



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

EFFECTO DE LA LAUROLITSINA EN UN MODELO ANIMAL DE PERIODONTITIS

The effect of laurolitsina in an animal model of periodontitis

**Trabajo de Investigación para obtener el Título de
Cirujano Dentista**

Alumno:

Emilio Alfredo Cafferata Chea

Lima – Perú

2020

JURADO EXAMINADOR

Jurado Coordinador: Mg. Esp. Marco Antonio Alarcón Palacios

Jurado: Mg. Esp. Tania Ariza Fritas

Jurado: Mg. Esp. Natali Chavez Vereau

Fecha de Sustentación: 15 de mayo de 2020

Calificación: Aprobado con Mención Honorable

ASESOR DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

ASESOR

Mg. Esp. Roberto León Manco

Departamento Académico de Odontología Social

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres, que con mucho esfuerzo me apoyaron desde el primer día de la carrera, hasta el último; y que, por seguir mis sueños de perfeccionamiento científico, tuvieron que esperar casi 4 años por mi titulación. Todos mis éxitos personales y profesionales son debido a su incansable dedicación a mi educación, y al amor que me dieron a mí y a mis hermanos todos los días. Del mismo modo, quiero agradecer a toda mi familia, a Diego, Bruno, Antoinette, Denise, Mabel, Lucho, Christian, Elsa, Katy, Tito, Eva y Mariano, por siempre darme palabras de aliento y darme la mano siendo mis pacientes. Finalmente y de manera muy especial, esta tesis va dedicada también para Silvia, mi futura esposa, que desde el pregrado ha estado a mi lado en los momentos más difíciles, cuando he querido tirar la toalla, cuando me han faltado pacientes o ganas de atender, y ahora, durante la pandemia, me ha motivado y dado el cariño y las ganas necesarias para cumplir mis metas, gracias a ella, ahora no solo soy mejor dentista, sino mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los profesores y amigos, que se tomaron el tiempo de revisar esta tesis para la obtención de mi título profesional; en particular, a Roberto, que me asesoró durante todo el proceso de formulación, inscripción y sustentación del proyecto y, a Marco, que me apoyó durante la revisión del proyecto para su sustentación.

Grandes amigos, les estaré siempre agradecido.

DECLARACIONES Y CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS	5
IV. RESULTADOS	11
V. DISCUSIÓN	13
VI. CONCLUSIONES	17
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
VIII. GRÁFICOS Y FIGURAS	22

RESUMEN

Antecedentes: Durante la periodontitis, el desequilibrio entre la respuesta inmunitaria efectuada por los linfocitos T colaboradores tipo 17 (Th17) y los linfocitos T reguladores (Treg) incrementa los niveles periodontales de RANKL. En el periodonto con periodontitis, la destrucción patológica del hueso alveolar es provocada por el incremento local del ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), la molécula responsable de inducir la actividad resorptiva de los osteoclastos. En este escenario, las inmuno-terapias destinadas a tratar el desequilibrio entre Th17 y Treg podrían mitigar la destrucción ósea causada por los osteoclastos, por ejemplo, la lauroilitsina es capaz de inhibir la destrucción ósea inducida durante la artritis, la que se asocia también a un desequilibrio entre las respuestas Th17 y Treg; sin embargo, el posible efecto de la lauroilitsina en la destrucción ósea durante la periodontitis aún no ha sido descrito. **Objetivo:** Analizar si la lauroilitsina mitiga la destrucción ósea alveolar y modula el desequilibrio entre las respuestas Th17 y Treg durante la periodontitis. **Materiales y métodos:** La presente investigación corresponde a información secundaria de una investigación previamente realizada, en la cual la periodontitis se indujo en animales de 6-8 semanas de edad mediante la colocación de suturas de seda. Luego, la lauroilitsina se inoculó a un grupo de animales durante 15 días. Los animales no inoculados y sanos se usaron como controles. Finalmente, se analizó la destrucción ósea alveolar, la producción de RANKL y su inhibidor, osteoprotegerina (OPG), y la respuesta Th17 y Treg en la mucosa palatina. **Resultados:** La inoculación de lauroilitsina mitigó la destrucción ósea. Asimismo, disminuyó los niveles de RANKL y aumentó los de OPG en la mucosa. Además, redujo la expresión de moléculas relacionadas a la respuesta Th17 e incrementó las relacionadas a la respuesta de los Tregs. **Conclusiones:** La lauroilitsina mitiga la destrucción ósea alveolar, modula el balance entre RANKL y OPG, y entre la actividad de los Th17 y Treg en un modelo animal de periodontitis.

Palabras clave: Lauroilitsina, mucosa, odontología

ABSTRACT

Background: Bone destruction during periodontitis arises from the imbalance between T helper type 17 (Th17) and regulatory T lymphocytes (Treg) which leads to the excessive expression of the receptor activator of the nuclear factor κ B ligand (RANKL), the essential molecule for the induction of osteoclasts' bone-destructive activity. In this scenario, the immuno-t therapies able to restore this Th17 and Treg disequilibrium could possibly mitigate the bone destruction caused by RANKL. Recently, the therapeutic role of laurolicsina over bone destruction during arthritis, which is also caused by a disequilibrium between Th17 and Treg, has been described. Nonetheless, the possible effect of laurolicsina during periodontitis onset has not been reported yet. **Objective:** To analyze if the inoculation of laurolicsina mitigates alveolar bone destruction and modulates the disequilibrium between Th17 and Treg during periodontitis. **Materials and methods:** This investigation corresponds to the analysis of secondary information from a previously performed study, from which 7-week-old mice were used. Experimental periodontitis was induced in mice by the ligature method. Then, mice were inoculated with laurolicsina for 15 days. Non-inoculated periodontitis and naïve mice were used as controls. Finally, alveolar bone resorption, RANKL and OPG, the RANKL inhibitor, expression and production, and the expression of the molecules related to Th17 and Treg immune response were analyzed in periodontal mucosa. **Results:** Laurolicsina inoculation mitigated bone destruction. In the same way, it diminished the levels of RANKL and increased the levels of OPG. Also, it reduced the expression of molecules related to Th17 response and promoted the ones related to Treg response. **Conclusions:** Laurolicsina mitigates alveolar bone destruction, modulated the balance between RANKL and OPG, and between Th17 and Treg response in an animal model of periodontitis.

Keywords: Laurolicsina, mucosa, stomatology

I. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la destrucción ósea, la cual es causada por un aumento en la actividad osteo-destructiva de los osteoclastos mediada por la acción del ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) (1). Los cambios en los niveles periodontales de RANKL y osteoprotegerina (OPG), están determinados por el patrón de respuesta inmuno-inflamatoria del huésped desencadenado ante la sinergia polimicrobiana y la disbiosis del microbioma subgingival, y en particular se asocia al tipo de respuesta desplegada por las distintas subpoblaciones de linfocitos T (2). En efecto, el ambiente inflamatorio local enriquecido en interleuquina (IL)-6 durante la periodontitis, favorece la expresión, expansión y actividad patogénica de los linfocitos T colaboradores tipo 17 (Th17), los cuales provocan la resorción ósea mediante la producción de citoquinas osteo-resortivas como IL-17A, que induce la producción de RANKL por células residentes del periodonto, y RANKL, que promueve la activación de los osteoclastos (3). Por otro lado, los linfocitos T reguladores (Treg) son capaces de inhibir la respuesta inmune osteo-destructiva mediada por los Th17 en el periodonto, mediante la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-35 y factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 (4). No obstante, los altos niveles de IL-6 también causan la pérdida de las capacidades inmuno-reguladoras y anti-inflamatorias de los Treg, pudiendo convertirlos también en células osteo-destructivas, productoras de RANKL (3). De acuerdo con esto, la resorción ósea alveolar está estrechamente asociada con un desequilibrio entre la actividad de los linfocitos Th17 y Treg, definido por un aumento en la expresión periodontal de RANKL provocada por los Th17 y una disminución en la actividad inmuno-reguladora y anti-inflamatoria de los linfocitos Treg en el periodonto (1-4). En este contexto, una estrategia terapéutica molecular capaz de restaurar esta respuesta inmune

desbalanceada podría ser un coadyuvante ideal para la prevención y tratamiento de la periodontitis.

Actualmente, las fitoterapias juegan un rol importante en la medicina moderna, principalmente debido a sus propiedades terapéuticas y mínimos efectos secundarios, observados con mayor frecuencia en los fármacos sintetizados artificialmente; por lo cual, vienen siendo utilizadas para la prevención y el tratamiento de enfermedades orales, como la estomatitis, la caries dental y la periodontitis (5, 6) En este sentido, la lauroilsina, un alcaloide extraído de la corteza y de las hojas del árbol *Peumus boldus*, es una de las plantas medicinales más conocidas y utilizadas en Latinoamérica (7), debido a sus aplicaciones terapéuticas para el dolor de cabeza, dolor de oído, congestión nasal, enfermedades reumáticas y trastornos gastrointestinales (8). Actualmente, existe suficiente evidencia científica para respaldar las propiedades farmacológicas citoprotectoras, hepatoprotectoras, antioxidantes, antibacterianas, antipiréticas y antiinflamatorias de los alcaloides derivados del boldo, para su uso preventivo y terapéutico contra la hipertensión, la diabetes mellitus, el cáncer, las lesiones cerebrovasculares y la artritis reumatoide, enfermedades asociadas y con perfiles inflamatorios similares a la periodontitis (9, 10, 11, 12, 13). Estudios recientes han reportado que la inoculación oral de lauroilsina, en un modelo animal de artritis reumatoide, fue capaz de inhibir la resorción ósea subcondral articular, y esta inhibición se asoció con la disminución de la expresión de RANKL y el aumento de la expresión de su inhibidor, OPG, en los tejidos articulares afectados (9, 14). En particular, la disminución de la resorción ósea articular se asoció con la disminución del número de linfocitos Th17 y al incremento de la expresión de citoquinas asociadas al perfil Treg, como IL-10 y TGF- β 1, restaurando el desequilibrio entre la actividad Th17 y Treg, determinante de los niveles de RANKL/OPG articular (15-17). Por lo tanto, teniendo en cuenta las similitudes inmuno-patogénicas que causan la resorción ósea articular durante la artritis

reumatoide, se puede sugerir que los productos naturales utilizados para controlarla, como la laurólitsina, también podrían ser útiles para la prevención y tratamiento de la periodontitis.

Con el objetivo de evaluar si la laurólitsina tiene un efecto preventivo sobre la resorción ósea alveolar y la respuesta inmune durante la periodontitis, esta investigación evaluará si la inoculación oral continua de laurólitsina en los animales con periodontitis inducida por ligadura tiene un efecto en la extensión de la resorción ósea alveolar, la producción de RANKL y OPG, la expresión de factores de transcripción y citoquinas asociadas a la actividad Th17/Treg.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el efecto de la lauroilsina en la destrucción ósea alveolar, la producción de RANKL/OPG, y la expresión de factores de transcripción y citoquinas asociadas a la respuesta Th17/Treg en un modelo animal de periodontitis.

Objetivos específicos:

1. Cuantificar el área de destrucción ósea alveolar en las mucosas periodontales de animales con periodontitis e inoculados oralmente con lauroilsina.
2. Cuantificar los niveles de expresión de RANKL y OPG; así como, la razón RANKL/OPG en las mucosas periodontales de animales con periodontitis e inoculados oralmente con lauroilsina.
3. Cuantificar los niveles de expresión de los factores de transcripción característicos de los linfocitos Th17 (ROR γ t) y Treg (Foxp3) y de las citoquinas asociadas a su actividad IL-6, IL-17A e IL-23 (Th17), e IL-10, IL-35 EB13 y TGF- β 1 (Treg) en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis e inoculados oralmente con lauroilsina.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Retrospectivo de información secundaria.

Muestra

El presente estudio se basa en información secundaria, parte de una investigación previamente realizada, en la que se utilizaron 40 ratones singénicos C57BL/6 de 6-8 semanas de edad de ambos sexos y 25 g de peso, considerando que cada experimento se realizó 8 veces por cada condición experimental. La ejecución de este proyecto estuvo en el marco del proyecto FONDECIT 1181781, financiado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONYCIT) del gobierno de Chile. Los datos obtenidos están a la disposición del autor, el cual es actualmente ejecutor y co-investigador del proyecto FONDECIT 1181781.

Criterios de selección

Al emplearse una base de datos, se incluyeron los registros de todos los especímenes del estudio mencionado, aquellos que tengan ausencia o incoherencia de información fueron excluidos.

Definición operacional de variables

- a. Destrucción ósea alveolar: Es el área de pérdida ósea comprendida entre la superficie mesial del primer molar maxilar y la superficie distal del tercer molar maxilar, y entre la unión cemento-adamantina y la cresta ósea alveolar. Ésta se cuantificó usando un microscopio electrónico de barrido (SEM) a un aumento de 30x.
- b. Niveles de expresión de RANKL y OPG, de los factores de transcripción ROR γ t y Foxp3, y de las citoquinas IL-6 e IL-17A (Th17), e IL-10 y EBI3 (Treg): Son los niveles de

expresión de mRNA de las distintas moléculas en las lesiones periodontales. Éstos se cuantificaron usando un equipo de RT-qPCR.

- c. Razón RANKL/OPG: Es la proporción entre la producción de RANKL y OPG presente en el fluido crevicular gingival. Ésta se cuantificó usando kits de ELISA específicos.

Procedimientos y técnicas

Los datos obtenidos son parte del proyecto FONDECIT 1181781, del cual el autor es ejecutor y co-investigador, teniéndose permiso para la ejecución y utilización de los datos del mismo por el investigador principal del proyecto (Anexo 1)

Asimismo, es importante esclarecer que ciertos criterios del estudio base de donde se recolectó la información fueron analizados para la obtención de los resultados:

Animales: Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en un ambiente controlado: Temperatura a $24 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 40 a 70%, una tasa de intercambio de aire de 15 vol/hora y 12 horas de luz/oscuridad. A lo largo del período del estudio, los animales tuvieron acceso libre a alimento estándar estéril y agua.

Inducción de periodontitis e inoculación de lauroilsina: La periodontitis se indujo usando el método de la sutura (16). Brevemente, los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina; luego, fueron colocados en un soporte acoplado a gel-packs para mantener su temperatura, para proceder a la apertura bucal bi-maxilar mediante la colocación de cadenas elásticas colocadas alrededor de los incisivos superiores e inferiores, respectivamente. Finalmente, se colocaron suturas de seda negra 5-0 alrededor de los segundos molares maxilares usando pinzas castro viejo (Fine Science Tools), y se cortaron los cabos con tijeras (Fine Science Tools), sin causar daño a los tejidos periodontales, con el fin de favorecer

la acumulación de placa bacteriana, una respuesta inmune ante ésta y, en consecuencia, la destrucción del hueso alrededor de los dientes. La lauroilsina se inoculó, usando una sonda oral de punta roma introducida hasta el estómago, a 10, 20 o 40 mg/kg en 100 µl de buffer fosfato salino (PBS), iniciando el día de la colocación de la ligadura, durante 15 días consecutivos, con el fin de simular la ingesta del preparado, con un enfoque preventivo, que luego podría ser aplicado en pacientes en riesgo a sufrir pérdida de inserción de los tejidos periodontales. Las dosis de lauroilsina se determinó en base a investigaciones previas (9, 13, 17). Los animales fueron asignados aleatoriamente en cinco grupos de ocho ratones: (a) grupo no ligado, (b) grupo ligado no inoculado, (c) grupo ligado inoculado con 10 mg/kg de lauroilsina, (d) grupo ligado inoculado con 20 mg/kg de lauroilsina, y (e) grupo ligado inoculado con 40 mg/kg de lauroilsina. El grupo no ligado (grupo a) se utilizó como control. El grupo ligado no inoculado (grupo b), que solo se le inoculó el vehículo PBS, se utilizó para las comparaciones. Después de 15 días, los animales fueron eutanasiados por una sobredosis de anestesia, para evitar el daño de los tejidos cervicales y maxilares causado por la dislocación cervical, y se recolectaron las muestras de maxilares, fluido crevicular gingival y tejidos periodontales palatales para su análisis. Todas las intervenciones fueron realizadas por el autor, previamente capacitado en el manejo de animales de experimentación; ésta capacitación consistió; primero, en la demostración de la colocación de las ligaduras por un operador experimentado, *in vivo* y en animales eutanasiados, seguido de prácticas en el animal eutanasiado hasta evidenciar el mínimo trauma a los tejidos adyacentes; finalmente, se procedió a la práctica *in vivo* con el animal bajo anestesia y se comenzó con los animales asignados al estudio cuando no se evidenciaron traumas a la mucosa oral de los ratones después de la colocación de las suturas (Anexo 2).

Destrucción ósea alveolar: La extensión de la destrucción ósea alveolar se cuantificó en los

maxilares mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un protocolo establecido (18). Se retiraron los tejidos blandos de los maxilares sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% durante 12 horas y se lavaron con alcohol al 70%, seguido de alcohol al 90% y 100% durante 24 horas cada uno. Para el análisis SEM, los maxilares se fijaron en glutaraldehído tamponado al 2.5% durante la noche a temperatura ambiente, luego se recubrieron con una capa de oro de 200 nm de espesor y se analizaron a un voltaje de 20 kV en un microscopio electrónico de barrido. El análisis de pérdida ósea se realizó con una ampliación de 30x. Todos los datos fueron recolectados por un solo observador enmascarado a las condiciones experimentales de la muestra.

Producción de RANKL y OPG: Para medir la producción de RANKL y OPG en los tejidos periodontales, se recolectaron muestras de fluido crevicular gingival utilizando un protocolo descrito anteriormente (19). Brevemente, se retiraron, suavemente y bajo anestesia, las ligaduras utilizadas para la inducción de la periodontitis, luego se colocaron nuevas ligaduras de seda 5-0 de 2 cm de longitud en las mismas posiciones. Después de 10 minutos, se recogieron las ligaduras embebidas en fluido crevicular gingival y se procesaron usando un protocolo de elución de proteínas estandarizado. Las ligaduras se sumergieron en 60 µl de Tween 20 al 0,05% en PBS, con un cóctel de inhibidores de proteasas, luego se incubaron durante 30 minutos a 4°C y se centrifugaron a 12 000 G por 5 minutos. El protocolo de elución se repitió dos veces. A partir de las muestras eluidas, los niveles de RANKL y OPG se determinaron utilizando kits ELISA específicos. Finalmente, las placas de ELISA se analizaron usando un lector automático de microplacas.

Niveles de expresión de los factores de transcripción y citoquinas asociadas a la respuesta de los linfocitos Th17 y Treg: Para analizar los posibles cambios en la actividad Th17/Treg en los tejidos periodontales, se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de los factores de

transcripción ROR γ t y Foxp3, y de las citoquinas IL-6 e IL-17A (Th17), e IL-10 y EBI3 (Treg) mediante qPCR. Además, se cuantificaron los niveles de expresión para los mRNA de RANKL y OPG. De cada muestra de mucosa palatal periodontal, primero se obtuvo el RNA citoplasmático total usando un reactivo de purificación molecular, luego se sintetizó el cDNA complementario usando un kit de transcripción reversa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, se amplificaron 10 ng de cDNA utilizando cebadores específicos (Anexo 3: Tabla 1), un reactivo qPCR y un equipo de RT-qPCR. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de la siguiente manera: 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 3 segundos, y 60°C durante 30 segundos. Para la detección de la formación de productos inespecíficos y la amplificación de falsos positivos, se realizó una curva de fusión de la siguiente manera: 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos. Finalmente, se cuantificaron los niveles de expresión del rRNA 18S como control endógeno o gen “housekeeping”; es decir, un gen con una expresión constante e inalterable ante los estímulos, pudiendo ser usado como valor de referencia al aumento de niveles de expresión de otro gen o “fold-change”.

Plan de análisis: Una vez con la base de datos, se procedió a la obtención de la media \pm DE de los datos obtenidos de los ocho ratones por grupo. La destrucción ósea alveolar se calculó como μm^2 . Los datos de ELISA se calcularon como pg/ml utilizando una ecuación logística de 4 parámetros. Los datos de qPCR se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ con el software StepOne v.2.2.2 y se expresaron como “fold-change” de la expresión de mRNA, usando la expresión del gen “house-keeping” como referencia a la unidad. Finalmente, los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS v.22. La normalidad de la distribución de los datos se estableció mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y las diferencias estadísticas se determinaron mediante las pruebas de ANOVA y Bonferroni. Los valores de p

<0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

Aspectos éticos del estudio: La ejecución de la presente investigación fue aprobada por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de la UPCH el 06 de Abril del 2020; sin embargo, es importante aclarar que este estudio se basa en datos secundarios obtenidos de un estudio previo, el cual contó con la aprobación del Comité de Ética Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (Protocolo # 061612), siendo realizado en conformidad con las pautas NC3Rs ARRIVE, las recomendaciones de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) y las pautas aprobadas por el Consejo de la Sociedad Americana de Psicología (1980) para el uso de experimentos con animales (Anexo 4).

IV. RESULTADOS

Destrucción ósea alveolar: La inoculación con lauroilsina mitigó la destrucción ósea alveolar de manera dosis-dependiente después de 15 días que los maxilares fueran sometidos a periodontitis experimental mediante ligaduras (Fig 1). Cuando se inoculó la dosis de 10 mg/kg de lauroilsina, se observó significativamente menos resorción ósea comparado con el grupo no inoculado. Cuando se inoculó la dosis de 20 mg/kg de lauroilsina, se observó significativamente menos resorción ósea comparado con el grupo no inoculado y el grupo tratado con 10 mg/kg de lauroilsina. Cuando se inoculó la dosis de 40 mg/kg de lauroilsina, se observó significativamente menos resorción ósea comparado con el grupo no inoculado y el grupo tratado con 10 o 20 mg/kg de lauroilsina (Fig 1).

Niveles de RANKL y OPG: La producción y expresión de RANKL disminuyó de manera significativa y dependiente de la dosis de lauroilsina inoculada, los niveles detectados de RANKL fueron significativamente menores en el grupo de animales tratados con lauroilsina comparado con el grupo no inoculado (Fig 2). Por el contrario, la producción y expresión de OPG aumentó de manera significativa y dependiente de la dosis de lauroilsina inoculada, los niveles detectados de OPG fueron significativamente mayores en el grupo de animales tratados con lauroilsina comparado con el grupo no inoculado (Fig 2). Estos cambios resultaron en una tasa RANKL/OPG disminuida en los tejidos periodontales de los animales inoculados con lauroilsina.

Factores de transcripción y citoquinas asociadas a la respuesta linfocitaria Th17 y Treg: La expresión del mRNA del factor de transcripción ROR γ t, asociado a la diferenciación de linfocitos Th17, fue significativamente menor en los animales inoculados con lauroilsina comparados con el grupo de animales no inoculados (Fig 3). Por el contrario, la expresión de

mRNA de Foxp3, factor de transcripción asociado a la actividad de linfocitos Treg, aumentó de manera significativa y dependiente de la dosis en el grupo inoculado con lauroilsina comparado con el grupo no inoculado (Fig 3) Además, el grupo tratado con lauroilsina demostró menor expresión de mRNA de citoquinas asociadas a la actividad Th17 (IL-6 e IL-17A), comparado con el grupo no inoculado (Fig. 3). También, los niveles de expression de mRNA de las citoquinas asociadas a la actividad Treg (IL-10 y Ebi3) aumentaron de manera significativa y dependiente de la dosis en el grupo inoculado con lauroilsina comparado con el grupo no inoculado (Fig. 3).

V. DISCUSIÓN

Hoy en día, existe un cambio de paradigma con respecto a la percepción de la seguridad de las medicinas, en el cual los pacientes asocian la mínima posibilidad de efectos secundarios a los productos derivados naturales frente a los completamente sintéticos para el tratamiento de distintas enfermedades. Como resultado, diversos estudios han analizado los posibles efectos de las alternativas fitoterapéuticas sobre las enfermedades orales (1, 2). No obstante, ninguno de los tratamientos disponibles actualmente ha sido capaz de inhibir la resorción ósea alveolar de manera efectiva y a largo plazo (20). Por lo tanto, el uso de laurolicina es una fitoterapia conveniente; ya que, estudios en animales han reportado también sus efectos sobre la pérdida ósea patológica (12). En efecto, el uso de berberina, un alcaloide similar, inhibió la resorción ósea y la detección de osteoclastos activos en las lesiones periodontales de animales ovariectomizados, y estos efectos se asociaron a la disminución de la actividad de los linfocitos Th17 (21). En esta tesis, la inoculación con laurolicina fue capaz de controlar la periodontitis en un modelo animal, al mitigar la destrucción ósea alveolar, disminuir la tasa RANKL/OPG y la actividad Th17/Treg en las mucosas periodontales.

Existe suficiente evidencia científica para afirmar que el uso de alcaloides naturales, como la laurolicina, puede tener un efecto beneficioso sobre distintas enfermedades; en particular, en aquellas caracterizadas por la pérdida ósea patológica (12, 13). Por ejemplo, la administración oral de norisoboldina, otro alcaloide derivado del boldo, en un modelo animal de artritis reumatoide, mitiga la resorción ósea articular al inhibir la formación de osteoclastos (7). En este caso, el alcaloide provocó una disminución de la expresión de RANKL y un aumento de la expresión de OPG en las articulaciones afectadas. De manera similar, otro derivado del boldo redujo significativamente la pérdida ósea patológica al inhibir la diferenciación de osteoclastos mediada por RANKL en un modelo de osteoporosis (22). Del mismo modo y acorde con

investigaciones previas, la inoculación oral de lauroilsina durante el estudio mitigó la resorción ósea periodontal patológica inducida por ligadura, y esta atenuación se asoció a la disminución de la tasa RANKL/OPG.

Los alcaloides derivados del *Peumus boldus* han demostrado ser capaces de inhibir la vía de señalización mediada por RANKL, crucial para el desarrollo de los osteoclastos (23, 24). Por otro lado, se ha reportado que el uso de anticuerpos monoclonales anti-RANKL para el tratamiento de la periodontitis disminuye significativamente la resorción ósea alveolar mediada por linfocitos T (25). Entre estas subpoblaciones de linfocitos, la actividad patogénica de los linfocitos Th17, se encuentra ligada al incremento de los niveles de IL-23 en el periodonto; ya que, ésta induce su supervivencia y su producción mantenida de IL-17A y RANKL, estimulando a las células residentes a sobreproducir RANKL y aumentando directamente los niveles de RANKL y, finalmente, la formación y activación de osteoclastos (26). No obstante, en condiciones de homeostasis, los niveles basales de IL-6 producidos durante la masticación, ayudan a mantener la producción de IL-17A suficiente para evitar las infecciones fúngicas sin inducir la resorción ósea (27); por lo tanto, al inhibir la actividad patogénica de los linfocitos Th17, usando lauroilsina, se pueden disminuir en mayor medida los niveles de IL-23 comparados con los de IL-6. Por otro lado, los linfocitos Treg producen citoquinas anti-inflamatorias que suprimen la producción de RANKL y la actividad Th17, manteniendo la homeostasis ósea periodontal (28). En efecto, el incremento de la respuesta inmune Th17, ante una respuesta inmuno-reguladora Treg debilitada, puede ser la causa del aumento de la presencia de RANKL durante la periodontitis. En este estudio, la inoculación de lauroilsina moduló la actividad de linfocitos Th17 y Treg, promoviendo la expansión de la respuesta inmuno-reguladora Treg y la supresión de la respuesta inmune Th17 de manera dosis dependiente; asimismo, esta modulación entre Th17 y Treg proporcionó un ambiente

abundante en citoquinas anti-inflamatorias en los tejidos periodontales que pudieron afectar los niveles de RANKL y OPG, pudiendo afectar la formación de osteoclastos y; consecuentemente, la resorción ósea alveolar patológica.

Existe una conversación metabólica entre los linfocitos T, los osteoclastos, que reabsorben los huesos, y los osteoblastos, que los forman (28, 29). En este contexto, la berberina también pudo inducir la osteoblastogénesis a partir de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, pudiendo incrementar la tasa de formación de osteoblastos y la actividad regeneradora de hueso (30); por lo tanto, los eventos anabólicos asociados a la regeneración ósea alveolar podrían involucran a células estimuladas por la lauroilsina. En efecto, la inoculación con lauroilsina en nuestra investigación causó un aumento en los niveles periodontales de las citoquinas anti-inflamatorias derivadas de linfocitos Treg y de OPG, lo que favoreció la resolución de la inflamación crónica y la inhibición de la resorción ósea. Por lo tanto, un entorno inflamatorio local regulado por las citoquinas IL-10 y Ebi3 en los tejidos periodontales podría promover la regeneración ósea periodontal.

La presente investigación demostró satisfactoriamente que la inoculación de lauroilsina en un modelo animal de periodontitis es capaz de atenuarla; no obstante, las inmuno-terapias probadas en animales singénicos, i.e. con genes idénticos y criados en ambientes controlados, como los ratones C56BL/6 usados en este estudio, tienen limitada validez externa; ya que, la variación genética y epigenética entre sujetos que se obtiene en intervenciones en humanos o en animales “silvestres”, es inexistente. En este contexto, distintos estudios concuerdan en que la aplicabilidad de intervenciones probadas en animales es limitada en humanos (31). Por otro lado, el uso del modelo de ligadura para la inducción de la periodontitis ha sido cuestionado por no ser un modelo espontáneo de la enfermedad, en el cual una alteración genética inducida en el animal es capaz de inducir el desarrollo de una enfermedad, como en el caso de la artritis

reumatoide o la esclerosis múltiple; no obstante, el modelo también ha sido ampliamente validado por ser capaz de inducir una disbiosis del microbioma oral y una consecuente respuesta inmune destructora de los tejidos de soporte periodontal, muy similar a lo que, se presume, ocurre durante la periodontitis humana (32). A pesar de todas las limitaciones, el uso de animales de experimentación para estudios de posibles tratamientos es el primer paso para demostrar su eficacia y posible toxicidad, para sus próximas pruebas clínicas. Por otro lado, los resultados positivos de esta investigación dan paso a la posibilidad del uso de derivados naturales efectivos para el tratamiento de la periodontitis. En efecto, otros derivados, como la curcumina, han demostrado tener efectos anti-formación de biopelículas e inmunomoduladores, inhibiendo la respuesta inflamatoria osteo-destructiva (33). Por lo tanto, a pesar de las limitaciones del modelo animal usado, la inoculación de lauroilsina da pie a nuevas investigaciones para demostrar su toxicidad y eficacia en modelos animales mayores, animales humanizados y, dependiendo de sus resultados, a ensayos clínicos tipo I en humanos, y la de otros derivados naturales que pudieran tener efectos similares y menos efectos secundarios que sus contrapartes sintéticas.

El raspado y alisado radicular se considera como la primera opción de tratamiento para la periodontitis, siendo eficiente al limitar la resorción ósea alveolar inflamatoria en gran parte de los pacientes; sin embargo, en algunos casos la homeostasis periodontal y la detención de la resorción ósea no son alcanzadas (34). Lamentablemente, las alternativas convencionales para estos casos, incluyendo la terapia periodontal quirúrgica y los antibióticos, pueden conducir a efectos secundarios indeseados (35). Actualmente, el desarrollo de terapias nuevas enfocadas en la resolución de la inflamación patológica periodontal es una área de investigación en constante crecimiento; por lo cual, la lauroilsina puede llegar a ser una opción atractiva como coadyuvante bioactivo natural para el tratamiento de la periodontitis.

VI. CONCLUSIONES

De forma general, se concluye que:

En el presente estudio, la inoculación de lauroilsina mitiga la periodontitis experimental al disminuir la resorción ósea alveolar y, esta atenuación se asocio a la disminución de RANKL y al aumento de OPG; así como, a la disminución de la expresión pro-inflamatoria de los linfocitos Th17, y al aumento de la expresión de las moléculas asociadas a la actividad inmuno-reguladora de los linfocitos Treg en un modelo animal de periodontitis.

Y de forma específica, se concluye que:

1. La inoculación con lauroilsina disminuyó el área de resorción ósea alveolar en los animales afectados de periodontitis.
2. La inoculación con lauroilsina disminuyó los niveles de expresión de RANKL, aumentó los de OPG, y disminuyó la razón RANKL/OPG en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis.
3. La inoculación con lauroilsina disminuyó los niveles de expresión del factor de transcripción característico de los linfocitos Th17 ($ROR\gamma t$) y de las citoquinas asociadas a su actividad (IL-6 e IL-17A), y aumentó niveles de expresión del factor de transcripción característico de los linfocitos Treg (Foxp3), y de las citoquinas asociadas a su actividad (IL-10 y Ebi3) en las lesiones periodontales de animales afectados de periodontitis.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parachuru VPB, Coates DE, Milne TJ, Rich AM, Seymour GJ. FoxP3+ regulatory T cells, interleukin 17 and mast cells in chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2018;53(4):622-635.
2. Campbell L, Millhouse E, Malcolm J, Culshaw S. T cells, teeth and tissue destruction - what do T cells do in periodontal disease?. *Mol Oral Microbiol.* 2015;31(6):445-456.
3. Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W, Shukunami C et al. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):701.
4. Garlet G, Cardoso C, Mariano F, Claudino M, De Assis G, Campanelli A et al. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol.* 2009;37(7):591-600.
5. Ara T, Nakatani S, Kobata K, Sogawa N, Sogawa C. The Biological Efficacy of Natural Products against Acute and Chronic Inflammatory Diseases in the Oral Region. *Medicines.* 2018;5(4):122.
6. Watanabe S, Toyama T, Sato T, Suzuki M, Morozumi A, Sakagami H et al. Kampo Therapies and the Use of Herbal Medicines in the Dentistry in Japan. *Medicines.* 2019;6(1):34.
7. Kringstein P, Cederbaum AI. Boldine prevents human liver microsomal lipid peroxidation and inactivation of cytochrome P4502E1. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(3):559-563.
8. Chiou CM, Lin CT, Huang WJ, et al. Semisynthesis and myocardial activity of thaliporphine N-homologues. *J Nat Prod.* 2013;76(3):405-412.

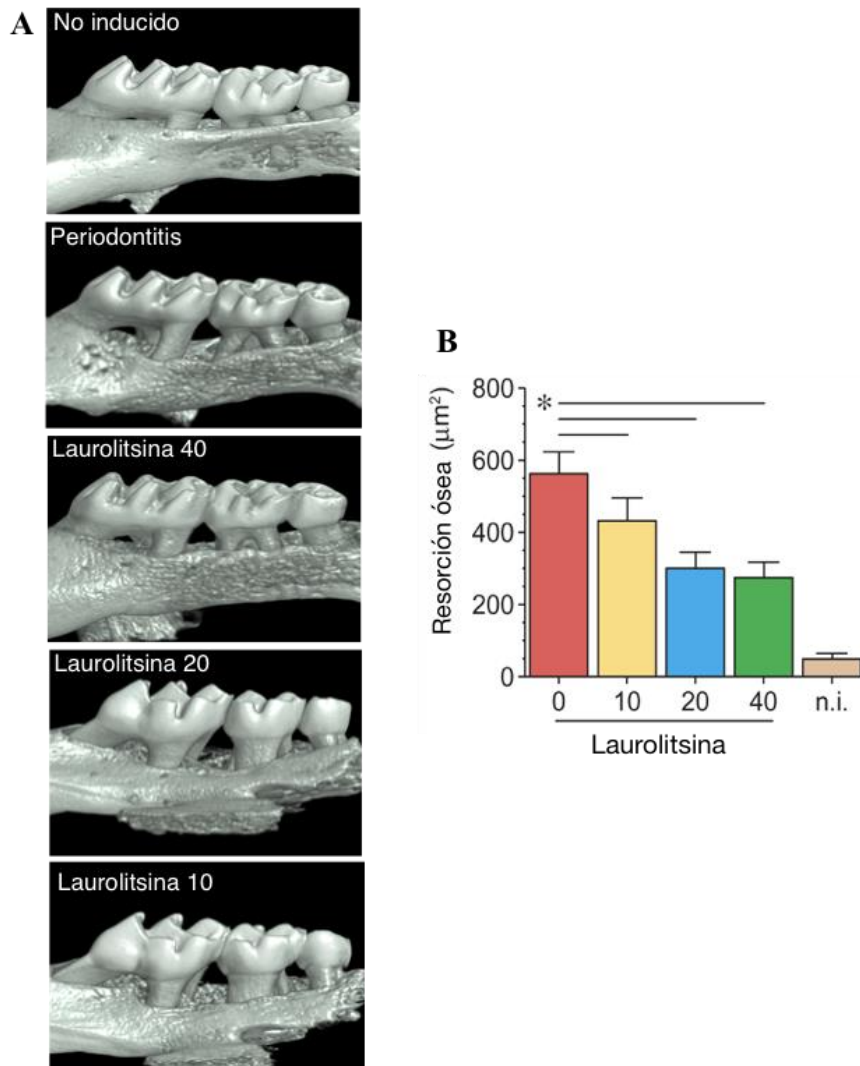
9. Zhao H, Xu H, Qiao S, Lu C, Wang G, Liu M et al. Boldine isolated from *Litsea cubeba* inhibits bone resorption by suppressing the osteoclast differentiation in collagen-induced arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2017;51:114-123.
10. Qiu X, Shi L, Zhuang H, Zhang H, Wang J, Wang L et al. Cerebrovascular Protective Effect of Boldine Against Neural Apoptosis via Inhibition of Mitochondrial Bax Translocation and Cytochrome C Release. *Med Sci Monit.* 2017;23:4109-4116.
11. Lau Y, Tian X, Mustafa M, Murugan D, Liu J, Zhang Y et al. Boldine improves endothelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II-mediated BMP4-oxidative stress cascade. *Br J Pharmacol.* 2013;170(6):1190-1198.
12. Lau Y, Machha A, Achike F, Murugan D, Mustafa M. The aporphine alkaloid boldine improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med.* 2012;237(1):93-98.
13. Looi C, Paydar M, Kamalidehghan B, Wong Y, Wong W, Mustafa M. Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using in vitro and in vivo models. *Drug Des Devel Ther.* 2014;:719.
14. Wei Z, Jiao X, Wang T, Lu Q, Xia Y, Wang Z et al. Norisoboldine alleviates joint destruction in rats with adjuvant-induced arthritis by reducing RANKL, IL-6, PGE2, and MMP-13 expression. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(3):403-413.
15. Tong L, Nanjundaiah S, Venkatesha S, Astry B, Yu H, Moudgil K. Pristimerin, a naturally occurring triterpenoid, protects against autoimmune arthritis by modulating the cellular and soluble immune mediators of inflammation and tissue damage. *Clin Immunol.* 2014;155(2):220-230.
16. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods.* 2013;394(1-2):49-54.

17. Luo Y, Liu M, Xia Y, Dai Y, Chou G, Wang Z. Therapeutic effect of norisoboldine, an alkaloid isolated from *Radix Linderae*, on collagen-induced arthritis in mice. *Phytomedicine*. 2010;17(10):726-731.
18. Li H, Zhong X, Li W, Wang Q. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on experimental periodontitis and AhR/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway in a mouse model. *J Appl Oral Sci*. 2019;27:e20180713.
19. Matsuda S, Movila A, Suzuki M, Kajiya M, Wisitrasameewong W, Kayal R et al. A novel method of sampling gingival crevicular fluid from a mouse model of periodontitis. *J Immunol Methods*. 2016;438:21-25.
20. Bunte K, Hensel A, Beikler T. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Fitoterapia* 2019;132:30-39.
21. Jia X, Jia L, Mo L, Yuan S, Zheng X, He J et al. Berberine Ameliorates Periodontal Bone Loss by Regulating Gut Microbiota. *J Dent Res*. 2018;98(1):107-116.
22. Chen K, Lv ZT, Cheng P, et al. Boldine ameliorates estrogen deficiency-induced bone loss via inhibiting bone resorption. *Front Pharmacol* 2018;9:1046.
23. Yang X, Gao X, Cao Y, et al. Anti-Inflammatory effects of boldine and reticuline isolated from *Litsea cubeba* through JAK2/STAT3 and NF- κ B signaling pathways. *Planta Med* 2018;84:20-25.
24. Pandurangan AK, Mohebbi N, Hasanpourghadi M, Looi CY, Mustafa MR, Mohd Esa N. Boldine suppresses dextran sulfate sodium-induced mouse experimental colitis: NF- κ B and IL-6/STAT3 as potential targets. *Biofactors* 2016;42:247-258.
25. Lin X, Han X, Kawai T, Taubman MA. Antibody to receptor activator of NF- κ B ligand ameliorates T cell-mediated periodontal bone resorption. *Infect Immun* 2011;79:911-917.

26. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673-2682.
27. Bunte K, Beikler T. Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14):3394.
28. Dar HY, Azam Z, Anupam R, Mondal RK, Srivastava RK. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. *Front Biosci*. 2018;23:464-492.
29. Gruber R. Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. *J Clin Periodontol* 2019;46 (Suppl 21):52-69.
30. Zhang R, Yang J, Wu J, et al. Berberine promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells with therapeutic potential in periodontal regeneration. *Eur J Pharmacol* 2019;851:144-150.
31. Pound P, Ritskes-Hoitinga M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med*. 2018;16(1):304.
32. Marchesan J, Gimari MS, Jing L, et al. An experimental murine model to study periodontitis. *Nat Protoc*. 2018;13(10):2247-2267
33. Asteriou E, Gkoutzourelas A, Mavropoulos A, Katsiari C, Sakkas L, Bogdanos D. Curcumin for the Management of Periodontitis and Early ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis: Killing Two Birds with One Stone. *Nutrients*. 2018;10(7):908.
34. Moro MG, Silveira Souto ML, Franco GCN, Holzhausen M, Pannuti CM. Efficacy of local phytotherapy in the nonsurgical treatment of periodontal disease: A systematic review. *J Periodontal Res* 2018;53:288-297.
35. Collateral damage: microbiota-derived metabolites and immune function in the antibiotic era. *Cell Host Microbe* 2014;16:156-163.

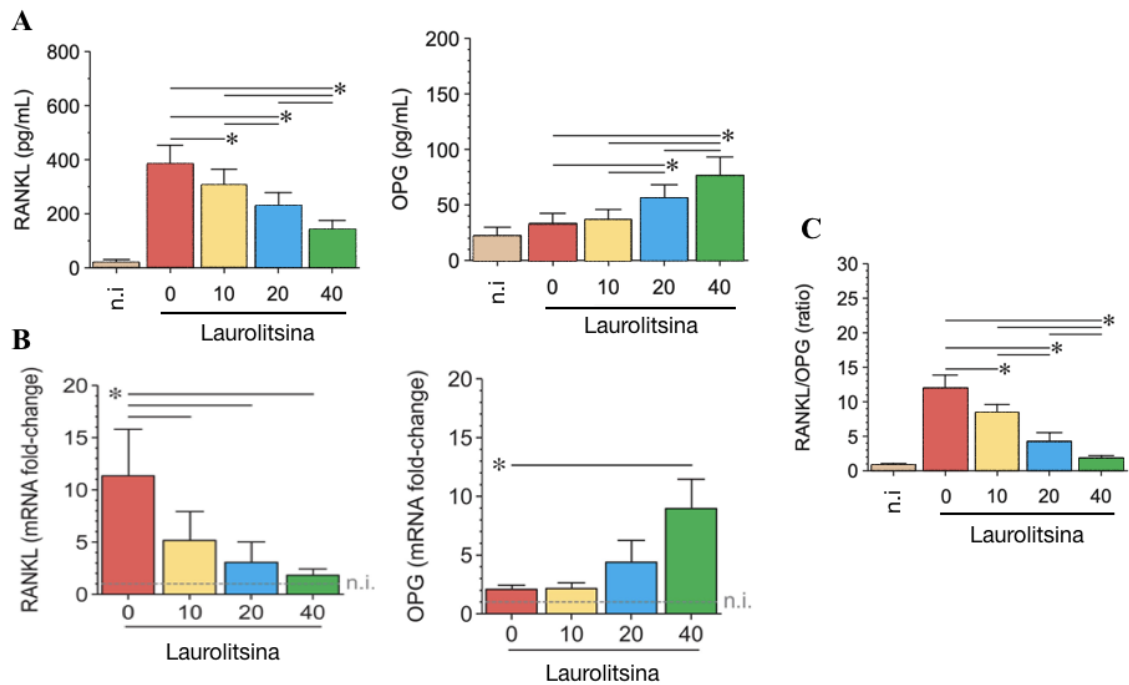
VIII. GRÁFICOS Y FIGURAS

Figura 1. Resorción ósea alveolar.



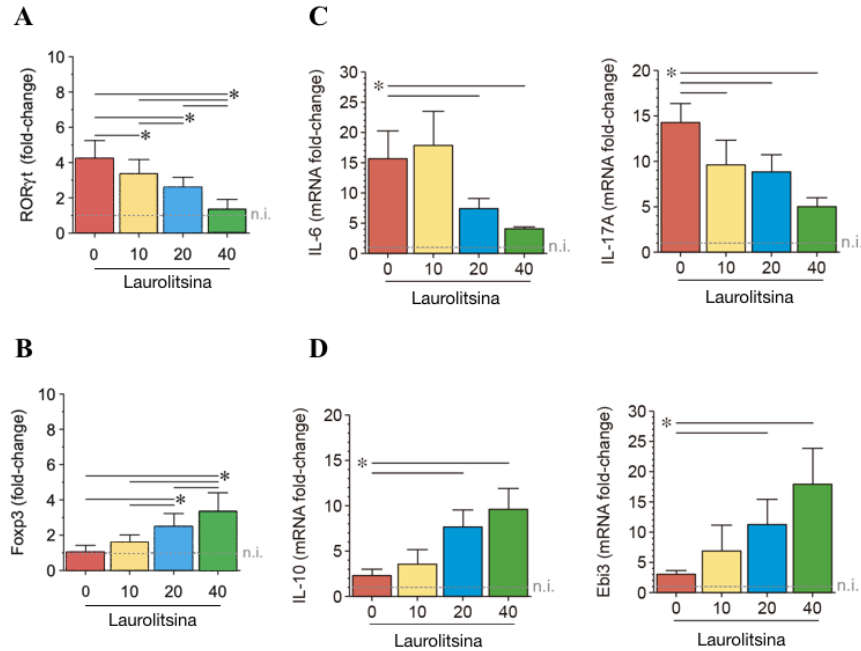
Leyenda: **A)** Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los maxilares sometidos a periodontitis experimental e inoculados o no con laurólitsina. **B)** Área de resorción ósea alveolar cuantificada por SEM. Los datos se encuentran representados como μm^2 ajustados al grupo no inducido y mostrados como promedio \pm DE. * $P < 0.05$.

Figura 2. Niveles de RANKL y OPG.



Leyenda: **A)** Producción de RANKL y OPG detectada en fluido gingival crevicular de animales sometidos a periodontitis experimental e inoculados o no con lauroilsina. Los datos se encuentran representados como pg/mL y mostrados como promedio \pm DE. **B)** Expresión de mRNA de RANKL y OPG en lesiones periodontales de animales sometidos a periodontitis experimental e inoculados o no con lauroilsina. Los datos se encuentran representados como mRNA fold-change y mostrados como promedio \pm DE. **C)** Taza de niveles secretados de RANKL/OPG en fluido gingival crevicular de animales sometidos a periodontitis experimental e inoculados o no con lauroilsina. Los datos se encuentran representados como RANKL/OPG ratio y mostrados como promedio \pm DE. * $P < 0.05$.

Figura 3. Expresión de factores de transcripción y citoquinas asociadas a la actividad de linfocitos Th17 y Treg.



Leyenda: A y B) Niveles de expresión de mRNA de los factores de transcripción ROR γ t (Th17) y Foxp3 (Treg) en las lesiones periodontales de animales sometidos a periodontitis experimental e inoculados o no con lauroilsina. C y D) Niveles de expresión de mRNA de las citoquinas IL-6 e IL-17A (Th17), e IL-10 y Ebi3 (Treg) en las lesiones periodontales de animales sometidos a periodontitis experimental e inoculados o no con lauroilsina. Los datos se encuentran representados como mRNA fold-change y mostrados como promedio \pm DE. * $P < 0.05$.

ANEXO 3: TABLA 1 CEBADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR QPCR

Molécula objetivo	Secuencia adelante	Secuencia reversa
IL-6	tgatggatgctaccaaactgg	ttcatgtactccaggtagctatgg
IL-10	gcttcatccctgaaaactgtg	tgctacaaaggcagacaaaca
IL-17A	cagggagagcttcatctgtgt	gctgagctttgagggatgat
IL-23p19	gaagggaaggacaccatta	ttcttcttccagctccttc
IL-35 EBI3	gtccctgggttactgaa	acgggataccgagaagcat
TGF- β 1	tggagcaacatgtggaactc	gtcagcagccggttacca
ROR γ t	cgcggagcagacacactta	ccctggacctctgtttggc
Foxp3	agaagctgggagctatgcag	actggtggctacgatgcag
RANKL	tgaagacacactacctgactctg	cccacaatgtgtgcagttc
OPG	gtttcccgaggaccacaat	ccattcaatgatgtccaggag
18S rRNA	gcaattattcccatgaacg	gggacttaatcaacgcaagc