicamente en una población colombiana.

Palabras Clave: Ácidos grasos, Volátil, Periodontitis crónica, Microbioma Gastrointestinal

Abstract

The roll of short chain fatty acids produced by bacteria have been widely studied in gut microbiome, finding out insights of immune response regulation locally and at distant sites from the gut. The relation of short chain fatty acids produced by oral bacteria has not been deeply evaluated. To do so, it´s necessary first to determine the kind of volatile fatty acids produced by the most prevalent bacteria in a Colombian population. The objective of this work was to evaluate by the exploration of different investigation methods, including laboratory techniques and throughout theory, the function of periodontopathogens in the regulation of the immune response by the production of short chain fatty acids. Thereby, a internship was carried out at the Basic Oral Investigation Unit, UIBO, with the participation on projects concerning periontopathic bacteria apart from the development of a literature review relating to the regulation of the immune response through the production of volatile fatty acids by periodontopathic microorganisms.

The results of this work determine the importance of carrying out an investigation to evaluate short chain fatty acids produced by periodontopathogens in a Colombian population in order to evaluate their roll in the regulation of immune responses specifically in the mentioned population.

Key Words: Fatty acids, Volatile, Chronic periodontitis, Gastrointestinal Microbiome

Contenido

Reseña UIBO 6
1.1 Antecedentes 6
1.2 Misión 6
1.3 Visión 6
2. Objetivos de la Pasantía 7
2.1 Objetivo general: 7
2.2 Objetivos específicos: 7
3. Asistencia a Asignatura: INVESTIGACIONES II 8
3.1. Objetivo específico por cumplir 8
3.2 Justificación 8
3.3 Objetivos de la asignatura 8
3.4 Metodología 8
3.5 Actividades realizadas 9
4. Rotación UIBO Microbiología Oral 11
4.1 Objetivo específico por cumplir: 11
4.2 Descripción 11
5. Evaluación de microorganismos del complejo rojo y A. actinomycentecomitans en muestras de pacientes con periodontitis modulados por medicamentos anti-inflamatorios. 14
5.1 Introducción: 14
5.2. Marco teórico 14
5.3 Objetivos 26
5.4 Metodología 26
5.5 Resultados 31
5.6 Discusión de los resultados 36
5.7 Conclusión 37
6. Producción de ácidos grasos de cadena corta por microorganismos periodontopáticos en un población Colombiana.....
Objetivo específico por cumplir: 38

Reseña UIBO

1.1 Antecedentes

La Unidad de Investigación Básica Oral UIBO a cargo de la Doctora Gloria Ines Lafaurie, se encuentra ubicado en la Universidad El Bosque y fue creado en Diciembre del año 2000. Trabaja en el diseño y desarrollo de proyectos en las áreas de Microbiología Oral, Inmunogenética, Bioquímica del Lipopolisacárido, Medicina periodontal,Cicatrización y Regeneración Tisular, con énfasis en la Biología de las células Stem. A su vez los proyectos se encuentran enmarcados en las temáticas: Etiopatogenia y Epidemiología de la Enfermedad Periodontal y sus efectos sobre la salud sistémica; la Neurofisiología pulpar y la regeneración tisular con células madres de origen pulpar.

1.2 Misión

La Unidad de Investigación Básica Oral propenderá por el desarrollo de la investigación dirigida a cuatro líneas de investigación: Microbiología Oral, Inmunogenética, Medicina periodontal, Cicatrización y Regeneración Tisular, con énfasis en la biología de las células Stem. Los proyectos están enmarcados dentro del estudio de la Etiopatogenia y Epidemiología de la Enfermedad Periodontal y sus efectos sobre la salud sistémica y la Neurofisiología pulpar y la Regeneración tisular mediada por células Stem.

1.3 Visión

El grupo UIBO será un grupo reconocido como grupo de referencia por el programa de ciencia y tecnología de Colciencias y a nivel latinoamericano y será capaz de interactuar con pares internacionales de su misma temática en las 5 líneas propuestas, consolidadas con la publicación de por lo menos 4 artículos internacionales por año y 3 Nacionales. En él se desarrollarán proyectos de Maestría y Doctorado, y se mantendrá trabajo en red con otros grupos interesados en las mismas temáticas a nivel Nacional e Internacional.

2. Objetivos de la Pasantía

2.1 Objetivo general:

Profundizar en los conocimientos de ciencias básicas aplicadas a la periodoncia, en el contexto de la patogénesis de la enfermedad periodontal, con el fin de desarrollar destrezas en el planteamiento y ejecución de proyectos de investigación en microbiología periodontal, mediante la participación activa en un grupo de investigación consolidado.

2.2 Objetivos específicos:

- Desarrollar destrezas en el planteamiento de proyectos de investigación tanto clínicos como de básicas aplicadas a la etiopatogenia de las enfermedades Periodontales.
- Realizar entrenamiento en múltiples técnicas de cultivo y biología molecular, incluyendo:

  Métodos de cultivo, siembra de muestras en diferentes medios de cultivo, métodos de diagnóstico molecular para bacterias periodontopáticas (PCR convencional, electroforesis para ácidos nucleicos, PCR en tiempo real).

- Explorar desde la teoría el papel que juegan las bacterias en la regulación de la respuesta inmune mediante la producción de ácidos grasos volátiles.

3. Asistencia a Asignatura: INVESTIGACIONES II

Durante el segundo semestre de 2017 asistí los viernes desde las 9:00 am hasta las 11:00 am a la asignatura: INVESTIGACIONES II.

3.1. Objetivo específico por cumplir

Desarrollar destrezas en el planteamiento de proyectos de investigación tanto clínicos como de básicas aplicadas a la etiopatogenia de las enfermedades Periodontales.

3.2 Justificación

La asignatura de investigación II, hace parte del plan de estudios para la formación de odontólogos generales, en el cual con base a los conocimientos adquiridos permite al estudiante desarrollarse en diferentes medios como líderes de opinión que generen impacto e innovación en los proyectos que adelanten, que sean personas inquietas por el conocimiento, que deseen continuar con su proceso formativo, que se caractericen por la excelencia en su quehacer diario ya sea en el medio clínico, administrativo, investigativo o docencia, pudiendo enfrentar temas complejos buscando soluciones con base en la evidencia científica.

3.3 Objetivos de la asignatura

Comprender los conceptos fundamentales de metodología de la investigación del diseño de estudios clínicos aleatorizados para poderlos aplicar en su práctica como odontólogos e investigadores.

Desarrollar la capacidad de evaluar y analizar críticamente la evidencia científica basada en el diseño experimental, (ensayos clínicos aleatorizados).

Identificar las fuentes importantes de información y realizar búsquedas en las diferentes bases de datos científicas.

3.4 Metodología

- Lecturas de material docente y artículos de los temas planteados.
- Evaluaciones escritas de control de lectura.

- Presentación y sustentaciones de trabajos orales.
- Reflexión crítica de la evidencia científica.
- Desarrollo de guías

3.5 Actividades realizadas

FECHA 2016-II	ACTIVIDADES INDEPENDIENTES DEL APRENDIZAJE	ACTIVIDADES PRESENCIALES DEL APRENDIZAJE	TEMA	RESPONSABLE
SESION 1 Julio 22		Inducción Pruebas diagnósticas búsqueda de abstracts, división de grupos de trabajo.		Dra Lafaurie. Dra Mora. Dra. Sabogal.
SESION 2 Julio 29	Introducción. Lectura Quiz control de lectura	Clase magistral	Pruebas diagnósticas	Dra. Lafaurie
SESION 3 Agosto 5	Pruebas diagnósticas	Taller 1. Pruebas diagnósticas.	Pruebas diagnósticas	Dra. Lafaurie.
SESION 4 Agosto 12	Pruebas diagnósticas Temas:Diagnóstico pulpar 1. Térmicas. 2. Eléctricas. 3. Láser 4. Doppler Guía JAMA	Exposiciones guía Selección de articulos	Pruebas diagnósticas	Dra. Lafaurie
SESION 5 Agosto 19	Pruebas diagnósticas Temas: Diagnóstico pulpar 1. Térmicas. 2. Eléctricas. 3. Láser Doppler Guía JAMA	Exposiciones guía Pruebas diagnósticas	Pruebas diagnósticas	Dra. Lafaurie
SESION 6 Agosto 26		Clase Bioética: Pautas éticas internacionales y nacionales para la investigación biomédica en seres humanos.		

SESION 7 Septiembre 2	Lectura Ensayos clínicos. Quiz control de lectura	Inducción 3 equipos. . Temas de trabajo: Tema general Enjuagues bucales 1. CHX + Placebo 2. Aceites escenciales + Placebo 3. Aceites escenciales + CPC	Clase Magistral	Dra. Lafaurie
SESION 8 Septiembre 9	Guía de búsqueda de ensayos clínicos Subir actividad a aula virtual.	Exposiciones	Presentación de búsqueda	Drs. Equipo
SESION 9 Septiembre 16	Aprobación de abstract	Aprobación de abstract	Presentación de abstract para aprobación.	Drs. Equipo
SESION 10 Septiembre 23	Aprobación de abstract	Aprobación de abstract	Presentación de abstract para aprobación	Drs. Equipo
SESION 11 Septiembre 30	Ensayos clínicos. Análisis de datos. Estadística inferencial. Lectura y Quíz.	Clase Magistral	Bioestadistica	Dra. Lafaurie
SESION 13 Octubre 7	Ensayos clínicos. Análisis de datos. Estadística inferencial. Lectura y Quíz.	Clase Magistral	Bioestadistica	Dra. Lafaurie
SESION 14 Octubre 14	Tamaño de muestra ensayos clinicos	Clase Magistral	Tamaño de muestra	Dra. Lafaurie
SESION 15 Octubre 21	Asesorias presenciales en oficina	Asesorias presenciales en oficina	Asesorias presenciales en oficina	Drs. Equipo
SESION 16 Octubre 28	Exposición final. Grupos 1 y 2	Exposición final	Exposición Final	Drs. Equipo
SESION 17 Noviembre 4	Exposición final. Grupos 3 y 4	Exposición final	Exposición Final	Drs. Equipo
Sesion 18 Noviembre 11	Exposición final. Grupos 5 y 6.	Exposición final	Exposición Final	Drs. Equipo
Sesion 19 Noviembre 18	Exposición final Grupos 7 y 8.	Exposición final	Exposición Final	Drs. Equipo
Sesion 20	Exposición final	Exposición final	Exposición Final	Drs. Equipo

Noviembre 25	Grupo 9.			

4. Rotación UIBO Microbiología Oral

4.1 Objetivo específico por cumplir:

- Realizar entrenamiento en múltiples técnicas de cultivo y biología molecular, incluyendo:

  Métodos de cultivo, siembra de muestras en diferentes medios de cultivo, métodos de diagnóstico molecular para bacterias periodontopáticas (PCR convencional, electroforesis para ácidos nucleicos, PCR en tiempo real)

4.2 Descripción

Viernes de 11:00 – 1:00 y de 2:00 – 6:00pm

Pasantía Laboratorio de Microbiología

-Llegada al laboratorio 11:00 am

Durante la pasantía la rotación en el área de Microbiología Oral de UIBO se llevaron a cabo las actividades de diferentes proyectos.

La adquisición de competencias partiendo de este objetivo, se logró de diferentes maneras. La primera de ellas acompañando a los investigadores en la realización de técnicas para la identificación de periodontopatógenos, que se detallan a continuación y participando en la construcción de un proyecto de investigación basado en un experimento que hace parte de un proyecto macro del UIBO, titulado: Evaluación de microorganismos del complejo rojo y *A. actinomycentecomitans* en muestras de pacientes con periodontitis modulados por medicamentos anti-inflamatorios. A partir del método científico, se buscó realizar un análisis retrospectivo de una casuística previamente muestreada. Se utilizaron los datos suministrados para desarrollar de allí en adelante, el proceso de análisis y discusión de los mismos.

4.2.a Identificación de Bacterias Periodontopatógenas por cultivo:

Las muestras de placa subgingival, supragingival o saliva llegan en el medio de transporte VMGAIII y 100 µL de las diluciones 10-3, 10-4 y 10-5 son sembradas en Agar Brucella Sangre enriquecido con Hemina y Menadiona, se incuban a 36°C en condiciones de anaerobiosis por 7 días previa rotulación de las cajas. En el Agar Brucella pueden crecer múltiples microorganismos como: *P. gingivalis, T. forsythia, P. intermedia/P. nigrescens, E. corrodens, C. rectus* y *Fusobacterium nucleatum.*

El Agar MacConkey es utilizado para aislar bacilos Gram negativos no exigentes, aerobios y anaerobios facultativos. Principalmente utilizado en el laboratorio para aislar enterobacterias. Dentro de los componentes de este medio de cultivo están las peptonas, que aportan nutrientes para el desarrollo de las bacterias, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable por bacterias que tengan esta capacidad, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas. Las bacterias se incuban a 37°C durante 24-48horas.

Para aislar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se siembran las muestras sin diluir y 10-1 en Agar TSB tripticasa de soya con bacitracina y vancomicina. Contiene enzimas digeridas de caseína y soya que aportan sustratos nutricionales ricos en péptidos, aminoácidos libres, minerales y vitaminas, además de carbohidratos. El amplio rango de suplementos nutricionales estimularía el crecimiento de muchos microorganismos pero los antibióticos como la vancomicina y la bacitracina lo hacen un medio selectivo. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. Las cajas se incuban a atmósfera de 10% de CO_2 por 3 a 5 días.

Los microorganismos aislados se resiembran para su adecuada identificación o para ser almacenados. En caldo de cultivo BHI (Brain Heart Infusion) se almacenan y se guardan en agua cuando se quiere realizar identificación por PCR.

4.2.b Identificación de microorganismos periodontopatógenos por PCR convencional:

Las muestras se calientan a 37°C por 10 minutos y se mezclan bien con Vortex. Se hacen 3 lavados con agua destilada por 0,2ml de suspensión bacteriana. El precipitado de bacterias se suspenden nuevamente en 0,1ml de agua destilada y se colocan en hielo. Después de centrifugar se toman 5 µL del sobrenadante y se añaden a la mezcla: 5µL de Buffer, 1,25 Taq ADN polimerasa y 0,2mM de cada DNP y los primers específicos. La concentración de MgCl2 es diferente para los microorganismos al igual que las temperaturas de la PCR en cada ciclo. Para *T. forsythia, E. corrodens, P. gingivalis and T. denticola* se realiza la desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos. Etapa de hibridización a 60°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min.

Electroforesis:

Los productos de la PCR se analizan en un gel de agarosa que son teñidos con bromuro de etidio. La presencia de las especies bacterianas de interés se evidencia a partir de la tinción de una banda especifica para la especie determinada por una cepa de referencia ATCC. Por ejemplo: *P. gingivalis* se identifica por la presencia de amplificación en la banda de 404 pb, *T forsythia* por amplificación en la banda de 641 pb, *P. intermedia* por amplificación en la banda de 575 pb.
La técnica de PCR convencional sirve para detectar la presencia de ADN bacteriano en muestras. Sin embargo, no permite determinar la cantidad de UFC que existen en la muestra. Por eso se utiliza la qPCR (PCR en tiempo real), cuyo protocolo se encuentra descrito en detalle más adelante en la metodología del **Informe: Evaluación de microorganismos del complejo rojo y *A. actinomycentecomitans* en muestras de pacientes con periodontitis modulados por medicamentos anti-inflamatorios.**

5. Evaluación de microorganismos del complejo rojo y *A. actinomycentecomitans* en muestras de pacientes con periodontitis modulados por medicamentos anti-inflamatorios.

5.1 Introducción:

Se han postulado principalmente 2 mecanismos a partir de los cuales podría existir una asociación entre la aterogénesis y la enfermedad periodontal. El primero es la infección de las placas ateromatosas por microorganismos periodontopáticos. El segundo está relacionado con la naturaleza inflamatoria de ambas condiciones, las cuales generan el aumento de sustancias proinflamatorias a nivel sistémico y podrían regular la respuesta en lesiones vasculares y a nivel del periodonto. Se ha observado que el manejo de pacientes con enfermedades cardiovasculares con estatinas ayuda no solo a controlar la hiperlipidemia sino que controla la ateroesclerosis a partir de su efecto antiinflamatorio, inmunomodulador e incluso antibiótico. A su vez, estudios anteriores han demostrado una disminución de los parámetros clínicos periodontales con la administración de estatinas, más los mecanismos a partir de los cuales se logra dicha reducción no han sido esclarecidos. El objetivo de este informe fue evaluar la cantidad de *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, T. forsythia, T. denticola y E. nordatum* en muestras de placa subgingival de un grupo de pacientes con periodontitis crónica severa en tratamiento con estatinas para manejo de Síndrome Coronario Agudo y comparar los resultados con un grupo control de pacientes con periodontitis crónica severa sin medicación; a través de qPCR.

5.2. Marco teórico

5.2.a Definición de periodontitis crónica

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, y como tal, es necesario abordar las relaciones que existen entre los diferentes componentes que determinan el desarrollo de la misma. El factor etiológico de la enfermedad es el biofilm, que de manera natural recubre las superficies dentales que se encuentran en contacto con el medio oral. A pesar de ser necesario, el biofilm, este no es suficiente para desencadenar la enfermedad(1). En la actualidad se han descubierto más de 700 especies de bacterias en cavidad oral(2)(3), las mismas se encuentran en nichos con condiciones metabólicamente favorables para su desarrollo particular(4)(5). No obstante, además de las condiciones específicas de cada nicho, las condiciones de la cavidad oral en general cambian constantemente por la presencia de alimentos que alteran principalmente el pH y la temperatura. La falta de remoción del biofilm genera en 14 días la aparición de signos clínicos de la gingivitis (enrojecimiento y sangrado)(6). La gingivitis comprende lo que Page y Schroeder describieron como lesión estable(7), una enfermedad con características de los componentes microbiológicos e inmunológicos diferentes a los de la periodontitis(1).

Uno de los interrogantes que aun hoy no ha podido ser completamente esclarecido es por qué la lesión estable progresa a lesión avanzada, con destrucción ósea y formación de bolsas, en otras palabras, periodontitis. La explicación más aceptada, aunque sin esclarecer los mecanismos específicos por los cuales hay destrucción de los tejidos periodontales en algunos pacientes, y en otros con niveles de biofilm parecidos o mayores no hay progresión; tiene que ver con la integración entre: el microambiente que se genera en el surco gingival, los conglomerados bacterianos que hacen parte del biofilm y la asociación de las mismas, la respuesta inmunológica ante el constante reto bacteriano y sus productos en contacto con las células epiteliales y al interior del tejido conectivo y, finalmente, el compromiso sistémico del paciente y determinantes sicosociales del mismo. Estos factores se interrelacionan en el desarrollo de la enfermedad periodontal, pero la manera cómo lo hacen, qué factor resulta más determinante para su progresión o no progresión, es algo que continua sin ser esclarecido. Es evidente que la extensa variabilidad genera limitantes grandes para desarrollar modelos universales para explicar la patogénesis de la enfermedad periodontal. Dicha variabilidad en términos inmunológicos, genéticos o adquiridos, composición del biofilm (no solo de especies bacterianas sino también de cepas), condiciones sociales y culturales que modulan el biofilm y la respuesta inflamatoria en la etiopatogenia de la enfermedad, así como comorbilidades que podrían representar factores de riesgo para periodontitis. Incluso, es probable que la relevancia de los factores mencionados anteriormente sobre la patogénesis de la enfermedad periodontal sea diferente para cada individuo. Esto implica que el estudio de la patogénesis de la periodontitis, aun constituyendo un problema de salud pública en países como Colombia(8), continúe siendo difícil de determinar y que requiera del apoyo de técnicas moleculares y de cultivo para su investigación(9).Es entonces evidente la relevancia que tiene adquirir conocimiento sobre las técnicas utilizadas en la investigación la inmunopatogénesis de la enfermedad periodontal, bien sea para continuar una práctica investigativa o aun para entender los hallazgos científicos en este aspecto y poder adaptarlos a la toma de decisiones con respecto al manejo de la entidad que fundamenta la existencia de la periodoncia.

5.2.b Patogénesis de la Enfermedad Periodontal: Enfoque Microbiológico

La observación de placa subgingival al microscopio por Van Leeuwenhoek en 1663 fue el primer acercamiento a lo que él describió como “animaculos” y que hoy se sabe comprenden una intrincada red de conexiones entre microorganismos compartiendo el mismo nicho(5). La capacidad individual de los microorganismos de sobrevivir y de generar alteraciones en el huésped se ve potenciada en la organización de biofilms frente a los estados planctónicos de las especies que lo conforman, de ahí que se diga que dichas capacidades son más que la suma de las especies que lo conforman. El biofilm es un sistema dinámico en el cual conviven bacterias de mismo o diferente género, hay comunicación entre las mismas e

intercambio de productos metabólicos y nutrientes que determinan las condiciones del microambiente en el que se desarrolla y por lo tanto determinan la conformación de dicho biofilm. El biofilm no está compuesto únicamente por bacterias, estas se encuentran embebidas en una matriz de polisacárido que es el medio perfecto para que haya difusión de nutrientes, desechos, moléculas de comunicación entre ellas, y de protección frente a sustancias antibióticas.

La composición del biofilm en pacientes periodontalmente sanos y con periodontitis ha sido evaluada ampliamente, y gracias a los estudios de Sockansky y Haffajee, se asociaron diferentes especies bacterianas con la presencia de enfermedad y la severidad de la misma(10). De esta manera, se propuso a las bacterias mayormente asociadas a estadios severos de la enfermedad como miembros del complejo rojo: *Tanerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*(10). La facilidad para cultivar *P. gingivalis* sobre *T. denticola* y *T forsythia*, entre otras razones, ha hecho que este organismo sea el más estudiado y catalogado como principal responsable de la alteración del equilibrio entre el biofilm y la respuesta del huésped, teniendo como resultado la pérdida ósea característica de la enfermedad periodontal. De esta manera, se han analizado múltiples factores de virulencia que le permiten a *P. gingivalis* colonizar el surco crevicular, e invadir el epitelio y el tejido conectivo. Dentro de los factores de virulencia más importantes se encuentran las fimbrias como FimA y otras moléculas que le sirven como adhesinas para coagregarse con otras especies. Las gingipaínas le sirven además a *P. gingivalis* para degradar proteínas, una función vital para un microorganismo de metabolismo proteolítico. Es ese metabolismo anaerobio y proteolítico a su vez, es el que relaciona a *P. gingivalis* con estadios de la lesión avanzada, ya que requiere de productos de la inflamación, como la hemina de la sangre para obtener hierro, y su crecimiento y supervivencia se favorecen con la formación de surcos profundos y bolsas periodontales. De esta manera a medida que progresa la lesión, las condiciones son más favorables para el desarrollo de *P. gingivalis* y se convierte en un ciclo, pues tal crecimiento también aumenta la pérdida ósea y el mantenimiento de dichas condiciones en el microambiente de la bolsa periodontal. No obstante, si bien se han estudiado diversos mecanismos a partir de los cuales *P. gingivalis* tendría la capacidad de aumentar la progresión de la lesión, en los últimos años se ha evaluado también el papel que cumple sobre el inicio de la misma.

En condiciones de equilibrio, y como se ha evaluado en pacientes sanos, la frecuencia de *P. gingivalis* es baja, sin embargo, este microorganismo ante factores específicos tiene la capacidad de generar condiciones inflamatorias al interactuar con la respuesta inmune del paciente de forma particular y producir disbiosis. Dicha capacidad lo clasifica como una especie piedra angular que altera la relación biofilm-huésped alterando la respuesta del último al inducir inflamación, y a su vez alterando con esto la composición del biofilm y el comportamiento de las bacterias que sobreviven a las nuevas condiciones. Las bacterias que previo a la alteración de la respuesta inflamatoria son comensales y que ante condiciones alteradas intervienen

en la progresión de la enfermedad se conocen como probiontes. La presencia de las mismas especies en pacientes periodontalmente sanos y en pacientes con periodontitis, soporta el concepto de probiontes. Adicionalmente, se ha propuesto la existencia de especies que tienen un papel mixto dentro de la progresión de la enfermedad periodontal, como *Aggregatibacter actomycetemcomitans* y *Treponema denticola*, ya que inducen de manera importante la inflamación, pero en condiciones de salud pueden estar presentes como bacterias comensales(1).

A partir del modelo estudiado en *P. gingivalis* como director de la patogénesis de la enfermedad periodontal, resulta evidente la necesidad de analizar las relaciones entre los microorganismos en el biofilm y la respuesta inmune, que finalmente es la mayor causante de la destrucción tisular que ocurre en enfermedad periodontal(1). En el caso de *P. gingivalis,* como se explicará con mayor detalle más adelante, esta cuenta con múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune innata, infectando células dendríticas y macrófagos, pero impidiendo su eliminación por los mismos. Además de incidir sobre la respuesta inmune innata, se ha demostrado también que *P. gingivalis* estimula a células dendríticas para dirigir la diferenciación de linfocitos T colaboradores a partir de la presentación antigénica hacia el perfil Th17, pro-inflamatorio no especializado en la resolución de procesos infecciosos por eliminación de antígenos.

5.2.c Relación entre ateroesclerosis y periodontitis

La ateroesclerosis es una enfermedad en la cual la formación de ateromas en el endotelio implica el riesgo de producir infarto al miocardio, accidentes cerebrovasculares, entre otros riesgos con las consecuencias de los mismos a partir del desprendimiento de la placa ateroesclerótica y la oclusión de vasos sanguíneos(11).. Debido a la prevalencia de enfermedades cardiovasculares junto con la mortalidad causada por las complicaciones ocasionadas por la misma (entre el 25% y el 40% de las muertes dependiendo del país) que constituyen la mayor causa de muerte en el mundo según la OMS(12), se han realizado estudios de grandes cohortes para determinar factores de riesgo(11). Entre los factores de riesgo de infarto, uno de los más importantes es el nivel de lipoproteínas, no obstante, existe un porcentaje importante de personas que sufren infarto al miocardio sin presentar niveles altos de colesterol(2), lo cual hace evidente la importancia de continuar evaluando factores de riesgo. En primer lugar, la asociación entre enfermedad periodontal y enfermedades cardiovasculares se ha encontrado en estudios epidemiológicos donde ambas enfermedades coinciden(11). Sin embargo, tal coincidencia podría a su vez estar determinada por la alta prevalencia de ambas entidades y con factores de riesgo en común más que por una relación de causalidad. Es por eso que se han evaluado por separado los

diferentes mecanismos a partir de los cuales podría una enfermedad incidir sobre la patogénesis de la otra.

Por un lado, papel del inflamasoma en la aterogénesis ha sido estudiado y se ha determinado que es necesario el proceso inflamatorio en la formación y crecimiento de la placa ateroesclerótica(13)(14). De allí resulta coherente que se haya empezado a tomar en cuenta como factor de riesgo los niveles de PCR (proteína C reactiva), la cual hace parte de las proteínas de fase aguda que se elevan con procesos infecciosos e inflamatorios(2). Se ha demostrado que pacientes con periodontitis presentan niveles más elevados de PCR en sangre(15), así como niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias que regulan la misma como: TNFα, IL-1β e IL-6 y aumento de PAF (Factor activador de plaquetas) en fluido crevicular(16). Además, se ha encontrado que la presencia de bacterias periodontopáticas en placas ateroescleróticas constituyen el 47.3% del DNA bacteriano encontrado en pacientes con periodontitis, frente a un 7,2% de estas especies en ateromas de pacientes sin enfermedad periodontal(17) aunque los resultados en términos de recuento de bacterias en placa ateromatosa y placa subgingival son aun contradictorios como se describirá más adelante.

Sin embargo, no solo se ha analizado el rol de la enfermedad periodontal dentro de la patogénesis de la ateroesclerosis, se ha evaluado también la posibilidad de que sea proceso de dos vías, en el cual una condición influye sobre la otra en ambos sentidos. Investigadores han encontrado en ratones ApoE- infectados con *P. gingivalis*, que presentaban no solo aumento en el tamaño de la lesión vascular y presencia de estas bacterias vivas en la aorta, sino que también presentaron aumento de la reabsorción del hueso alveolar y presencia de *P. gingivalis* viable en cavidad oral(2).

La presencia de bacterias de la cavidad oral en sangre o bacteremia, ha sido ampliamente documentada(18)(19). Las vías a través de las cuales los microorganismos de cavidad oral logran pasar a la circulación tiene que ver con los mecanismos con los que cuentan los mismos para infectar tejidos, ya que al entrar en contacto con las células epiteliales e infectarlas, podrían posteriormente invadir otras células y llegar a los capilares que nutren los tejidos periodontales(19). A su vez, la ruptura de barreras epiteliales a partir de microtraumas con el cepillado, la alimentación o procedimientos odontológicos, ponen en contacto la microbiota oral con los vasos sanguíneos(19)(18). Los primeros reportes que intentaban asociar patógenos de la cavidad oral con ateroesclerosis enfrentaron el reto de buscar tales bacterias en placas ateromatosas(20) Haraszthy et al. fueron los primeros en comprobar la presencia de ADN bacteriano de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* a través de pruebas con PCR(21). Sin embargo, encontrar ADN bacteriano no comprobaba la viabilidad de tales microorganismos antes de las pruebas. Por lo tanto, fue necesario enfrentar un reto mayor, que implicó cultivar células endoteliales con tejido ateromatoso y evidenciar por medio de anticuerpos fluorescentes la presencia de bacterias intactas al interior de las células

endoteliales(22). Cabe destacar que además, se han encontrado diversos mecanismos a partir de los cuales diferentes especies logran llegar al ateroma, los cuales hacen parte de los factores de virulencia que les permiten de diferentes maneras invadir los tejidos(18). Estas diferencias no solo son evidentes entre diferentes especies, también se han encontrado diferencias entre los mecanismos utilizados por distintas cepas de una misma especie. Lo anterior concuerda con los resultados de estudios donde evalúan la variable capacidad de distintas cepas de invadir células endoteliales(23). Teniendo en cuenta la amplia variabilidad en la microbiota de poblaciones en ubicaciones geográficas diferentes(24), y de factores de virulencia expresados por cepas de la misma especie, es probable que el riesgo de ateroesclerosis se encuentre relacionado con la presencia no solo de ciertas especies sino también de ciertas cepas en particular.

5.2.d Inflamasoma y su relevancia en ateroesclerosis y periodontitis

El ambiente inflamatorio al interior de los vasos sanguíneos ha demostrado ser una condición necesaria para que haya alteración en el endotelio que favorezca el inicio de una lesión ateroesclerótica. Dentro de los factores que favorecen la lesión inicial en el endotelio se encuentran los niveles altos de especie reactivas de oxigeno ya que inhiben la síntesis de óxido nítrico (NO), el cual tiene un efecto protector sobre el endotelio. Los resultados de un estudio realizado en ratones *Itg* β 6-/- sin dieta alta en grasa e infectados con una mezcla de bacterias periodontales se destacaron por un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, radicales libres y expresión de genes involucrados en la formación del inflamasoma con disminución de NO frente a ratones de la misma cepa no infectados y a ratones WT; lo anterior propone un papel de la infección crónica polimicrobiana que caracteriza la enfermedad periodontal en la generación de condiciones inflamatorias necesarias para la formación de placas ateromatosas. A pesar de demostrar en el modelo murino *Itg* β 6-/- que no es suficiente la presencia de un proceso infeccioso de características similares a las de la enfermedad periodontal en humanos en la ateroesclerogénesis, es de resaltar que demostró condiciones endoteliales semejantes a las observadas en placas ateroescleróticas sin la predisposición genética para generar ateromas(13).

5.2.e Estatinas en el control de la ateroesclerosis y la enfermedad periodontal

Otra manera de comprobar asociación entre las entidades: ateroesclerosis y periodontitis son los ensayos clínicos controlados, en los cuales el tratamiento sobre una de las patologías tiene efectos sobre la progresión o reversión de la otra. Dentro

del manejo de la ateroesclerosis la medicación con estatinas es la conducta más aceptada debido a que ha demostrado reducir el riesgo de eventos cardiovasculares(25). Lo anterior se ha explicado por la capacidad de inhibir la síntesis de colesterol por HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa), pero además, dicha capacidad también ha sido relacionada con un papel regulador antiinflamatorio, evitando el aumento de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, como el colesterol y los triglicéridos, y de marcadores pro-inflamatorios(2)(25)(26). De esta manera, se ha observado que la implementación de estatinas disminuye los niveles de marcadores pro-inflamatorios y la expresión de TLR -2 en células endoteliales venosas de cordón umbilical aumentados por infección con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(25). Al mismo tiempo, la evidencia ha sido evaluada con respecto a la influencia del tratamiento de la enfermedad periodontal, raspaje y alisado radicular, con el desarrollo y progresión de ateroesclerosis, a partir de la disminución en factores de riesgo de ateroesclerosis y marcadores pro-inflamatorios, con cambios especialmente representativos en pacientes con comorbilidades como diabetes y/o enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, a partir de un metaanálisis de ensayos clínicos se concluyó que para disminuir el riesgo de infarto es necesario que los especialistas tratantes de pacientes diabéticos, cardiovasculares y con periodontitis deben remitir a los pacientes para manejo periodontal(26).

5.2.f Modelo de influencia de microorganismos periodontopáticos en aterogénesis.

Como se ha descrito anteriormente, las bacterias periodontopáticas pueden llegar hasta el endotelio donde se encuentra la lesión ateroesclerótica, es preciso entonces determinar las vías a través de las cuales pueden iniciar o exacerbar la lesión en el endotelio. A pesar de que existen pruebas que demuestran en modelos animales la influencia de bacterias y la respuesta inmune que se desencadena a partir de las mismas en el desarrollo y progresión de los ateromas, no se ha logrado establecer una relación de causalidad entre la infección con patógenos específicos y ateroesclerosis(2). No obstante, se han creado modelos que, a partir de plausibilidad biológica comprobada, expliquen la posible relación de causalidad, el modelo más estudiado como se ha dicho, es el de *P. gingivalis*.

Inicialmente la invasión de células endoteliales por *P. gingivalis* o la activación de dichas células por medio de sus productos (en forma de vesículas con gingipaínas, exopolisacárido, etc.) y el reconocimiento de los mismos como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) inducen la expresión de moléculas de adhesión y citocinas proinflamatorias y quemotacticas como MCP-1(27). Estas moléculas a su vez, inducen la proliferación de células del musculo liso y el reclutamiento de monocitos que posteriormente se convertirán en macrófagos que

reconocen *P. gingivalis* por medio de receptores TLR (hasta ahora la vía más clara es a partir de receptores TLR 2, y comienzan a expresar citocinas pro-inflamatorias como: IL-6, IL-1β , TNFα e INFγ (18). Los macrófagos además, fagocitan por medio de receptores scavengers LDH oxidada y se convierten en células espumosas que entran en necrosis y exacerban la respuesta inflamatoria(28).

No obstante, la manera como se ha propuesto que microorganismos periodontopáticos favorezcan el desarrollo de ateroesclerosis no es de forma directa como el modelo expuesto anteriormente; también se ha destacado el papel que tiene el microbioma oral e intestinal en la susceptibilidad a ateroesclerosis en modelo murino. Se ha comprobado a partir de transplante de microbioma fecal de ratones con ateroesclerosis a ratones ApoE- bajo una dieta de colina tenían placas ateromatosas significativamente mayores a los ratones transplantados de cepas no susceptibles a ateroesclerosis(29). A su vez, la infección con *P. gingivalis* ha demostrado alterar el microbioma intestinal, y con ello el balance en los perfiles de expresión de citoquinas de linfocitos T en el intestino (el perfil Th17 aumenta la inflamación y el Treg regula la respuesta)(30).

El modelo murino para evaluar la relación entre enfermedad periodontal y ateroesclerosis ha sido el más estudiado. Este modelo cuenta con dos limitantes y ya que de manera natural, los ratones no desarrollan ateroesclerosis ni enfermedad periodontal. Es necesario entonces utilizar diferentes cepas mutantes para adaptar el modelo a las condiciones de estas dos patologías. Para desarrollar ateroesclerosis se utilizan ratones ApoE-(2)(13). Al mismo tiempo, para generar periodontitis se han utilizado diferentes modelos que incluyen desde el modelo de inducción con ligadura que se ha abandonado últimamente para adoptar modelos más acertados que incluyen la infección con bacterias de cavidad oral humanas. Un modelo bastante interesante es el de infección polibacteriana con periodontopatógenos en ratones *Itg* β 6-/-, es decir, carecen de integrina β 6(13). La razón por la cual este modelo surge como una alternativa interesante para estudiar la relación de la enfermedad periodontal con la patogénesis de otras afecciones, es porque la falta de integrina β 6, expresada por células del epitelio de unión, genera tanto la formación de bolsas periodontales por migración apical de dicho tejido, reabsorción ósea subyacente y lo más importante, inflamación en el tejido gingival(13). Además, la integrina β6 tiene la capacidad de activar el TGFβ1 y este pertenece al perfil antiinflamatorio dentro de la patogénesis de la periodontitis en humanos Se ha demostrado que la inoculación de esta cepa de ratones con bacterias periodontopáticas favorecen el desarrollo de los signos de la periodontitis en humanos, lo cual se explica porque el ambiente anaerobio que genera la migración apical del epitelio de unión representa un nicho favorable para las especies bacterianas de interés(13).

5.2.g *Porphyromonas gingivalis:* posibles mecanismos involucrados en la aterogénesis

Como se ha mencionado anteriormente, el microorganismo periodontopático mas estudiado buscando asociar la periodontitis con ateroesclerosis es *P. gingivalis*, aunque no es el único. *P gingivalis*, dentro de los factores de virulencia que podrían ser expresados por las diversas cepas presenta, fimbrias como FimA, hemaglutininas y gingipainas(18). A partir de estos factores, el microorganismo tiene la capacidad de invadir células no pertenecientes al sistema inmune (como células epiteliales y endoteliales), y también células dendríticas(22) y macrófagos(18). La infección de células endoteliales por parte de microorganismos como *P. gingivalis*, induce la liberación de productos pro-inflamatorios con propiedades quemotácticas, induciendo la migración de monocitos, la producción de factores procoagulantes y aumento de la proliferación de células del músculo liso. Por otro lado, al infectar de manera específica macrófagos o células dendríticas, limita la posibilidad de ser eliminada por parte de estas células. *P. gingivalis* tiene varias posibilidades de entrar a la célula y evadir la respuesta inmune mientras permanece inalterada al interior de la célula del huésped(22).

5.2.h Mecanismos de *P. gingivalis* para evadir la respuesta inmune

Además de los factores de virulencia mencionado anteriormente, *P gingivalis* se ha adaptado para evadir la respuesta inmune innata y evitar así el control de la infección por parte de la respuesta adaptativa del huésped. En primer lugar, posee lipopolisacárido que gracias al recubrimiento del lípido A es inmunológicamente inerte y por lo tanto no activa los TLR 4 de las células huésped, de allí que el reconocimiento de este microorganismo este dado principalmente por TLR2(31). Dicho reconocimiento es a su vez aprovechado por el microorganismo para ser fagocitado mas no eliminado, y lo hace estimulando CR3, un receptor especializado en fagocitosis de restos apoptóticos y no en destrucción de antígenos(32). De esta manera *P. gingivalis* no es destruida al interior de la célula. Al mismo tiempo, la fagocitosis por medio de CR3 inhibe la producción de IL-12, que es importante activadora de mecanismos antimicrobianos(32).

Por otro lado, *P. gingivalis* también genera un aumento de los niveles de la C5a, al clivar C5 por medio de las gingipainas. A pesar de que C5a es una anafilotoxina que además de favorecer la degranulación de granulocitos induce el reclutamiento de leucocitos, genera un aumento de su concentración, aumentando la activación de CR5 y con ello la concentración de cAMP al interior de la célula, inhibiendo la producción de óxido nítrico, importante en la respuesta antimicrobiana. De la misma manera, hay inhibición de la transcripción de IL-12, y aumento de la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6 y TNF-α, lo cual favorece a *P*.

gingivalis, ya que el proceso inflamatorio y la subyacente destrucción de tejidos aumenta la disponibilidad de sustratos nutricionales como la hemina(32).

El efecto potenciador que tiene la activación de CR5 adicional al efecto generado por estimulación de TLR2, es igual al que se genera por reconocimiento de la fimbrias por parte de CXCR4. De hecho se ha propuesto que la inhibición de la destrucción del microorganismo mediada por óxido nítrico es lograda únicamente por estimulación de los tres receptores mencionados para aumentar lo suficiente los niveles de cAMP(32).

La relevancia de los mecanismos descritos anteriormente para evadir la respuesta inmune es evidente teniendo en cuenta que se ha determinado un papel de TLR 2 en el desarrollo y progresión de lesiones ateroescleróticas ante la infección con *P. gingivalis* en modelo murino(33). Se ha evidenciado un aumento de citoquinas proinflamatorias como INFγ y IL-1 β en las placas ateromatosas en ratones infectados con *P. gingivalis*, el aumento de IL-6, TNF α e IL-1 β en ratones con TLR2 comparados con ratones carentes de TLR 2(31). El aumento de estas citocinas no es evidente únicamente a nivel sistémico, sino que la infección por *P. gingivalis* genera un mayor aumento principalmente en el sitio de la lesión(31).

5.2.i Otros microorganismos periodontopáticos que han sido relacionados con enfermedades cardiovasculares

Además de *P. gingivalis*, otras especies periodontopáticas han sido detectadas y cuantificadas con reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCRq) a partir de placa ateroesclerótica de pacientes con enfermedad cardiovascular y periodontitis. En estos pacientes se ha comparado la presencia y frecuencia de microorganismos periodontopàticos de la placa arterial con el grado de severidad de la enfermedad periodontal. Ishihara et al. en 2004 compararon las frecuencias de microorganismos: *P. gingivalis, A. actinomycetemcomitans, T. forsythia, T. denticola y C. rectus* en placas arteriales de pacientes con enfermedad cardiovascular observando una frecuencia de 21.6%, 23.3%, 5.9%, 23.5% y 15.7% respectivamente, y las compararon con la frecuencia de las mismas especies en placa subgingival en 51 pacientes con enfermedad cardiovascular con periodontitis, encontrando que la presencia de *P gingivalis y de C . rectus* en placa ateromatosa se correlacionó con la detección de las mismas en placa subgingival(34). Por su parte, Padilla et al. encontraron crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* solo en 2 muestras de placa ateromatosa, relacionada con la presencia de este microorganismo también en placa subgingival de los mismos 2 pacientes; en el resto de pacientes el microorganismo más frecuente fue *P. gingivalis* en 6 muestras subgingivales y *T forsythia* que fue identificada en 2 muestras periodontales(35).

Kozarov et al. en 2006 evaluaron la presencia de microorganismos periodontopatógenos en placas ateromatosas como: *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, P. intermedia, Treponema denticola, E. corrodens y T. forsythia* en placas ateromatosas de 29 individuos divididos en un grupo de individuos jóvenes y otro de adultos mayores. En el grupo de jóvenes encontraron frecuencias de A. actinomycetemcomitans 40%, *P. gingivalis*: 18.3% *P. intermedia* 15%, *T. denticola*:19.1% , *E. corrodens*: 17.5% y *T. frosythia*: 15 %, frente al grupo de adultos mayores con frecuencias de *A. actinomycetemcomitans*: 55.5%, *P. gingivalis*: 88.8%, *P. intermedia*: 77.7%, *T. denticola*: 33.3% *E. corrodens*: 22.2% y *T. forsythia* 22.2%(36). En 2007 Aimetti et al. intentaron evaluar la relación entre la composición de la placa bacteriana subgingival con el recuento de especies periodontopatógenas en placa ateromatosas de 33 pacientes con ateroesclerosis y periodontitis. Los autores detectaron en placa subgingival prevalencia de *T. forsythia, P. gingivalis, T. denticola, P. intermedia,* y *A. actinomycetemcomitans* en: 69.7%, 63.6%, 54.5%, 45.4%, y 33.3%. Sin embargo, no encontraron presencia de dichos microorganismos en placa ateromatosas(37). Gaetti-Jardim *et al*. por su parte, encontraron ADN bacteriano y ADN de bacterias periodontopatógenas en el 92,3% de las muestras con frecuencias de*: Prevotella intermedia* (59%), *Porphyromonas gingivalis* (53.8%), *A. actinomycetemcomitans* (46.2%) *T. forsythia* (25.6 %)(17).

Otros estudios no sólo han evaluado la presencia de bacterias periodontales en placas ateromatosas sino también, en muestras de válvulas cardiacas. De Oliveira et al. encontraron en 42 pacientes con alteración de válvulas cardiacas y bolsas periodontales mayores a 4mm una frecuencia de *P. gingivalis y T. denticola* mayor al 75%(27). Mientras que, Serra et al. evaluaron con PCR las especies bacterianas presentes en pacientes con enfermedad coronaria obstructiva, cateterismo y periodontitis y determinaron que los microorganismos periodontopáticos más frecuentes en placa subgingival fueron del filum: Eikenella corrodens (50%), *Veillonella atypica* (33%), *Aggregatibacter sp* (33%) *Campylobacter concisus* (50%)*, Treponema sp* (33%)(38).

5.2.j Efecto de las estatinas sobre la condición periodontal y microorganismos periodontopáticos.

Se ha observado que su uso adicionado a terapias de prevención primaria o secundaria, tiene un resultado benéfico para los pacientes. También se ha podido encontrar en diferentes estudios, que las estatinas pueden modificar el curso clínico de la inflamación inducida por bacterias, a través de la disminución de la adhesión de leucocitos al endotelio vascular y disminución de liberación de citoquinas inflamatorias, mitigando la disfunción endotelial, que es el primer paso de la enfermedad(39). Además de estimular propiedades en el tejido óseo, las estatinas también tienen otros efectos pleiotrópicos, tales como efectos antiinflamatorios e

inmunomoduladores. Estos fármacos han sido ampliamente estudiadas debido que podrían ser beneficiosos en la formación de hueso, la reducción de la inflamación y la inmunomodulación(40). Por esto, es importante tener en cuenta el tratamiento farmacológico que reciben los pacientes con antecedentes de evento cardiovascular, debido a que puede influenciar en la condición periodontal.

En estudios como el de Kozarov et al, en 2014 se encontró que el impacto de altas dosis de atorvastatina fue mayor en individuos con evidencia de periodontitis activa, y era evidente después de un período de tratamiento de 4 semanas. Después de 12 semanas, hubo una reducción significativa en la inflamación periodontal en los pacientes asignados al azar a atorvastatina de 80mg versus 10 mg(39).

En un estudio in vitro, se evaluó la actividad antimicrobiana de la simvastatina sobre patógenos periodontales específicos, *P. gingivalis y A. actinomycetemcomitans* donde ambas bacterias fueron sensibles al medicamento. Clínicamente, los pacientes con periodontitis bajo tratamiento con estatinas tienen un 37% menos de bolsas periodontales patológicas en comparación con los que no reciben la medicación. Mejora los parámetros clínicos y defectos infraóseos ya que se observó relleno después de la terapia de raspaje y alisado radicular, al aplicar la simvastatina tópicamente(41). En un análisis retrospectivo con 7 años de seguimiento, la administración sistémica de simvastatina mostró un menor riesgo para la pérdida de dientes en pacientes con periodontitis(42). Por lo tanto, en este contexto, simvastatina puede jugar un papel doble en el tratamiento de la hiperlipidemia para prevenir la Enfermedad Cardiovascular y la periodontitis, lo que podría impedir la prescripción de antimicrobianos para pacientes con periodontitis que ya están bajo tratamiento con estatinas.

Estudios previos han atribuido la acción antimicrobiana de las estatinas a un aumento de la depuración bacteriana o mediante la promoción de la apoptosis de las células microbianas. Además, la naturaleza hidrofóbica de la simvastatina también explica su acción antibacteriana, penetrando la membrana bacteriana y de esta manera causando su muerte. Sin embargo, el exacto mecanismo de acción necesita más investigación(41).

Los mecanismos exactos de los efectos antimicrobianos de las estatinas no se conocen y la diferencia en la CMI entre las estatinas podría ser relacionados con la diferencia en su estructura química y en cómo se producen. La Simvastatina, es un producto natural de la fermentación por hongos y tiene más propiedades antibacterianas de actividad intrínseca, que la Fluvastatina, que es un producto sintetizado químicamente. Diferentes efectos antimicrobianos de las estatinas sugieren la especificidad con respecto a la muerte mediada por estatinas. Las concentraciones plasmáticas alcanzadas de las estatinas no actúan de manera significativa contra estos microorganismos orales, por lo que se requiere una concentración mucho mayor de estatinas para la actividad antimicrobiana; Esto se

puede lograr a través de una aplicación local en forma de un enjuague bucal con estatina o un gel tópico de estatinas Las estatinas pueden convertirse en una alternativa antimicrobiana viable, o adjunta, contra la aparición de antibióticos resistentes a microorganismos y a la toxicidad de altas dosis de antibióticos, pero se necesitan estudios adicionales para determinar si las estatinas pueden ser solubilizadas para que los pacientes, con enfermedades cardiovasculares, puedan usar la medicación como un beneficio contra las enfermedades orales infecciosas(43).

5.3 Objetivos

Comparar la concentración de microorganismos de complejo rojo y *A. actinomycemcomitans* en pacientes con periodontitis crónica modulados con estatinas a altas dosis y pacientes con periodontitis sin medicación anti-inflamatoria.

5.4 Metodología

Se seleccionaron muestras de placa subgingival de 31 pacientes, 16 pacientes eran pacientes con periodontitis avanzada modulados con estatinas posterior a un evento coronario con altas dosis medicados con un mínimo de 6 semanas posterior a un evento coronario y 15 pacientes con periodontitis crónicas sin condición sistémica. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de microbiología oral del Instituto UIBO y algunas de ellas procesadas dentro de la rotación extramural.

5.4.a Grupo Síndrome coronario agudo modulado con estatinas

Criterios de selección

- Síndrome coronario agudo con o sin elevación del ST en el último mes a la evaluación clínica periodontal.
- Pacientes con periodontitis severa de acuerdo a los criterios del CDC. Por lo menos 5 sitios con bolsas > 6 mm
- Paciente estable (Tensión arterial <140/90 mm Hg, sin angina, sin disnea, sin arritmias y con saturación > al 90%)
- Menor o igual a 70 años
- Pacientes sometidos a angioplastia con colocación de Stent.

- Pacientes manejados según el protocolo atención del paciente con síndrome coronario agudo de la clínica Shaio que incluye antiagregación plaquetaria dual, antihipertensivos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueadores de los receptores de la angiotensina, estatinas a altas dosis (atrovastatina 40 mg) y betabloqueadores, combinado con cambios en el estilo de vida.

Criterios de exclusión

- Pacientes con diabetes mellitus
- Paciente con obesidad.
- Pacientes fumadores activos
- Paciente con enfermedades autoinmunes
- Historia de infección aguda en los últimos 3 meses
- Antibioticoterapia en los últimos 3 meses
- Pacientes con menos de 6 dientes en boca
- Pacientes con tratamiento periodontal en los últimos de 6 meses
- Consumo de AINES
- Consumo de corticoides

5.4.b Grupo control de periodontitis crónicas

Criterios de selección

- Pacientes con periodontitis crónica severa de acuerdo a los criterios del CDC-AAP
- Por lo menos 5 sitios con bolsas > 6 mm
- Sanos sistémicamente

Criterios de exclusión

- Consumo de bifosfonatos
- Tratamiento periodontal en los últimos 6 meses
- Pacientes fumadores activos
- Antibioticoterápia en los últimos 6 meses
- Consumo de AINES
- Consumo de corticoides
- Consumo de estatinas

5.4.b Evaluación de microorganismos periodontopáticos en placa subgingival:

La detección de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *A. actinomicetecomitans* y *E. nodatum*, en muestras de placa subgingival fue realizada por PCR en tiempo real con cuantificación absoluta que permite confirmar el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Para la identificación de *P. gingivalis* se emplearon los primers y la sonda de hidrolisis reportados por Boutaga et al., 2003. La mezcla de reacción contenía MgCl2 3 mM, buffer 1X [GoTaq Polimerasa® (Promega)], dNTPs 0,1 mM, sonda específica para *P. gingivalis* 0.9µM, primers 1µM y DNA GoTaq Polimerasa® (Promega) 0.125U.

Para *A. actinomycetemcomitans* la mezcla de reacción contenía MgCl2 3 mM, buffer 1X [GoTaq Polimerase®] (Promega), dNTPs 0,2 mM, sonda específica para *A. actinomycetemcomitans* 0.5µM, primer sentido 0.3µM, primer antisentido 0.9µM y DNA GoTaq Polimerase® (Promega) 0.125U de acuerdo con el protocolo reportado por Boutaga et al., 2005.

T. forsythia fue identificada de acuerdo con el protocolo reportado por Morillo et al., 2004, y las concentraciones ajustadas para la mezcla de reacción constituyó de 3,5mM de MgCl2, buffer 1X [GoTaq Polimerase®] (Promega), dNTPs a una concentración de 0.2mM, primers 2µM, sonda específica para T. forsythia 0,5 µM y DNA GoTaq Polimerase® (Promega) 0.125U.

Para la identificación de *T. denticola* se siguió el protocolo de Yoshida et al., 2004, la mezcla de reacción contenía 2.25mM de MgCl2, buffer 1X [GoTaq Polimerase®] (Promega), dNTPs 1,5mM, primers 0,5 µM, sonda específica para esta bacteria 0,5 µM y DNA GoTaq Polimerase® (Promega) 0.125U.

Para la identificación de *E. nodatum* fueron diseñados los primers usando la secuencia reportada en el GenBank número Z36274.1 que corresponde al gen que codifica para rRNA 16S, las secuencias de los primes y la sonda de hidrolisis se diseñaron usando el programa Primer3Plus (http://primer3plus.com/), una vez obtenidas las secuencias la especificidad fue confirmada con Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), además de PCR in silico. Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas y las concentraciones finales para la amplificación fueron 3mM de MgCl2, buffer 1X [GoTaq Polimerase®] (Promega), dNTPs 0,1mM, primers 1 µM, sonda especifica 0,5 µM, DNA GoTaq Polimerase® (Promega) 0.125U. En la Tabla 1. se encuentran listados todos los primers y sondas para cada bacteria.

Todas las muestras fueron amplificadas en un termoclador BioRad CFX 96 y se sometieron a un ciclo de amplificación inicial de 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. La cuantificación absoluta se realizó con ayuda de curvas de calibración que se hicieron para cada una de las

bacterias con muestras de ADN que tienen cantidades conocidas de bacterias en UFC, los datos fueron pasados a Log10 para realizar el análisis estadístico. Tanto para las curvas de calibración como para los controles positivos se usaron ADN de cepas de referencia para cada una de las bacterias (Metodología tomada del Laboratorio UIBO Microbiología oral).

Tabla 1. Listado de primers y sondas empleados para la detección de bacterias en placa subgingival

Bacteria	Primers	Sonda	Referencia
P. gingivalis	F5-GCGCTCAACGTTCAGCC-3 R5-CACGAATTCCGCCTGC-3	5- Cal Fluor Red -CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-3- BHQ-2	Boutaga et al.(44)
A. actinomycete mcomitans	F5´-GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC GAA-3´ R5´-TGC AGC ACC TGT CTC AAA GC-3´	S- FAM-AGA ACT CAG AGA TGG GTT TGT GCC TTAGGG- BHQ-1	Boutaga et al., 2005(45)
T. forsythia	F 5´-TCCCAAAGACGCGGATATCA-3´ R 5´-ACGGTCGCGATGTCATTGT-3´	5´- HEX -CCGCGACGTGAAATGGTATTCCTC-3´ BHQ-1	Morillo et al., 2004(46)
T. denticola	F-5´-AGAGCAAGCTCTCCCTTACCGT-3´ R-5´-TAAGGGCGGCTTGAAATAATGA-3´	Quasar 670-CAGCGTTCGTTCTGAGCCAGGATCA- BHQ-2	Yoshida et al., 2004(47)
E. nodatum	F: 5’-AAGCAACGCGAAGAACCTTA-3´ R: 5’-CTCCACTGTTCCGAAGAAGG-3´	FAM- CCAGGACTTGACATCCCACT- BHQ1	Instituto UIBO

5.5 Resultados

En la tabla 2 se observan las características de edad y sexo de los pacientes evaluados. La edad de los pacientes no mostró diferencias significativas aunque los pacientes con historia de síndrome coronario tenían más hombres que el grupo de control.

Tabla 2. Tabla demográfica

GRUPO CONTROL		
PACIENTE	**EDAD**	**SEXO**
1	53	M
2	67	F
3	58	F
4	49	M
5	60	F
6	55	M
7	52	M
8	56	F
9	62	F
10	67	M
11	54	F
12	60	M
13	49	F
14	58	F
15	65	M
16	62	M

GRUPO SCA		
PACIENTE	**EDAD**	**SEXO**
1	53	M
2	62	M
3	56	M
4	58	M
5	67	F
6	60	F
7	58	M
8	53	M
9	58	M
10	57	M
11	51	M
12	61	M
13	70	F
14	59	M
15	59	M

La cuantificación de microorganismos periodontopáticos se observa en la tabla 3 y la frecuencia se evaluó como la presencia o ausencia de cada microrganismo en placa subgigival. En las figuras 1 a 5 se observan las gráficas box plot para decribir gráficamente la concentración de los diferentes microrganismos. La concentración para cada especie fue comparada por la prueba de suma de rangos de Wilcoxon ya que los datos no siguieron la distribución normal. Cada análisis fue realizado con un nivel de confianza del 95% $p<0.05$.

Tabla 3. Cuantificación de microorganismos periodontopáticos en Log 10 para Grupa SCA y Grupo Control

GRUPO SCA

PACIENTE	qPCR Aa- C Log 10	qPCR Pg-C Log10	qPCR Tf- C Log10	qPCR Td- C Log10	qPCR En- C Log 10
1	0	6,83	4,56	4,20	0
2	0	5,15	0	0	1,96
3	0	7,21	9,09	3,59	3,70
4	0	7,31	9,20	4,12	4,54
5	0	4,55	7,05	0	3,22
6	0	7,46	8,53	3,79	4,00
7	0	7,02	8,84	0	0
8	0	4,83	3,4	3,52	1,90
9	0	4,36	7,35	1,97	2,78
10	0	6,95	4,56	3,66	3,59
11	0	2,23	7,50	2,55	3,36
12	0	6,32	8,67	0	2,92
13	0	0	8,18	2,59	0
14	0	7,02	9,90	3,19	4,32
15	0	6,58	6,32	4,47	4,50

GRUPO CONTROL

PACIENTE	qPCR Aa- C Log 10	qPCR Pg-C Log10	qPCR Tf- C Log10	qPCR Td- C Log10	qPCR En- C Log 10
1	5,17	8,11	9,51	5,57	6,36
2	2,97	7,88	9,13	5,15	5,35
3	0	6,77	8,76	3,64	0
4	4,64	7,97	8,76	4,69	5,88
5	0	7,32	8,88	6,57	6,1
6	0	8,51	9,64	6,42	6,62
7	6,04	8,69	9,73	6,55	6,3
8	3,16	9,01	9,93	6,87	5,94
9	5,86	8,27	9,47	0	6,31
10	0	5,71	8,91	4,35	4,64
11	0	5,79	6,56	8,73	9,67
12	0	6,68	0	9,08	9,87
13	0	4,5	7,1	0	3,29
14	0	3,82	8,19	4,3	9,05
15	0	6,87	9,38	4,78	9,99
16	0	0	8,52	4,6	9,28

Tabla 4. Detección de microorganismos periodontopáticos con frecuencia de identificación (%)

GRUPO SCA	
Microorganismo	Prevalencia (%)
A. actinomycetemcomitans	37
P. gingivalis	93
T. forsythia	87
T. denticola	68
E. nordatum	75
GRUPO CONTROL	
Microorganismo	Prevalencia (%)
A. actinomycetemcomitans	0
P. gingivalis	93
T. forsythia	93
T. denticola	87
E. nordatum	93

Como se observa en la tabla 4, se presentó una mayor frecuencia de *T. forsythia*, *T. denticola* y *E. nodatum* en pacientes control con periodontitis crónica sin modulación.

Figura 1. Box plot de las concentraciones de *A actynomicentemcomitans* en pacientes con periodontitis crónica con y sin modulación de estatinas. Observese la mayor concentración de microorganismos en el grupo control. Valor p=0.1377, no se observan diferencias significativas para las concentraciones de *A actynomicentemcomitans* entre los grupos.

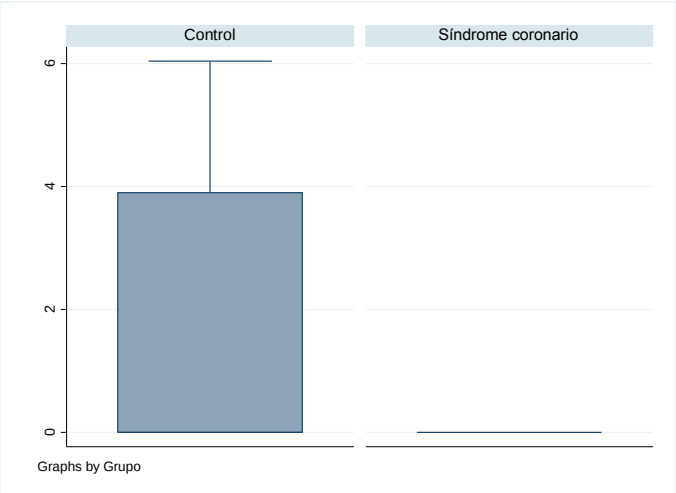


Figura 2. Box plot de las concentraciones de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica con y sin modulación de estatinas. Observese la mayor concentración de microorganismos en el grupo control. Valor p=0.29, no se observan diferencias significativas para las concentraciones de *P. gingivalis* entre los grupos.

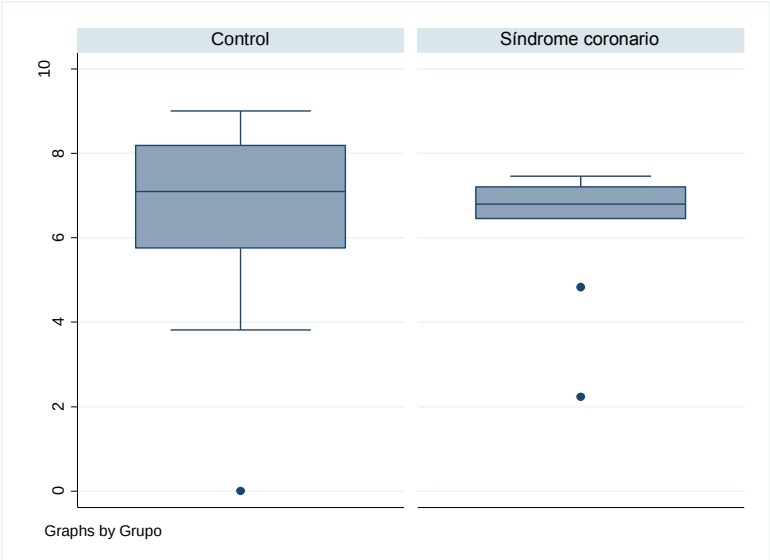


Figura 3. Box plot de las concentraciones de *T. forshytia* en pacientes con periodontitis crónica con y sin modulación de estatinas. Obsérvese la mayor concentración de microorganismos en el grupo control. Valor p=0.013 se observan diferencias significativas para las concentraciones de *T. forshytia* entre los grupos.

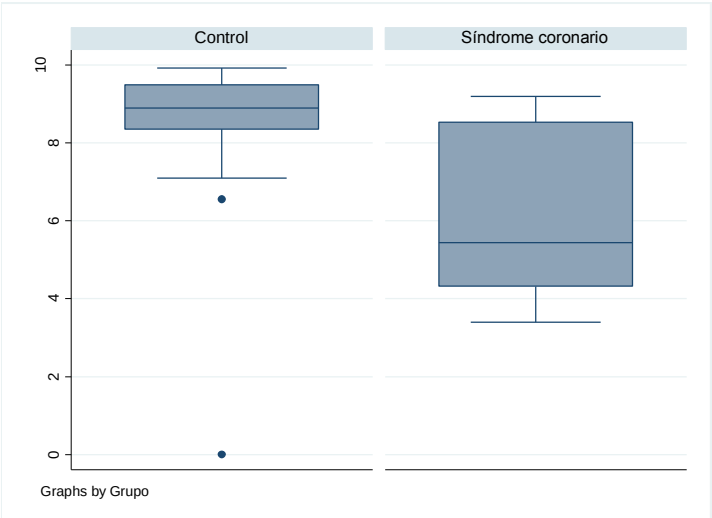


Figura 4. Box plot de las concentraciones de *T. denticola* en pacientes con periodontitis crónica con y sin modulación de estatinas. Obsérvese la mayor concentración de microorganismos en el grupo control. Valor p= 0.0084, se observan diferencias significativas para las concentraciones de *T. denticola* entre los grupos.

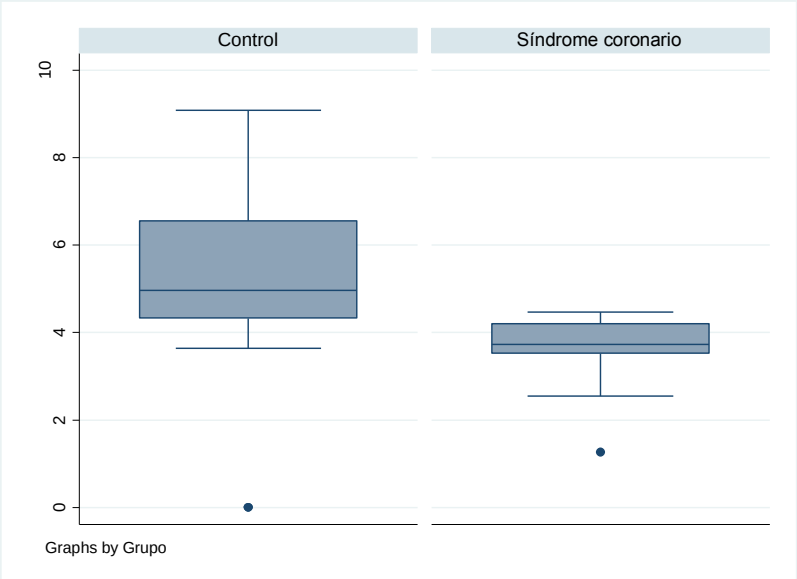
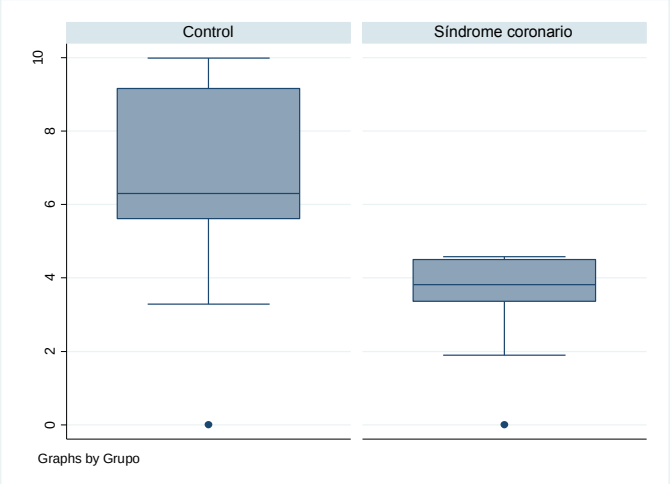


Figura 5. Box plot de las concentraciones de *E. nodatum* en pacientes con periodontitis crónica con y sin modulación de estatinas. Obsérvese la mayor concentración de microorganismos en el grupo control. Valor p=0.001, se observan diferencias significativas para las concentraciones de *E. nodatum* entre los grupos.



5.6 Discusión de los resultados

La composición de muestras de placa subgingival ha sido reportada en muchos estudios, bien sea evaluada a partir de la identificación de bacterias por las diferentes modificaciones de PCR, o por cultivo. En este estudio fue identificado *A. actinomycetemcomitans* únicamente en el grupo control con una baja prevalencia, lo cual contrasta con estudios anteriores evaluando la presencia de este microorganismo en placa subgingival. Boutaga et al, encontró una prevalencia de 90% de *A. actino*mycetemcomitans en pacientes con periodontitis crónica (48). Padilla et al, por su parte, encontraron esta especie en 7 de 12 pacientes con enfermedad cardiovascular y periodontitis(35). Tales resultados concuerdan con los de Figuero et al. con una prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en 66.7%. No obstante, Lafaurie et al. encontraron *A.actinomycetemcomitans* con menor prevalencia (16,5%) en pacientes con periodontitis crónica en población colombiana; la frecuencia de este microorganismo en pacientes con periodontitis crónica se ha reportado un rango variable entre 5% y100%(49). El no encontrar este microorganismo en pacientes modulados por altas dosis de estatinas podría deberse a la modulación antimicrobiana reportada para este microorganismo (Emani, et al. 2014).

Para la prevalencia de *P. gingivalis* los resultados de este estudio se encontraron entre los rangos reportados por otros estudios de 3,7% a 100%(50)(51)(49)(35). *T. forsythia* de igual manera, ha sido identificados con rango entre 73% y 93%(51), mientras que, *T. denticola* ha sido identificada en un rango entre 17.6% y 64.0%(27)(34) cercano al resultado del presente estudio (68%),

Con respecto a los resultados de la comparación entre el grupo SCA modulado con altas dosis de estatinas y el grupo control, la disminución estadísticamente significativa para *T. denticola*, *T. forsythia* y *E. nordatum* en el grupo SCA podría estar relacionada con el tratamiento con estatinas en estos pacientes. Además del papel antiinflamatorio que cumplen las estatinas en el manejo de pacientes con SCA, también se ha propuesto un potencial antibiótico(39). No obstante, dicho potencial podría estar relacionado con la capacidad que tienen las estatinas para disminuir marcadores de inflamación como la PCR y reducir también signos clínicos de inflamación(52), más que por una injuria directa sobre microorganismos.

El presente estudio tiene un número limitado de muestras sumado a que no existe seguimiento para evaluar cambios en las mismas, lo cual impide determinar con seguridad una que la disminución en la frecuencia de microorganismos periodontopáticos en el grupo SCA esté relacionada con el tratamiento con estatinas, sin embargo la disminución significativa en la identificación 2

microorganismos pertenecientes al complejo rojo de Socransky(10) es un resultado interesante que una vez más hace imperativo cuestionarse acerca del papel de estos microorganismos dentro de la patogénesis de la enfermedad periodontal y del Síndrome coronario agudo. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios con tamaños de muestra mayor con un seguimiento que permitan establecer relaciones entre la composición de la placa subgingival y las enfermedades cardiovasculares y así como determinar los efectos de las estatinas sobre tal composición.

5.7 Conclusión

A pesar de la reportada variabilidad existente entre la microbiota oral en diferentes poblaciones, los resultados de este estudio piloto en población colombiana evidencian una disminución significativa de la identificación de dos bacterias del complejo rojo, *T. forsithya* y *T. denticola*, así como de *E. nordatum,* en un grupo de pacientes con SCA modulados con altas dosis de estatinas y periodontitis; frente al grupo control (periodontitis sin alteraciones sistémicas.

6. Producción de ácidos grasos de cadena corta por microorganismos periodontopáticos en un población Colombiana.

Objetivo específico por cumplir:

- Explorar desde la teoría el papel que juegan las bacterias en la regulación de la respuesta inmune mediante la producción de ácidos grasos volátiles.

  Para este último objetivo, se construyó a partir de una revisión teórica sobre la regulación de la respuesta inmune por ácidos grasos de cadena corta que sustenta la realización de una futura investigación en población colombiana. Se realiza un artículo de revisión del tema propuesto, que se anexa en el formato correspondiente.

REFERENCIAS

1. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol [Internet]. 2014;35(1):3–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001

2. Aarabi G, Eberhard J, Reissmann DR, Heydecke G, Seedorf U. Interaction between periodontal disease and atherosclerotic vascular disease - Fact or fiction? Atherosclerosis. 2015;241(2):555–60.

3. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. Vol. 42, Periodontology 2000. 2006. p. 47–79.

4. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I DF. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005;43:5721–5732.

5. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. Microbes Infect [Internet]. 2000;2(13):1599–607. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113379

6. Löe H. Experimental Gingivitis. J Periodontol. 1965;36:177–87.

7. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest. 1976 Mar;34(3):235–49.

8. Ministerio de Salud y Protección Social, MINSALUD. IV Estudio Nacional De Salud Bucal - ENSAB IV. Bogotá, Colomb. 2014;3:381.

9. Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? J Clin Periodontol. 2011;38(SUPPL. 11):7–16.

10. Socransky SS, Haffajee a D, Cugini M a, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25(2):134–44.

11. Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an

independent association?: A scientific statement from the American heart association. Circulation. 2012;125(20):2520–44.

12. 44Ca138F76Cb1F1608Dbdd32010F0E4Eecb80863 @ Www.Who.Int [Internet]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/

13. Velsko IM, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Zheng D, Aukhil I, Lucas AR, et al. Periodontal pathogens invade gingiva and aortic adventitia and elicit inflammasome activation in αvβ6 integrin-deficient mice. Infect Immun. 2015;83(12):4582–93.

14. Libby P. History of Discovery : Inflammation in Atherosclerosis. Arter Thromb Vasc Biol. 2012;32(9):2045–51.

15. Gomes-Filho IS, Freitas Coelho JM, da Cruz SS, Passos JS, Teixeira de Freitas CO, Aragão Farias NS, et al. Chronic Periodontitis and C-Reactive Protein Levels. J Periodontol [Internet]. 2011;82(7):969–78. Available from: http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2010.100511

16. Chen H, Zheng P, Zhu H, Zhu J, Zhao L, El Mokhtari NE, et al. Platelet-activating factor levels of serum and gingival crevicular fluid in nonsmoking patients with periodontitis and/or coronary heart disease. Clin Oral Investig. 2010;14(6):629–36.

17. Gaetti-Jardim E, Marcelino SL, Feitosa ACR, Romito GA, Avila-Campos MJ. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. J Med Microbiol. 2009;58(12):1568–75.

18. Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldán S, Progulske-Fox A. Periodontal bacterial invasion and infection: Contribution to atherosclerotic pathology. J Clin Periodontol. 2013;40(SUPPL. 14).

19. Slocum C, Kramer C, Genco CA. Immune dysregulation mediated by the oral microbiome: potential link to chronic inflammation and atherosclerosis. J Intern Med. 2016;280(1):114–28.

20. Kespohl M, Vachharajani N, Luu M, Harb H, Pautz S, Wolff S, et al. The microbial metabolite butyrate induces expression of Th1- associated factors in cD4+ T cells. Front Immunol. 2017;8(AUG):1–12.

21. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of Periodontal Pathogens in Atheromatous Plaques. J Periodontol [Internet]. 2000;71(10):1554–60. Available from: http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2000.71.10.1554

22. Carrion Julio, Scisci Elizabeth, Miles Brodie, Sabino Gregory J, Zeituni Amir E, Gu Ying, Bear Adam, Genco Caroline A, Brown David L. CCW. Microbial Carriage State of Peripheral Blood Dendritic cells (DCs) in Chronic Periodontitis Influences DC Differentiation, Atherogenic Potential. J Immunol. 2014;189(6):1–20.

23. Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of Porphyromonas gingivalis. FEMS Microbiol Lett. 2000;187(2):139–44.

24. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. J Clin Periodontol. 2004;31(11):996–1002.

25. Gualtero DF, Viafara-Garcia SM, Morantes SJ, Buitrago DM, Gonzalez OA, Lafaurie GI. Rosuvastatin Inhibits IL-8 and IL-6 Production in Human Coronary Artery Endothelial Cells Stimulated With Aggregatibacter actinomycetemcomitans Serotype b. J Periodontol [Internet]. 2016;(February):1–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27739345

26. Teeuw WJ, Slot DE, Susanto H, Gerdes VEA, Abbas F, D'Aiuto F, et al. Treatment of

periodontitis improves the atherosclerotic profile: A systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol. 2014;41(1):70–9.

27. Oliveira FAF, Forte CPF, Silva PG de B, Lopes CB, Montenegro RC, Santos ÂKCR dos, et al. Molecular Analysis of Oral Bacteria in Heart Valve of Patients With Cardiovascular Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction. Medicine (Baltimore) [Internet]. 2015;94(47):e2067. Available from: http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201511240-00035

28. Qi M, Miyakawa H, Kuramitsu HK. Porphyromonas gingivalis induces murine macrophage foam cell formation. Microb Pathog. 2003;35(6):259–67.

29. Gregory JC, Buffa JA, Org E, Wang Z, Levison BS, Zhu W, et al. Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. J Biol Chem. 2015;290(9):5647–60.

30. Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, et al. Oral administration of P. gingivalis induces dysbiosis of gut microbiota and impaired barrier function leading to dissemination of enterobacteria to the liver. PLoS One. 2015;10(7):1–15.

31. Hayashi C, Madrigal AG, Liu X, Ukai T, Goswami S, Gudino C V., et al. Pathogen-mediated inflammatory atherosclerosis is mediated in part via toll-like receptor 2-induced inflammatory responses. J Innate Immun. 2010;2(4):334–43.

32. Hajishengallis G. Immune Evasion Strategies of Porphyromonas gingivalis. J Oral Biosci [Internet]. 2011;53(3):233–40. Available from: http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/joralbiosci/53.233?from=CrossRef

33. Køllgaard T, Enevold C, Bendtzen K, Hansen PR, Givskov M, Holmstrup P, et al. Cholesterol crystals enhance TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory cytokine responses of monocytes to the proatherogenic oral bacterium Porphyromonas gingivalis. PLoS One. 2017;12(2):1–14.

34. Ishihara K, Nabuchi A, Ito R, Miyachi K, Kuramitsu HK, Okuda K. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples. J Clin Microbiol. 2004;42(11):5437.

35. Padilla C, Lobos O, Hubert E, González C, Matus S, Pereira M, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2006;41(4):350–3.

36. Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. Microbes Infect. 2006;8(3):687–93.

37. Aimetti M, Romano F, Nessi F. Microbiologic Analysis of Periodontal Pockets and Carotid Atheromatous Plaques in Advanced Chronic Periodontitis Patients. J Periodontol [Internet]. 2007;78(9):1718–23. Available from: http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2007.060473

38. Serra E Silva Filho W, Casarin RC V, Nicolela EL, Passos HM, Sallum AW, Gonc¸alves RB. Microbial diversity similarities in periodontal pockets and atheromatous plaques of cardiovascular disease patients. PLoS One. 2014;9(10).

39. Kozarov E, Padro T, Badimon L. View of statins as antimicrobials in cardiovascular risk modification. Cardiovasc Res. 2014;102(3):362–74.

40. Estanislau IMG, Terceiro IRC, Lisboa MRP, Teles P de B, Carvalho R de S, Martins RS, et al. Pleiotropic effects of statins on the treatment of chronic periodontitis--a systematic review. Br J Clin Pharmacol. 2015 Jun;79(6):877–85.

41. Emani S, Gunjiganur G V, Mehta DS. Determination of the antibacterial activity of

simvastatin against periodontal pathogens, Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans: An in vitro study. Contemp Clin Dent. 2014 Jul;5(3):377–82.

42. Cunha-Cruz J, Saver B, Maupome G, Hujoel PP. Statin use and tooth loss in chronic periodontitis patients. J Periodontol. 2006 Jun;77(6):1061–6.

43. Ting M, Whitaker EJ, Albandar JM. Systematic review of the in vitro effects of statins on oral and perioral microorganisms. Eur J Oral Sci. 2016 Feb;124(1):4–10.

44. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM SP. Comparison of real -time PCR and culture for detection of Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque samples. J Clin Microbiol. 2003;41:4950–4.

45. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM SP. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;45:191–9.

46. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Martín C SA. Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. J Clin Periodontol. 2004;31:1054–60.

47. Yoshida A, Kawada M, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Saito T YY. TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of Treponema denticola numbers with the severity of periodontal disease. Oral Microbiol Immunol. 2004(19):196–200.

48. Boutaga K, Savelkoul PHM, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. J Periodontol. 2007;78(1):79–86.

49. Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, Clinical, and Microbial Aspects of Chronic and Aggressive Periodontitis in Colombia: A Multicenter Study. J Periodontol [Internet]. 2007;78(4):629–39. Available from: http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2007.060187

50. Rydén L, Buhlin K, Ekstrand E, De Faire U, Gustafsson A, Holmer J, et al. Periodontitis Increases the Risk of a First Myocardial Infarction: A Report from the PAROKRANK Study. Circulation. 2016;133(6):576–83.

51. Figuero E, Lindahl C, Marín MJ, Renvert S, Herrera D, Ohlsson O, et al. Quantification of Periodontal Pathogens in Vascular, Blood, and Subgingival Samples From Patients With Peripheral Arterial Disease or Abdominal Aortic Aneurysms. J Periodontol [Internet]. 2014;85(9):1182–93. Available from: http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2014.130604

52. Sangwan A, Tewari S, Singh H, Sharma RK, Narula SC. Periodontal status and hyperlipidemia: statin users versus non-users. J Periodontol [Internet]. 2013;84(1):3–12. Available from: http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2012.110756?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed

Revisión. Regulación de la respuesta inmune por ácidos grasos de cadena corta producidos por periodontopatógenos.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, y como tal, es necesario abordar las relaciones que existen entre los diferentes componentes que determinan el desarrollo de la misma. El factor etiológico de la enfermedad es el biofilm, que de manera natural recubre las superficies dentales que se encuentran en contacto con el medio oral(1). A pesar de ser necesario, el biofilm no es suficiente para desencadenar la enfermedad(2). En la actualidad se han descubierto más de 700 especies de bacterias en cavidad oral(3)(4), las mismas se encuentran en nichos con condiciones metabólicamente favorables para su desarrollo particular(5)(6). No obstante, además de las condiciones específicas de cada nicho, las condiciones de la cavidad oral en general cambian constantemente por la presencia de alimentos que alteran principalmente el pH y la temperatura. La falta de remoción del biofilm genera en 14 días la aparición de signos clínicos de la gingivitis (enrojecimiento y sangrado)(7).

La gingivitis comprende lo que Page y Schroeder describieron como lesión estable(8), una enfermedad con características de los componentes microbiológicos e inmunológicos diferentes a los de la periodontitis(2)(9).

Una de las interrogantes que aun hoy no ha podido ser completamente esclarecida es por qué la lesión estable progresa a lesión avanzada, con destrucción ósea y formación de bolsas, en otras palabras, periodontitis. La explicación más aceptada, aunque sin esclarecer los mecanismos específicos por los cuales hay destrucción de los tejidos periodontales en algunos pacientes, y en otros con niveles de biofilm parecidos o mayores no hay progresión; tiene que ver con la integración entre: el microambiente que se genera en el surco gingival, los conglomerados bacterianos que hacen parte del biofilm y la asociación de las mismas, la respuesta inmunológica ante el constante reto bacteriano y sus productos en contacto con las células epiteliales y al interior del tejido conectivo y, finalmente, el compromiso sistémico del paciente y determinantes sicosociales del mismo(1)(2). Estos factores se interrelacionan en el desarrollo de la enfermedad periodontal, pero la manera cómo lo hacen, qué factor resulta mas determinante para su progresión o no progresión, es algo que continua sin ser esclarecido.

Dentro de los factores que modulan la respuesta inmune se ha encontrado un papel por parte de los ácidos grasos volátiles producidos por bacterias comensales a nivel intestinal. Tal modulación aparentemente tiene que ver con la capacidad alterar el equilibrio de poblaciones de linfocitos Th17 y Treg(10). Es probable entonces que los ácidos grasos volátiles producidos por periodontopatógenos tengan a su vez el potencial de modular la respuesta inmune.

La presente revisión busca evaluar a partir de la evidencia existente una nueva

perspectiva en el papel de los microorganismos como estimuladores de la respuesta inmune por alteración en el eje Th17 / Treg a través de la producción de acidos grasos de cadena corta y, su eventual influencia sobre la historia natural de la enfermedad periodontal.

Perfil Th17

La importancia de los linfocitos T CD4+ dentro de la respuesta inmunológica se hizo especialmente evidente a partir del entendimiento de la historia natural de la enfermedad del SIDA, cuyas manifestaciones están dadas principalmente por la reducción del número de estas células, con la subsecuente aparición de infecciones oportunistas(11). No obstante, los linfocitos T CD4+ han sido clasificados a su vez de acuerdo al perfil de citoquinas que producen, el cual es direccionado por los estímulos o señales recibidas por linfocitos vírgenes, y a partir de los cuales los linfocitos T CD4 activados dirigen la respuesta inmune.

Inicialmente fueron reconocidos dos perfiles de citoquinas, Th1 y Th2 desde 1986 (12). El perfil Th1 hace referencia a un grupo de linfocitos que producen IFN-γ a partir de la estimulación con IL-12, y regulan las respuesta inmune celular contra microorganismos intracelulares; mientras que el perfil Th2 se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 en reacciones de hipersensibilidad tipo II y dirigen la respuesta humoral en procesos infecciosos contra microorganismos extracelulares como los parásitos(11)(13)(12).

Para promover la diferenciación de un perfil de citoquinas específico es necesaria la presentación antigénica, con una primera señal: unión al TCR del linfocito virgen, como segunda señal que incluye moléculas coestimuladoras: CD80 y CD86 de células dendríticas con CD28 del linfocito virgen; y la tercera señal que son citoquinas específicas (3).

A finales de los 90's empezó a identificarse un grupo de linfocitos CD4+ productores de IL-17, los cuales fueron asociados a enfermedades autoinmunes como inductores de la exacerbación de la respuesta inflamatoria en modelos animales. No obstante, fue a comienzos del 2000 que se identificaron como poblaciones productoras de un perfil de citoquinas completamente diferentes a los ya descritos Th1 y Th2(13)(14)(15). Se dice que son completamente diferentes porque los factores de transcripción expresados para inducir su diferenciación son distintos a STAT4 y T-bet necesarios en activación y diferenciación del perfil Th1, y a STAT 6 y GATA 3 para Th2(16)(15).

A pesar de la relevancia de los perfiles Th1 y Th2, estos no explicaban la aparición de infecciones por microorganismos como el hongo *Pneumocystis jirovecii* causante de neumonía en ausencia de linfocitos CD4+, la cual no es afectada por la respuesta mediada por Th1 y Th2. Fue por eso que se propuso la existencia de otro tipo de linfocitos que en recuentos de CD4 + normales medien la respuesta inmune en procesos particulares (13)(11). Cabe aclarar que aunque se hable de IL-17 en realidad existe una familia de citoquinas IL-17. Cuando se habla de IL-17 en realidad se hace referencia a IL-17A. Estas interleucinas comparten ciertas características, varias comparten receptores, sin embargo, participan de maneras diferentes en la regulación de la respuesta inmune. Por ejemplo, IL-17E (también conocida como IL-25) es producida por linfocitos Th2 y se ha asociado con reacciones de hipersensibilidad(15).

El perfil llamado Th17 incluye la producción de IL17A, IL-17F3, IL-22 entre otras, pero es IL-17A la más estudiada. Esta interleucina es producida por las células dendríticas como parte de las citocinas que polarizan la respuesta inmune a través de la diferenciación de linfocitos hacia un perfil Th17, y que dependen de la naturaleza del antígeno. Un gran número de células expresa receptor para la misma, IL-17R, queratinocitos, células endoteliales, además de células propias de tejidos especializados en pulmón, en hígado, etc. La unión de la IL-17 al receptor desencadena la expresión de distintas quemoquinas y de CSF-G. De esta manera, se puede decir que IL-17 participa en el reclutamiento de neutrófilos, induce la granulopoyesis y potencializa los efectos de citoquinas altamente proinflamatorias como IL-1B e IL-6(11).

Inicialmente, y como se mencionó anteriormente, la acción de la IL 17 fue altamente asociada a la exacerbación de la inflamación y de la destrucción tisular en procesos autoinmunes, sin embargo, en este momento se tiene claro que es de vital importancia en la respuesta contra antígenos específicos de tipo fúngico, viral y bacteriano(17). En particular, se ha encontrado que la IL-17 está ampliamente involucrada en la inmunidad de mucosas y que la regulación de la misma implica formas de protección o de injuria durante procesos infecciosos(11)

Por su parte, la expresión de IL-17 depende de la estimulación con IL-6, IL-21 y TGF-β y es principalmente importante IL-23 para mantener el linaje Th17. Estas citoquinas actúan por vía STAT3 para estimular la expresión de RORγt, factor de transcripción necesario para la diferenciación de células T al perfil Th17. Este factor por su parte, reafirma la importancia de IL-23 para linfocitos Th17, porque aumenta la expresión de receptores de dicha interleucina, garantizando así, la expansión clonal(11)(18)(19).

LINFOCITOS Treg

Además del perfil Th17, se ha explorado cada vez más una población de linfocitos T encargada de limitar la respuesta inmune durante procesos inflamatorios y controlar las reacciones contra autoantigenos. Así lo demuestran diversos estudios experimentales en ratones, donde, a partir de marcadores celulares, dividen las células T en reguladoras y reactivas, y evalúan los cuadros clínicos observados en ausencia de células reguladoras por timectomía e inyección de linfocitos reactivos en un grupo de ratones los cuales desarrollan: autoinmunidad y aumento de la respuesta inmune contra antígenos respectivamente(20)(21) .

A la población de linfocitos con capacidad de regular de manera negativa la respuesta inmune se le conoce con el nombre de linfocitos Tregs y se encuentran relacionados con los fenómenos de inmunotolerancia. La inmunotolerancia incluye los diferentes mecanismos con los que cuenta el sistema inmune para impedir la reacción exacerbada contra autoantigenos, entre los cuales está la selección negativa, la edición del receptor TCR y el control por parte de los linfocitos Treg. Cabe resaltar que la inmunotolerancia puede generar linfocitos anérgicos que no reaccionan de manera oportuna ni con la magnitud necesaria para controlar infecciones y la generación de tumores. Por lo tanto, la respuesta descontrolada de Tregs tiene a

su vez consecuencias negativas para el organismo(22).

El factor de transcripción necesario para la diferenciación de Tregs es FOXP3, que además constituye el mejor marcador molecular de células reguladoras. Fue a partir del modelo de ratones scurfy, el cual supone desregulación inmunológica por mutacion en el gen FOXP3(23). Este modelo resulta homologo al IPEX (síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado a X), enfermedad ligada al cromosoma X con manifestaciones clínicas de procesos autoinmunes evidentes en diferentes órganos: diarrea, diabetes, eccema, tiroiditis, psoriasis, entre otras(24). Teniendo en cuenta que la expresión del gen se da poco después del nacimiento y por lo tanto las manifestaciones también empiezan en este periodo y entre el primero y segundo año de vida el individuo con el síndrome fallece. FOXP3 aumenta la expresión de CTLA-4 y la disminución de de IL-2, INFγ y de IL-4, disminuyendo la diferenciación de linfocitos Th1 y Th2. Adicionalmente, la Il-2 interviene de manera importante dentro de la diferenciación y expansión de linfocitos T reguladores. Esta interleucina es pleiotrópica en tanto que induce la diferenciación de perfiles Th1 y Th2, pero al mismo tiempo ejerce un control negativo sobre la respuesta de los mismos a partir de la inducción de apoptosis y la activación de linfocitos T reg(22).

Existen dos formas como se pueden generar linfocitos Treg, directamente desde el timo, o en la periferia. La primera posibilidad implica que los lincitos T reg naturales se encuentran completamente diferenciados y no son linfocitos virgenes en el timo como los últimos(22). La población de linfocitos Treg naturales constituye alrededor de un 5% de las células T CD4+ y menos del 1% de los linfocitos T CD8+ en el timo (15,23)(25).

Patogénesis de la Enfermedad Periodontal: Enfoque Microbiológico

La observación de placa subgingival al microscopio por Van Leeuwenhoek en 1663 fue el primer acercamiento a lo que él describió como “animaculos” y que hoy se sabe comprenden una intrincada red de conexiones entre microorganismos compartiendo el mismo nicho(26)(5). La capacidad individual de los microorganismos de sobrevivir y de generar alteraciones en el huésped se ve potenciada en la organización de biofilms frente a los estados planctónicos de las especies que lo conforman, de ahí que se diga que dichas capacidades son mas que la suma de las especies que lo conforman(4)(27). El biofilm es un sistema dinámico en el cual conviven bacterias de mismo o diferente género, hay comunicación entre las mismas e intercambio de productos metabólicos y nutrientes que determinan las condiciones del microambiente en el que se desarrolla y por lo tanto determinan la conformación de dicho biofilm(28)(4). El biofilm no está compuesto únicamente por bacterias, estas se encuentran embebidas en una matriz de polisacárido que es el medio perfecto para que haya difusión de nutrientes, desechos, moléculas de comunicación entre ellas, y de protección frente a sustancias antibióticas(4).

La composición del biofilm en pacientes periodontalmente sanos y con periodontitis ha sido evaluada ampliamente, y gracias a los estudios de Sockansky y Haffajee, se asociaron diferentes especies bacterianas con la presencia de enfermedad y la severidad de la misma(10). De esta manera, se propuso a las bacterias mayormente

asociadas a estadios severos de la enfermedad como miembros del complejo rojo: *Tanerella forsythia, Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*(10). La facilidad para cultivar *P. gingivalis sobre T. denticola y T. forsythia*, entre otras razones, ha hecho que este organismo sea el mas estudiado y catalogado como principal responsable de la alteración del equilibrio entre el biofilm y la respuesta del huésped, teniendo como resultado la pérdida ósea característica de la enfermedad periodontal(27). De esta manera, se han analizado múltiples factores de virulencia que le permiten a *P. gingivalis* colonizar el surco crevicular, e invadir el epitelio y el tejido conectivo. Dentro de los factores de virulencia mas importantes se encuentran las fimbrias como FimA y otras moléculas que le sirven como adhesinas para coagregarse con otras especies(29). Las gingipaínas le sirven además a *P. gingivalis* para degradar proteínas, una función vital para un microorganismo de metabolismo proteolítico. Es ese metabolismo anaerobio y proteolítico a su vez, es el que relaciona a *P. gingivalis* con estadios de la lesión avanzada, ya que requiere de productos de la inflamación, como la hemina de la sangre para obtener hierro, y su crecimiento y supervivencia se favorecen con la formación de surcos profundos y bolsas periodontales. De esta manera, a medida que progresa la lesión, las condiciones son más favorables para el desarrollo de *P. gingivalis* y se convierte en un ciclo, pues tal crecimiento también aumenta la pérdida ósea y el mantenimiento de dichas condiciones en el microambiente de la bolsa periodontal. No obstante, si bien se han estudiado diversos mecanismos a partir de los cuales *P. gingivalis* tendría la capacidad de aumentar la progresión de la lesión, en los últimos años se ha evaluado también el papel que cumple sobre el inicio de la misma. En condiciones de equilibrio y, como se ha evaluado en pacientes sanos, la frecuencia de *P. gingivalis* es baja(30), sin embargo, este microorganismo ante factores específicos tiene la capacidad de generar condiciones inflamatorias al interactuar con la respuesta inmune del paciente de forma particular y producir disbiosis(2). Dicha capacidad lo clasifica como una especie piedra angular que altera la relación biofilm- huésped y alterando la respuesta del huésped al inducir inflamación, a su vez altera la composición del biofilm y el comportamiento de las bacterias que sobreviven a las nuevas condiciones. Las bacterias que previo a la alteración de la respuesta inflamatoria son comensales y que ante condiciones alteradas intervienen en la progresión de la enfermedad se conocen como probiontes(2). La presencia de las mismas especies en pacientes periodontalmente sanos y en pacientes con periodontitis, soporta el concepto de probiontes. Adicionalmente, se ha propuesto la existencia de especies que tienen un papel mixto dentro de la progresión de la enfermedad periodontal, como *Aggregatibacter actomycetemcomitans* y *Treponema denticola*, ya que inducen de manera importante la inflamación, pero en condiciones de salud pueden estar presentes como bacterias comensales(1)**.**

Etiopatogénesis de la enfermedad periodontal: Enfoque inmunológico:

El hecho de que sean los microorganismos “piedra angular” los que dirijan el cambio en la relación huésped_ microbioma es una posibilidad, sin embargo, la falta de susceptibilidad a la periodontitis de algunos individuos con altos niveles de placa implica la

posibilidad alternativa de que sea la respuesta intrínseca del huésped la que determine dicho cambio, necesario para que se generen relaciones de disbiosis y con ello se desarrolle la enfermedad periodontal(9).

El amplio arsenal que comprende la respuesta inmune ha sido ampliamente evaluado frente a sus posibilidades como agente protector o destructor dentro de la patogénesis de la enfermedad periodontal. Los modelos aplicados en otros sistemas y en otras enfermedades de tipo inflamatorio con potencial infeccioso han sido a lo largo de la historia evaluados en la progresión de la periodontitis. Así ocurrió con el modelo Th1 y Th2, en el cual se propuso que el perfil Th1 era más prevalente en la lesión estable y por lo tanto era protector, mientras que el perfil Th2 se encontraba asociado a la liberación de anticuerpos por linfocitos B en la lesión periodontal avanzada y por lo tanto, constituía un perfil que incrementaba la destrucción tisular y por lo tanto la progresión de la enfermedad periodontal (31)(32)(33). Sin embargo, la producción de citoquinas con capacidad de inhibir la osteoclastogénesis como IL-13 e IL-4 por linfocitos Th2 y el reporte de expresión de RANKL por TH1, entre otros resultados contradictorios, permitieron avanzar sobre un modelo que por ahora se ha mostrado mas coherente, Th17- Treg.

En la actualidad los niveles de linfocitos T productores de IL-17 se ha visto relacionada con el grado de severidad de la enfermedad periodontal, y con los niveles de IL-23 producidos por macrófagos(34). A su vez la importancia de los neutrófilos como células presentes de manera importante en lesiones periodontales podría estar relacionada con la producción de IL-17 que a su vez incrementa el reclutamiento de PMNs(35), con efectos importantes tanto dentro del control de la infección, como en la progresión de la enfermedad por liberación de sustancias que aumentan la destrucción celular(2).

Frente a la relación de Th17 con enfermedad periodontal, se ha reportado aumento de la cantidad de células productores de IL-17 y mayores niveles de IL-17 en muestras de tejido gingival en lesiones periodontales con respecto a muestras de tejido gingival sano. Se ha propuesto que la unión directa de antígenos periodontales a TLR active las células T hacia el perfil Th17, ya que se ha observado que las gingipainas de *P. gingivalis* pueden inducir la expresión de CD69 y de CD25.

No obstante, el papel de Th17 en la etipatogenesis de la periodontitis no ha sido esclarecido y los resultados son contradictorios frente a un rol protector o destructivo. Por un lado, se ha observado mayor progresión de la enfermedad periodontal en ratones IL-17RA null. Por otro lado, la falta de Del -1 (antagonista de la proteína de adhesión LFA-1 de neutrófilos) aumenta la progresión de la enfermedad periodontal, efecto que no sucede en ratones Del-1/LFA-1 null. Este último hallazgo hace evidente el papel de IL-17 en el reclutamiento de neutrófilos(34).

Por otro lado, el papel de poblaciones de Treg también han demostrado tener un papel protector en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Se encontró una relación negativa entre la presencia de linfocitos Treg en lesiones periodontales y expresión aumentada de RANKL(36). No obstante, en etapas posteriores a la lesión se observó aumento de linfocitos Treg y aumento de CTLA-4, que al inhibir los linfocitos Treg incrementa la pérdida ósea en las lesiones periodontales en modelo

murino(37). La administración oral de ácido transretinóico disminuyó la progresión de la enfermedad periodontal inducida en ratones a partir del aumento de Treg y disminución en el recuento de Th17(38).

Producción de ácidos grasos volátiles por microorganismos periodontopatógenos

Los ácidos grasos de cadena corta, son moléculas alifáticas con menos de 6 carbonos(39) son productos metabólicos bacterianos con importante acción biológica(40), además . Los receptores celulares que reconocen ácidos grasos volátiles son los receptores asociados a proteína G: GPR43 y GPR41 (39) generando alteraciones en los leucocitos a partir de alteración del pH citoplasmático, de los niveles de calcio y de IP3, además de alteraciones en los filamentos de actina, y la función celular(41). El perfil de producción de ácidos grasos fue utilizado como método para identificar bacterias y han sido identificados en saliva y en fluido crevicular, lo cual generó la incertidumbre acerca de su influencia sobre la respuesta inmune del huésped en tejidos periodontales(40)(42), inicialmente manifestada por Singer y Buckner particularmente para con respecto al efecto del ácido butírico y el ácido propiónico(43) . Adicionalmente, las concentraciones de ácido butírico e isovalénico han demostrado estar relacionados con lesiones periodontales de mayor severidad, sugiriendo la posibilidad de ser utilizados como marcadores progresión de la enfermedad periodontal(40)(42)(44). No obstante, el papel de los diferentes ácidos grasos volátiles no es igual. Se ha encontrado disminución de la proliferación de células B y T esplénicas de ratón al ser expuestas a ácido butírico, ácido valénico y ácido isovalénico(45), mientras que el ácido propionico y butírico generan alteraciones la síntesis de proteínas con disminución del crecimiento de fibroblastos gingivales(46). Adicionalmente, Kurita et al, encontraron que los fibroblastos gingivales de lesiones periodontales eran más susceptibles a la apoptosis inducida por presencia de ácido butírico(47), mientras que fibroblastos aislados de pacientes sanos, no lo eran(48).

Además de los efectos de los diferentes ácidos grasos de cadena corta sobre las células del huésped, estos también tienen la capacidad de modular la composición del biofilm al inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos e incrementar el crecimiento de otros por actuar como fuentes nutricionales(49). En particular*, P. gingivalis* es productor de niveles importantes de ácido butírico(47), lo cual configura un mecanismo protector sobre este tipo de ácidos.

Regulación de la respuesta inmune por direccionamiento de los perfiles Th17/Treg ácidos grasos de cadena corta.

Los primeros reportes sobre la acción reguladora del microbioma sobre el direccionamiento hacia perfiles Th17 y Treg(50) estudiaron dicho efecto en el intestino. La manera como los ácidos grasos regulan dicho direccionamiento tiene que ver con las diferencias en los requerimientos nutricionales entre Th17 y Treg. Los primeros requieren de la síntesis de ácidos grasos mediada por acetil CoA carboxilasa 1 para su desarrollo, mientras que T regs obtienen los ácidos grasos de manera exógena y dependen solo de la oxidación fosforitativa de los mismos para desarrollarse. La activación de la glicolisis necesaria en Th17 puede ser activada por el factor 1 inducible por hipoxia HIF1α que

induce la expresión de RORγt e inhibe Foxp3(51). De manera especifica se ha descrito el papel del butirato como inductor de la diferenciación hacia Treg por participación en la acetilación de la histona H3 en la región promotora del locus de Foxp3(50). Además el butirato podría activar el receptor GPR109a que induce la producción de ácido retinoico, que como se explicó anteriormente induce la diferenciación de linfocitos Treg(52)

El efecto de los ácidos grasos sobre la diferenciación hacia Th17 o Treg depende del perfil de citoquinas del medio y del contexto inmunológico(51). En presencia de citocinas proinflamatorias como IL-6 o IL-23 con TGFβ hay un direccionamiento hacia el perfil Th17, mientras que solo en ausencia de dichas citocinas TGFβ se comporta como una molecula pleiotrópica y genera linfocitos Treg(51).

Se han evaluado efectos antiinflamatorios de los ácidos grasos de cadena corta en ratones libres de microbios (GF) que presentan menores concentraciones de estos metabolitos: acetato, butirato y propionato, en el lumen del tracto gastrointestinal, y cuya administración oral genera aumento de Treg(53). Además, se ha evidenciado una importante capacidad de NaB (butirato de sodio) de disminuir la expresión de IL-12 y aumento de IL-10 en monocitos estimulados con *Staphylococcus aureus* en presencia de butirato(54)(55), así como inhibición de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible). TNFα e IL-6 en macrófagos estimulados con INFγ.

Adicionalmente los ácidos grasos volátiles han sido propuestos como inhibidores de HDAC (histona deacetilasas) particularmente de HDAC3 demostrado *in vitro* e *in silico,* razón por la cual se ha propuesto su potencial terapéutico en cáncer (56).

Los receptores GPR43 y GPR41 activados por los ácidos grasos volátiles, son necesarios para combatir infecciones gastrointestinales, así como para resolver procesos inflamatorios como la colitis inducida en ratones(57)(58).

Por otro lado, *Meike et al*. demostró que el efecto inmunomodulador de los ácidos grasos volátiles, específicamente del ácido butírico ampliamente estudiado hacia la formación de Treg es dosis dependiente, que en altas concentraciones induce la expresión de INFy T-bet, lo cual induce el aumento del daño por colitis inflamatoria inducida con dextran sulfato de sodio (DSS) en modelo murino(59). También, reafirmó lo ya mencionado anteriormente, el papel inmunoregulador de estos metabolitos depende de las citocinas en el medio, ya que en ausencia de TGFβ con citocinas proinflamatorias el butirato es incapaz de generar Treg, por el contrario induce expresión de factores asociados a Th1(59)

Perspectivas sobre el posible papel de los ácidos grasos volátiles en Enfermedad Periodontal

Como otros dilemas que han surgido en el papel de células, citocinas y ahora productos metabólicos, en el estudio de la etipatogénesis de la enfermedad periodontal, los ácidos grasos de cadena corta han demostrado tener el potencial de generar reacciones inmunológicas contradictorias, con efectos protectores y destructores en el desarrollo de enfermedades inflamatorias/infecciosas. Los mecanismos a través de los cuales logran generar tales efectos contrarios no han sido dilucidados aún.

Por un lado, los efectos protectores por regulación de la respuesta inmune y limitación de la respuesta inflamatoria con formación de linfocitos Treg ha sido

comprobada en tracto gastrointestinal y no en boca. No obstante, ambos nichos cuentan con características en común, el tracto gastrointestinal alberga entre 800 y 1000 especies bacterianas con cuya relación de simbiosis puede alterarse a disbiosis, produciendo condiciones inflamatorias/infecciosas(60)(10).

El tracto gastrointestinal alberga alrededor de 2/3 de las células inmunes, que posteriormente migran a otras partes del cuerpo(10). Las alteraciones en la dieta alteran la diversidad de la flora gastrointestinal(58)(61) . A su vez, la producción de ácidos grasos de cadena corta por parte de la flora gastrointestinal se altera y tiene repercusiones sobre la respuesta inmune en sitios distantes al intestino, como el cerebro(10). Haghikia et al, demostraron en 2015 que la disminución de ácidos grasos volátiles exacerba la respuesta inmune en encefalitis autoinmune experimental, mientras que el tratamiento con tales productos metabólicos disminuye el daño neuronal con aumento de Treg(62). Según lo anteriormente mencionado, la relación entre la flora gastrointestinal y el huésped podría su vez alterar la respuesta inmune frente a la enfermedad periodontal.

Por otro lado, Cueno en 2015 elaboró varias hipótesis para explicar los efectos contrarios del butirato en cavidad oral y en el intestino. Inicialmente, postuló que las diferencias en el tipo de células epiteliales y el espesor de la mucosa oral e intestinal podrían estar involucradas en un aumento en la concentración de ácido butírico en células epiteliales de la mucosa oral(39), y por lo tanto un papel destructivo en la misma. Adicionalmente, propuso que el aumento en el grupo heme por ácido butírico presente a su vez dos posibles implicaciones en enfermedad periodontal, que funcione como suplemento nutricional de periodontopatógenos como *P. gingivalis*, o que aumente el estrés oxidativo(39). No obstante, estos mecanismos no han sido comprobados.

CONCLUSION:

El rol de los ácidos grasos de cadena corta en la etiopatogénesis de la enfermedad periodontal no ha sido dilucidado. Sin embargo, el potencial inflamatorio y antinflamatorio de estos metabolitos parece estar relacionado con la concentración de los mismos. El entendimiento de los mecanismos a partir de los cuales los ácidos grados volátiles regulan los componentes tanto de la respuesta inmune como del biofilm periodontal, implicará no solo un gran avance sobre el entendimiento de la etiopatogénesis de la enfermedad periodontal, sino que permitirá a explotación de nuevas alternativas terapéuticas para el manejo de la misma.

REFERENCIAS

1. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. Periodontol 2000. 2014 Feb;64(1):57–80.

2. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol [Internet]. 2014;35(1):3–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001

3. Aarabi G, Eberhard J, Reissmann DR, Heydecke G, Seedorf U. Interaction between periodontal disease and atherosclerotic vascular disease - Fact or fiction? Atherosclerosis. 2015;241(2):555–60.

4. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. Vol. 42, Periodontology 2000. 2006. p. 47–79.

5. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I DF. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005;43:5721–5732.

6. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. Microbes Infect [Internet]. 2000;2(13):1599–607. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113379

7. Löe H. Experimental Gingivitis. J Periodontol. 1965;36:177–87.

8. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest. 1976 Mar;34(3):235–49.

9. Ali J, Pramod K, Tahir MA, Ansari SH. Autoimmune responses in periodontal diseases. Autoimmun Rev [Internet]. 2011;10(7):426–31. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2010.04.005

10. Bhutia YD, Ganapathy V. Short, but Smart: SCFAs Train T Cells in the Gut to Fight Autoimmunity in the Brain. Vol. 43, Immunity. 2015. p. 629–31.

11. Shabaana A. Khader, Sarah L. Gaffen and JKK. Th17 cells at the cross roads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. Mucosal Immunol. 2009;2(5):403–11.

12. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol. 1986 Apr;136(7):2348–57.

13. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y, et al. NIH Public Access. 2006;6(11):1133–41.

14. Zaia, W. L. S.; Figueiredo, J. L. G.; Alves J. A avaliação da resistência de união dos sistemas adesivos na dentina sadia e afetada por cárie em dentes humanos. Revista dental Press Estética. 2014. p. 60–70.

15. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. Nat Rev Immunol. 2006;6(4):329–33.

16. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005 Nov;6(11):1123–32.

17. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae. Vol. 202, The Journal of Experimental Medicine. 2005. p. 761–9.

18. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. Semin Immunol. 2007 Dec;19(6):400–8.

19. de Beaucoudrey L, Puel A, Filipe-Santos O, Cobat A, Ghandil P, Chrabieh M, et al. Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. J Exp Med. 2008 Jul;205(7):1543–50.

20. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995 Aug;155(3):1151–64.

21. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. J Exp Med. 1985 Jan;161(1):72–87.

22. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Cell. 2008;133(5):775–87.

23. Hori S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. Science (80-) [Internet]. 2003;299(5609):1057–61. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1079490

24. Liu R, Li S, Yang W-H, Wang L. IPEX Syndrome, FOXP3 and Cancer. J Syndr. 2013 Jun;1(1).

25. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. Nat Immunol. 2005 Nov;6(11):1142–51.

26. Provenzano JC, Rôças IN, Tavares LFD, Neves BC, Siqueira JF. Short-chain fatty acids in infected root canals of teeth with apical periodontitis before and after treatment. J Endod. 2015;41(6):831–5.

27. Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. Periodontol 2000. 2010;52(1):12–37.

28. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. Trends Microbiol. 2003;11(2):94–100.

29. Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of Porphyromonas gingivalis. FEMS Microbiol Lett. 2000;187(2):139–44.

30. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. Vol. 30, Journal of Periodontal Research. 1995. p. 332–41.

31. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. Periodontol 2000. 2004;35:21–41.

32. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000. 1997 Jun;14:112–43.

33. Ebersole JL, Kirakodu S, Novak MJ, Stromberg AJ, Shen S, Orraca L, et al. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. J Clin Periodontol. 2014 Sep;41(9):853–61.

34. Allam JP, Duan Y, Heinemann F, Winter J, Götz W, Deschner J, et al. IL-23-producing CD68 + macrophage-like cells predominate within an IL-17-polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions. J Clin Periodontol. 2011;38(10):879–86.

35. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. Nat Rev Immunol. 2010 Jul;10(7):479–89.

36. Ernst CWO, Lee JE, Nakanishi T, Karimbux NY, Rezende TMB, Stashenko P, et al. Diminished forkhead box P3/CD25 double-positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor-kB ligand (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease. Clin Exp Immunol. 2007;148(2):271–80.

37. Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, De Assis GF, Campanelli AP, et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. J Clin Periodontol. 2010;37(7):591–600.

38. Wang L, Wang J, Jin Y, Gao H, Lin X. Oral Administration of All- *Trans* Retinoic Acid Suppresses Experimental Periodontitis by Modulating the Th17/Treg Imbalance. J Periodontol [Internet]. 2014;85(5):740–50. Available from: http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2013.130132

39. Cueno ME, Ochiai K. Re-discovering periodontal butyric acid: New insights on an old metabolite. Microb Pathog [Internet]. 2015;94:48–53. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.006

40. Niedermanh R, Buyle-Bodin3 Y, Lu3 B-Y, Robinson3 P, Naleway4 C. Short-chain Carboxylic Acid Concentration in Human Gingival Crevicular Fluid. J Dent Res. 1997;76(1):575–9.

41. Swartwout S, Niederman R. Bacterial metabolite mediated differential human PMN gene expression. [Internet]. Vol. 32, Journal of periodontal research. 1997. p. 196–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9085234

42. Qiqiang L, Huanxin M, Xuejun G. Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy. J Periodontal Res. 2012;47(6):740–9.

43. Singer RE, Buckner BA. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. Vol. 32, Infection and Immunity. 1981. p. 458–63.

44. Kostelc JG, Preti G, Zelson PR, Stoller NH, Tonzetich J. Salivary volatiles as indicators of periodontitis. J Periodontal Res. 1980;15(2):185–92.

45. Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K. Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. Infect Immun [Internet]. 1998;66(6):2587–94. Available from: https://www.researchgate.net/publication/15639505_Volatile_Fatty_Acids_Metabolic_By-products_of_Periodontopathic_Bacteria_Inhibit_Lymphocyte_Proliferation_and_Cytokine_Production%5Cnhttp://iai.asm.org/content/66/6/2587.full.pdf

46. Jeng JH, Chan CP, Ho YS, Lan WH, Hsieh

CC CM. Effects of Butyrate and Propionate. 1999;(December):1435–42.

47. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuk N, Yamamoto M, Otsuka K, Abe K, et al. Butyric Acid Induces Apoptosis in Inflamed Fibroblasts. J Dent Res. 2008;87(1):51–5.

48. Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K, Fukushima K. Human gingival fibroblasts rescue butyric acid-induced T-cell apoptosis. Infect Immun. 2002 May;70(5):2361–7.

49. Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. Arch Oral Biol [Internet]. 2011;56(7):650–4. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.011

50. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature [Internet]. 2013;504(7480):446–50. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature12721

51. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome. Front Immunol. 2015;6(DEC):1–8.

52. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. Immunity. 2014 Jan;40(1):128–39.

53. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. Science. 2013 Aug;341(6145):569–73.

54. Säemann MD, Böhmig G a, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. FASEB J [Internet]. 2000;14(15):2380–2. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11024006

55. Park J-S, Lee E-J, Lee J-C, Kim W-K, Kim H-S. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-γ-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: Involvement of NF-κB and ERK signaling pathways. Int Immunopharmacol [Internet]. 2007;7(1):70–7. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156757690600261X

56. Ho RH, Chan JCY, Fan H, Kioh DYQ, Lee BW, Chan ECY. In Silico and in Vitro Interactions between Short Chain Fatty Acids and Human Histone Deacetylases. Biochemistry. 2017 Sep;56(36):4871–8.

57. Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. Gastroenterology [Internet]. 2013;145(2). Available from: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.056

58. Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. Nat Commun [Internet]. 2015;6:6734. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms7734

59. Kespohl M, Vachharajani N, Luu M, Harb H, Pautz S, Wolff S, et al. The microbial metabolite butyrate induces expression of Th1- associated factors in cD4+ T cells. Front Immunol. 2017;8(AUG):1–12.

60. Nicholson Jeremy K., Holmes Elaine, Kinross James, Burcelin Remy, Gibson Glenn, Jia Wei PS. Host-gut microbiota metabolic interactions by integrated-omics analysis. Ther Res. 2014;35(9):787–8.

61. Goverse G, Molenaar R, Macia L, Tan J, Erkelens MN, Konijn T, et al. Diet-Derived Short Chain Fatty Acids Stimulate Intestinal Epithelial Cells To Induce Mucosal Tolerogenic Dendritic Cells. J Immunol [Internet]. 2017;198(5):2172–81. Available from: http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1600165

62. Haghikia A, Jörg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, et al. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. Immunity. 2015;43(4):817–29.