
β -defensinas como posibles indicadores de la actividad inflamatoria en la enfermedad periodontal.

Saira K. Ramírez Thomé^{1,2}, Beatriz X. Ávila Curiel¹, María T. Hernández Huerta² y Carlos J. Solórzano Mata^{1,2}

¹Facultad de Odontología.

²Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México.

Palabras clave: β -defensinas; epitelio bucal; enfermedad periodontal; gingivitis; periodontitis; gingivitis experimental.

Resumen. La enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis) es un proceso inflamatorio ocasionado por la actividad de bacterias patógenas y sus productos sobre el surco gingival, con la consecuente activación de la respuesta inmunitaria. La saliva y el fluido crevicular contienen una gran variedad de enzimas y factores antimicrobianos que están en contacto con la región supragingival y subgingival; entre ellos, las β -defensinas (hBDs). Las hBDs son péptidos catiónicos no glicosilados ricos en cisteína, producidos por las células epiteliales; tienen efecto antimicrobiano e inmunorregulador; de esta forma, contribuyen al mantenimiento de la homeostasis en los tejidos periodontales. Los cambios en la microbiota y en la respuesta inmunitaria de un periodonto sano a gingivitis y, finalmente, a periodontitis, es compleja. Su severidad depende de un equilibrio dinámico entre las bacterias asociadas a la placa, factores genéticos y ambientales. Los avances recientes han permitido comprender la implicación de las hBDs en la detección, el diagnóstico y la terapéutica de la enfermedad periodontal, así como la relación que hay entre la periodontitis y otras enfermedades inflamatorias. El objetivo de esta revisión es describir el efecto de las hBDs en la respuesta inmunitaria y su utilización como marcadores de la actividad inflamatoria de la enfermedad periodontal.

β -defensins as possible indicators of inflammatory activity in periodontal disease.

Invest Clin 2022; 63 (4): 414 – 434

Keywords: β -defensins; buccal epithelium; periodontal disease; gingivitis; periodontitis; experimental gingivitis.

Abstract. Periodontal disease (gingivitis and periodontitis) is an inflammatory process caused by the activity of pathogenic bacteria and their products on the gingival sulcus, with the consequent activation of the immune response. Saliva and crevicular fluid contain a wide variety of enzymes and antimicrobial factors that are in contact with the supragingival and subgingival region, including β -defensins (hBDs). hBDs are non-glycosylated, cysteine-rich cationic peptides produced by epithelial cells with antimicrobial and immunoregulatory effects, thus contributing to maintaining homeostasis in periodontal tissues. The changes in the microbiota and the immune response from a healthy periodontium to gingivitis and, finally, to periodontitis are complex. Their severity depends on a dynamic balance between bacteria associated with plaque, genetic and environmental factors. Recent advances have made it possible to understand the implication of hBDs in the detection, diagnosis, and therapy of periodontal disease and the relationship between periodontitis and other inflammatory conditions. This review aims to describe the effect of hBDs on the immune response and its use as a possible marker of the inflammatory activity of the periodontal disease

Recibido: 14-03-2022

Aceptado: 07-04-2022

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) es un padecimiento inflamatorio en los tejidos de soporte (encía, ligamento periodontal y hueso) de los órganos dentarios (O.D.); típicamente inicia con gingivitis y, al no ser tratada, puede evolucionar a periodontitis crónica con la posibilidad de la pérdida de los O.D.¹ La gingivitis es definida como una condición inflamatoria en un sitio específico de la encía que inicia con un acúmulo de biopelícula alrededor del O.D; clínicamente se caracteriza por la presencia de sangrado, eritema e inflamación gingival². La periodontitis es una patología inflamatoria crónica multifactorial, asociada con una biopelí-

cula disbiótica que produce la destrucción progresiva de los tejidos de soporte del O.D; clínicamente se caracteriza por sangrado al sondeo y presencia de bolsas periodontales³.

La EP representa un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia en muchos países. Así, se estima que en América Latina la prevalencia en países como Brasil, México, Chile, República Dominicana, Argentina, Guatemala y Colombia está entre un 19-96%⁴. El Centro para la Prevención y Control de las Enfermedades en Estados Unidos (CDC) y la Academia Americana de Periodontología han estimado una prevalencia de más del 50% en la población adulta a partir de estudios de casos los cuales consideraron la pérdida de inserción

clínica y la profundidad al sondeo¹. Por otro lado, estudios epidemiológicos en los cuales se realizaron mediciones continuas de pérdida de inserción clínica mostraron la presencia de enfermedad periodontal avanzada y pérdida dental entre un 10-15% de manera global¹. En otros estudios se estableció una prevalencia de 64%-96.7% dependiendo del grupo etario, siendo más prevalente en el grupo de más de 65 años^{5,6}. Las superficies de la cavidad oral están en contacto constante con una alta variedad de microorganismos que son capaces de formar biopelículas sobre los O. D., la mucosa oral y sobre las prótesis dentales⁷. Una función básica del epitelio gingival es actuar como una barrera mecánica y química en sus diferentes regiones (epitelio oral, del surco y de unión)^{8,9}, ya que protege a los tejidos de la invasión de los microorganismos^{7,10}. El mantenimiento de un estado saludable solo es posible cuando el hospedador mantiene una interacción equilibrada entre la colonización microbiana y los mecanismos de defensa¹¹. En este sentido, las células del tejido epitelial oral sintetizan péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) dirigidos contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, así como levaduras y algunos virus^{11,12}. Dentro de los AMPs se encuentran las α y β defensinas presentes en el epitelio gingival¹³, glándulas salivales, saliva y fluido crevicular¹⁴. El objetivo de esta revisión es describir el efecto de las hBDs en la respuesta inmunitaria y su utilización como marcadores de la actividad inflamatoria en la enfermedad periodontal.

Defensinas

Las defensinas son péptidos catiónicos de pequeño tamaño, presentes en un gran número de especies tanto en el reino animal como en el reino vegetal¹⁵. Fueron reportadas por primera vez en el bovino en 1991¹⁶ y, posteriormente, en un estudio realizado por Jones y Bevins en 1992¹⁷ y se describieron en el epitelio intestinal humano con un papel importante en la respuesta inmunitaria innata con actividad antiviral y antibacterial

potente¹⁸. Desde su descubrimiento, han sido intensamente investigadas por su actividad antimicrobiana y sus funciones inmunomoduladoras multifacéticas bajo condiciones fisiológicas y patológicas^{19,20}. Es por ello que actualmente se les ha renombrado como péptidos de defensa del hospedador (PDH)^{9,15}, considerando su función y participación en el proceso de cicatrización^{21,22}, la homeostasis y el manejo de la diversidad del microbioma.

Las defensinas están constituidas por 16 a 50 aminoácidos, con un peso molecular de 3-4.5 kDa y una alta concentración de arginina; su estructura contiene hojas beta plegadas con 6 residuos de cisteína estabilizadas por tres enlaces disulfuro intramoleculares conservados^{19,23,24}. De acuerdo a la topología de los enlaces disulfuro, se clasifican en defensinas alfa, beta y teta (α , β y θ)¹⁹. Actualmente, se han identificado 6 tipos de α -defensinas en humanos^{19,25,26,27} y 31 tipos de β -defensinas, de las cuales, solo las β -defensinas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4, hBD-5, hBD-6) han sido aisladas de los tejidos humanos²⁸. La θ -defensina se expresa en el reino animal y se encuentra exclusivamente en los monos. Se presentan 6 isoformas en los macacos *rhesus* y la isoforma Defensina Teta Rhesus-1 (DTR-1) es la más abundante^{18,29}.

β -defensinas

Las β -defensinas más estudiadas son la hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4. La hBD-1 es secretada de forma constitutiva; se expresa en el tracto genitourinario y respiratorio¹⁹. La hBD-1 puede ser modulada por mediadores inflamatorios, mientras que la hBD-2 y hBD-3 son expresadas al ser estimuladas por citocinas proinflamatorias³⁰⁻³³.

En algunas condiciones como el embarazo se presenta un incremento significativo de hBD-1, lo cual sugiere que otros factores no infecciosos la podrían inducir^{34,35}. La hBD-2 se encuentra en el epitelio de las superficies internas y externas del cuerpo humano, tales como la piel y el tracto res-

piratorio e intestinal. Este tipo de defensina es inducida por un estímulo infeccioso³⁰. Se ha observado que existe una expresión basal mínima, la cual aumenta enormemente mediante la inducción de patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMPs) tales como lipopolisacáridos, peptidoglucanos, lipoarabinomanano o algunas citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interferón γ (IFN- γ)^{30,36}. La hBD-3, al igual que la hBD-2, es inducible por estímulos inflamatorios y es detectable *in vitro* posterior a la coestimulación con IL-1 o TNF- α ³⁷. Este tipo de defensina es de mayor tamaño (5kD) y su mecanismo de acción es similar a las anteriores defensinas. Es posible detectarla en células epiteliales del tracto respiratorio, genitourinario, piel, amígdalas, corazón y músculo esquelético; igual que las otras hBDs tienen un amplio espectro de acción antimicrobiano^{34,35,38}.

La hBD-4 se expresa en testículo, estómago, útero, tiroides, pulmón, riñón y neutrófilos; además, se expresa en células epiteliales de la cavidad oral³⁹⁻⁴¹. Ha sido poco descrita en la EP, aunque podría tener actividad bactericida y fungicida, además de actividad quimiotáctica para monocitos, siendo inducible por algunas citocinas y PAMPs; sin embargo, se inactiva con altas concentraciones de sal. García y col.¹¹, se refieren a esta defensina como la más potente de todas, aunque esto no ha sido comprobado en otros estudios^{36,40,41}.

En el epitelio oral normal, el RNAm para hBD-1 y hBD-2 se expresan fuertemente en el estrato espinoso, granuloso y corneo^{30,42,43}. En los tejidos gingivales, hBD-1 y hBD-2 se encuentran localizadas en el epitelio del surco, pero no en el epitelio de unión; esto podría deberse a la diferenciación de los queratinocitos en los estratos del epitelio (Fig. 1)³⁰.

Los patrones de localización para hBD-3 en el epitelio escamoso estratificado, podrían ser los mismos para hBD-1 y hBD-2; sin embargo, hBD-3 ha sido localizada prin-

cipalmente en el estrato basal del epitelio gingival, por lo que se ha propuesto que podría ser el vínculo entre epitelio gingival y el tejido conectivo, funcionando como enlace entre la inmunidad innata y adaptativa^{30,44,45}. De igual manera, las hBDs han sido localizadas en las glándulas salivales y en el fluido crevicular. En este sentido, se ha encontrado la presencia del RNAm de hBD-1, 2 y 3 en la glándula parótida, submandibular y las glándulas salivales menores^{25,46}.

Las defensinas son activas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y virus, incluyendo especies de microbios orales como son: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum*^{47,48}. La capacidad antibacteriana de las hBDs depende de su concentración en la saliva, siendo para hBD-1 150 ng/mL, hBD-2 450-550 ng/mL, mientras que para hBD-3 es de 730 ng/mL⁴⁷. Estas concentraciones son suficientes para desarrollar su actividad bactericida por sí mismas o actuando en sinergia con otros factores bactericidas presentes, tales como la histatina-5, lactoferrina, mucinas y lisozima^{12,42,50}.

Se ha estudiado la expresión de estas moléculas en estados patológicos y han sido comparadas en individuos libres de enfermedad; por ejemplo, se ha documentado la elevación de hBD-2 en saliva no estimulada de niños con caries dental de 6-12 años en comparación con niños sanos (Tabla 1)^{51,52}. Sin embargo, existen algunas condiciones que pueden afectar la actividad antimicrobiana de las hBDs tales como las altas concentraciones de sodio en la saliva, ya que altera la unión del AMP a la bacteria⁴⁸. En condiciones óptimas las hBDs responden a diversas bacterias, virus, parásitos e infecciones fúngicas¹⁵. Estos péptidos catiónicos interactúan con las cargas negativas de las membranas de las bacterias Gram positivas y negativas, de igual forma sobre hongos y virus con envoltura.

El mecanismo de acción biológico lítico de los AMPs que incluyen a las hBDs, se da mediante cinco pasos. En primer lugar,

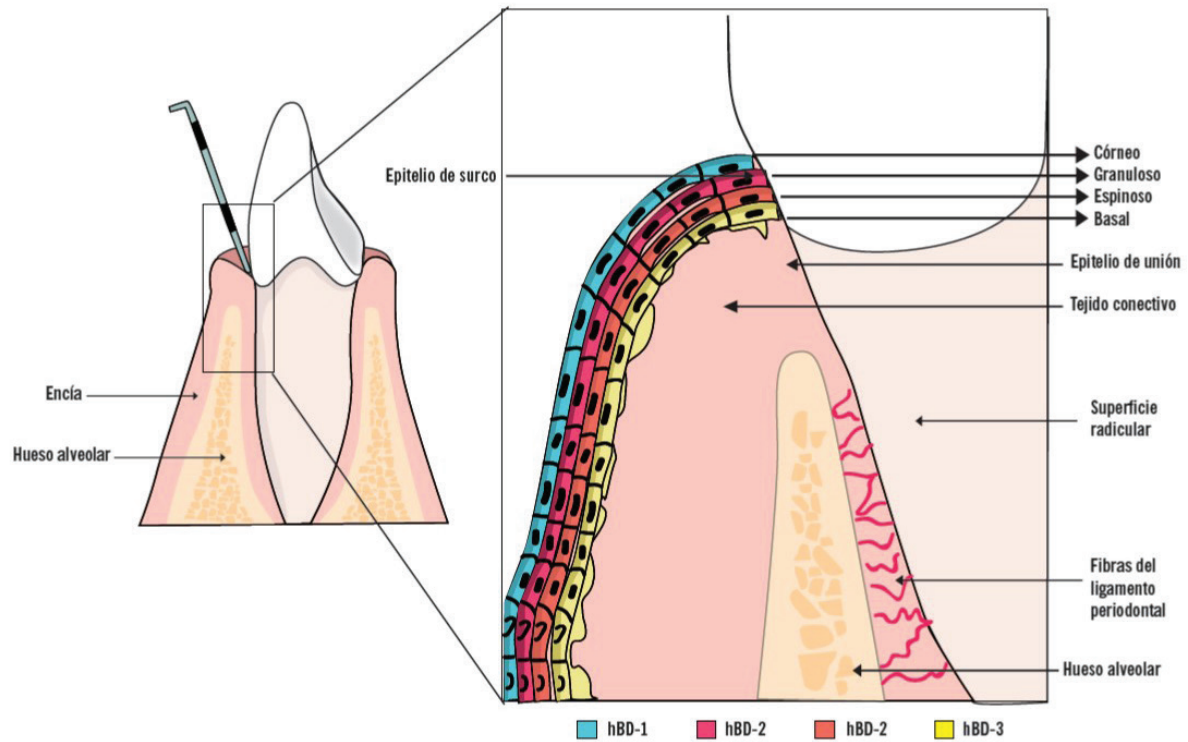


Fig. 1. Expresión de las β -defensinas 1,2 y 3 en el estrato basal, espinoso y granuloso del epitelio en salud periodontal.

Tabla 1
Características de las β -defensinas

Tipo de defensina	Síntesis, expresión y secreción	Concentración en saliva	Activación en tejidos periodontales	Efectos reguladores
β -defensinas (hBDs)	Células epiteliales ¹⁰ monocitos, CDs ¹³	Salud: hBD-1=150 ng/mL ³⁶ hBD-2=450-550ng/mL ³⁶ hBD-3= 730ng/mL ³⁶	hBD-1 es secretada constitutivamente ^{17,24} . hBD-2 y hBD-3 es expresada en infección o inflamación activa ^{24,29} .	Quimioatracción de células T, CDs, macrófagos ⁹ . Cicatrización de heridas en epitelio ¹³ , Diferenciación, proliferación y migración de queratinocitos ¹⁷ , mantenimiento de la homeostasis periodontal ¹⁸ . Propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras ²⁴ , incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias ³⁶ , promueve la regeneración periodontal ⁴² , neovascularización ⁴³ , actividad anti o protumoral ^{49,53} .

los AMPs interactúan con los fosfolípidos de la membrana de la célula del hospedador estableciendo un contacto primario con las células blanco a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas; en segundo lugar, ocurre un ajuste estructural en la membrana celular (conformación en una estructura de hélice o barril); en tercer lugar, se presenta una acumulación hasta un nivel estequiométrico activo; en cuarto lugar, se presenta una alteración de la membrana a través de la permeabilización o despolarización, ocasionando alteraciones en su función que puede ser transitoria o estable y, finalmente, la muerte de la bacteria ⁵⁴.

Se han propuesto algunos modelos hipotéticos para la formación de poros en la membrana, tales como el modelo en forma de barril, poro toroidal, alfombra y agregado. Respecto al modelo de barril, al presentarse un aumento en la cantidad y/o expresión del péptido que se une a la membrana, se produce agregación y una transformación conformacional que ocasiona el desplazamiento de los fosfolípidos locales y el adelgazamiento de la membrana ⁵⁵.

Durante el proceso de penetración dentro de la bicapa fosfolipídica, las regiones hidrofóbicas helicoidales de los péptidos de α-hélice y los péptidos de hoja β-plegada están cerca de las regiones hidrofóbicas del fosfolípido de la membrana, mientras que

las regiones hidrofílicas de las hélices peptídicas están hacia dentro; de esta forma, las moléculas se disponen en paralelo para formar la luz central ⁵⁶.

El mecanismo del modelo de poro toroidal es similar al del modelo de barril, la diferencia es que en el modelo de poro toroidal las hélices peptídicas se insertan en la membrana y se unen a los lípidos para formar complejos de poro toroidal. Los AMPs acumulados localmente en altas concentraciones inducen la deformación de la flexión en las moléculas lipídicas, lo que permite que los péptidos y la cabeza de los grupos lipídicos se inserten dentro del centro hidrofóbico de los lípidos ⁵⁶.

En el modelo de alfombra, se requieren altas concentraciones de AMPs para formar micelas y la consecuente destrucción de la membrana microbiana ⁵⁵.

Cuando la concentración del péptido alcanza el umbral, los AMPs cubren la membrana en grupos y provocan su ruptura de manera similar a un surfactante. No se produce la formación de canales, ni inserción de los péptidos en el centro hidrofóbico de la membrana. Este efecto es lo suficientemente potente para inducir la lisis total o parcial de la membrana celular; los AMPs al atravesarla actúan sobre moléculas intracelulares ocasionando la muerte celular (Fig. 2) ⁵⁷.

En el modelo de agregado, los AMPs se unen a la membrana citoplasmática anióni-

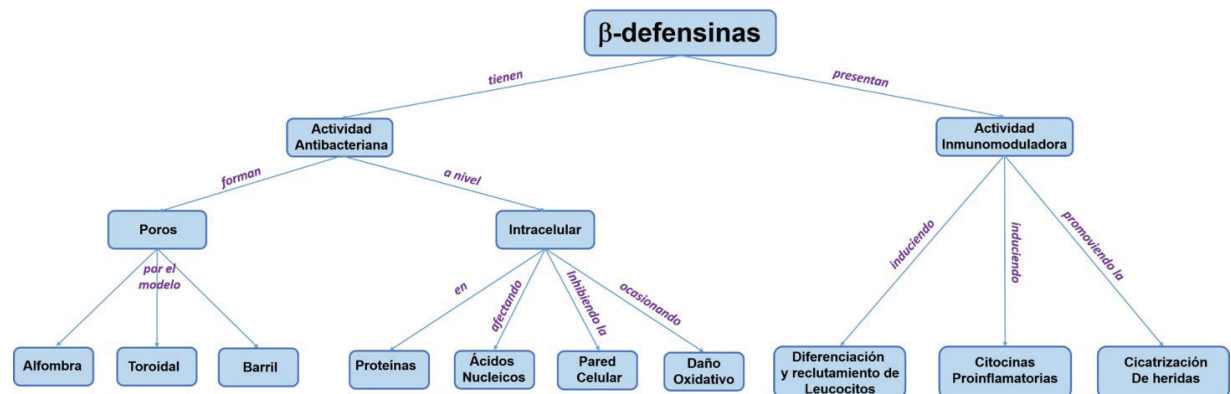


Fig. 2. Clasificación de los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos y β-defensinas.

ca, obligando a los péptidos y lípidos a formar una micela en un complejo péptido-lípido ⁵⁸.

A diferencia del modelo de alfombra, los canales formados por AMPs, los iones de lípidos y agua permiten que el contenido intracelular se filtre y provoquen la muerte celular. Estos canales también pueden ayudar a que los AMPs se transfieran al citoplasma y ejerzan su función. Este mecanismo explica por qué los AMPs no solo se dirigen a la membrana citoplasmática, sino que también pueden atravesar la membrana hacia el citoplasma para actuar sobre moléculas intracelulares ⁵⁷. De esta forma por su naturaleza anfipática, las hBDs son capaces de insertarse en la membrana fosfolipídica de los patógenos, ocasionando así, la destrucción de la membrana celular ^{15,59}. De igual manera, las hBDs tienen objetivos intracelulares e interfieren con los procesos metabólicos, incluyendo la síntesis de componentes celulares de vital importancia (Fig. 2) ⁶⁰.

Por otra parte, existen algunas condiciones que pueden alterar la efectividad de las hBDs como lo es el cloruro de sodio (NaCl). La presencia de NaCl (100mM) reduce la actividad antimicrobiana de hBD-1 y 2 entre un 50-80% hacia *A. actinomycetemcomitans* y *S. mutans*; sin embargo, la actividad antimicrobiana de hBD-3 no se ha visto afectada (200mM) ⁴⁸. En la cavidad oral, las hBDs están expuestas constantemente a los iones en la saliva que contienen 800mM de NaCl. La concentración de NaCl salival es menor de la que se necesita para inactivar a las hBDs; sin embargo, el NaCl no es el único ión presente en la saliva ⁴⁸. De hecho, el efecto orquestado de los iones salivales de Sodio (Na^{2+}), Magnesio (Mg^{2++}) y Calcio (Ca^{2++}), pueden afectar parcial o totalmente la función de las hBDs; por lo tanto, es plausible que estos péptidos sean inactivos contra las bacterias fuera de los tejidos, así como en la saliva ⁴⁸.

En estudios experimentales en ratas libres de gérmenes, se ha observado la producción de precursores de hBDs en ausencia de infección ¹⁵. Estudios *in vitro* en células renales embrionarias, han descrito la ex-

presión de diferentes receptores tipo Toll (TLRs) y hBD-3 mediando la activación de la transcripción del factor NF- κ B, que dependen de la expresión de TLR1 y TLR2; esto demuestra que la señalización de TLRs no está restringida de manera única a PAMPs sino que también puede ser iniciado por hBDs ¹⁵. Las hBDs se consideran como un enlace entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, de tal manera que se ha reportado que la hBD-3 puede intervenir rápidamente estimulando macrófagos vía TLR-4 e impedir la expresión de genes proinflamatorios ¹⁵. De igual manera, inducen la expresión de moléculas coestimuladoras sobre monocitos y células dendríticas (CDs) mieloides dependientes de TLRs, actuando como quimiotáctico para linfocitos T y células dendríticas inmaduras¹⁵. Las observaciones experimentales y clínicas sugieren que las hBDs son capaces de activar a los macrófagos y favorecer la respuesta proinflamatoria a través de ligandos para TLRs; sin embargo, es necesario ampliar los estudios tanto en animales como en humanos para esclarecer este punto.

A lo largo de la evolución las hBDs han adquirido roles adicionales en un proceso conocido como neofuncionalización, mientras mantienen su rol de defensa original ¹⁵. Se considera que las funciones inmunomoduladoras de las hBDs ^{61,62} no son mutuamente exclusivas y, por lo tanto, no se deben compartimentalizar sus funciones en una u otra, sino deben ser vistas como parte de la evolución en progreso, como elementos críticos con múltiples roles en funciones complejas contra enfermedades, es por ello que la expresión a través de las mucosas los implica como mediadores fundamentales y centinelas de la homeostasis y la salud ¹⁵.

β -defensinas en salud y enfermedad periodontal

La salud periodontal es definida como la ausencia de inflamación clínicamente detectable ⁶³. La cavidad oral es un ambiente expuesto a una multitud de bacterias; en promedio 800 especies residentes, de las

cuales de 150 a 200 son típicamente encontradas en muchos individuos ^{1,64}. Estas bacterias son increíblemente complejas y forman comunidades diferentes que viven sobre los O. D., lengua, paladar duro y tejidos epiteliales ⁶⁴. La gingivitis inducida por placa y la periodontitis son consideradas como procesos inflamatorios, en los cuales existe una disrupción de la homeostasis provocada por la presencia de una biopelícula, que de manera inicial, se presenta en una forma incipiente y, en la medida que progresa, se convierte en una forma disbiótica hasta ocasionar la destrucción de los tejidos de soporte del O. D., como se ha mencionado con anterioridad ^{1,65}. La flora bacteriana es controlada inicialmente por el sistema inmunitario innato del epitelio oral, la saliva y el fluido crevicular a través de proteínas y AMPs ⁶⁵. Por otro lado, al presentarse un desequilibrio entre la flora oral normal y los patógenos, se forma rápidamente la biopelícula oral sobre la superficie dental; si esto no se corrige, la inflamación gingival progresará posiblemente hacia una periodontitis produciendo pérdida ósea alveolar y finalmente la pérdida dental ⁶⁶. La función de los AMPs en la cavidad oral no solo se limitan a controlar el crecimiento bacteriano, sino también a prevenir el crecimiento de la biopelícula. Para tales efectos, bloquea –de manera directa– la aparición de mecanismos de resistencia bacteriana o interfiere con los sistemas de la regulación de la expresión génica, en respuesta a las fluctuaciones en la densidad de población celular de la comunidad bacteriana ⁶⁷. Todo ello representa una condición primordial para controlar la EP y mantener la salud periodontal clínica ⁶⁸. La inflamación es una respuesta de los tejidos vasculares en la que el sistema inmunitario del hospedador actúa para eliminar la fuente inductora del estímulo inflamatorio ⁶⁸. Las infecciones microbianas como la gingivitis inducida por placa y la periodontitis comienzan como una inflamación. Se presenta como una secuencia de eventos bioquímicos coordinados que inician con la rápida migración de leucocitos al sitio

de la infección, seguido por un aumento del flujo sanguíneo que transporta diferentes mediadores los cuales controlan el curso de la inflamación ⁶⁸. En un inicio, este proceso inflamatorio es benéfico para el hospedador; sin embargo, pueden presentarse mecanismos de resolución inflamatoria ineficientes, que no permiten la eliminación del cuerpo extraño o los mismos patógenos; si esto ocurre, podría darse un proceso inflamatorio crónico ⁶⁸. Un gran número de estudios han reconocido a los AMPs, particularmente las hBDs, como moléculas que están implicadas en múltiples actividades proinflamatorias tales como: neutralización de bacterias, quimioaxis y activación de células inmunitarias, neovascularización y cicatrización de las heridas, así como también, actividad anti o pro tumoral ⁶⁹. Es importante mencionar que los AMPs interactúan también con la inmunidad innata ⁷⁰, a través de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), Receptores para quimiocinas (CCRs), el inflamosoma y el sistema del complemento. De esta manera, regula algunos procesos celulares fundamentales en las células del sistema inmunitario, tales como la diferenciación, proliferación y muerte celular programada ^{68,71}. En épocas recientes, se ha enfatizado que la hBD-2 tiene la capacidad de unirse fuertemente al componente del complemento C1q. Curiosamente, esta proteína no afecta de manera significativa la vía de activación alternativa, pero puede inhibir la vía de activación clásica del complemento y puede estar involucrada en la protección contra la activación descontrolada de la respuesta inmunitaria innata, la interacción entre hBDs y la respuesta inmunitaria serán explicadas con más detalle, más adelante ^{72,73}.

Las actividades señaladas controlan la inflamación y/o aceleran el proceso de reparación de los sitios infectados, apoyando la función microbicida para la resolución del proceso infeccioso ⁷⁴. En este contexto, las hBDs pueden definirse como alarmas o señales de peligro; es decir, moléculas endógenas conocidas como Patrones Moleculares

Asociados a Daño (DAMPs) que se liberan de las células dañadas o moribundas e inician una amplia gama de funciones fisiológicas y fisiopatológicas^{68,71}. Así, la hBD-3 crea una disrupción en la biosíntesis de la pared celular uniéndose a regiones ricas en lípidos de la misma, de esta manera, participa rápidamente en el reconocimiento y respuesta a patógenos^{75,76}.

En diversos estudios se ha demostrado que la expresión de hBDs se correlaciona con el estado inflamatorio del tejido gingival⁷⁷⁻⁷⁹. Por ello, con el objetivo de conocer el papel que desempeñan las hBDs en la enfermedad periodontal, se han realizado estudios clínicos en humanos, experimentales *in vivo* e *in vitro*. Dommisch⁴³, investigó la expresión de las hBDs-1, 2 y 3 en biopsias gingivales de individuos sanos, con gingivitis y periodontitis. En el tejido sano no se encontraron variaciones en la expresión de las hBDs-1, 2 y 3, mientras que en la gingivitis se presentó un aumento en la expresión de la hBD-2 y en la periodontitis hubo una sobreexpresión de hBD-2 y hBD-3. Adicionalmente, la expresión de hBD-3 se limitó al estrato basal en condiciones de salud y se extendió al estrato espinoso superficial en condiciones patológicas. Estos datos sugieren que, en la primera etapa del proceso inflamatorio, es decir, en la gingivitis, existe una sobreexpresión de hBD-2, mientras que, en etapas avanzadas de periodontitis, existe una sobreexpresión de hBD-3, además de una alta expresión de hBD-2⁴³.

Vandar Seul y cols.⁸⁰, estudiaron la expresión del ARNm de las hBD-1 y 2 en los tejidos gingivales de individuos sanos, con gingivitis, periodontitis agresiva y crónica; los resultados demostraron que la expresión génica de la hBD-1 fue baja en gingivitis y periodontitis agresiva, y significativamente alta en el grupo de periodontitis crónica, más que en el grupo control ($p < 0.001$). La expresión del ARNm de hBD-2 en gingivitis fue más baja que en el grupo control y más alta en periodontitis crónica, mientras que en la periodontitis agresiva hubo un incremento en su ex-

presión génica. Por su parte, Ebrahim y col.⁸¹ analizaron la expresión de las hBDs-1, 2 y 3 en fluido crevicular de pacientes con periodontitis agresiva posterior a la terapia periodontal no quirúrgica, se observó un incremento en la frecuencia de la expresión de la hBDs-1 y 3 posterior a la terapia periodontal. Yong y cols.⁸², estudiaron la correlación que existe entre periodontopatógenos, parámetros clínicos y expresión de hBD-2; encontraron que la concentración de hBD-2 en fluido crevicular en sitios con EP fue más alta comparada con sitios en salud. Concluyeron que la prevalencia, composición y número de copias de los periodontopatógenos están íntimamente relacionados con la severidad de los datos clínicos de la EP. Brancatisano y cols.⁸³, evaluaron el nivel de hBD-3 en el fluido crevicular de individuos sanos y con periodontitis; demostraron que, en sujetos con periodontitis, la expresión de hBD-3 fue menor al ser comparado con sujetos sanos. Costa⁸⁴, analizó los niveles de hBD-1 en el fluido crevicular en sujetos con y sin periodontitis; encontró que en sujetos con salud periodontal los niveles de hBD-1 fueron más altos que en pacientes con periodontitis crónica, sugiriendo un rol protector de la hBD-1 ante la susceptibilidad a la periodontitis crónica (Figs. 3 y 4). Pereira y cols.⁸⁵, evaluaron los niveles de hBD-1 y hBD-2, en el fluido crevicular de individuos con y sin periodontitis; sus resultados demostraron que los individuos con periodontitis presentaron altos niveles de hBD-2 y hBD-3. Sidharthan y su grupo⁸⁶, analizaron los niveles de Interleucina-22 (IL-22) y hBD-2 en el fluido crevicular en pacientes sanos, con gingivitis y periodontitis crónica y encontraron que los niveles de hBD-2 fueron significativamente más altos en la periodontitis crónica cuando se comparó con el grupo de gingivitis y sanos ($P < 0.001$), indicando el rol de la IL-22 y hBD-2 en la respuesta inmunitaria durante la periodontitis (Tabla 2).

Los datos existentes permiten detectar cambios en la expresión de hBDs en diversos cuadros clínicos dentro de la enfermedad periodontal, evidenciando su participación en

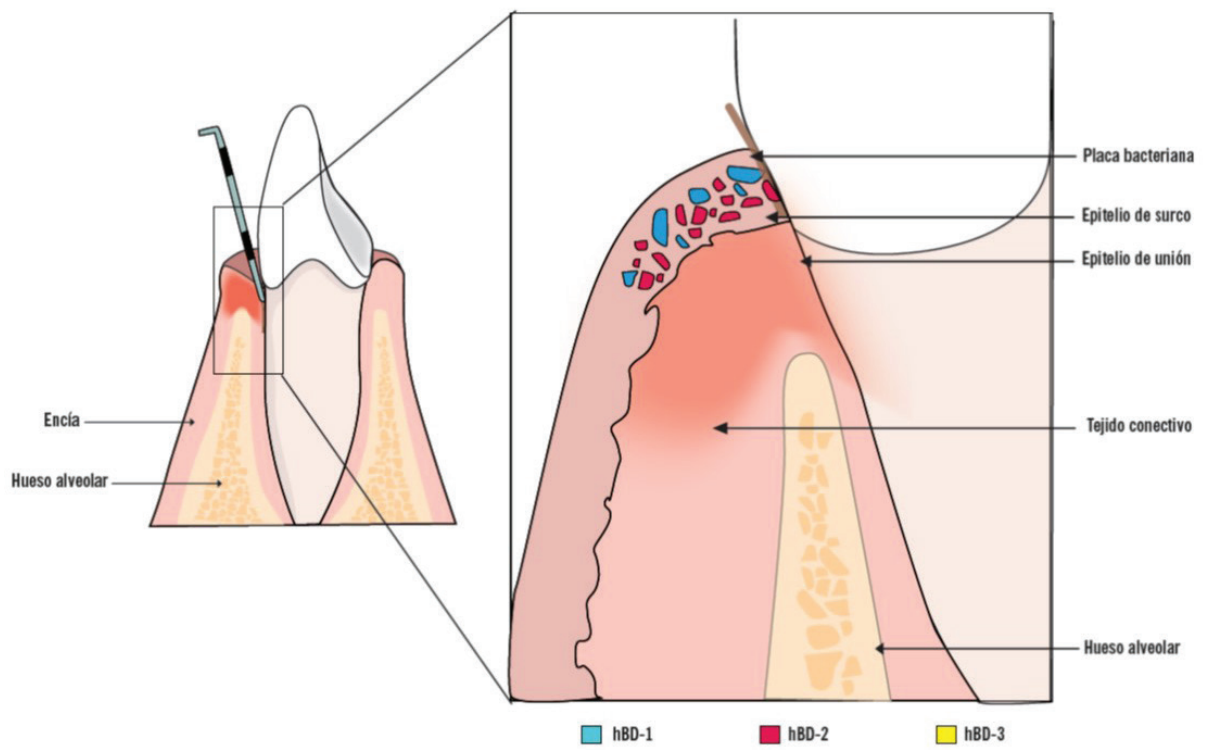


Fig. 3. Expresión de las β -defensinas en el epitelio gingival en gingivitis.

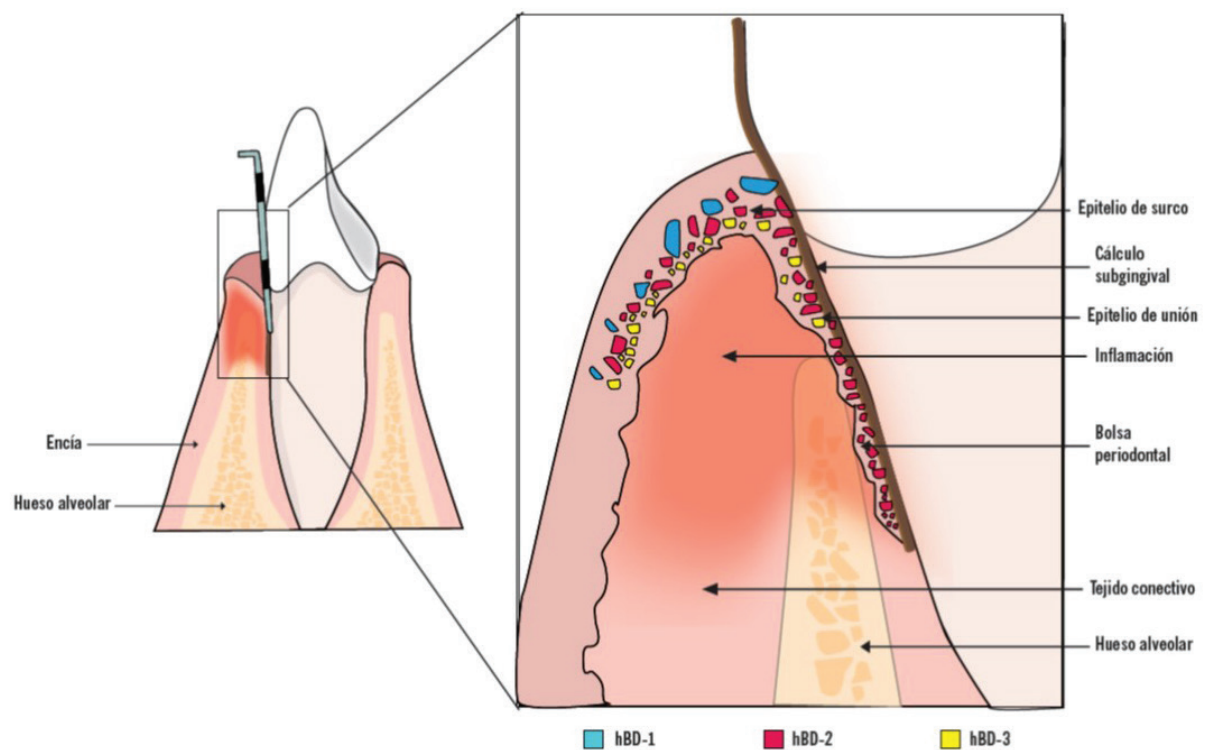


Fig. 4. Expresión de las β -defensinas en el epitelio gingival en periodontitis.

Tabla 2
β-defensinas en la enfermedad periodontal.

Autor	Año	Modelo de estudio y tipo de β-defensina	Enfermedad periodontal estudiada	Resultado del estudio
Dommisch ¹¹	2005	hBDs-1, 2 y 3	Salud, gingivitis y periodontitis	En salud; niveles de expresión similares para las hBDs-1,-2, y -3. Gingivitis; expresión significativamente alta de hBD-2 comparada con hBD-1. En periodontitis la expresión de hBD-2 fue más alta que hBD-1; sin embargo, hBD-2 fue comparable con hBD-3
Várdar-Sengül ⁸⁰	2007	Expresión de ARNm en las hBDs-1 y 2	Salud, gingivitis, periodontitis agresiva, periodontitis crónica	Expresión de genes de hBD-1 fue baja en gingivitis y periodontitis agresiva, y significativamente alta en periodontitis crónica, más que en el control (p <0.001). hBD-2, la expresión del ARNm en gingivitis fue más baja que en el control. El ARNm de la hBD-2 en periodontitis crónica fue más alta cuando se comparó con el control. En la periodontitis agresiva incrementó la expresión génica de la hBD-2.
Mohamed ⁸¹	2013	hBDs-1, 2 y 3 En fluido crevicular	Periodontitis agresiva posterior a la terapia periodontal no quirúrgico.	Incrementó en la frecuencia de la expresión de las hBDs-1 y -3 después de la terapia periodontal.
Yong ⁸²	2015	Expresión de hBD-2.	Periodontitis y salud periodontal	La concentración de hBD-2 en fluido crevicular de sitios con enfermedad periodontal fue más alta comparada con sitios en salud.
Brancatisano ⁸³	2011	Expresión de hBD-3	Salud y periodontitis	Evaluó el nivel de hBD-3 en fluido crevicular en pacientes sanos y con periodontitis; demostró que en sujetos con periodontitis, la expresión de hBD-3 fue menor al ser comparado con sujetos sanos.
Costa ⁸⁴	2018	Niveles de hBD-1, en fluido crevicular	Sanos Periodontitis	Los niveles de hBD-1 en el fluido crevicular fueron más altos en sujetos con salud periodontal comparados con pacientes con periodontitis crónica.
Pereira ⁸⁵	2020	Niveles de hBD-1 y hBD-2 en fluido crevicular	Sanos Periodontitis	En periodontitis presentaron altos niveles de las hBD-2 y hBD-3 en el fluido crevicular.
Sidharthan ⁸⁶	2020	Niveles de IL-22 y hBD-1 en fluido crevicular	Periodontitis crónica, gingivitis y sanos	Los niveles de hBD-2 fueron significativamente más altos en periodontitis crónica al compararse con gingivitis y los sanos (P < 0.001).

la respuesta microbicida e inflamatoria. La identificación de hBDs en fluido crevicular y saliva permite su detección de una manera sencilla, fácil y no invasiva, con el objeto de determinar la actividad inflamatoria de la enfermedad; sin embargo, es necesario considerar algunas situaciones en las que puede encontrarse una disminución de las hBDs y que podrían influir en la interpretación. Una de las responsables es la degradación de hBDs por enzimas proteolíticas producidas por los patógenos periodontales y el hospedador, tales como las proteasas tipo tripsina y las gingipaínas de *P. gingivalis* que degradan a las hBD-1, hBD-2, y hBD-3⁸⁷. Otras de las enzimas proteolíticas del hospedador que pueden contribuir a la degradación de las hBDs son los miembros de la familia de enzimas cisteín-proteinasas, catepsina B y L, las cuales tienen la capacidad de inactivar a la hBD-2 y hBD-3 en condiciones *in vitro*⁸⁸. Estas enzimas son producidas predominantemente por macrófagos y suelen aumentar en los tejidos gingivales en el inicio y progresión de la periodontitis⁸⁸. Por otra parte, se ha postulado que una mayor participación de la inmunidad adaptativa en comparación con la inmunidad innata durante la enfermedad periodontal, es la responsable en la disminución de la secreción de las hBDs⁸⁸. La expresión de las hBDs, está modulada por el estado inflamatorio de los tejidos; por lo tanto, el incremento de la expresión de las hBDs, ocasiona la presencia de citocinas inflamatorias, por ejemplo, las hBDs-2 y 3 inducen la producción de TNF- α , IL-1 e IFN- γ ⁸⁹. En un estudio *in vitro*⁹⁰ se observó que las hBD-2 y hBD-3 inducen la maduración de las CDs; las CDs activas son fuente importante de citocinas que reclutan a otras poblaciones celulares, como las células T, las Natural Killer (NK), monocitos y CDs adicionales⁹¹. En este sentido se ha sugerido que, al pasar de una lesión gingival inicial a una establecida, las funciones antibacterianas de las hBDs son reemplazadas por la inmunidad celular⁹², favoreciendo la secreción de IL-8, y el factor estimulador de colonias de

macrófagos-1 (MCP-1) y al oncogén que es un regulador de crecimiento (GRO)⁹². Se observó también que las CDs responden de manera diferente a las hBDs-2 y 3; la hBD-2 induce la producción de IL-6 mientras que hBD-3 induce grandes niveles de MCP-1. La inducción de IL-6 e IL-8, pueden ser particularmente importantes ya que son quimiotácticos para neutrófilos y células Th17⁹². Por otro lado, MCP-1 actúa como quimiotáctico para monocitos y células Treg⁹³. Esto indica que las hBDs-2 y 3, inducen de manera selectiva la expresión de citocinas, sugiriendo que las hBDs tienen un rol único en la respuesta inmunitaria al utilizar diferentes receptores para estimular CDs; TLR4, CCR6 y CD91 han sido implicadas como receptores para hBD-2, mientras que TLR1 y TLR2 como receptores para hBD-3⁹⁴. De tal manera que las hBDs no solo actúan como quimiotácticos para células inmunitarias, sino también inducen patrones de citocinas únicos, que son cruciales en la respuesta inmunitaria hacia bacterias⁹⁰. Otro aspecto importante a considerar es el polimorfismo genético, que se ha asociado con una disminución de hBDs predisponiendo a desarrollar periodontitis, por lo que la relación entre el polimorfismo funcional de los genes de las hBDs y la susceptibilidad a padecer periodontitis es probable, pero necesita ser estudiada a fondo⁸³.

Los estudios experimentales, por su parte, permiten tener condiciones más controladas que brindan información adicional y valiosa. El desarrollo de la gingivitis clínica se ha estudiado de manera extensa en un modelo denominado gingivitis experimental, descrito inicialmente por Löe y Theilade⁹⁵. Ha sido utilizado en investigación clínica como una herramienta en el estudio de la fisiopatología de la gingivitis en el cual se miden parámetros clínicos (placa e índice gingival)⁹⁶ e histológicos en lesiones asociadas a gingivitis para evaluar diferentes grados de inflamación, efectos de agentes farmacéuticos que inhiben la formación de placa bacteriana, así como el efecto en la inmunidad innata. Esto podría ayudar a comprender el

proceso inflamatorio gingival en humanos, en un tiempo corto y con reversión de la inflamación⁹⁵. Esta situación no se podría conocer exactamente en pacientes con gingivitis inducida de manera natural, puesto que no se tiene certeza en qué momento se inicia el proceso inflamatorio y, por tanto, no se puede hacer una correlación entre distintos parámetros clínicos y el inicio de la enfermedad. Sin embargo, una desventaja que tiene el modelo es la duración de la inducción ya que se lleva a cabo en un tiempo no prolongado; por lo tanto, solamente puede ser útil para conocer el fenómeno inflamatorio agudo. Al respecto, se han realizado modificaciones en la fase de inducción, a partir del modelo original de Löe⁵⁰, en el que propuso dos fases, la de inducción y la de resolución en un tiempo de 21 días. Posteriormente, ha sido modificado por el modelo experimental de Salvi⁹⁷ y Offenbacher⁹⁸. Ramírez-Thomé y cols.⁹⁹, realizaron un estudio de 35 días, en el que consideraron 28 días para la fase de inducción y 7 días para la fase de resolución (35 días), a diferencia de los estudios de Dommisch^{11,43} que propone un modelo de 14 días y no comprende una etapa de resolución de la gingivitis. Este modelo permite evaluar la expresión de AMPs, por ejemplo, Dommisch y cols. en el 2019⁴³ evaluaron la secuencia y expresión diferencial de las hBDs-2 y 3, quimiocina ligando 20 (CCL20), psoriasina/S100A7 (S100A7), y calgranulina A/B (S100A8, S100A9) en biopsias y fluido crevicular, el resultado indicó que hay una expresión elevada de ARNm en los diferentes AMPs explorados. Respecto al análisis de proteínas en muestras de fluido crevicular, encontraron un patrón de expresión similar para hBD-2 y CCL20. Con resultados similares, Dommisch y col.¹⁰⁰ monitorearon la expresión de hBD-2 e IL-8 en fluido crevicular, encontrando elevadas concentraciones de hBD-2 e IL-8. En otro estudio⁹⁹ donde se evaluaron parámetros clínicos, microbiológicos y expresión de hBD-1 y 2 en muestras de saliva, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de

hBD-2; sin embargo, se encontró una mayor concentración de hBD-1, en saliva total en el día 21 y 28 comparado con el día 0. Este aumento coincide con la elevación de hBD-1 durante la fase de inducción (estadísticamente significativa en relación a la hBD-2). Los resultados de diferentes estudios muestran que el comportamiento de los AMPs y que, posiblemente, el tiempo de inducción de la gingivitis genera un sesgo en el momento de comparar los resultados entre los diferentes estudios. En consecuencia, se requieren más estudios controlados con parámetros a medir más uniformes y concretos (Tabla 3).

Los estudios *in vitro*, presentan un papel importante en el esclarecimiento de la participación de las hBDs en la enfermedad periodontal. De acuerdo a Krisanaprakornkit y cols.⁷⁵, la incubación de células epiteliales gingivales con *F. nucleatum*, demostró un aumento en la expresión del RNAm de la hBD-2. Vankeerberghen y cols.¹⁰¹, examinaron la estimulación de las hBDs-1, 2, 3 y 4, utilizando células epiteliales incubadas con bacterias comensales y periodontopatógenas, encontrando que *F. nucleatum* incrementó la secreción de hBD-2 y hBD-3 en las células epiteliales, pero no la hBD-1 y la hBD-4. Por otro lado, *P. gingivalis* no estimuló la secreción de hBD-2 y hBD-4, pero si la secreción de hBD-1 tras 14 horas de incubación, siendo similar el resultado para *A. actinomycetemcomitans* que induce la secreción de hBD-1. La incubación de células epiteliales con *A. actinomycetemcomitans* indujo transitoriamente la expresión de hBD-3, pero después de 3 horas la expresión regresó a los niveles basales. Este cambio dependiente del tiempo en la secreción de las hBDs, puede ser atribuido a la virulencia de las bacterias, ya que invade monocapas de las células epiteliales gingivales en 90 minutos y después se replica intracelularmente. Durante la invasión, *P. gingivalis* inhibe la proliferación y migración de las células epiteliales, modulando el comportamiento de las células del

Tabla 3
β-defensinas en modelos experimentales.

Autor	Año	Modelo de estudio	β-defensina estudiada	Resultados del estudio
Dommsich ⁴³	2019	Gingivitis experimental	Secuencia y expresión diferencial de diferentes péptidos antimicrobianos.	La expresión de RNAm de los péptidos fue elevada, similar patrón de expresión de hBD-2 y CCL-20 en fluido crevicular.
Ramírez-Thomé ⁹⁹	2019	Gingivitis experimental	Parámetros clínicos, microbiológicos que se correlacionan con la expresión de β-defensinas 1 en saliva ⁵¹ .	Se encontró una mayor concentración de hBD-1 en los días 21 y 28 en comparación con el día 0, no se encontró una diferencia estadística con hBD-2.
Dommsich ¹⁰⁰	2015	Gingivitis experimental	Monitorear la expresión de AMPs e IL-18 en un modelo de gingivitis experimental.	Elevadas concentraciones de hBD-2 e IL-8 en el fluido crevicular.

hospedador para su propio beneficio e inhibiendo también la secreción de las hBDs ⁸. Otro estudio ⁶⁹, evaluó las hBDs-1, 2, 3, 4 y LL-37, y se encontró que las hBDs-2, 3 y 4 pero no hBD-1, estimulan a los queratinocitos humanos para incrementar su expresión génica y la producción de la proteína quimiotáctica para monocitos-1 (IP-10), proteína inflamatoria de macrófagos alfa-3, IL-6, IL-10, y RANTES (Tabla 4).

En un estudio donde se evaluó a la hBD-3, en CDs expuestas a hemaglutinina B (HagB) de *P. gingivalis*, se propone que HagB, induce la producción de metaloproteasas de la matriz (MMP) en las CDs y que la hBD-3 en conjunto con HagB, altera los perfiles de inducción de MMP, disminuyendo la respuesta de la MMP-1, 7 y 9; esto sugiere que hBD-3 puede alterar la producción de MMP inducida por antígenos antimicrobianos ¹⁰².

CONCLUSIÓN

Las hBDs son péptidos antimicrobianos con múltiples funciones cuyo objetivo principal es el de eliminar microorganismos en los epitelios. Se han identificado diversos tipos

de hBDs que producen lisis en las bacterias, además de efectos inmunoreguladores en los leucocitos. De igual modo, se han identificado algunos de los receptores que median la respuesta de las hBDs, en particular para hBD-3 mediado por TLR-4. Sin embargo, aún es necesario esclarecer otros receptores que podrían funcionar en el reconocimiento de la primera señal de activación de la célula, que continúa con la señalización y activación de genes con productos que modulan la respuesta inmunitaria, no solamente para hBD-3 si no también para las otras hBDs. Por otra parte, la evidencia muestra que las hBDs pueden inducir la producción de mediadores proinflamatorios; ahora bien, existen reportes sobre un posible efecto anti-inflamatorio ^{15,72,73}, por lo que deben ser esclarecidas las condiciones, receptores o vías de señalización que puedan favorecer este efecto.

Los diversos estudios en pacientes con EP han mostrado una participación fehaciente de estos AMPs como mecanismos de defensa en esta patología; sin duda, tienen un papel crucial dado que en la mayoría de los estudios realizados se ha encontrado, en general, un aumento en la producción de hBDs. Sin embargo, se requieren

Tabla 4
β-defensinas *in vitro*

Autor	Año	β-defensina estudiada	Modelo de estudio	Expresión
Niyonsaba ⁶⁹	2007	hBDs-2, 3, 4	Queratinocitos humanos	Incrementó la expresión de mediadores inflamatorios, proteína-1 quimiotáctica de monocitos, proteína inflamatoria de macrófago -3, RANTES, IL-6, IL-10, e IP-10.
Krisanaprakornkit ⁷⁵	2000	hBD-2	<i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i>	+ <i>F. nucleatum</i> , dispara la expresión del ARNm de la hBD-2. La ++ <i>P. gingivalis</i> evade el reconocimiento del hospedador.
Vankeerberghen ¹⁰¹	2005	hBDs-1, 2, 3, 4	Células epiteliales	+ <i>F. nucleatum</i> incrementa la secreción de hBD-2 y hBD-3. <i>P. gingivalis</i> , no estimula la secreción de hBD-2 y hBD-4, incrementa secreción de hBD-1 a las 14 horas de incubación ++ +A. <i>actinomyces comitans</i> induce secreción de hBD-1.

+*F. nucleatum*: *Fusobacterium nucleatum*, ++*P. gingivalis*: *Porphyromonas gingivalis*, ++ +A. *actinomyces comitans*: *Aggregatibacter actinomyces comitans*.

más estudios de forma integral en los cuales se puedan incluir un mayor número de pacientes con diferentes estadios de la EP, para cuantificar las hBDs-1, 2 y 3 en saliva y fluido crevicular en una sola intención, así como al finalizar el tratamiento periodontal. De esta forma se disminuirían los sesgos y se obtendría mayor información sobre el comportamiento de las hBDs durante la enfermedad clínica y en la resolución de la misma; también permitirían la obtención de resultados más homogéneos para analizar la posible utilización de las hBDs como indicador de la actividad inflamatoria en la EP. Adicionalmente, es indispensable continuar con el estudio experimental y clínico de las hBDs-4, 5 y 6, dado que no se tiene información sobre su efecto biológico y sobre la EP. Por otra parte, es importante considerar la degradación de hBDs por enzimas bacterianas y del hospedador y/o su inactivación, como por ejemplo por las concentraciones de NaCl, o en aquellos pacientes

que presenten una disminución en las hBDs y que en estos grupos de pacientes los péptidos no podrían funcionar como indicador de la EP.

Como se ha mencionado, el modelo de gingivitis experimental es muy útil para estudiar la inflamación gingival en un corto periodo de tiempo en su etapa inicial. Al respecto, se han realizado diversas modificaciones en el modelo de gingivitis experimental que han aportado información sobre mediadores inflamatorios; sin embargo, se requieren más investigaciones con mayor cantidad de pacientes en quienes se estudien las tres hBDs en saliva y fluido crevicular y añadir una última medición en la etapa de resolución, tal como la describe Ramírez-Thomé y cols. ⁹². Así, el modelo originalmente propuesto por Löe y cols., debe ser actualizado para generar un modelo completo, homogéneo, y estandarizado para todos; esto permitiría la comparación de los resultados entre diferentes publicaciones.

Finalmente, las hBDs podrían ser buenas candidatas para ser utilizadas como indicadores de la actividad inflamatoria de la EP; sin embargo, se deben realizar más estudios que permitan enriquecer los ya reportados, así como la publicación de artículos de revisión sistemática y meta análisis, para poder proponer a las hBDs como marcador de la actividad inflamatoria en la enfermedad periodontal.

REFERENCIAS

1. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 22;3:17038.
2. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol* 2018; 45:44–67.
3. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig T, García R, Giannobile, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Richard T, Kibscull M, Kinane D, Kirkwood K, Loos B, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher, Seymour G, Teles R, Tonetti M. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-Implant diseases and conditions. *J Clin Periodontol* 2018; 89(Suppl 1):173–182.
4. Oppermann RV, Haas AN, Rösing CK, Susin C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *Periodontol* 2000, 2015; 67:13–33.
5. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 2012; 91:914–920.
6. Eke PI, Borgnakke WS, Genco RJ. Recent epidemiologic trends in periodontitis in the USA. *Periodontol* 2000 2020; 82:257–267.
7. Feller L, Altini M, Khammissa RAG, Chandran R, Bouckaert M, Lemmer J. Oral mucosal immunity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 116:576-583.
8. Gursoy KU, Könönen E. Understanding the roles of gingival beta-defensins. *J Oral Microbiol* 2012; 4:1-10.
9. Niyonsaba F, Kiatsurayanon, Chieosilatham P, Ogawa H. Friends or foes? host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp Dermatol* 2017;26: 989–998.
10. Chang AM, Kantrong N, Darveau RP. Maintaining homeostatic control of periodontal epithelial tissue. *Periodontol* 2000 2021; 86:188–200.
11. Dommisch H, Açil Y, Dunsche A, Winter J, Jepsen S. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:186–190.
12. Zharkova MS, Orlov DS, Golubeva OY, Chakchir OB, Eliseev IE, Grinchuk TM, Shamova OV. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics-A novel way to combat antibiotic resistance? *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 30:9:128.
13. García J-RC, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez F-J, Klüver E, Adermann K. Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *The FASEB J* 2001; 15:1819–1821.
14. Kaiser V, Diamond G. Expression of mammalian defensin genes. *J Leukoc Biol* 2000;68:779-784.
15. Meade KG, O'Farrelly C. β -Defensins: Farming the microbiome for homeostasis and health. *Front. Immunol* 2019; 9:3072.
16. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL. Tracheal antimicrobial peptide, a novel cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 3952–3956.
17. Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* 1992; 267:23216–23225.
18. Skeate JG, Segerink WH, Garcia MD, Fernandez DJ, Prins R, Lühen KP, Voss FO, Da Silva DM and Kast WM. Theta-defensins inhibit high-risk human Papillomavirus infection through charge-driven capsid clustering. *Front Immunol* 2020; 11:561843.

19. **Xu D, Lu W.** Defensins: A double-edged sword in host immunity. *Front. Immunol* 2020; 11:764.
20. **Büyükkiraz E, Kesmen M.** Antimicrobial peptides (AMPs): a promising class of antimicrobial compounds. *J Appl Microbiol* 2021; 132:1–24.
21. **Enigk K, Jentsch H, Rodloff A C, Eschrich K, Stingü CS.** Activity of five antimicrobial peptides against periodontal as well as non-periodontal pathogenic strains. *J Oral Microbiol* 2020; 12:1829405.
22. **Mangoni ML, McDermott AM & Zasloff M.** Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Exp Dermatol* 2016; 25: 167–173.
23. **Jarczak J, Kościuczuk EM, Lisowski P, Strzalkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J.** Defensins: Natural component of human innate immunity. *Hum Immunol* 2013; 74:1069–1079.
24. **Ekuni D, Firth JD, Putnins EE.** Studies on periodontal disease. 1st Ed.3 Human Press:Springer(NY) 2014; p.53-75.
25. **Risso A.** Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukocyte Biol* 2000; 68:785–792.
26. **Lamont R, Diamond G, Maron JL, Güncü GN, Yilmaz D, Könönen E.** Salivary antimicrobial peptides in early detection of periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5:99.
27. **Niyonsaba F, Naگاoka I, Ogawa H.** Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties. *Crit Rev Immunol* 2006; 26:545-576.
28. **García JRC, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U.** Identification of a novel, multifunctional β -defensin (human β -defensin 3) with specific antimicrobial activity: Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell and Tissue Research* 2001; 306:257–264.
29. **Boman HG.** Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev immunol* 1995; 13:61-92.
30. **Abiko Y, Saitoh M.** Salivary defensins and their importance in oral health and disease. *Current Pharmaceutical Design* 2007; 13:3065–3072.
31. **Goebel C, Mackay LG, Vickers ER, Mather LE.** Determination of defensin HNP-1, HNP-2, and HNP-3 in human saliva by using LC/MS. *Peptides*. 2000; 21:757-765.
32. **Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T.** Levels of human defensin-1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;87:539-543.
33. **Niyonsaba F, Naگاoka I, Ogawa H & Okumura K.** Multifunctional antimicrobial proteins and peptides: natural activators of immune systems. *Curr Pharm Des* 2009; 15:2393–2413.
34. **Zasloff M.** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415:389–395.
35. **Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway B.** Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14961–14966.
36. **Shafer W.M.** Antimicrobial peptides and human disease. 1st Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (USA);2006, p.1-25.
37. **Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM.** Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276:5707–5713.
38. **Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC.** Human defensins. *J Mol Med (Berl)*. 2005; 83:587–595.
39. **Li X, Duan D, Wang P, Han B, Xu Y.** New finding of the expression of human beta defensin-4 in healthy gingiva. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2013; 31:165-168.
40. **Braff MH, Gallo RL.** Antimicrobial peptides: An essential component of the skin defensive barrier. Vol. 306, *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 306:91–110.
41. **Li X, Duan D, Yang J, Wang P, Han B, Zhao L, Jepsen S, Dommisch H, Winter J & Xu Y.** The expression of human β -defensins (hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4) in gingival epithelia. *Arch Oral Biol* 2016; 66:15–21.
42. **Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D & Kaku T.** Role of beta-

- defensins in oral epithelial health and disease. *Med Mol Morphol* 2007; 40:179–184.
43. **Dommisch H, Skora P, Hirschfeld J, Olk G, Hildebrandt L, Jepsen S.** The guardians of the periodontium—sequential and differential expression of antimicrobial peptides during gingival inflammation. Results from *in vivo* and *in vitro* studies. *J Clin Periodontol* 2019; 46:276–285.
 44. **Diamond G, Ryan L.** Beta-defensins: what are they really doing in the oral cavity? *Oral Dis.* 2011; 17:628-635.
 45. **Marshall RI.** Gingival defensins: Linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontol 2000* 2004; 35:14–20.
 46. **Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Kaku T.** Presence of human beta-defensin 2 peptide in keratinization in salivary gland tumor. *Oral Med Patol* 2000; 5:95-97.
 47. **Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E.** Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 2003; 32:586–594.
 48. **Gursoy UK, Könönen E.** Understanding the roles of gingival beta-defensins. *J Oral Microbiol* 2012;4:10.
 49. **Lamkin MS, Oppenheim FG.** Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4:251-259.
 50. **Schenkels LM, Veerman ECI, Nieuw A.** Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6:161-175.
 51. **Arellanes C, Toledo M, Jiménez V, Ávila B, Flores AL, Torres Anayetzin, Solórzano C.** Niveles de β -defensina 2 en saliva total en escolares de 6 a 12 años de edad con y sin obesidad y su relación con lesiones cariosas. Esteban López Ed. Oaxaca; Ciencias joven. Anuario del 3º Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Oaxaca, México: COCYT; 2016. P 39-41.
 52. **Arellanes C, Toledo M, Jiménez V, Ávila B, Flores AL, Torres Anayetzin, Solórzano C.** Beta-defesin-2, obesity and caries in children of 6 to 12 years. *Int J Mol Med* 2017;40:S60.
 53. **Koo HB, Seo J.** Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Pept Sci* 2019; 111:e24122.
 54. **Koprivnjak T, Peschel A.** Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:2243-2254.
 55. **Lee TH, Hall KN, Aguilar MI.** Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Curr Top Med Chem* 2016; 16:25–39.
 56. **Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK.** Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules* 2018; 8:4.
 57. **Hancock RE, Patrzykat A.** Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; 2:79–83.
 58. **Hale JD, Hancock RE.** Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5:951–959.
 59. **Teixeira V, Feio MJ, Bastos M.** Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res.* 2012; 51:149-177.
 60. **Le CF, Fang CM, Sekaran SD.** Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *antimicrob agents chemother.* 2017; 61:e02340-16.
 61. **Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G.** Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Front Pharmacol.* 2018; 9:281.
 62. **Hancock RE, Sahl HG.** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 2006; 24:1551-1557.
 63. **Chapple ILC, Mealey BL, van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger M, Genco R, Glogauer M, Goldstein M, Griffin T, Holmstrup P, Johnson G, Kapila Y, Lang N, Meyle J, Murakami S, Plemmons J, Romito G, Shapira L, Tatakis D, Teughels W, Trombelli L, Walter C, Wimmer G, Xenoudi P, Yoshie H.** Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-Implant diseases and conditions. *J Clin Periodontol* 2018; 45:S68–S77.

64. **Weyrich LS.** The evolutionary history of the human oral microbiota and its implications for modern health. *Periodontol* 2000. 2021; 85:90–100.
65. **Gorr SU, Abdolhosseini M.** Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2011; 38:126–141.
66. **Oztürk A, Kurt-Bayrakdar S, Avcı B.** Comparison of gingival crevicular fluid and serum human beta-defensin-2 levels between periodontal health and disease. *Oral Dis* 2021; 27:993–1000.
67. **Li J, Fernández-Millán P, Boix E.** Synergism between host defence peptides and antibiotics against bacterial infections. *Curr Top Med Chem* 2020; 20:1238-1263.
68. **Prasad SV, Fiedoruk K, Daniluk T, Piktel E, Bucki R.** Molecular sciences expression and function of host defense peptides at inflammation sites. *Int. J. Mol. Sci* 2020; 21:104.
69. **Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sa-yama K, Hashimoto K.** Antimicrobial peptides human β -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007; 127:594–604.
70. **Lewies A, Du Plessis LH, Wentzel JF.** Antimicrobial peptides: the achilles' heel of antibiotic resistance? probiotics antimicrob *Proteins* 2019; 11:370-381.
71. **Magrone T, Russo MA, Jirillo E.** Antimicrobial peptides: phylogenic sources and biological activities. First of two parts. *Curr Pharm des* 2018; 24:1043–1053.
72. **Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismüller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randell SH, Modlin RL.** Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 2003; 171:6820–6826.
73. **Vora P, Youdi A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen K S, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT.** Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J. Immunol* 2004; 173:5398–5405.
74. **Semple F, Dorin JR.** B-Defensins: multi-functional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun* 2012; 4:337–348.
75. **Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA.** Inducible expression of human-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: Multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect immun* 2000; 68: 2907–2915.
76. **Haney EF, Mansour SC, Hancock RE.** Antimicrobial peptides: An introduction. *Methods Mol Biol* 2017; 1548:3-22.
77. **Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B.** Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J* 2011; 278:3942-3951.
78. **Ganz T.** Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:710-720.
79. **Suarez-Carmona M, Hubert P, Delvenne P, Herfs M.** Defensins: “simple” antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26:361-370.
80. **Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H.** Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontal Res* 2007; 42:429-437.
81. **Ebrahim MA.** Expression of human beta defensins (HBDs) 1, 2 and 3 in gingival crevicular fluid of patients affected by localized aggressive periodontitis. *Saudi Dental Journal* 2013; 25:75–82.
82. **Yong X, Chen Y, Tao R, Zeng Q, Liu Z, Jiang L, Ye L, Lin X.** Periodontopathogens and human β -defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. *J Periodontal Res* 2015; 50:403–410.
83. **Brancatisano FL, Maisetta G, Barsotti F, Esin S, Miceli M, Gabriele M.** Reduced human beta defensin 3 in individuals with periodontal disease. *J Dent Res* 2011; 90:241–245.
84. **Costa LCM, Soldati KR, Fonseca DC, Costa JE, Abreu MHNG, Costa FO.** Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin 1 in individuals with and without chro-

- nic periodontitis. *J Periodontol* 2018; 53:736–742.
85. **Pereira A, Costa L, Soldati K, Guimarães de Abreu M, Costa F, Zandim-Barcelos D.** Gingival Crevicular fluid levels of human beta-defensin 2 and 3 in healthy and diseased sites of individuals with and without periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 2020; 22:90–99.
 86. **Sidharthan S, Dharmarajan G, Kulloli A.** Gingival crevicular fluid levels of interleukin-22 (IL-22) and human β defensin-2 (hBD-2) in periodontal health and disease: A correlative study. *J Oral Biol Craniofacial Res* 2020; 10:498–503.
 87. **Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M, Batoni G.** Gingipains produced by *Porphyromonas gingivalis* ATCC49417 degrade human- β -defensin 3 and affect peptide's antibacterial activity in vitro. *Peptides* 2011; 32:1073–1077.
 88. **Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB, O'Neill S.** Inactivation of human β -defensins 2 and 3 by Elastolytic Cathepsins. *J Immunol* 2003; 171:931–937.
 89. **Pingel LC, Kohlgraf KG, Hansen CJ, Eastman CG, Dietrich DE, Burnell KK, Srikantha RN, Xiao X, Be langer M, Prog- ulske-Fox A, Cavanaugh JE, Guthmiller JM, Johnson GK, Joly S, Kurago ZB, Dawson DV, Brogden KA.** Human beta- defensin 3 binds to hemagglutinin B (rHagB), a non-fimbri- al adhesin from *Porphyromonas gingivalis*, and attenuates a pro-inflammatory cytokine response. *Immunol Cell Biol* 2008; 86:643–649.
 90. **Yin L, Chino T, Horst OV, Hacker BM, Clark EA, Dale BA, Chung WO.** Differential and coordinated expression of defensins and cytokines by gingival epithelial cells and dendritic cells in response to oral bacteria. *BMC Immunol* 2010; 11:37.
 91. **Cutler CW, Teng YT.** Oral mucosal dendritic cells and periodontitis: many sides of the same coin with new twists. *Periodontol* 2000 2007; 45:35-50.
 92. **Zhou L, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR.** IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8:967-974.
 93. **Goulvestre C, Batteux F, Charreire J.** Chemokines modulate experimental autoimmune thyroiditis through attraction of autoreactive or regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002; 32:3435-3442.
 94. **Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadhowsky J, Harding CV, Weinberg A, Sieg SF.** Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:18631-18635.
 95. **Loe H, Theilade E, Jensen Sb.** Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36:177-187.
 96. **Yamamoto M, Aizawa R.** Maintaining a protective state for human periodontal tissue. *Periodontol* 2000 2021; 86:142-156.
 97. **Salvi GE, Franco LM, Braun TM, Lee A, Rutger Persson G, Lang NP, Giannobile WV.** Pro-inflammatory biomarkers during experimental gingivitis in patients with type 1 diabetes mellitus: a proof-of-concept study. *J Clin Periodontol* 2010; 37:9-16.
 98. **Offenbacher S, Barros SP, Paquette DW, Winston JL, Biesbrock AR, Thomason RG, Gibb RD, Fulmer AW, Tiesman JP, Juhlin KD, Wang SL, Reichling TD, Chen KS, Ho B.** Gingival transcriptome patterns during induction and resolution of experimental gingivitis in humans. *J Periodontol* 2009; 80:1963-1982.
 99. **Ramirez T, Díaz C, Franco A, Jimenez C, Vargas C, Solorzano M.** Expression of beta-defensins 1 and 2 in total saliva in individuals with a 35-day experimental gingivitis model. *Int J Mol Med* 2019; 44:45.
 100. **Dommisch H, Staufienbiel I, Schulze K, Stiesch M, Winkel A, Fimmers R.** Expression of antimicrobial peptides and interleukin-8 during early stages of inflammation: An experimental gingivitis study. *J Periodontol Res* 2015; 50:836–845.
 101. **Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quirynen M, Cassiman JJ, Cuppens H.** Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal com-

-
- mensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *J Periodontol* 2005; 76:1293–1303.
102. Raina M, Bates AM, Fischer CL, Progulsk-Fox A, Abbasi T, Vali S, Brogden KA. Human beta defensin 3 alters matrix metalloproteinase production in human dendritic cells exposed to *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B. *J Periodontol* 2018; 89:361-369.