



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD
DE LAS MAPK INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDOS
(LPS) EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS (HGF)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ANABEL CONTRERAS SÁNCHEZ

TUTORA: Dra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

Proyecto financiado por PAPIIT IN218609-3



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el privilegio de tener un lugar y de ser parte de la Máxima casa de estudios, por todo el conocimiento y la cultura que me ha otorgado, y sobre todo en la contribución en mi desarrollo y superación profesional y personal.

A la Facultad de Odontología por todo el conocimiento otorgado durante mi estancia en ella

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por creer y tener gran confianza en mí; por todo su apoyo, aliento, estímulo y conocimiento otorgado, por lo cuál siempre le estaré eternamente agradecida, considerándola más que una tutora para mí.

Dedicatorias

A Dios por darme el privilegio de tener esta vida tan maravillosa y darme la mejor familia del mundo que es tan importante para mí. Por estar a mí lado en cada paso que doy, por cuidarme en cada momento de mi vida, por rodearme de cosas maravillosas. Gracias

A mi padre, por ser siempre un padre maravilloso, por todo lo que ha hecho por mí, y que siempre me impulsa a ser una mejor persona en todos los aspectos y a seguir adelante, a siempre levantarme y a no conformarme; protector y que cuida y cuidará por siempre de mi pase lo que pase y que sepa que yo también siempre cuidaré de él. Te amo papá

A mi madre un ser maravilloso que me dio la vida, una madre mejor no pudo haber existido, que toda la vida me ha dado su apoyo y amor incondicional, que a cada paso de mi vida siempre esta ahí, por creer y tener fe en mí; por siempre alentarme de que puedo lograr todo lo que me proponga, por su apoyo en todos los aspectos de mi vida, y porque se que siempre estará ahí conmigo. Te amo mamá

A mi hermano por darle muchísima alegría a mi vida desde el momento en que existió, por querer que siempre esté con una sonrisa en la boca, por preocuparse por mí en todos los aspectos de mi vida, por ayudarme en todo lo que necesite y por saber que pasemos lo que pasemos en la vida siempre estaremos el uno para el otro. Te amo hermano

A mi familia: A mi abuelita Chelo por quererme tanto como yo te quiero a ti, sabes lo importante que eres y que siempre serás para mí, por siempre consentirme y querer que sea feliz, siempre agradeceré que hayas sido mi abuelita. Te quiero abue

A mi abuelito Sacra que aunque ya no estas aquí conmigo siempre te estaré eternamente agradecida por todo lo que hiciste por mí y

por mi familia, por lo tierno que fuiste conmigo, siempre te voy a querer y te tendré en mi mente y en mi corazón.

A mis abuelitos Eladio, Chata y Macaria que aunque no estén conmigo los voy a tener en mi mente y corazón toda mi vida.

A mis tías: A mis tías Lilia y Guille por quererme, por su fe y confianza, por creer en mí y consentirme y a la vez mostrarme lo que es luchar a través de la vida. Las quiero

A mis tías Aurora, Chilo y Chela porque durante todo este tiempo de mi vida me han dado muchísimo cariño, por alentarme apoyarme y procurarme desde pequeña, siempre las voy a querer.

A mis primos: Gracias Mau por tu apoyo a pesar de la distancia. A Carlitos por estar conmigo desde pequeña cuidándome y protegiéndome, por todo el cariño que me has dado a lo largo de todos estos años, por todas las risas y los momentos felices que he compartido contigo, por tus consejos y por todos esos momentos. Muchas gracias

A Yazmín, porque en lugar de una prima eres como una hermana mayor para mí, por todos esos momentos a lo largo de mi vida que pase contigo y por tu apoyo incondicional.

A Beba como decirte que pienso en ti como una hermana mas que en una prima, muchas gracias por todo tu apoyo, cariño y risas a través de todo este tiempo, te quiero prima. A Gera te quiero primo gracias por tu apoyo cuando lo necesité.

A Yuri y Miguel que a pesar de la distancia y tiempo gracias, los quiero.

A Aline, Sergio y Laura por compartir momentos de alegría, felicidad y juegos desde pequeña.

A Memo, Sebastián y Tamara gracias pequeños no saben como me apoyaron a lo largo de mi carrera, los quiero.

Rebe, Chucho, Ricardo, Andrés y Kala gracias por su cariño y apoyo.

A toda mi familia, gracias por su confianza y por creer y tener fe en mí. Los quiero

A mis amigos: Oscar, Joel, Rosa, Gissel, Martha, Pedro y Julián; por su gran apoyo y confianza, ya que siempre creyeron en mí a lo largo de mi carrera y de mi vida. Los quiero

A Juan Antonio, Giro y Omar muchas gracias por su apoyo y ayuda, la confianza y los conocimientos que me otorgaron en el laboratorio.

A todos los pacientes que me apoyaron y tuvieron confianza en mí. Muchas gracias

1.0 Resumen

La enfermedad periodontal ha sido un gran problema de salud pública, y aunque es una enfermedad multifactorial, que se caracteriza por la presencia de una gran variedad de bacterias periodontopatógenas que provocan esta enfermedad, en su mayoría Gram negativas, los cuales presentan en su membrana externa celular lipopolisacáridos, una de las toxinas que causan la enfermedad periodontal, y estimulan la inflamación y lisis celular.

Se han presentado varias publicaciones en donde se mencionan la acción de los flavonoides, una sustancia de origen vegetal, en cuyas propiedades se ha demostrado que posee características, antiinflamatorias, antineoplásicas, y antioxidantes entre otras, y se ha demostrado su acción en diferentes tipos de células.

En el presente estudio se pretende plantear los beneficios que tienen estas sustancias ante el tratamiento de la enfermedad periodontal, principalmente en células HGF (Fibroblastos gingivales humanos), y la acción de lipopolisacáridos (componente celular inducida por bacterias periodontopatógenas gramnegativas) ante diferentes tipos de flavonoides.

La investigación en materia de flavonoides como antiinflamatorio es muy variada y mas con respecto a la enfermedad periodontal.

Será de gran relevancia su efecto a nivel de salud pública con su continua investigación, si se logra determinar el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación o degradación de diferentes MAPK (Proteínas cinasas activadas por mitógenos) inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos, puede ser un importante y determinante elemento como tratamiento auxiliar en pacientes con enfermedad periodontal, debido a que será de gran importancia saber si de alguna manera la vía de transducción de señales intracelular de ERK1/2, pJNK, pp38, pAKT, COX 2 e IκB inducida por lipopolisacáridos de la superficie de membrana de las bacterias gram negativas, es inhibida o disminuida por acción de los flavonoides en este caso ;Luteolina, Morina, Myricetina y Fisetina.

De esta manera la inhibición de la fosforilación de las diferentes cinasas en fibroblastos gingivales humanos inducida por lipopolisacáridos muestra una alternativa en el tratamiento de la enfermedad periodontal, coadyuvada por las diferentes fases de tratamiento.

2.0 Planteamiento del problema

La enfermedad periodontal debe considerarse un proceso infeccioso bacteriano crónico. En su etiología, no hay una única especie bacteriana implicada, sino que podríamos considerarla como una infección polimicrobiana en la que estarían implicados diversos microorganismos.

*Las bacterias que se han asociado más directamente con la enfermedad periodontal son *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola*. En la superficie de las membranas de las bacterias Gram negativas, que participan en la enfermedad periodontal, producen lipopolisacáridos, endotoxinas que producen procesos inflamatorios y lisis celular en los tejidos periodontales.*

Cuando se afectan las estructuras de soporte la enfermedad se denomina periodontitis. Hay continuos cambios desde la gingivitis marginal hasta la periodontitis, y se emplea de manera genérica el término de enfermedad periodontal para poder referirse a todo este proceso.

Son varios los trastornos que afectan los tejidos de soporte en los dientes. El trastorno más frecuente por mucho, comienza por la acumulación de placa en la zona gingivo dental y en general es de carácter inflamatorio.

En este estudio se trabajó con flavonoides los cuales son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana, se encuentran en vegetales, semillas, frutas, flores, en extractos de plantas, etc. Poseen propiedades antioxidantes; antiinflamatorias; antitrombóticas; antimicrobianas; antialérgicas; antitumorales; y antiasmáticas. Por lo que decidimos evaluar el papel de los flavonoides sobre los efectos de endotoxinas derivadas de microorganismos presentes en la placa dentobacteriana.

Una vez tomando en cuenta la problemática del estudio, se decidió caracterizar la señalización celular que se da entre fibroblastos gingivales humanos y los lipopolisacáridos (toxinas liberadas por bacterias gram negativas responsables de la enfermedad periodontal), cuando entran en contacto con diferentes flavonoides.

En el laboratorio se ha estudiado el efecto de los flavonoides que conduce a la fosforilación de proteínas, de igual forma promueve la activación de las MAPK (ERK, JNK y p38), la inducción de COX-2 y la degradación de I κ B.

3.0 Justificación del Estudio

*Estudiar el efecto de los flavonoides sobre la acción del lipopolisacárido obtenido de *Porphyromonas gingivalis*, sería de gran relevancia por su efecto a nivel de salud pública, ya que si se logra determinar el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de las MAPK inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos, será un importante y determinante elemento en el tratamiento de pacientes con enfermedad periodontal, debido a su gran importancia para conocer la regulación de la vía de transducción de señalización intracelular de las MAPK inducida por lipopolisacáridos y su inhibición por acción de los flavonoides, en este caso; Luteolina, Morina, Myricetina y Fisetina (los flavonoides específicos en los cuales se trabajó en esta investigación).*

Todo esto llevará a un importante método de tratamiento a pacientes que presentan enfermedad periodontal, y de igual manera este estudio nos ayudará en un futuro a promover la investigación de estos compuestos polifenólicos en el campo de la odontología, donde se pueden aplicar sus diferentes propiedades y mecanismos antiinflamatorios, antiapoptóticos entre otros.

Por supuesto todo esto tomando en cuenta la importancia de que el paciente tendrá que tomar previamente las fases de tratamiento periodontal:

Fase I: Sistémica

En esta fase lo que buscamos es conocer enfermedades cardiovasculares, renales, respiratorias etc. La presencia de ciertas enfermedades nos puede modificar el tratamiento o posponerlo (en el caso que necesitemos una interconsulta). (1,2)

Fase II: Etiológica

La mayoría de las enfermedades periodontales pueden ser tratadas con esta terapia, ya que aquí van a caer todas las gingivitis crónicas o asociadas a placa y también se incluyen las periodontitis incipientes e incluso moderadas. A esta terapia le podríamos adicionar antibioticoterapia y técnica de raspado y alisado radicular. (1,2)

Fase III: Correctora

Corresponde a la fase quirúrgica, esta puede ser de acceso ó exploratoria. (1,2)

Fase IV: Mantenimiento

Procedimientos realizados a intervalos de tiempo con el fin de mantener la salud bucal ya alcanzada con el tratamiento.

Es una parte integral del tratamiento periodontal, comienza una vez terminada la terapia activa y continua durante la vida de las piezas dentarias. (1,2)

Puede corregir deficiencias de las fases II y III. (1,2)

4.0. Introducción

Algunas de las enfermedades bucodentales más comunes y con más prevalencia a nivel mundial es la Caries dental y la Enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal esta compuesta de reacciones inflamatorias en los tejidos periodontales inducidas por la acumulación de bacterias en la vecindad de la encía ,esto dirige a la inflamación gingival y la destrucción del tejido periodontal acompañada de pérdida de hueso alveolar, y en casos severos es acompañada por exfoliación dental.

El principal factor etiológico de esta enfermedad es la presencia de la placa dentobacteriana o también denominado biopelícula, aunque se puede decir que es una enfermedad multifactorial, que se caracteriza por la presencia de una variada serie de bacterias periodontopatógenas, la enfermedad periodontal debe considerarse un proceso infeccioso bacteriano crónico. En su etiología, no hay una única especie bacteriana implicada, sino que podríamos considerarla como una infección polimicrobiana en la que están implicados diversos microorganismos.

*Las bacterias que se han asociado más directamente con la enfermedad periodontal son *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola* entre otros; que provocan esta enfermedad, en su mayoría bacterias Gram negativas, los cuales presentan en su membrana externa celular lipopolisacáridos, una de las toxinas causantes de la enfermedad periodontal, y por lo tanto provoca la inflamación y lisis celular.*

Existe en la literatura una gran variedad de trabajos de investigación científica y artículos que hablan acerca de los mecanismos de acción de los flavonoides, los cuales, son sustancias de origen vegetal, polifenólicas, cuyas propiedades poseen características antiinflamatorias, antineoplásicas, antioxidantes entre otras, y se ha demostrado su acción en diferentes tipos de células.

En dichos trabajos de investigación, se plantea la acción de estas sustancias en la enfermedad periodontal, específicamente en fibroblastos gingivales humanos.

Y se ha planteado las acciones que tienen los diferentes flavonoides en los procesos de inflamación de los tejidos periodontales; ya que se ha demostrado que dichos flavonoides tienen un efecto inhibitorio en la activación de las MAPK que son inducidas por diferentes PAMPs (Patrón molecular asociado a patógenos).

En el presente estudio se pretende plantear los beneficios que tendrían estas sustancias ante el tratamiento de la enfermedad periodontal, principalmente en fibroblastos gingivales humanos, y como actúan diferentes tipos de flavonoides ante lipopolisacáridos inducidas por bacterias periodontopatógenas gram-.

5.0 Antecedentes

Los flavonoides son conocidos como drogas naturales que poseen varias actividades biológicas y farmacológicas incluyendo anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, inmunomodulatorias y actividades trombóticas.

Muchas investigaciones han demostrado que la variedad de los flavonoides poseen actividad antiinflamatoria en varios modelos de inflamación. Especialmente algunos flavonoides han encontrado inhibir la inflamación crónica de varios modelos experimentales.

Se han propuesto varios mecanismos de acción celular explicando actividades antiinflamatorias de los flavonoides.

Ellos pueden regular las actividades celulares relacionadas con la inflamación en mastocitos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos.

También algunos flavonoides inhiben la liberación de histamina de mastocitos y otras inhiben la proliferación de células T. (3,4)

Existen varios trabajos de investigación que hablan acerca de la aplicación de flavonoides en la enfermedad periodontal.

Reportes en la literatura citan la activación por LPS un gran número de señales intracelulares en macrófagos y neutrófilos pueden ser bloqueados por flavonoides. Ya que la enfermedad periodontal es ocasionada por endotoxinas bacterianas. (5,6)

Así mismo la literatura notifica que la activación por LPS en un gran número de macrófagos y neutrófilos en la señalización intracelular puede ser bloqueada por flavonoides. (5,7)

Los mecanismos moleculares involucrados de los flavonoides incluyen la inhibición de cinasa con actividad de la tirosina y serina, actividades por competencia con el sitio de unión del ATP.(8,9)

Esta acción es importante porque la activación de la cinasa es un evento crucial en la vía de transducción de señales, por lo tanto una vez inhibido la síntesis de citocina y su liberación son también bloqueadas.

Así mismo se ha reportado que los flavonoides también ejercen efectos antiinflamatorios por la inhibición de óxido nítrico y la producción de prostaglandinas E2. (10)

*Los flavonoides a parte de mostrar prevención ante la inflamación gingival también se muestra como un bactericida y con efectos anti-proteolíticos contra *P. gingivalis* y protegen a las células del ligamento periodontal de citotoxicidad bacteriana. (11)*

6.0 Periodonto

El periodonto comprende de los siguientes tejidos: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar.

La función principal del periodonto es unir el diente al tejido óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal.

6.1 Encía

La encía es parte de la mucosa masticatoria que recubre el proceso alveolar y rodea la porción cervical de los dientes.

En sentido coronario, la encía rosada coral termina en el margen gingival libre, que tiene un contorno festoneado. En sentido apical, la encía se continúa con la mucosa alveolar (mucosa tapizante), laxa y de un rojo oscuro, de la cuál esta separada por lo que es, habitualmente, un límite fácil de reconocer llamado límite mucogingival o línea mucogingival. (2)

Línea mucogingival.-*Esta línea en la zona de incisivos y caninos se localiza aproximadamente a 3 mm apical a la cresta del hueso alveolar en las superficies radiculares, y a 5 mm de los espacios interdentes. En dientes con enfermedad periodontal, o dientes sin enfermedad en malposición el hueso se localiza más apicalmente y puede extenderse más allá de la línea mucogingival. (1)*

Se pueden distinguir tres zonas de la encía:

6.1.1. Encía libre o marginal

La encía libre es de color coral, tiene una superficie opaca y consistencia firme y comprende el tejido gingival y las zonas vestibular y lingual/palatino de los dientes, y la encía interdentaria o papilas interdentarias. En el lado vestibular y lingual de los dientes, la encía libre se extiende desde el margen gingival libre en sentido apical hasta el surco apical libre que esta ubicado en un nivel que se corresponde con el nivel de la unión o límite cementoadamantino. Al término de la erupción el margen gingival libre se ubica sobre la superficie adamantina, midiendo aproximadamente de 0.5-3mm en sentido coronal.(2)

Esta encía se asemeja a un listón de 1 a 2 mm de ancho, que contornea con su borde libre la corona clínica. Se trata de un tejido fibroso muy resistente cubierto por epitelio queratinizado.

La unión de la encía libre con la pared dentarias forman el surco gingival de 0.5 a 3 mm de profundidad, normalmente y con salud gingival. En esta región del surco, el epitelio que cubre la encía no se encuentra queratinizado, en el fondo del surco gingival, el epitelio se encuentra adherido al diente por medio de una inserción epitelial. (1)

6.1.2. Encía adherida o insertada

En sentido coronario esta señalada por el surco gingival libre o cuando el surco no esta

presente, por un plano horizontal ubicado en el nivel del límite cemento adamantino. La encía adherida se extiende en dirección apical hacia la unión mucogingival, donde se continúa con la mucosa alveolar.

Tiene una textura firme, en raza caucásica generalmente tiene un color rosa coral y suele mostrar un punteado delicado que le da aspecto de cáscara de naranja. (2)

El ancho de esta encía en la zona vestibular difiere en las diferentes zonas de la boca. En la maxila, en la zona de los incisivos tienen un ancho de 3.5 mm a 4.5 mm, en la zona de premolares y molares de 1.9 mm. En la mandíbula la zona de incisivos tiene una anchura de 3.3 mm a 3.9 mm y en la zona de premolares y molares tiene un espesor de 1.8 mm.(1)

6.1.3 Encía interdentaria

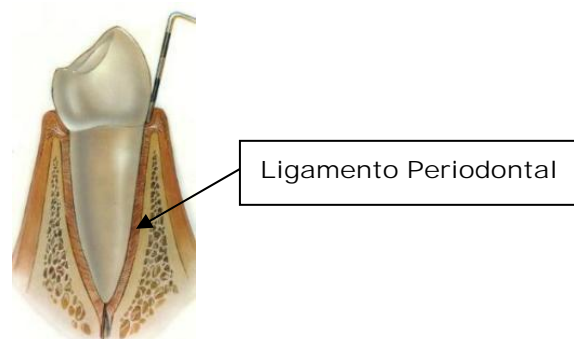
La forma de la encía interdentaria está determinada por las relaciones de contacto entre los dientes, la anchura de las superficies dentarias proximales y el curso de la unión cementoadamantina .En las regiones anteriores de la dentadura, la papila dental tiene forma piramidal, mientras que en las regiones molares las papilas suelen estar más aplastadas en sentido vestibulo lingual.

Debido a la presencia de las papilas interdentarias, el margen gingival libre sigue un curso festoneado, más o menos acentuado a lo largo de los dientes. (2)

Así las papilas interdentarias en estas zonas, suelen tener una porción vestibular y otra lingual o palatina separadas por la región llamada col o collado. (1)

6.2. Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es el tejido conectivo blando, muy vascularizado y celular que rodea los dientes y une el cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar propiamente dicho .En sentido coronario, el ligamento periodontal se continúa con la lámina propia de la encía y esta separado de ésta por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta del hueso alveolar con la raíz (fibras de la cresta alveolar). (2)



6.3 Cemento radicular

El cemento es un tejido mineralizado especializado que recubre las superficies radiculares y, ocasionalmente pequeñas porciones de las coronas dentarias, no encierra vasos

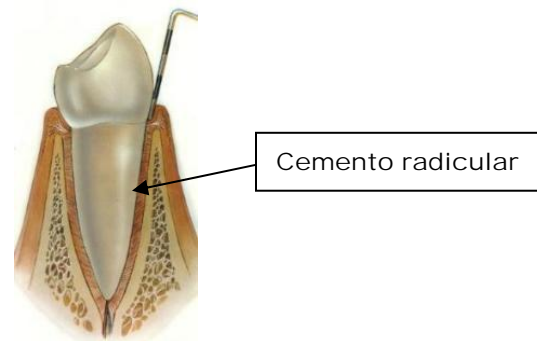
sanguíneos ni linfáticos, no posee inervación. Consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica. Su contenido mineral es hidroxiapatita. Se reconocen distintos tipos de cemento: (2)

6.3.1. Cemento primario o acelular

Se forma conjuntamente con la raíz y la erupción dentaria (2)

6.3.2. Cemento secundario o celular

Se forma después de la erupción dentaria y en respuesta a las exigencias funcionales. Sin embargo sobre la superficie radicular pueden alternar áreas de cemento acelular y celular. (2)



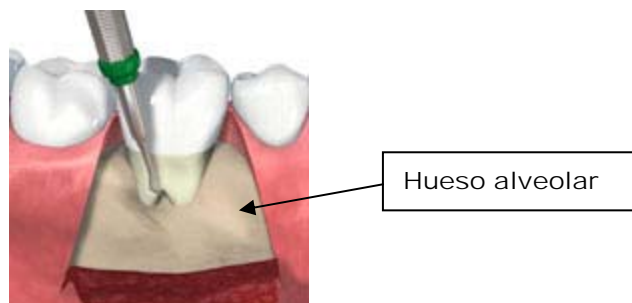
6.4 Hueso alveolar

La apófisis alveolar, o proceso alveolar, puede ser definida como aquella parte de los maxilares, superior e inferior, que forma y sostiene los alveolos de los dientes.

El proceso alveolar se desarrolla conjuntamente con la formación y erupción de los dientes y se reabsorbe gradualmente cuando los dientes se pierden.

Dicho proceso óseo está formado en parte por células del folículo dentario (hueso alveolar propio) y por células que son independientes del desarrollo dentario.

Junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal, el hueso alveolar constituye el aparato de inserción de los dientes, cuya función principal es distribuir y reabsorber las fuerzas generadas como la masticación. (2)



7.0. Enfermedad Periodontal

7.1 Definición

La enfermedad periodontal esta compuesta de reacciones inflamatorias en los tejidos periodontales inducidas por la acumulación de bacterias en la vecindad de la encía, esto dirige a la inflamación gingival y la destrucción del tejido periodontal acompañada de pérdida de hueso alveolar, y en casos severos es acompañada por exfoliación dental. Es una enfermedad multifactorial que puede estar involucrada en infecciones virales y bacterianas, lesiones traumáticas, síndromes congénitos, afecciones autoinmunes o alteraciones ectodérmicas.(2)

7.2 Clasificación de enfermedades y lesiones periodontales (12)

I. Enfermedades gingivales

A.- Enfermedad por placa dental

- 1.- Gingivitis asociada únicamente a placa
 - a. Sin otros factores locales contribuyentes
 - b. Con otros factores locales contribuyentes
 - 2 Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos
 - a. Asociadas al sistema endocrino
 - 1) En la pubertad
 - 2) En el ciclo menstrual
 - 3) En el embarazo
 - a) gingivitis
 - b) granuloma piógeno
 - 4) Gingivitis en diabetes mellitus
 - b. Asociadas a discrasias sanguíneas
 - 1) Gingivitis en la leucemia
 - 2) Otras
- 3 Enfermedades gingivales influenciadas por medicación
 - a. Influenciada por drogas
 - 1) agrandamientos gingivales inducidos por drogas
 - 2) gingivitis influenciada por drogas
 - b. Influenciada por anticonceptivos
 - c. Otros
- 4 Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición
 - a. Gingivitis por deficiencia de ácido ascórbico

b. Otros

B.- Enfermedades gingivales no asociadas a la placa

1 Lesiones originadas por bacterias específicas

- a. *Neisseria gonorrhoea*
- b. *Treponema pallidum*
- c. *Streptococcal sp.*
- d. Otras variedades

2 Enfermedad gingival de origen viral

- a. Infecciones por herpes
 - 1) *gingivostomatitis primaria*
 - 2) *herpes oral recurrente*
 - 3) *varicela-zoster*
- b. Otras

3 Enfermedad gingival de origen fúngico

- a. Infecciones por *Candida sp.*
 - 1) *Candidiasis gingival generalizada*
- b. *Eritema gingival lineal*
- c. *Histoplasmosis*
- d. Otras

4 Lesiones gingivales de origen genético

- a. *Fibromatosis gingival hereditaria*
- b. Otras

5 Manifestaciones gingivales de ciertas condiciones sistémicas

a. *Desórdenes mucocutáneos*

- 1) *liquen plano*
- 2) *penfigoide*
- 3) *pénfigo vulgar*
- 4) *eritema multiforme*
- 5) *lupus eritematoso*
- 6) *inducido por drogas*
- 7) *otros*

b. *Reacciones alérgicas*

1) *Materiales dentales*

a) *mercurio*

b) *níquel*

c) *acrílico*

d) *otros*

2) *Reacciones atribuibles a*

a) dentífricos

b) enjuagues bucales

c) aditivos del chicle

d) alimentos y aditivos

3) Otros

6 Lesiones traumáticas (iatrogénicas, accidentales, incidentales)

a. Químicas

b. Físicas

c. Térmica

7 Reacciones a cuerpo extraño

8 No especificadas (NES)

II Periodontitis

II.- Periodontitis crónica

A. Localizada

B. Generalizada

III.- Periodontitis agresiva

A. Localizada

B. Generalizada

IV.- Periodontitis con manifestaciones de enfermedades sistémicas

A. Asociada con desórdenes hematológicos

1. Neutropenia adquirida

2. Leucemias

3. Otras

B. Asociada con desórdenes genéticos

1. Neutropenia cíclica y familiar

2. Síndrome de Down

3. Síndrome de deficiencia de adherencia de leucocitos

4. Síndrome de Papillon-Lefevre

5. Síndrome de Chediak-Higashi

6. Síndrome de histiocitosis

7. Enfermedad de almacenamiento de glucógeno

8. Agranulocitosis genética infantil

9. Síndrome de Cohen

10. Síndrome de Ehlers-Danlos (tipo IV y VII)
11. Hipofosfatasa
12. Otras

C. No especificadas (NES)

V.- *Enfermedades periodontales necrotisantes*

A. Gingivitis ulcerativa necrosante (GUN)

B. Periodontitis ulcerativa necrosante (PUN)

VI.- *Abscesos en el periodonto*

A. Absceso gingival

B. Absceso periodontal

C. Absceso pericoronar

VII.- *Periodontitis asociadas con lesiones endodóncicas*

A. Lesión combinada endoperiodontal

VIII.- *Deformidades y condiciones del desarrollo y adquiridas*

A. Factores localizados al diente que modifican o predisponen la acumulación de placa que inducen enfermedad gingival y periodontitis.

1. Factores de la anatomía dentaria
2. Restauraciones y aparatos dentales
3. Fracturas radiculares
4. Resorción radicular cervical y fisuras cementarias

B. Deformidades mucogingivales y condiciones alrededor del diente

1. Recesión gingival y de tejidos blandos
 - a. Superficies vestibulares y linguales
 - b. Interproximal o papilar
2. Falta de encía queratinizada
3. Vestíbulo poco profundo
4. Posición aberrante de el frenillo / muscular
5. Excesos gingivales
 - a. Bolsa gingival (pseudobolsa)
 - b. Margen gingival inconsistente
 - c. Despliegue gingival excesivo

d. Agrandamientos gingivales

6. Coloración anormal

C. Deformidades mucogingivales y condiciones de procesos edéntulos

1. Deficiencia horizontal / vertical del proceso
2. Falta de tejido gingival queratinizado
3. Agrandamiento de tejidos blandos/gingivales
4. Posición aberrante de frenillo /muscular
5. Vestíbulo poco profundo
6. Coloración anormal

D. Trauma oclusal

1. Trauma oclusal primario
2. Trauma oclusal secundario

7.3. Prevalencia de la enfermedad periodontal

Las enfermedades bucales continúan siendo un problema de salud pública a nivel mundial, por el impacto que generan en la calidad de vida de las personas y comunidades, siendo la caries y la enfermedades periodontal las más importantes en la población adulta.

Las poblaciones sin ventajas económicas continúan siendo las más afectadas, lo que implica un gran desafío para los países de América Latina más aún cuando se espera que la carga de enfermedades bucales y, en especial de las periodontales, aumente por la falta de acceso a servicios, la alta prevalencia de tabaquismo y diabetes, entre otras causas.

En América Latina existe una escasa producción científica en el tema, así como una gran heterogeneidad en la calidad de artículos científicos.

Actualmente se plantea que sólo un porcentaje de la población mundial adulta tiene periodontitis severa (5-15%); que no todas las gingivitis progresan a periodontitis, pero que todas las periodontitis se inician con una gingivitis; y que la mayor destrucción periodontal observada en las personas de mayor edad es reflejo de la acumulación del daño ocurrido a través de la vida más que producto de alguna condición específicamente relacionada con la edad.

En cuanto al diagnóstico de periodontitis, la medición clínica básica para establecer su presencia es la evaluación del nivel de inserción clínico y la determinación de la presencia y profundidad de la bolsa periodontal.

Sin embargo, se ha planteado que en los países de América Latina no existen estudios de prevalencia de enfermedades periodontales representativos del nivel nacional y que los pocos estudios existentes han sido realizados en muestras de sub poblaciones con representatividad discutible y métodos diversos de evaluación de enfermedad periodontal representativos del nivel nacional y que los pocos estudios existentes han sido realizados en muestras de sub poblaciones con representatividad discutible y métodos diversos de evaluación de enfermedad.(13)

Sin embargo, en términos generales, es posible concluir que la prevalencia de enfermedades periodontales varía entre 3.75% y 100%, siendo mayor la magnitud del

daño periodontal a medida que avanza la edad. (13)

7.4. Factores de riesgo que afectan la prevalencia de la enfermedad periodontal

7.4.1 Edad

La prevalencia de la enfermedad periodontal aumenta de modo directo con el incremento de la edad, esto no significa que el proceso de envejecimiento provoque un aumento en la prevalencia extensión y gravedad de la enfermedad periodontal.

Los efectos progresivos y acumulativos del padecimiento del periodonto son mas graves en los adultos de mayor edad.

La pérdida de inserción en milímetros aumenta con la edad. (1)

7.4.2. Género

Los hombres exhiben de manera uniforme prevalencia y gravedad mayor de enfermedad periodontal que en las mujeres. (1)

7.4.3. Factores genéticos

Los factores genéticos tienen un efecto determinante en la prevalencia de la enfermedad periodontal, ya que de igual manera esta enfermedad puede ser determinada por efectos genéticos y hereditarios.

Estrés.-El estrés emocional interfiere en la función inmunitaria normal, y puede generar niveles mayores de hormonas circulantes que llegan a tener efecto sobre el periodonto.(1)

7.5 .Prevención

7.5.1. Higiene bucal

Existe una gran asociación entre una higiene bucal precaria y la presencia de la enfermedad periodontal. Esto es un agente etiológico primario.

La placa bacteriana es el factor primario de la enfermedad periodontal.

En consecuencia, la higiene deficiente de la boca es un importante factor de riesgo en sujetos muy susceptibles y posee menor relevancia en otros con alta resistencia a huéspedes. (1)

7.5.2. Nutrición

Las vitaminas A, las del complejo B, la C y la D, así como el calcio y el fosforo son nutrientes relacionados de manera específica con los tejidos periodontales.

Hay la tendencia hacia una mayor prevalencia y gravedad del padecimiento en adultos que radican en zonas donde la deficiencia de vitamina A y la desnutrición caloricoproteínica son frecuentes en niños. La nutrición es un factor secundario en la etiología de la enfermedad periodontal. (1)

7.5.3. Floruros

No es posible hacer alguna afirmación definitiva sobre la prevalencia y gravedad del padecimiento del periodonto en ciudades con valores óptimos o altos de fluoruro en el agua potable. Algunos investigadores informan que las concentraciones inmejorables de fluoruro no poseen algún efecto sobre los tejidos gingivales.

El fluoruro es un agente importante en la prevención de la caries:

- 1.-Reduce la solubilidad del esmalte*
- 2.-Promueve la remineralización en lesiones cariosas tempranas*
- 3.- Como Bactericida en la microflora de la placa bacteriana (1)*

7.5.4. Hábitos adversos

El tabaquismo se relaciona ampliamente con la enfermedad periodontal. Aunque dicha asociación no es irrefutable, cualquier costumbre que incremente la irritación de los tejidos gingivales o abata su resistencia sería un factor secundario o predisponente en el inicio de la enfermedad periodontal. (1)

7.5.5. Cuidado dental profesional

La incidencia y gravedad de las enfermedades periodontales son menores en las personas que reciben atención dental frecuente. La prevalencia y gravedad del trastorno crecen con el abandono dental. (1)

7.6. Etiología y patogénesis de la enfermedad periodontal

La acumulación de placa microbiana en la superficie dentaria adyacente a los tejidos gingivales pone a las células epiteliales sulculares bucales y de inserción en contacto con los productos de deshecho, enzimas y componentes superficiales de las bacterias colonizantes.

Al aumentar la carga bacteriana, lo mismo hace la irritación de los tejidos del huésped por estas sustancias. Las sustancias microbianas estimulan a las células epiteliales para que produzcan citocinas proinflamatorias y otros mediadores químicos de la inflamación.

Estos mediadores inician en los tejidos una respuesta inflamatoria. Se produce tumefacción de los tejidos al acumularse líquido y se genera la gingivitis clínica.

En las primeras etapas los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares) predominan debido a la movilidad y flexibilidad de éstas células y a los efectos de las moléculas de adhesión sobre los vasos sanguíneos a los que preferentemente se unen los PMN en las etapas iniciales de la inflamación.

Además se genera un gradiente quimiotáctico desde el surco hacia el tejido conectivo y de esa forma los PMN son atraídos hacia el surco gingival.

Los factores quimiotácticos son proteínas y péptidos como metionil leucil fenilalanina (FMLP) y factores quimiotácticos del huésped, como las quimioquinas (particularmente IL-8), moléculas producidas por neutrófilos, como la leucotrina B4, y moléculas derivadas del desencadenamiento del sistema de complemento (C5a).

De esta manera los PMN son atraídos al área junto con otros leucocitos, como los monocitos macrófagos y linfocitos. Los macrófagos son probablemente el único tipo de célula fuera del neutrófilo que tiene una función útil en la hendidura, es decir, que pueden fagocitar PMN muertos y agonizantes y así retirarlos del área.

Esto es muy útil para el huésped, pues los PMN agonizantes o sobreactivados son capaces de degranulación, es decir, de liberación de sus enzimas de una manera descontrolada, con lo cual causan más daño y excitación a los tejidos del huésped y una exacerbación posterior de la inflamación.

Por lo tanto la función de limpieza del macrófago es útil para bajar la inflamación.

La otra función principal de esta célula es decir el papel de presentación del antígeno, no es operativa en la hendidura pues no es posible regresar a los tejidos y linfáticos del huésped donde completaría esa función.

El papel de los macrófagos de presentación de los antígenos y las funciones inmunitarias de los linfocitos T y B tienen lugar dentro del tejido conectivo.

Estas células inmunitarias pueden ser ancladas a los tejidos por la capacidad para ello de las moléculas de adhesión, como la CD44, para que puedan funcionar allí y no se pierdan en la hendidura.

Estas moléculas aumentan en número durante la inflamación por diversas citocinas proinflamatorias producidas por una gran variedad de células.

Además, el papel de las moléculas de adhesión específica, como ICAM-1, en el epitelio de unión puede ayudar en los movimientos de los PMN hacia el surco, y de hecho, están regulados por la acción directa de los productos bacterianos y por las citocinas producidas por los PMN.

Estos por lo tanto llegan en grandes cantidades al surco y comienzan su función de fagocitar bacterias, ayudados por los complementos y anticuerpos (opsoninas).

La presencia de los receptores Fc para estas moléculas en los PMN son necesarios para la función antimicrobiana de los anticuerpos.

Varios investigadores hallaron que las variaciones de los receptores Fc pueden predisponer a la enfermedad periodontal.

Se ha demostrado claramente que cualquier reducción en el número o función de los PMN será perjudicial para el periodonto.

Otro factor variable relacionado con la acumulación de PMN en los tejidos es la cantidad de moléculas de adhesión endoteliales y leucocitarias.

La importancia de éstas se manifiesta por la extensa destrucción periodontal observada en enfermedades como la “Deficiencia de Adhesión Leucocitaria” (LAD) donde los dientes literalmente son exfoliados al erupcionar, y aun cuando los vasos contengan grandes cantidades de PMN, su número es escaso en los tejidos y en el surco gingival.

Al aumentar la inflamación el proceso inmunitario se inicia o se reinicia.

En la iniciación de la respuesta inmunitaria, las células de Langerhans en el epitelio toman material antigénico derivado de los microorganismos y lo transportan al medio linfoide donde se produce la presentación de los antígenos a los linfocitos.

Esta presentación tiene como resultado linfocitos comprometidos que vuelven al sitio de la exposición microbiana donde los linfocitos B se transforman en plasmocitos y producen anticuerpos o los linfocitos T ayudan a la respuesta humoral y desarrollan respuestas inmunitarias de mediación celular frente a esos microorganismos.

Los anticuerpos pueden ser producidos local y sistémicamente y actúan agregando o aglutinando los microorganismos y, en conjunción con los PMN, permiten una fagocitosis eficiente (opsonización).

El número y función de los anticuerpos es importante; las personas que pueden desarrollar una respuesta de anticuerpos eficaz pueden ser más resistentes a la periodontitis que aquellas en que la respuesta inmunitaria es deficiente en cantidad o calidad.

La acumulación de PMN y su actividad en el surco gingival tiene como resultado la liberación de muchas enzimas que ocasionan efectos perjudiciales para los tejidos del huésped igual que para los microorganismos.

Además la infiltración inmunitaria necesita espacio en el periodonto para comenzar su función y deben perderse componentes estructurales con el fin de crear el espacio físico para esos leucocitos infiltrados.

Más aun las capas epiteliales son destruidas, el epitelio se reforma en una ubicación más apical y se forma la bolsa. Al extenderse la infiltración se reabsorbe el hueso con el fin de hacer más espacio para las células de defensa.

Se forma tejido de granulación fuertemente vascularizado y lleno de plasmocitos productores de anticuerpos. Este tejido de granulación requiere más espacio y muchas de sus células producen enzimas degradantes de la matriz y citocinas que directa e indirectamente degradan aún más el tejido conectivo y el hueso.

Finalmente, si no se los reprimen los microorganismos, continuarán generando productos perjudiciales para el huésped, éste continuará dando una respuesta frustrada, la bolsa profundizará, el tejido de granulación se extenderá, se perderá hueso y ligamento y, finalmente, desaparecerán bastantes estructuras de sostén del diente como para causar la exfoliación.

La enfermedad periodontal provoca la destrucción de los tejidos de soporte del diente y es consecuencia de las acciones de los sistemas de defensa del huésped en respuesta a la acumulación de placa.

Este proceso patogénico difiere en extensión y gravedad de un individuo a otro y en cada uno y las razones son multifactoriales.

Sin embargo se reconoce cada vez más que existe un fuerte componente genético en la susceptibilidad a la enfermedad periodontal.

La placa microbiana desarrolla un papel fundamental en el proceso patogénico, de modo que el único método universalmente aceptado para detener la destrucción periodontal es por medio de una estrategia antimicrobiana, para lo que suelen ser eficaces el alisado radicular y el escrupuloso mantenimiento de la higiene oral. (2)

7.7. Procesos inflamatorios en la enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es una enfermedad crónica inflamatoria caracterizada por una infiltración celular mononuclear dentro de los tejidos gingivales, provocando la

destrucción del tejido conectivo y resorción del hueso alveolar.

Mientras las bacterias periodontopatógenas han sido reconocidas como el principal agente causal con subsecuente progresión y severidad en la enfermedad, se cree que son determinadas por la respuesta inmune del hospedero en el cual varios tipos de células como los leucocitos polimorfonucleares, leucocitos, macrófagos, células T entre otros, han sido implicados en la patogénesis y se consideran que poseen un rol regulatorio en la progresión de la enfermedad.

Histológicamente la enfermedad periodontal también es caracterizada por la acumulación de tejido conectivo extravascular gingival. (2,14)

7.7.1 Expresión de las citocinas en la enfermedad periodontal

Una investigación extensiva en décadas pasadas ha demostrado que las citocinas juegan un papel importante en la homeostasis del tejido.

Además, este ha sido mostrado como un aumento en la producción de citocinas pueden dirigir el inicio de la enfermedad y/o el daño tisular. (2)

7.7.1.1. Proteinasa e inhibidores

La enfermedad periodontal genera una degradación tisular, por lo cual las proteinasas, del huésped y microbianas son elementales en los procesos destructivos.

Las proteinasas son aquellas moléculas que dividen las proteínas por hidrólisis de las uniones en péptidos.

La liberación de proteasa en las encías y el área del surco gingival promueven reacciones inflamatorias y contribuye al daño del tejido conectivo por distintas vías.

Todas las endopeptidasas (proteinasa) provenientes del huésped, de las cuáles se sabe que se liberan en el surco, pueden ser inhibidas por la función combinada de la alfa-2-macroglobulina (α 2-M) y alfa -1-antitripsina (α 1-AT) .

*Las colagenasas bacterianas también pueden ser inhibidas por inhibidores de proteínasa humana, pero también hay posibilidades de que potentes proteinasas como la que posee *P.gingivalis* (gingivaína) son capaces de degradar a estos inhibidores. (2)*

7.7.1.2. Metaloproteinasa de la matriz (MMP)

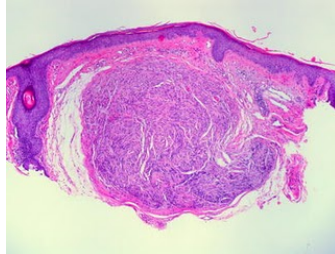
La evidencia científica del papel de las metaloproteinasa de la matriz en la destrucción del periodonto ha encontrado que las células aisladas de tejidos conectivos sanos y enfermos son capaces de expresar una amplia variedad de MMPs. (15)

Las MMP participan en la degradación del tejido periodontal; dividen la triple hélice de los colágenos de tipo I, II y III, iniciando así la degradación de la matriz extracelular. (2)

Una de las metaloproteinasa de la matriz es la colagenasa neutrófila (PMN), que se encuentra en concentraciones más elevadas en muestras gingivales inflamadas que en encías sanas. (2)

Además, se ha encontrado MMP-8 y MMP-3 en el fluido gingival crevicular de personas con gingivitis y periodontitis.

Aunque no es evidencia causal de enfermedad periodontal, es un hecho que las metaloproteinasas están participando activamente en procesos de salud y su producción se ve aumentada en estadios inflamatorios de gingivitis y enfermedad periodontal. (15)



MMP

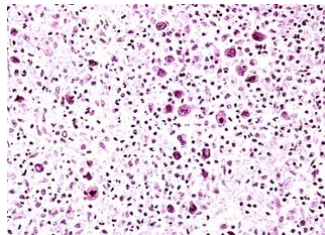
7.7.1.3. Leucocitos polimorfonucleares (PMN)

El PMN es el leucocito predominante en la hendidura gingival tanto en salud como en enfermedad. Los PMN de la circulación son atraídos al área por la vía de los estímulos quimiotácticos evocados desde la placa dental e histológicamente se puede ver a los PMN atravesando el tejido conectivo gingival en la inflamación.

Los números de PMN aumentan en la hendidura gingival con el desarrollo de la gingivitis y se encuentran más en los sitios de periodontitis.

La migración de los leucocitos hacia el tejido conectivo gingival y a través del epitelio de unión hacia la hendidura gingival, esta controlada por la vía de moléculas de adhesión como ICAM-1.

Los PMN constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos periodontales. (2)



PMN

7.7.1.4. Citocinas proinflamatorias

Las citocinas interleucina -1 (IL), IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF) estimulan la reabsorción ósea.

IL-1 puede actuar sobre los fibroblastos para promover la reparación o la destrucción de la matriz celular. (2)

7.7.1.4.1. Interleucina-1 (IL-1), IL-6 y TNF

IL-1 es un polipéptido con un gran número de diversas actividades y roles en inmunidad, inflamación, daño tisular y homeostasis tisular.

Siguiendo la activación, este es sintetizado por varios tipos de células, incluyendo macrófagos, monocitos, linfocitos, células vasculares y fibroblastos.

IL-1 estimula la proliferación de queratinocitos, fibroblastos, y células endoteliales y mejora la síntesis de fibroblastos de tipo I procolagena, colagenasa, hialuronasa, fibronectina, y prostaglandina E2.

IL-1 es, por lo tanto, un componente crítico en la homeostasis del tejido periodontal. Sin embargo una producción sin restricciones de IL-1 puede provocar daño celular. La excesiva producción de IL-1 por células que componen el periodonto son capaces de estimular los fibroblastos del ligamento periodontal.

Estos reguladores pueden ser responsables del efecto de destrucción del tejido conectivo, conduciendo a la pérdida de inserción.

Así IL-1 ha sido sugerido que juega un rol en la patogénesis de varias enfermedades óseas, incluyendo la periodontitis.

IL-1 α , IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) estimula la resorción ósea e inhibe la formación de hueso.

Además, IL-1 sinergiza las acciones de resorción ósea de TNF- α . Varios estudios in vitro han encontrado que IL-1 β es significativamente más potente que IL-1 α o TNF- α en los efectos de mediadores en hueso.

Otra importante actividad de IL-1 en el proceso patológico de la periodontitis es inducir la producción de la matriz de la metaloproteinasa.

IL-1 provoca el aumento de elevados niveles de procolagenasa en fibroblastos gingivales y ligamento periodontal, además que estimula el plasminógeno activador en fibroblastos gingivales, resultando en la generación del plásmido el cuál es un putativo, que ocurre naturalmente, activador de varias matrices de metaloproteinasas.

El TNF- α es una citocina proinflamatoria que es secretada principalmente por monocitos y macrófagos, Este induce la secreción de colagenasa por fibroblastos, resorción de cartílago y hueso, y ha estado implicado en la destrucción de tejido periodontal en la periodontitis.

TNF- α induce la síntesis de IL-1 y prostaglandina E2. TNF- α también activa osteoclastos y así induce la resorción ósea.

Lipopolisacárido (LPS) obtenido de una bacteria periodontal gram-negativa puede iniciar la producción de TNF- α por monocitos de sangre periférica.

IL-6 es una citocina pleiotropica que tienen influencia en respuestas inmune y reacciones inflamatorias, es producida por varios tipos diferentes de células. Las principales muestras in vivo son estimuladas por monocitos, fibroblastos y células endoteliales.

Macrófagos, células T y B, y queratinocitos también producen IL-6.

Los niveles de IL-6 en tejido gingival inflamado son altos que aquellos tejidos sanos.

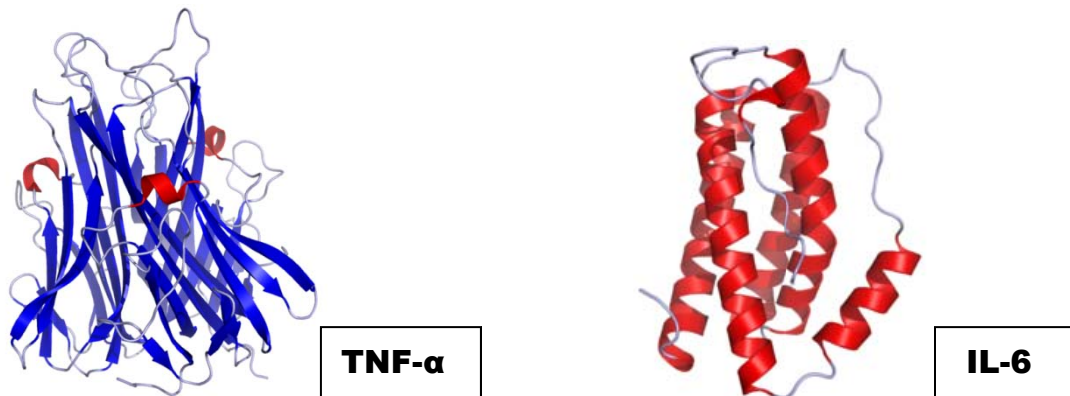
Una de las mayores funciones de IL-6 es la inducción de la maduración final de células B

dentro de la secreción de inmunoglobulina de células plasmáticas.

IL-6 tiene una importancia particular en respuestas de las células B, ha sido especulado que la expansión de células B células plasmáticas en lesiones periodontales pueden resultar del incremento de la producción de IL-6 en sitios de enfermedad.

Además esto sugiere que la IL-6 juega un importante papel en la regulación de la remodelación ósea y se sugiere que IL-6 puede actuar como un autocrino y/o paracrino en la resorción ósea en estados patológicos por la estimulación de la formación y activación de osteoclastos.

Estas acciones implican la participación de IL-6 en la patogénesis de la destrucción del tejido periodontal en la periodontitis. (14)



7.7.1.5. Citocinas quimiotácticas

La IL-8 tiene poderosas funciones quimiotácticas para los leucocitos particularmente los neutrófilos, linfocitos y macrófagos.

Estas moléculas actúan reclutando células de defensa hacia áreas donde se las necesita y son importantes en las respuestas con mediación celular. (2)

7.7.1.5.1 Interleucina 8 (IL-8)

IL-8 formalmente conocida como péptido-1 de neutrófilo activado (NAP-1), es un potente factor quimiotáctico para leucocitos.

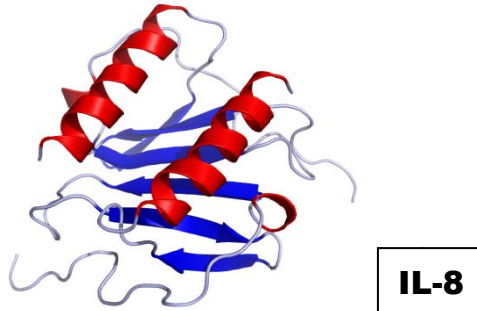
IL-8 es secretada por una variedad de células, incluyendo monocitos, fibroblastos, linfocitos y células endoteliales. En tejidos gingivales inflamados, IL-8 es expresado en células epiteliales y macrófagos.

Debido a estas propiedades proinflamatorias y quimiotácticas de neutrófilos, IL-8 juega un papel importante en la patogénesis de la periodontitis.

La secreción de IL-8 induce la extravasación de neutrófilos en el sitio de inflamación y numerosos neutrófilos se presentan en la lámina propia y el epitelio de inflamación gingival es causado por IL-8.

Esto sugiere que la infiltración de los neutrófilos juegan un papel crucial en la primera

línea de defensa contra la agresión de bacterias periodontopatógenas. Sin embargo la continua secreción de IL-8 regula los efectos quimiotácticos y los efectos en los neutrófilos en la inflamación gingival que contribuye a la destrucción tisular del tejido periodontal. (14)



7.7.1.6. Citocinas señaladoras de linfocitos

La IgG2 se encuentra mas alto que IgG1 en pacientes con enfermedad periodontal, así mismo los linfocitos productores de TH2 predominan en las lesiones periodontales, estas células refuerzan la respuesta inmunitaria humoral en la enfermedad periodontal. (2)

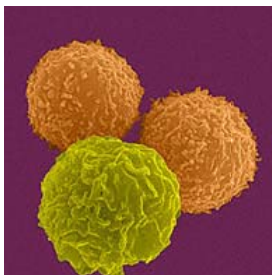
7.7.1.7. Linfocitos (Células T y B)

Debido a la presencia de numerosos linfocitos en lesiones inflamatorias en el periodonto, las citocinas producidas por la infiltración de linfocitos, puede involucrarse no solo en la protección contra un agente nocivo sino en el inicio y la progresión de la periodontitis.

En las lesiones periodontales, la mayoría de células infiltrativas B y células plasmáticas. Una expresión local de las células B resultaría en la producción de IL-1 por células B y, por lo tanto subsecuente destrucción tisular.

Las células T con un fenotipo activado están a menudo presentes en lesiones periodontales inflamatorias.

Más específicamente, la producción de IL-6 por células T en lesiones periodontales inflamadas ha sido confirmado. IL-6 participa no solo en la destrucción ósea sino también en el establecimiento de células B en las lesiones inflamatorias periodontales. (14)



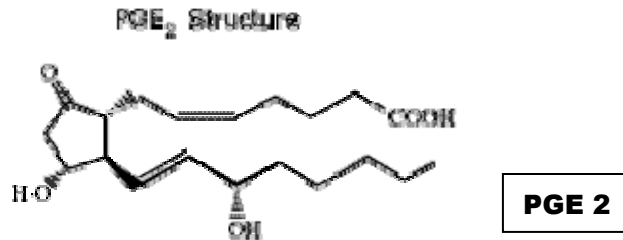
Células T



Células B

7.7.1.8. Prostaglandinas

PGE₂ actúa sobre los fibroblastos y osteoclastos, junto a las citocinas, para inducir la producción de metaloproteína de la matriz, lo cual es relevante para el recambio tisular y para el proceso destructivo periodontal, se encuentra en el líquido crevicular gingival.(2)



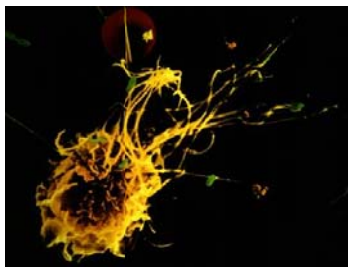
7.7.1.9. Monocitos y Macrófagos

Los macrófagos constituyen del 5 al 30% de la infiltración celular en lesiones periodontales inflamadas. Los macrófagos producen citocinas así como IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α , e INF- α .

En particular, es conocido que los macrófagos juegan un papel importante en la producción de IL-1 en sitios de inflamación.

*IL-1 producida por la estimulación de macrófagos es IL-1 β . Además la expresión de RNAm de TNF- α , IL-6, y IL-8 es detectada en macrófagos en tejido periodontal inflamado. Bacterias periodontopatógenas así como *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), y *Fusobacterium nucleatum* (Fn), inducen la expresión de IL-1 en células y monocitos mononucleares.*

Los lipopolisacáridos de las bacterias gram-negativas, han estimulado efectos sobre la producción de IL-1 por monocitos. (14)



Monocito

7.8 Microbiología de la Enfermedad Periodontal

La cavidad bucal esta habitada por bacterias desde el nacimiento hasta la muerte. Colonizan los tejidos blandos, incluidas las encías, las mejillas y, cuando hay dientes presentes, también estos son habitados por gérmenes por encima y por debajo del margen gingival.

Se estima que alrededor de 400 especies diferentes son capaces de colonizar la boca y que cualquier persona puede albergar 150 o más especies diferentes.

Los recuentos en zonas subgingivales oscilan desde 10^3 en hendiduras superficiales sanas hasta cifras mayores como 10^8 en las bolsas periodontales profundas.

Las cifras de la placa supragingival pueden exceder a 10^8 en una sola superficie dentaria. De modo que ciento y miles de millones de bacterias colonizan continuamente en el diente en el margen gingival o por dentro de éste a lo largo de toda la vida. (2)

Las principales bacterias implicadas en la génesis de la enfermedad periodontal son:

7.8.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*(A.a.). Este es el miembro más importante del género *Aggregatibacter* que forma parte de la microbiota bucal. Existen hasta ahora 5 serotipos de esta especie en base a diferencias en su pared bacteriana (a, b, c, d y e, siendo el más patógeno, el tipo b), y es un bacilo corto (cocobacilo), gramnegativo, inmóvil (carece de flagelos), sacarolítico (fermenta carbohidratos), anaeróbico facultativo, capnófilo (requiere CO_2 para su desarrollo), crece muy bien en medios que contengan sangre o suero, (agar TSBV), y se aísla ocasionalmente de mucosa yugal, lingual y en placa supragingival, pero están muy aumentados en pacientes con periodontitis agresivas y algunas formas crónicas, sobre todo las refractarias.*

Entre los factores de virulencia, posee endotoxina, fimbrias, produce leucotoxina, epiteliotoxina, colagenasa, factores inhibidores de la función leucocitaria, proteasas como complementasa (destruye el complemento), factores inmunosupresores (activan a los linfocitos T8 o (supresores), factor activador policlonal de linfocitos B, factores inhibidores de fibroblastos, de células epiteliales y endoteliales, y otros factores que juegan algún papel en la génesis de las infecciones periodontales.

Requiere zonas de fácil retención mecánica, de problemas en el epitelio gingival o placa bacteriana abundante, aunque no tienen predisposición por las encías inflamadas como otros periodontopatógenos. (2,16)

7.8.2. *Porphyromonas gingivales*

Estos son cocobacilos capsulados, inmóviles, fimbriados, gramnegativos, anaeróbicos estrictos, asacarolíticos (no fermentan carbohidratos), productores de un pigmento negro característico en agar-sangre y su crecimiento es favorecido por la protoporfirina. Son sensibles a las sales biliares al 20 % y se aíslan de la saliva, lengua, amígdalas, placa dental y otros sitios de la boca, pero se aíslan con frecuencia y en alto número en pacientes

con bolsas periodontales, por lo que se les relaciona con las periodontitis crónicas y sus formas refractarias. No se han asociado con infecciones extraorales.

Como factores de virulencia, se pueden citar: las fimbrias, la cápsula, la endotoxina, la hemaglutinina (aglutina glóbulos rojos para obtener de ellos hemina, el cual es un factor de crecimiento), colagenasas, inmunoglobulinasas, queratinasas, complementasas, condroitinsulfatasas, fosfolipasas A, y otras enzimas líticas, factor degradador del fibrinógeno, y otros. (2,16)

7.8.3. Bacteroides forsythus

Son bacilos pequeños, por lo tanto inmóviles, anaeróbicos estrictos, capsulados, fimbriados, endotoxigénicos, colagenolíticos, pero son buenos fermentadores de azúcares. Se han aislado más de lesiones periodontales activas, que de inactivas, y se las relacionan con las periodontitis crónicas refractarias.

Otros factores de virulencia son la endotoxina, la producción de neuraminidasa (degrada el ácido neuramínico de la mucina, lo cual licua el moco, (nasal o salival), y permite la invasión hacia las células epiteliales), enzimas tripsicas, y otras menos importantes en la patogenia periodontal. (2,16)

7.8.4 Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens

La prevotella intermedia es un Bacteroides de pigmentación negra. Los niveles de este bacilo gran-negativo, corto, de extremos redondeados, están particularmente elevados en la gingivitis ulcerativa necrotizante aguda y en ciertas formas de periodontitis.

Esta especie parece tener diversas propiedades virulentas. Se observaron anticuerpos séricos elevados para esta especie en algunos pero no en todos los sujetos con periodontitis refractaria.

Existe una relación de ambas especies con la patogenia de la enfermedad periodontal.

Son cocobacilos pleomórficos, gramnegativos, anaeróbicos estrictos, capsulados, fimbriados, sensibles a las sales biliares y moderadamente fermentativos. Existe dominancia de Prevotellas en casos de periodontitis crónicas.

P. nigrescens predomina en las infecciones periodontales crónicas. Como factores de virulencia poseen endotoxinas, cápsula, fimbrias, producen adhesinas, complementasas, IgGasa, IgAasa, e IgMasa, que son inmunoglobulinasas, es decir, proteasas. También producen factores supresores de linfocitos B, de fibroblastos, y otro factor con acción fibrinolítica. Están muy elevadas en periodontitis crónicas. (2,16)

7.8.5. Fusobacterium nucleatum

Bacilo grande, fusiforme, gramnegativo, fimbriado, anaeróbico estricto, inmóvil, no fermentador, no capsulado, y se localiza principalmente en el surco gingival debido a su característica sensibilidad al oxígeno, y aunque están relacionados con gingivitis y

periodontitis, donde se ha aislado más en lesiones activas que en las inactivas, su papel patógeno no parece muy claro debido mas que todo a sus escasos factores de virulencia, como lo son la presencia de fimbrias, producir endotoxinas débiles, adhesinas y un factor soluble inhibidor de la quimiotaxis leucocitaria. (2,16)

7.8.6. *Campylobacter rectus*

*Es un vibrión móvil corto, gram negativo y anaerobio. Este microorganismo es inusual es miembro del género *Wolinella*, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter gracilis*.*

Este microorganismo esta presente en mayores cantidades en zonas enfermas que presentaban destrucción periodontal activa, que en zonas sanas.

También es hallado en combinación con otros patógenos potenciales en sujetos con enfermedades periodontales refractarias. Este microorganismo produce una leucotoxina. (2,16)

7.8.7. *Eikenella corrodens*

*Es un bacilo gram-negativo, anaeróbico facultativo, capnófilo, asacarolítico, sin flagelos, pero puede moverse por movimientos deslizantes, por lo que corroe el agar y de allí su nombre. Puede habitar diversas partes del organismo humano, y se le considera periodontopatógena, ya que en ratas gnotobióticas (libre de microorganismos o con microbiota conocida) es capaz de inducir reabsorción ósea cuando se inocula en el ligamento periodontal, y su implicación como periodontopatógeno también estriba en el hecho que se han aislado mas de sitios activos que inactivos, cuando el tratamiento tiene éxito, las cuentas de *Eikenella corrodens* bajan significativamente, por lo cual su papel como periodontopatógeno parece cierto. (2,16)*

7.8.8. *Peptostreptococcus micros*

*Cocos grampositivos, anaeróbicos estrictos, muy similares estructuralmente al género *Streptococcus*, pero son mas pequeños y asacarolíticos. Este coco ha sido observado con frecuencia en lesiones destructivas periodontales, así como en lesiones periodontales activas y su escasez en sitios sanos, adicionalmente, el número de estos cocos bajaron significativamente cuando se logró curación de las lesiones. Los títulos de anticuerpos se encuentran elevados en los pacientes con lesiones activas. (2,16)*

7.8.9. *Especies de Selenomonas*

Son microorganismos bacilos curvados gram- negativos y sacarolíticos, de movilidad saltarina por la presencia de un penacho de flagelos insertos en el lado cóncavo, provoca enfermedad periodontal destructiva. (2,16)

7.8.10. Especies de Eubacterium

Se encuentran en niveles incrementados en zona de enfermedad, particularmente en los de periodontitis grave.

E. nodatum, E. brachy y E. timidum son bacilos pequeños gram-positivos, estrictamente anaerobios y pleomórficos. Algunas de estas especies provocan respuesta elevadas de anticuerpos en sujetos con diferentes formas de periodontitis destructiva. (2,16)

7.8.11. Streptococcus intermedius

Contribuye al progreso de la enfermedad periodontal en subgrupos de pacientes periodontales y con enfermedad refractaria. Esta especie se encuentra en números elevados en zonas que muestran progreso de la enfermedad. (2,16)

7.8.12. Espiroquetas

Las espiroquetas son microorganismos con movilidad, de forma helicoidal, anaerobios y gram-negativos que se observan frecuentemente en las bolsas periodontales.

Se encuentra en grandes cantidades en la gingivitis ulcerativa necrosante (GUNA).

Se presenta un gran número en los sitios con mayor profundidad de bolsa. Han sido descritas por lo menos quince especies de espiroquetas subgingivales, y provocan una respuesta elevada en enfermedad periodontal destructiva.

T. denticola por es la mas común en placa subgingival y en lesiones activas que en placa supragingival, se encuentra en sitios con periodontitis grave además de encontrarse elevados los títulos de anticuerpos antitreponemas. (2,16)

8.0. Lipopolisacáridos (LPS)

El lipopolisacárido, componente de la pared de las bacterias Gram negativas, es el principal agente causante del shock séptico. Una vez en el torrente sanguíneo, el lipopolisacárido activa los sistemas de contacto y estimula diferentes tipos celulares mediante moléculas de reconocimiento como el CD14 y los recientemente conocidos receptores TLR, disparando diversas vías de transducción que interaccionan entre sí. Dentro de éstas destacan la vía de las MAP kinasas y la cascada de los TLR, que a su vez actúan sobre factores de transcripción. Uno de los principales factores nucleares es el NF- κ B, con un papel fundamental en la inducción de enzimas implicadas en la producción de citocinas y autacoides, tales como la óxido nítrico sintasa o la ciclooxigenasa inducibles. El aumento en la producción de óxido nítrico, tromboxanos, prostaglandinas y otros agentes vasoactivos derivados de las enzimas sintetizadas da lugar a las graves alteraciones cardiovasculares características del shock séptico. (17)

Contienen seis ácidos grasos unidos a residuos de glucosamina, uno de los cuales es el punto de unión de un oligosacárido compuesto. Los lipopolisacáridos constituyen la característica dominante de la superficie de las bacterias gram -; son los objetivos principales de los anticuerpos producidos por el sistema inmune en respuesta de la infección bacteriana.

La porción lipídica de los lipopolisacáridos de algunas bacterias es tóxica para el organismo humano y de otros animales, por ejemplo responsable del peligroso descenso en la presión sanguínea que se produce en el síndrome tóxico causado por la infección de humanos con bacterias gram negativas.(18)

Son capaces tanto de provocar la respuesta inflamatoria e inmunitaria como de interactuar con las células del huésped. Tiene efectos profundos sobre el sistema de coagulación sanguínea y el sistema de complemento, con el resultado de una alteración de homeostasis y la formación de péptidos proinflamatorios.

Los lipopolisacáridos activan los mediadores químicos de la inflamación para que produzcan permeabilidad vascular y alienten mediante acciones quimiotácticas, a las células inflamatorias para que se muevan hacia los tejidos y provoquen que las células de defensa liberen agentes proinflamatorios y citocinas. (2)

9.0. Respuesta inmune y receptores Toll

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra la infección. Los receptores semejantes a Toll (TLRs: Toll-like receptors) reconocen al lipopolisacárido bacteriano y otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns). Los eventos moleculares intracelulares iniciados por la interacción entre TLRs y su PAMPs específicos desencadenan respuesta inflamatoria sistémica. (41)

Los organismos superiores disponen de numerosos mecanismos de defensa contra las infecciones. Aunque son muy variados, pueden agruparse en dos grandes grupos (inmunidad innata e inmunidad adaptativa) dependiendo, esencialmente, de las características de los elementos encargados de reconocer a los agentes ofensores.

Algunos mediadores químicos liberados por elementos celulares de uno u otro grupo son característicos y privativos, pero muchos son comunes a ambos y una vez liberados interaccionan directa o indirectamente sobre la totalidad, de manera que se establece una acción concertada del conjunto del sistema inmunitario ante cualquier agresión.

No debe olvidarse que los organismos unicelulares deben también preservar su integridad biológica y para ello disponen, a su nivel, de mecanismos de defensa contra las infecciones.

La mayoría de las células del organismo disponen de mecanismos moleculares capaces de limitar la replicación viral, la señalización por vía de interferones de tipo I pone en marcha un variado conjunto de genes, proteín-quinasas y ribonucleasas con múltiples acciones antivirales, ya sea destruyendo el ARNm viral, impidiendo la síntesis de proteínas virales u otros procedimientos, y recientemente se ha señalado el papel jugado por las mitocondrias a este respecto. (19)

9.1. Respuesta inmune innata

La inmunidad innata, o natural, constituye la primera línea de defensa contra la infección.

Se incluyen todos aquellos que lo hacen mediante moléculas que son codificadas por genes presentes en la línea germinal, en su conjunto constituyen la llamada inmunidad innata, y están presentes constitutivamente en todos los sujetos normales.

Cuando se hablaba de inmunidad innata se hacía referencia a las barreras anatómicas, por su papel físico en la defensa contra la infección, y a determinadas secreciones (clorhidropéptica, manto ácido, mucinas, lisozima, lactoferrina, lípidos antibacterianos) que contribuyen por su acción química a la protección de las mucosas, así como también al sistema del complemento y a las células fagocíticas.

La inmunidad natural se basa en un variado conjunto de elementos celulares y humorales. En cierta medida, prácticamente todos los tejidos del organismo están implicados en ella, aunque muy especialmente los más expuestos a la agresión microbiana, como la piel y las mucosas, así como las células fagocíticas mieloides.

En general, la mayoría de los patógenos son controlados eficazmente por el sistema inmunitario innato. Muchos de sus elementos son inducibles, es decir son elaborados y secretados bajo el estímulo de la agresión microbiana, y además causan múltiples acciones biológicas, desencadenan y regulan el proceso inflamatorio, controlan el tráfico de leucocitos hacia el foco de infección y señalizan a los linfocitos para su expansión clonal.

El sistema inmunitario innato es capaz de reconocer estructuras de patógenos y es capaz de diferenciar entre elementos propios y extraños, reconociendo determinadas secuencias moleculares y reaccionando en consecuencia. (19)

La inmunidad innata filogenéticamente es primitiva, por lo que la comparten vegetales y animales (invertebrados y vertebrados, incluyendo mamíferos). Es mediada por monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se caracteriza por ser de respuesta rápida, actúa directamente sobre el patógeno sin necesidad de selección o maduración celular, no tiene memoria y es fundamental en la génesis de la sepsis y choque séptico. (41)

La función de la inmunidad innata es el reconocimiento de constituyentes microbianos, lo que desencadena una respuesta celular y humoral caracterizada por activación de neutrófilos, células endoteliales, monocitos-macrófagos y la síntesis de citocinas proinflamatorias, lo que tiene como finalidad del control de la infección.(41,20,21)

Los productos microbianos que activan esta respuesta son: lipopolisacárido, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, DNA, glicolípidos, fragmentos de pared celular, y lipoarabinomanan, que en conjunto reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs. Los receptores celulares encargados del reconocimiento de los PAMPs se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR: Pattern Recognition Receptor), los cuales se han seleccionado en el transcurso de la evolución para reconocer estructuras o productos microbianos y de los que forman parte los receptores Toll (41,22).

9.2. Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por la selección clonal de linfocitos antígeno específicos, es tardía, tiene memoria, da protección prolongada, no participa en la patogénesis de la sepsis y choque séptico y exclusivamente se presenta en los animales vertebrados. (41-23-24)

Son mecanismos que utilizan moléculas codificadas por genes construidos al efecto en células especializadas y que no están presentes en la línea germinal, no siendo por lo tanto transmisibles a la descendencia. Para combatir adecuadamente a microorganismos más evolucionados, aquellos que disponen de medidas más sofisticadas de penetración y supervivencia, se requiere del sistema inmune adaptativo.

Finalmente, se ha visto que los sistemas de inmunidad adaptativa propios de los mamíferos están bajo control de estos otros elementos más básicos y primitivos, en la orquesta del sistema inmune.

La respuesta inmune adaptativa es específica; es decir, se dirige específicamente contra cada agente agresor. Desde el punto de vista molecular, los elementos esenciales son las inmunoglobulinas producidas por linfocitos B y células plasmáticas y los receptores TCR de los linfocitos T.

Estas moléculas se sintetizan previa recombinación genética entre diferentes segmentos de las cadenas de inmunoglobulinas o de los componentes del receptor TCR (α - β - γ - δ). Cada elemento celular sufre su propia recombinación mediante un proceso muy complejo que tiene lugar a lo largo del ciclo madurativo y que resulta abortivo con frecuencia, con la consiguiente muerte celular por ser ineficaz el ensamblaje de la molécula por haber reactividad con autoantígenos, uno de los fundamentos de la tolerancia inmunológica.

Cuando el proceso concluye con éxito, se tiene la célula madura (T o B), cada una con su propio y exclusivo idiotipo de inmunoglobulina o de receptor TCR.

En caso de contactar con el antígeno específico, se produce la expansión clonal de la célula hasta lograr una respuesta cuantitativamente eficaz. Al tiempo que se expande el clon por divisiones sucesivas de sus componentes, nuevas mutaciones en las sucesivas generaciones producidas en el proceso de multiplicación mejoran la afinidad del anticuerpo o receptor.

Superada la agresión, algunas células sobreviven como células de memoria; de manera que, en el futuro la respuesta será mucho más rápida si se producen nuevas exposiciones al antígeno. El resto de los componentes del clon muere por apoptosis.

Así, cuando el organismo se enfrenta por primera vez a un ofensor, se produce una respuesta inmune específica primaria, tanto celular como humoral, que tarda días (con frecuencia más de 10) en alcanzar el grado de eficacia. Si el sujeto sobrevive, guardará memoria del suceso quedando inmunizado, y ante nuevas exposiciones su respuesta será mucho más rápida y eficaz, por la rápida expansión clonal de la población residual de células de memoria, produciéndose anti-cuerpos de gran afinidad. Aun en caso de integridad del sistema, la respuesta requiere un período de tiempo hasta alcanzar el grado de eficacia requerido, que será variable dependiendo del caso.

Ambas respuestas, humoral y celular, B y T, son necesarias y se producen siempre en condiciones normales, pero dependiendo del tipo de patógeno tendrán mayor o menor relevancia. En líneas generales, las inmunoglobulinas son muy importantes para la

neutralización de virus y bacterias, cuya penetración en las células del huésped evitan, al tiempo que facilitan su eliminación por células fagocíticas.

Algunas bacterias disponen de cápsula de polisacáridos que les confiere resistencia a la fagocitosis; frente a ellas, las inmunoglobulinas son especialmente importantes por su capacidad opsonizante y de interacción con proteínas del complemento.

Las observaciones realizadas sobre modelos experimentales con animales inmunodeficientes (animales knockouts, con delección de genes específicos), ponen de relieve la importancia de la cooperación entre la inmunidad humoral y otros elementos del sistema inmune. Se ha visto que la administración pasiva de anticuerpos es protectora por sí misma en relación con algunos patógenos, pero en otros casos sólo es efectiva en presencia de una inmunidad celular intacta. En todo caso, el empleo de anticuerpos monoclonales y diferentes modelos animales ha puesto en evidencia la enorme variedad de posibilidades de actuación de los anticuerpos, relativas a su clase y subclase, especificidad, cantidad, tipo de patógeno y características del huésped.

Otras acciones ejercidas por los anticuerpos son relevantes, muchos virus y bacterias son neutralizados por los anticuerpos bloqueando sus moléculas de adhesión, necesarias para la fijación a la membrana celular y la penetración en la célula huésped, y algunos anticuerpos parecen ejercer una acción paralizante sobre parásitos intestinales, facilitando su expulsión.

Las células T citotóxicas y las células NK son esenciales para la eliminación de células infectadas por virus o patógenos intracelulares, así como para eliminar hongos y protozoos; en este sentido, la activación de linfocitos por anticuerpos unidos mediante receptores FcR, estimula la eliminación de patógenos intracelulares por linfocitos citotóxicos, un mecanismo llamado citotoxicidad mediada por anticuerpos.

La IgM tiene un papel de gran importancia frente a infecciones en relación con patógenos, especialmente al principio del proceso infeccioso, por ser un potente activador del complemento; pero además y sorprendentemente, se ha demostrado que tiene capacidad antiinflamatoria. En algunos pacientes con sepsis, el nivel de IgM específica contra endotoxinas es un marcador de supervivencia. Y algo similar ocurre también con la IgG; la acción proinflamatoria o contrainflamatoria de las inmunoglobulinas depende de la subclase, de la concentración de antígeno, de la célula diana y, esencialmente, del tipo de receptor Fc sobre el que actúen.

La puesta en marcha de los mecanismos efectores del sistema inmunológico conlleva enorme riesgo para el propio organismo y la modulación de esta respuesta es primordial. Se ha comprobado en diferentes modelos experimentales y con distintos patógenos (Herpes simplex, S. pneumoniae, Toxoplasma gondii, Leishmania donovani, entre otros) que las inmunoglobulinas pueden disminuir las consecuencias tisulares de la respuesta inflamatoria consiguiente a la infección con reducción de los niveles de citocinas proinflamatorias. La acción antiinflamatoria de las inmunoglobulinas ha justificado su utilización terapéutica en diferentes procesos, como en la enfermedad de Kawasaki o en la dermatomiositis. (19)

9.3. Receptores Toll

Los receptores Toll son una familia de proteínas transmembranales con un dominio extracelular caracterizado por repeticiones de leucina (LRR: Leucine-Rich Repeat) y un dominio intracelular homólogo al receptor de interleucina 1 de los mamíferos, cuya función es el reconocimiento de los PAMPs. (41)

En su conjunto, su activación desencadena diferentes acciones, incluyendo la elaboración y liberación de péptidos antimicrobianos, síntesis y liberación de TNF e interferones, quimiocinas y otras interleucinas, síntesis de proteínas antivirales, activación de fagocitos y regulación de la quimiotaxis.

Las células presentadoras de antígeno y las células dendríticas son esenciales para la expansión clonal de los linfocitos T y B y entre otros muchos receptores expresan también TLRs; la señalización por vía de estos receptores ocasiona la maduración de las células y la expresión de moléculas coadyuvantes necesarias para la presentación de antígenos a los linfocitos T y para la expansión clonal de linfocitos T y B. Se ha comprobado en animales de experimentación que la delección de los receptores tipo Toll comporta grave insuficiencia en la respuesta inmune adaptativa. (19)

Se ha descrito interacción de TLRs con varios receptores de membrana:

CD14 es una proteína glicosilfosfatidilinositol que se une a la membrana celular sin tener dominio intracelular, se expresa en monocitos, macrófagos y polimorfonucleares. Tiene alta afinidad por el lipopolisacárido de bacterias gram negativas aunque también interactúa con otros productos microbianos como: lipoarabinomano, componentes de pared celular, ramnosa, polímeros de ácido manurónico, peptidoglicanos, antígeno W-1 y lipoproteínas de espiroquetas.

Los receptores CD14 son fundamentales para el reconocimiento de lipopolisacáridos, pero al no tener dominio intracelular tienen que interactuar con un receptor que lo tenga para poder enviar información transmembranal. (41)

De esta manera CD14 se une a TLR2 y TLR4 formando los complejos:

CD14-TLR2 y CD14-TLR4 que son de gran importancia en la inmunidad innata y en la generación de respuesta inflamatoria (41-25,26).

Las integrinas B2 y CD11/CD18 son una familia de moléculas de adhesión leucocitaria que tienen como función la interacción célula-célula y célula-matriz. Se expresan en la superficie de monocitos, neutrófilos y células asesinas naturales.

Forman complejos con TLR4 cuya función es la señalización transmembranal incrementando la respuesta al lipopolisacárido (41-27-28).

La interacción del lipopolisacárido con TLR4 requiere de una proteína accesoria denominada MD-2. MD-2 es una glicoproteína de 20 a 30 kD que carece de dominio transmembranal, la cual a semejanza de CD14 presenta la endotoxina al dominio extracelular de TLR4 (41-29-30).

9.3.1 A) Receptores Toll en *Drosophila melanogaster*

*Los receptores Toll se describieron inicialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como moduladores de la polarización dorsoventral durante el desarrollo*

embrionario.

Posteriormente se estableció que eran parte fundamental de la inmunidad innata de la mosca para su defensa en contra de infecciones bacterianas y micóticas. (41-31-32)

En Drosophila los receptores Toll inducen la activación de genes que inducen la síntesis de péptidos antibacterianos como la atocina y antifúngicos como la drosomicina.

El sistema molecular que se activa en la mosca de la fruta una vez que Toll reconoce las PAMPs es semejante a la vía de interleucina 1/factor nuclear kB de los mamíferos. Toll utiliza como ligando a Spatzle, proteína que tiene que ser activada por una proteasa denominada Easter. El complejo Toll-Spatzle recluta a una proteína adaptadora que se denomina Tube y activa un complejo citoplásmico de cinasa de treonina-serina que recibe el nombre de Pelle.

De esta manera a pesar de no tener inmunidad adaptativa, el sistema innato mediado por receptores Toll en Drosophila es efectivo y altamente específico para el control de infecciones bacterianas y micóticas. (41-33,34)

9.3.2. B) Receptores Toll en humanos

En los mamíferos, incluyendo al hombre, existe un sistema de receptores de reconocimiento de PAMPs que por su semejanza en estructura y función con el sistema Toll de Drosophila se denominan receptores semejantes a Toll (TLRs: Toll like Receptors). Tagushi en 1996 describió el primer TLRs en humanos, al que denominó TIL y que corresponde a TLR1. Medzhitov identificó la segunda molécula en 1997, la denominó hToll (actualmente TLR4) y demostró que inducía la activación de factor nuclear kappa beta (FNkB) y la cascada de síntesis de citocinas proinflamatorias. La importancia de este descubrimiento fue que confirmó que los TLRs están involucrados en la respuesta inmune innata en el humano (41-35,36).

Se han descrito 10 TLRs en humanos, los cuales son proteínas transmembranales con un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (N-terminal), un dominio transmembranal y uno intracelular denominado TIR (C-terminal), el cual es similar al dominio intracelular del receptor de interleucina 1(41-37,38).

TLRs se expresan tanto en tejido linfoide como no linfoide.

TLR1 se expresa en monocitos, neutrófilos, células B y células asesinas naturales.

TLR2 en monocitos, neutrófilos y células dendríticas.

TLR3 en células dendríticas.

TLR4 en monocitos, neutrófilos, células dendríticas y endoteliales.

TLR5 en monocitos y células dendríticas.

El resto de TLRs se expresan fundamentalmente en monocitos y células dendríticas (43).

Los TLRs se han especializado en el reconocimiento de diferentes PAMPs(41-39,40).

TLR1-2: Peptidoglicanos de bacterias gram positivas.

TLR3: Virus RNA.

TLR4: Lipopolisacárido de bacterias gram negativas.

TLR5: Flagelina bacteriana.

TLR6-2: Lipopéptidos y peptidoglicanos derivados de mycoplasma.

TLR7: Componentes antivirales pequeños.

TLR9: DNA bacteriano.

Receptor	Ligandos
TLR1	Lipoproteína de 19KDa de micobacterias, lipopéptidos triacilados
TLR2	Peptidoglicanos. Lipoproteínas bacterianas. Zymosan de paredes fúngicas, lípidos de <i>Tripanosa cursi</i> y de <i>Leptospira interrogans</i>
TLR3	RNA viral de doble cadena
TLR4	Lipopolisacáridos. Ac. lipoteicoico. Proteína de fusión del VRS
TLR5	Flagelina
TLR6	Peptidoglicanos. Lipopéptido de micoplasmas
TLR7	Compuestos imidazoquinolinicos
TLR8	Compuestos imidazoquinolinicos
TLR9	Fragmentos de CpG DNA no metilado
TLR10	No identificado
TLR11	Uropatógenos
TLR12	No identificado
TLR13	No identificado

(19)

Receptores Tipo Toll con sus respectivos ligandos

9.4. Receptores Toll y Lipopolisacáridos

Las bacterias son clasificadas dentro de dos grupos basados en un procedimiento de tinción. (57 -66). La respuesta de la tinción es una consecuencia de la composición de sus membranas.

Las bacterias gram-positivas presentan varias capas, de polímero reticulado de peptidoglicano que rodean su membrana plasmática.

Considerando que las bacterias gram-negativas tienen esencialmente una monocapa (57-66), la membrana externa de las bacterias gram-negativas tienen una asimétrica bicapa lipídica intercalada con proteínas. El lípido de esta membrana externa esta casi exclusivamente constituida por moléculas de LPS.

La infección bacteriana puede amenazar la vida, que requiere el organismo del huésped para desarrollar un sistema para responder a esta agresión.

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra agentes infecciosos y esta dedicado a reconocer elementos patógenos en lipopéptidos, DNA, dsRNA, ssRNA, proteínas específicas y LPS. Estos elementos son conocidos como patógenos asociados a patrones moleculares (PAMPs) (57-67).

Los lipopolisacáridos están compuestos por tres diferentes dominios, lípido A, cadenas cortas de oligosacáridos y el polisacárido antígeno –O.

El dominio lípido A es un componente bioactivo y es reconocido durante la infección humana. La composición del antígeno –O varia entre diferentes cepas de bacterias gram-negativas.

La presencia o ausencia de las cadenas O determinan si LPS es considerada áspera o

suave. (57-68)

Una completa longitud de las cadenas O le darían suavidad a las cadenas de LPS, mientras la ausencia o reducción de las cadenas de O podrían hacer el LPS rugoso. (57, 68,69)

El lipopolisacárido es una droga potencial, es fundamental en la estabilidad de la membrana y también juega un rol prominente actúa en aumento de la respuesta inmune (57-67). LPS desencadena la liberación de varias citocinas inflamatorias, en particular TNF α , interleucina 1- β , e IL-6, esto ha sido implicado como un agente etiológico de una variedad de patologías que van desde leves (fiebre) a letales (shock séptico, falla en órganos y muerte). (57 -70)

Así la estructura, función y biosíntesis de LPS ha tenido áreas de intensa investigación en la última década. (71)

Los receptores capaces del reconocimiento de patógenos asociados a patrones moleculares como los receptores tipo Toll, la identificación de la secuencia de Toll lleva al reconocimiento que es un dominio carboxilo terminal fue significativamente relacionado al receptor interleucina-1.

La activación de IL-1R es parte de la cascada de eventos unidos a una fase aguda en respuesta de la infección.

Esto sugiere que TLRs no podrían solo estar involucrados en el desarrollo pero también en la respuesta inicial de la infección en vertebrados. Esta hipótesis recibe soporte del trabajo de Lemaitre et al, quien encontró que Toll y otros genes del grupo dorsal juegan un rol en la respuesta inmune innata a los patógenos bacterianos y fúngicos.

Los TLRs pertenecen a un grupo de moléculas llamadas super-familia IL-1R/TLR caracterizada por la presencia del dominio citoplasmático Toll/IL-1R (TIR). (57-73)

Los tres subgrupos son: IL-1R (el cual presenta dominios extracelulares de inmunoglobulina), el subgrupo adaptador (proteínas citoplasmáticas sin región extracelular y los TLRs (57-72).

TLRs son tipo I proteínas transmembranales con amino terminales extracelulares y un dominio intracelular de carboxilo terminal.

El dominio extracelular de TLR 4 contiene más de 600 aminoácidos y es altamente polimórfico comparado con el dominio transmembranal y citosólico. (57-71)

El dominio TIR, compuesto de tres regiones altamente conservadas contiene 150 aminoácidos y regula las interacciones proteína-proteína entre TLRs y las proteínas adaptadoras involucradas en la señal de la cascada de transducción. (57-73)

A diferencia de otros receptores, TLRs no ha tenido una actividad enzimática. (57-71)

Lipopolisacáridos (LPS) componentes de la membrana externa de las bacterias gram-negativa, inducen la sepsis a través de la interacción con la unión de LPS con la proteína LBP o CD14 antes de la subsecuente formación de un complejo con diferenciación mieloide de la proteína 2(MD-2) receptor tipo Toll 4 (TLR 4). (42-43,44)

TLR4 contienen un dominio de 608 residuos extracelulares, un solo dominio transmembranales, y 187- residuos de dominio intracelular. (42-45)

TLR4 adopta una característica forma de herradura en la superfamilia LRR, con N-terminal (aminoácidos 27-202), central (aminoácidos 203-348), y dominio C-terminal (aminoácidos 394-582). (42-46,47)

Existe una unión de MD-2 a la superficie cóncava de N-terminal y dominio central de TLR4. (42-46-48)

Además de la unión de TLR4- a MD-2, la proteína MD-2 es también secretada dentro del medio extracelular en una forma soluble, la cual se presenta en el sistema circulatorio. (42-49,50)

MD-2 tiene una estructura de pliegue que forma una bolsa hidrofóbica de la unión de LPS. (42-48-51,52)

La unión del complejo LPS/MD-2 de TLR4 causa una dimerización de TLR4 y resulta en la activación de NF- κ B dejando una severa inflamación aguda y sepsis. (42-53-54-55)

En este aspecto, el bloqueo de TLR4 en la activación de la señalización, usa un receptor que podría ser una vía efectiva para prevenir la inducción de LPS por las bacterias gram-negativas en sepsis si aplica antes o después de la activación.

Aunque dos grupos de investigación han tratado de generar un dominio extracelular de proteína TLR4 como un receptor señuelo de MD-2 (42-50,56), resulta difícil de generar una cantidad substancial de proteína porque ésta es insoluble, la tasa de producción es extremadamente baja, y es difícil purificarlo debido a las propiedades bioquímicas intrínsecas.

Por lo tanto la prueba de bloqueo de TLR 4 usa un receptor señuelo en la prevención de la sepsis por debajo de las condiciones in vivo, no ha sido alcanzado hasta ahora.

Los lipopolisacáridos regulan la activación del receptor Toll 4, complejo que induce una específica vía de señalización así como la respuesta primaria de (MyD88) y el factor de necrosis tumoral receptor asociado a factor -6 (TRAF-6), involucrado en la activación NF-KB.

Un dato previo reporta que el hialuronato y heparin sulfato pueden interactuar con TLR4, también se ha investigado si los glucosaminoglucanos pueden modular el receptor TLR4 en un modelo en donde LPS es inducida por citocinas inflamatorias en condrocitos. (60)

El reconocimiento inmediato y la respuesta al daño es un evento crítico para la activación de mecanismos de respuesta innata, reclutamiento de las células inflamatorias, e iniciación del proceso de reparación. La respuesta al daño puede involucrar exposición de moléculas exógenas extrañas así como componentes microbianos. El sistema inmune innato no solo es esencial como la primera línea de defensa contra la invasión por patógenos pero también proporciona señales cruciales para la activación de las respuestas inmunes adaptativas. (60,61)

La respuesta inmune innata se desencadena sobre el reconocimiento patógeno por un conjunto de receptores que reconocen las (PAMPs). (60,62)

Entre el conocimiento de receptores de patrones de reconocimiento de los receptores Toll comprenden una familia de al menos 13 proteínas de membrana que pueden reconocer varios tipos de PAMPs así como peptidoglucanos de doble cadena viral RNA, lipopolisacáridos etc. (60,63)

Cuando los receptores Toll (excepto el Toll-3) reconocen las PAMPs el gene primario de la respuesta de la diferenciación Myeloid (MyD88) se une al dominio Toll/IL-1 (TIR), el cual desencadena el receptor intracelular interleucina -1 (IL-1R) en la cascada de señalización.

La activación de NF-KB y MAPK esta involucrado como un complejo de señalización que contiene MyD88, IL1R asociado a IRAK y (TRAF-6). (60,64)

Los lipopolisacáridos regulan la activación del complejo TLR-4 fue encontrado para inducir específicas vías de señalización, involucrando varios mediadores de proteína, así como MyD88 y TRAF-6, que dirige a la liberación de NF-kB dentro del núcleo. (60,65)

Sin embargo la activación de complejos de receptores TLR-4 no está limitada al LPS, y otros estimulantes proinflamatorios. (60)

Experimentos in vitro e in vivo en ratones han mostrado que la exposición de células al ligando TLR4, LPS induce tolerancia a través de una segunda exposición de LPS e induce tolerancia cruzada a determinados ligandos de TLRs. Recientemente se ha encontrado que la tolerancia del LPS en experimentos humanos endotoxémicos y sepsis Gram-negativa esta asociada con niveles elevados de IL-1R asociados a cinasa M, un regulador negativo intracelular de My-D88 dependiente de la señalización de TLR. También se ha investigado si la exposición in vivo en humanos con LPS induce tolerancia en leucocitos circulantes a otros TLR agonistas que dependen tanto de la señalización de My-D88 dependiente y My-D88 independiente. (74)

Estos adaptadores desencadenan la activación de las cinasas, así como (IRAK), PI3K y p38 MAPK y últimamente la liberación de NF-KB. (74)

El reconocimiento del LPS requiere además de la participación de otras moléculas asociadas, éste se une a una proteína de unión al LPS (LBP), presente en el suero, y este complejo LPS-LBP es reconocido por la molécula CD14, expresada preferentemente por monocitos, macrófagos y neutrófilos.

La estimulación por LPS es seguida por un aumento en la proximidad física entre CD14 y el TLR 4, lo que sugiere que CD14 y TLR 4 interactúan en las señales inducidas por LPS. También participa la proteína MD-2, la cual se asocia con la porción extracelular del TLR4 y aumenta la respuesta al LPS.

Otra proteína de superficie celular, la RP-105, también está involucrada en el reconocimiento de este ligando. Esta proteína contiene un dominio relacionado estructuralmente a aquellas encontradas en la porción extracelular de los TLR y se expresa preferentemente en la superficie de los linfocitos B.

Además del LPS, el TLR 4 reconoce otros ligandos, como el Taxol, el cual tiene actividad antitumoral; también reconoce a la proteína de fusión del virus respiratorio sincicial (VRS).

El TLR 4 también es capaz de reconocer ligandos endógenos, como la proteína de shock térmico 60 (HSP60), la cual estimula a los macrófagos y células dendríticas para que secreten citocinas proinflamatorias y expresen moléculas coestimuladoras. La HSP60 es una de las “señales de peligro”, es decir, moléculas que se liberan por parte de células que están sufriendo estrés o necrosis. Estas señales son reconocidas por los macrófagos y células dendríticas, lo que gatilla una respuesta inmune.

Estas moléculas endógenas activan células inmunes sólo cuando están presentes en altas concentraciones, a diferencia de las concentraciones requeridas para el LPS. (76)

10.0. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas, flores y en bebidas como vino té verde, té negro, café, cocoa, soja y cerveza .Se han identificado 13 subclases de flavonoides con más de 5.000 compuestos diferentes.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares.(58)

10.1. Propiedades y acciones de los flavonoides

Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antioxidante, antitrombóticos, antimicrobianas, antitumorales, antiasmáticas, eliminadora de radicales libres, antivirales o antialérgicos, inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, etc. Protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías.(58)

Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, bien patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales.

Los flavonoides pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de la acción de los radicales libres. Tienen la ventaja de ser liposolubles e hidrosolubles: es decir, se disuelven en lípidos o en agua. (59)

Son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger a las células cerebrales, que son muy sensibles a las lesiones producidas por los radicales libres.

Además combaten la inflamación y las alergias; y aumentan la efectividad de las células natural killer del sistema inmunológico. (58,77)

También ejercerían su acción antiinflamatoria al inhibir las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (58).

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de

eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos).

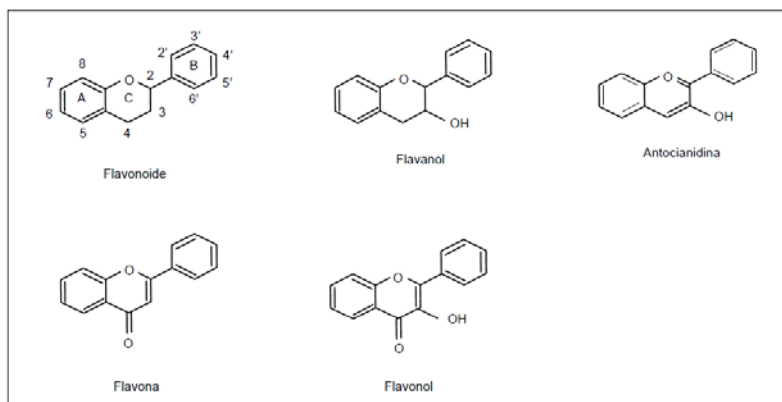
Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras (58).

10.2. Estructura química

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. (58)



Clasificación de los flavonoides en función de sus características estructurales

Se han identificado más de 5.000 flavonoides, entre los que se pueden destacar:

1. Citroflavonoides: quercitina, hesperidina, rutina, naringina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La

naringina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.

2. Flavonoides de la soja o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soja tales como porotos, tofu, tempeh, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeína.

3. Proantocianidinas se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.

4. Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.

5. Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.

6. Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.

7. Kaemferol: aparece en puerros, brócoles, rábano, endibias y remolacha roja. (58)

10.3. Síntesis, absorción y metabolismo

El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I ; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos.

La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos, o glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina.

Para evaluar los efectos biológicos de los flavonoides, así como de cualquier fármaco o componente alimenticio, uno de los más importantes aspectos es la biodisponibilidad en la que influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución y eliminación. (58)

10.4. Flavonoides que se utilizaron en la investigación

10.4.1. Luteolina

Luteolina 3',4', 5,7-tetrahydroxyflavone, es un flavonoide común que existe en varios tipos de plantas, incluyendo frutas, vegetales, y hierbas medicinales; estas están presentes en varias familias de plantas como: Bryophyta, Pteridophyta, Pinophyta and Magnoliophyta. (78)

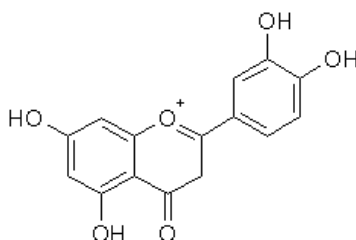
Plantas ricas en luteolina han sido usadas para tratar varias enfermedades como la hipertensión, desordenes inflamatorios y cáncer .Teniendo múltiples efectos biológicos como antiinflamatorios, anticancerígenos y antialérgicos, las funciones de la luteolina son ya sea como un antioxidante o un prooxidante bioquímico.

Los efectos biológicos de la luteolina pueden estar funcionalmente relacionados una con otra. Por ejemplo la actividad antiinflamatoria puede estar unida a la propiedad anticancerígena. (79)

La propiedad anticancerígena de la luteolina esta relacionada con la inducción de apoptosis, y la inhibición de la proliferación celular, metástasis y angiogénesis. Reduce crecimiento tumoral in vivo (78)

Además, la luteolina sensibiliza células cancerígenas induciendo citotoxicidad a través de la supresión de las vías de supervivencia celular así como fosfatidilinositol 3'- kinasa (PI3K)/Akt, factor nuclear kappa B (NF-kappaB).

Las vías de apoptosis incluyendo aquellas que inducen el supresor tumoral p53. (79)



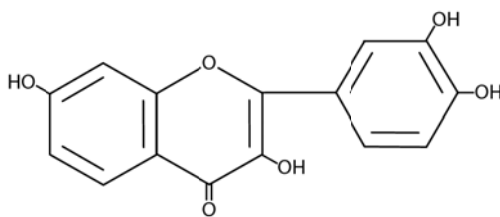
Luteolina

10.4.2. Fisetina

Fisetina (3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) tiene efectos antiinflamatorios y antiproliferativos, se encuentra principalmente en el árbol del humo (*Cotinus coggygria*) y es también ampliamente distribuido en frutas (fresas, manzanas y uvas) y vegetales (cebollas, y pepino).

Esta posee una gran variedad de actividades incluyendo efectos neurotróficos, antioxidantes, antiinflamatorias y antiangiogénicas. (80)

Ha sido reportado que suprime la proliferación de una gran variedad de células tumorales, incluyendo cáncer de próstata (Haddad et al., 2006), cáncer de hígado (Chen et al., 2002), cáncer de colon (Lu et al., 2005b), y leucemia (Lee et al., 2002). Así mismo induce la apoptosis de células tumorales. (81)



Fisetina

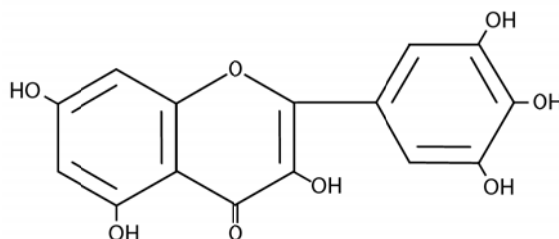
10.4.3. Miryctina

Myricetina (3,3',4', 5,5',7- hexahydroxyflavone) Es un bioflavonoide natural cuya presencia en la naturaleza se encuentra en las plantas y frutas como cerezas ,uvas y vino tinto; ha sido demostrado que posee propiedades antioxidantes y prooxidantes , es un potente anticarcinógeno, antiinflamatorio, antitumorales y antimutágeno, aunque este ha sido mostrado como un promotor de mutagénesis .

Es potencialmente terapéutico y beneficioso en enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus.

La miryctina naturalmente actúa a nivel citoquímico, y es un potente promotor anticancer.

Varios estudios muestran que la miryctina fuertemente inhibe la proliferación de células neoplásicas por una inhibición directa de las MAPK. (81)

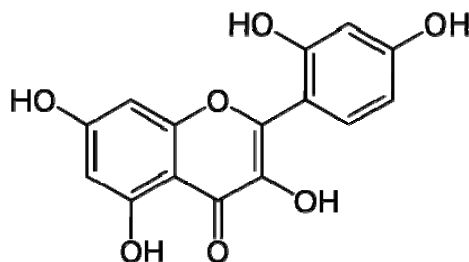


Myricetina

10.4.5. Morina

Morina (3, -5, -7, -2_, -4_-pentahydroxyflavone) es un bioflavonoide naturalmente obtenido en la dieta diaria, esta presente en las almendras, vino tinto y naranja Maclura pomifera. Esta compuesto por interacción de ácidos nucleicos enzimas y proteínas.

Se ha reportado que este flavonoide causa apoptosis celular en dosis y manera dependiente en diversas líneas celulares como HL-60 y LNCaP. La morina ha sido mostrada como un inhibidor de crecimiento de células COLO205, y muestra efectos quimiopreventivos en la carcinogénesis, así mismo como propiedades antiinflamatorias, antimutagénicos, antineoplásicos, actividades cardioprotectivas, e inhibición de proliferación celular. (82)



Morina

11. Objetivo General

Determinar el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de las MAPK inducida por lipopolisacaridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF).

12. Objetivo Específico

Determinar el efecto de los flavonoides, en específico: (Luteolina, Morina, Myricetina y Fisetina) sobre la fosforilación de las MAPK (ERK, AKT, JNK y p38) IκB inducida por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humanos por medio del procedimiento de Western Blot, RT-PCR e Inmunocitoquímica.

13. Hipótesis Verdadera

Si dichos flavonoides fosforilan o inducen la activación de las MAPK en los fibroblastos gingivales humanos, estos inhibirán los procesos inflamatorios y de lisis celular producidas por los lipopolisacáridos en los fibroblastos gingivales humanos, por lo que nos concluirá que estos compuestos polifenólicos serían una alternativa e tratamiento en la enfermedad periodontal.

14. Hipótesis Falsa

Si los flavonoides no producen forsoforilación en la activación de las MAPK, estos no tienen efecto inhibitorio alguno o mínimo; en los efectos inflamatorios y de lisis celular producidos en fibroblastos gingivales humanos por endotoxinas de las bacterias gram negativas responsables de la enfermedad periodontal como los lipopolisacáridos.

15. Tipo de estudio

El estudio será experimental comparativo y prospectivo.

16.0. Materiales y Métodos

16.1. Métodos

Los métodos utilizados fueron Western Blot, RT-PCR, e Inmunocitoquímica

16.1.2. Ensayo de Western Blot

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^6 células/pozo) crecieron en cajas de 6 pozos. Después del estímulo con flavonoides y LPS el medio se aspiró y las células se desprendieron ayudados con gendarme en buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio, la muestra se centrifugo a 5,000 rpm durante 10' y la pastilla se colocó con 50 μ l de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 μ g/ml leupeptina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio), todos estos reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.. La muestra se sonicó (1s x 30) en un baño con hielo. Para el ensayo de Western se utilizaron 50 μ g de proteína que se mezclaron 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; (todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.), la muestra se cargo en un gel al 10% SDS-PAGE y se corrió a 40V por 2 h. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) 1 hr a 0.3 amperes y 5 V. Para verificar que se colocó igual concentración de proteína, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau (Sigma Chemicals Co.) o la membranas se desnudaron para tratar con alguna proteína total. Posteriormente la membrana se bloqueo con 150 mM NaCl, 100mM Tris- HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de suero albúmina de bovino por 1 hr, se lavó y se incubó con el anticuerpo primario se utilizaron los siguientes anticuerpos: ERK, JNK, AKT, I κ B y p38 y sus respectivas formas fosforiladas (3:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con TBST y se incubaron durante 2 hr con el anticuerpo secundario, anti-mouse o anti-rabbit; dependiendo de su anticuerpo primario IgG (3:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Invitrogen) y la autoradiografía se obtuvo después de exponer la película durante 2 min. Los experimentos se realizaron en 3 ocasiones por separado. Las muestras se capturaron con el sistema DigiDocit y se analizaron con el sistema digital Labs-Works.

16.1.2. RT-PCR

El RNA total se aisló de los fibroblastos gingivales usando el método de Chomczynski y Sacchi. El RNA total (1 μ g) fué transcrito en forma inversa (RT) usando el reactivo One Step RT-PCR (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos 5'TCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT3' (sentido codificante) y AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT (Sentido anticodificante) derivado de COX-2; 5`GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG3` (Sentido codificante), y 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' (Sentido anticodificante) derivado del gene de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min. El PCR se efectuó por 35 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda sencilla para los productos de cada gene y una banda sencilla de 309 pares de bases para GADPH. La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se realizaron tres experimentos por separado de cada tratamiento.

16.1.3. Inmunocitoquímica

Las células crecieron en cubreobjetos y fueron fijadas por 30 minutos con formaldeído al 2% en PBS a 4°C. Después las células fueron permeabilizadas durante 5 min con Tritón al 0.1% en PBS y bañadas cinco veces con PBS. Para la visualización de NF-KB, las células fueron tratadas por una hora con anticuerpo primario, diluida 1:100 en PBS. Las células fueron incubadas por 45 min con rodamina conjugada con goat antimouse (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:100 en PBS. Las muestras fueron montadas en resina y examinadas con un microscopio confocal.

16.2. Material y Equipo a emplear

16.2.1. Población de estudio.- Fibroblastos Gingivales Humanos

16.2.2. Selección y tamaño de la muestra.- *un millón de células de fibroblastos gingivales humanos (HGF)*

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- 1.-Cultivo celular primario seguido de una línea celular de fibroblastos gingivales humanos originados de una muestra de tejido gingival de paciente sano.*
- 2.- Un millón de células sanas de fibroblastos gingivales humanos, ayunadas con DMEM al 2% de suero bovino fetal, células homogéneas, con morfología y composición uniformes.*
- 3.-Células sanas previamente tratadas con antibióticos y antifúngicos para evitar contaminaciones con bacterias y hongos.*

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- 1.-Contaminación de las células fibroblastos gingivales humanos (HGF) con levaduras etc.*
- 2.-Escasa o poca cantidad de proteína celular para su cuantificación y para poder obtener resultados viables.*

16.2.3. Cultivo de fibroblastos gingivales

Cultivo de fibroblastos gingivales humanos. Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron de una muestra de tejido sano de pacientes que acuden a la clínica de exodoncia. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente y el proyecto fue sometido a consideración del comité de investigación y de ética de la Facultad de Odontología. El tejido gingival se cortó quirúrgicamente del maxilar y se lavó por 6 ocasiones con solución de Hanks (In vitrogen) suplementado con penicilina/estreptomina/ fungizona (In vitrogen). El tejido gingival se desmenuzó en fragmentos de 1

a 2 mm³ y se colocó en cajas con medio Eagle modificado por Dulbecco (*In vitro*) suplementado con 2mM L-glutamina (*In vitro*), penicilina / estreptomicina / fungizona (*In vitro*) 100 ug/ml, 100 µg/ml y 1 mg/ml respectivamente y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. El explante se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. El cultivo celular se alimentó cada 3 días hasta que las células alcanzaron la confluencia. Las células se utilizaron entre los pases 5 a 7.

16.2.4. Equipo y Marca

- ❖ Agitador magnético (Nuova)
- ❖ Balanza GA200(Ohaus)
- ❖ Baño de agitación (Precision Scientific)
- ❖ Cajas de cultivo celular de 6 pozos (Costar)
- ❖ Cámara de electroforesis vertical (Hoeffer)
- ❖ Cámara de transferencia. (Hoeffer)
- ❖ Cámara de flujo laminar (Nuair)
- ❖ Centrífuga (Sorvall)
- ❖ Espectrofotómetro (Perkin Elmer)
- ❖ Gendarme (Costar)
- ❖ Gradillas (Nalgene)
- ❖ Incubadora (Nuair)
- ❖ Megascopio
- ❖ Microscopio de objetos invertidos C22 (Olympus)
- ❖ Orbit Shaker (Labline)
- ❖ Pipetas de 10, y 5 ml (Finnpipette)
- ❖ Potenciómetro (Equipar)
- ❖ Probetas graduadas
- ❖ Propipeta (Pepet-aid)
- ❖ Sonicador (Lab –Line instruments)
- ❖ Timer
- ❖ Tubos clínicos
- ❖ Tubos de ensaye
- ❖ Tubos de microcentrífuga (Eppendorf)
- ❖ Vasos de precipitado
- ❖ Vortex (Scientific industries)

16.3 Reactivos

- ❖ Acrilamida (Sigma)
- ❖ Antibiótico-antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomicina, anfotericina B (GIBCO BRL)
- ❖ Anticuerpos mouse monoclonal, rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology)
- ❖ Kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology)
- ❖ Marcador de peso molecular (Bio-rad)

- ❖ *Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO BRL)*
- ❖ *Medio de cultivo de Hanks (GIBCO BRL)*
- ❖ *Membrana de nitrocelulosa (Bio-rad)*
- ❖ *NaCl(Baker)*
- ❖ *PBS (SIGMA)*
- ❖ *Persulfato de amonio*
- ❖ *Suero Bovino Fetal (GIBCO BRL)*
- ❖ *Trisma (Sigma)*
- ❖ *Tripsina*
- ❖ *Tween(Sigma)*
- ❖ *Ortovanadato de sodio*

17. Análisis Estadístico

Las muestras se analizaron por densitometría. Se realizaron tres ensayos por triplicado y se obtuvo la media \pm S.E. Cualquier diferencia entre los dos grupos con un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

18.0 Resultados

Efecto del LPS sobre la fosforilación de diferentes cinasas en fibroblastos gingivales humanos

Para determinar si los flavonoides modifican los patrones de fosforilación, consecuentemente modificando la actividad de las cinasas involucradas en la señal de transducción.

Inicialmente las células fueron tratadas con LPS por diferentes periodos de tiempo. Se encontró que el tratamiento con LPS promueve la fosforilación de varias cinasas, incluyendo la familia de las MAPK (pERK 1/2, pp38, pJNK, pAKT) I κ B.

Usando el ensayo de Western Blot, se encontró que LPS a una concentración de (1mg/ml) estimula la fosforilación de las MAPK.

La máxima fosforilación de pERK 1/2, pp38, pJNK y pAKT ocurre a los quince minutos después del tratamiento.

En I κ B la translocación al núcleo ocurre a los 15 minutos. Para verificar que se usó la misma cantidad de proteína las membranas fueron desnudadas y tratadas con un control de Tubulina- γ .

Efecto de LPS sobre la fosforilación de ERK 1/2 en fibroblastos gingivales humanos

Usando en método de Western Blot, se encontró que a la estimulación de LPS a (1mg/ml) en Fibroblastos gingivales humanos ERK 1/2 se fosforiló a los cinco minutos; obteniendo su máxima fosforilación a los quince minutos de ser estimulado con lipopolisacáridos.

Posteriormente desciende drásticamente esta inducción a los 30 minutos de la estimulación con 1mg/ml de LPS.

Posteriormente se desnudó la membrana con control de Tubulina- γ .

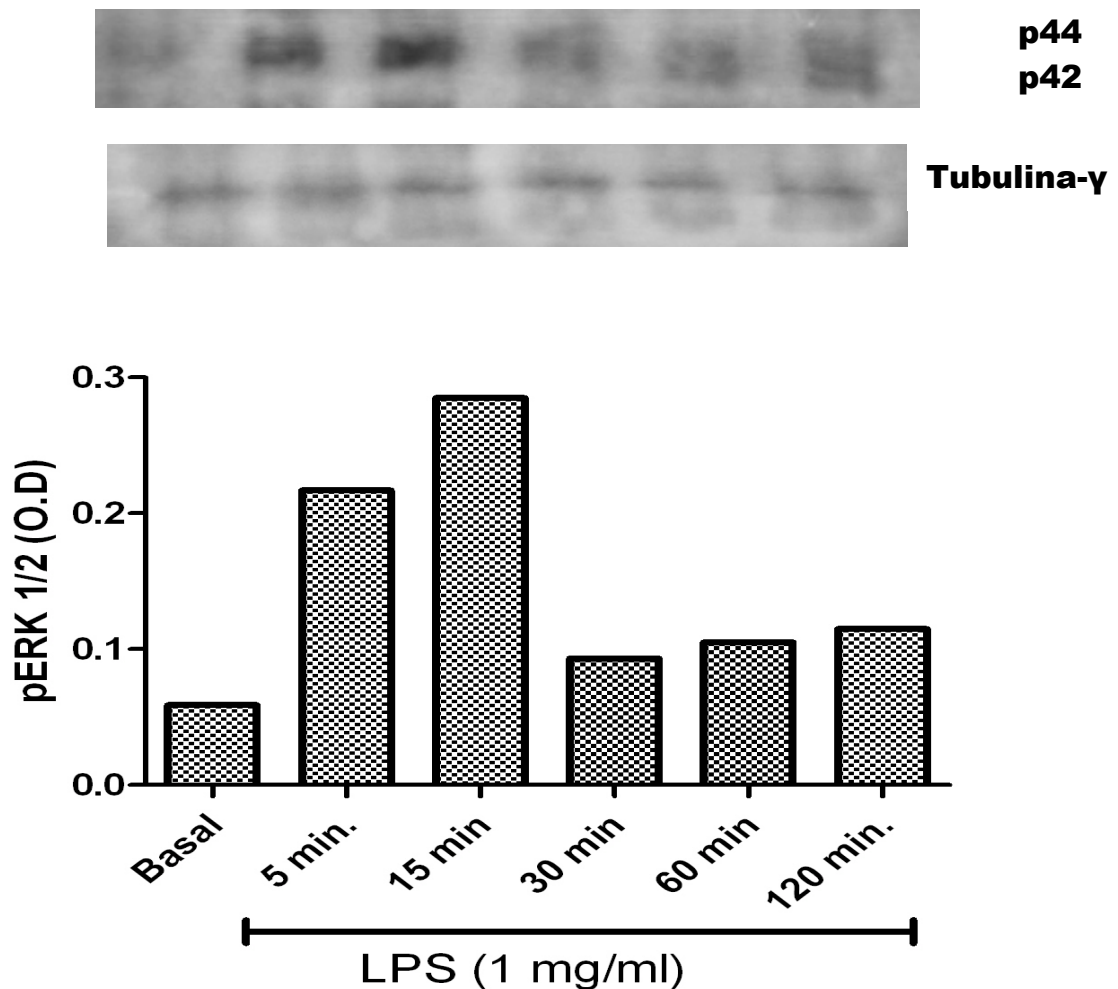


Fig.1 Efecto de LPS en curso-temporal sobre la fosforilación de ERK 1/2 en Fibroblastos Gingivales Humanos, las células fueron sembradas en cajas de seis pozos. Las células fueron estimuladas con 1mg/ml de LPS por los tiempos indicados. Las células fueron analizadas por método de Western Blot usando un anticuerpo pERK 1/2 (p44/42). Los datos mencionados se observaron en cinco diferentes experimentos. La fosforilación de las proteínas fueron cuantificadas por densitometría con Lab Works 4.0

Efecto del LPS sobre la fosforilación de pp38 en fibroblastos gingivales humanos

Por medio del método de Western Blot , los fibroblastos gingivales humanos fueron tratados a una concentración de 1mg/ml de LPS a diferentes periodos de tiempo; y se encontró que pp38 alcanzó su máxima fosforilación a los quince minutos de haber sido estimulado con la toxina. Posteriormente la fosforilación decae a los treinta minutos de la estimulación. Posteriormente se desnudó la membrana con control de Tubulina- γ .

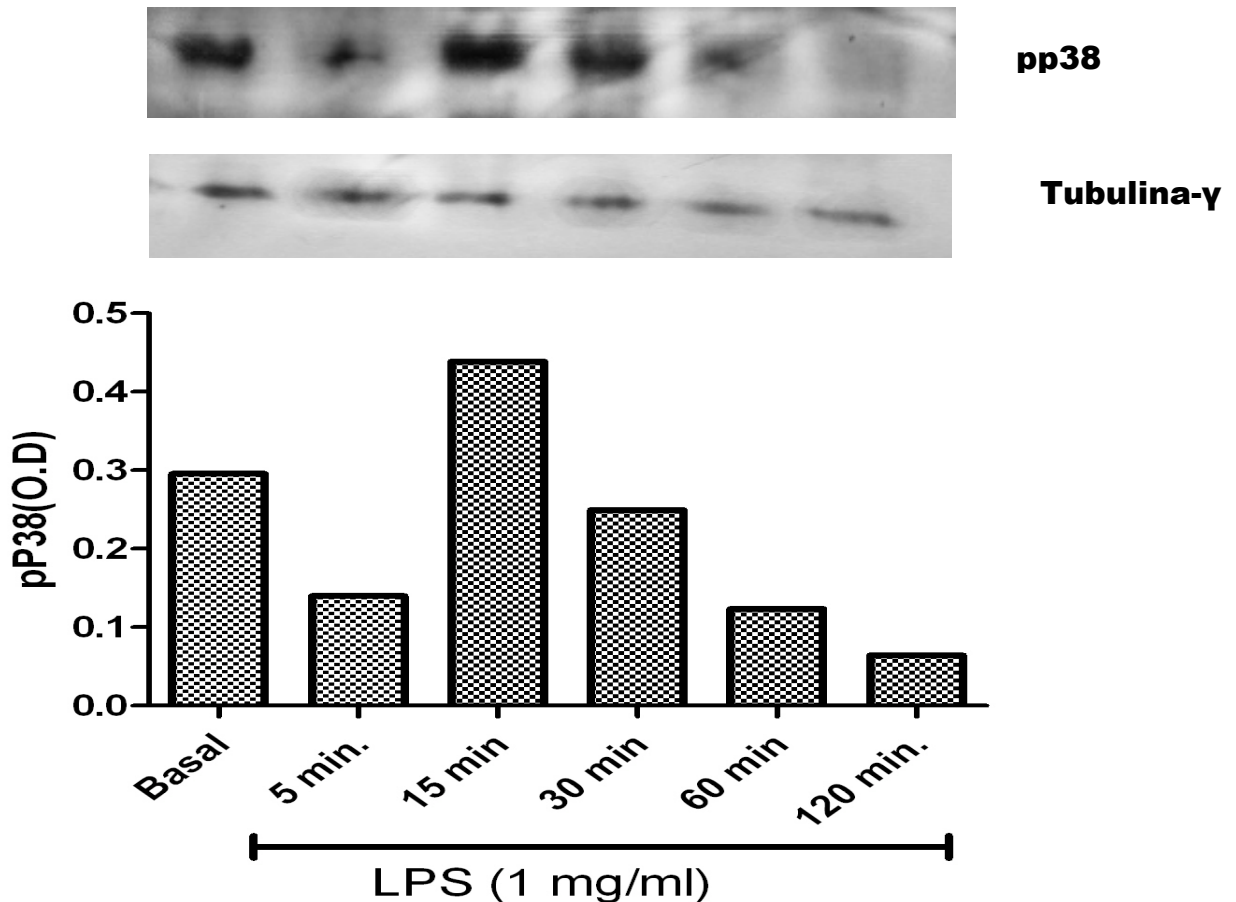


Fig.2 Efecto de LPS en curso-temporal sobre la fosforilación de pp38 en Fibroblastos Gingivales Humanos, las células fueron sembradas en cajas de seis pozos. Las células fueron estimuladas con 1mg/ml de LPS por los tiempos indicados. Las células fueron analizadas por método de Western Blot usando un anticuerpo pp38 (p43). Los datos mencionados se observaron en cinco diferentes experimentos .La fosforilación de las proteínas fueron cuantificadas por densitometría con Lab Works 4.0

Efecto del LPS sobre la fosforilación de pJNK en fibroblastos gingivales humanos

Utilizando el método de Western Blot, al estimular los fibroblastos gingivales humanos con 1mg/ml de LPS a diferentes periodos de tiempo se encontró que pJNK alcanzó su máxima fosforilación a los 15 minutos de la estimulación con LPS, en el cuál desciende a los 30 minutos. Posteriormente se desnudó la membrana con control de Tubulina- γ .

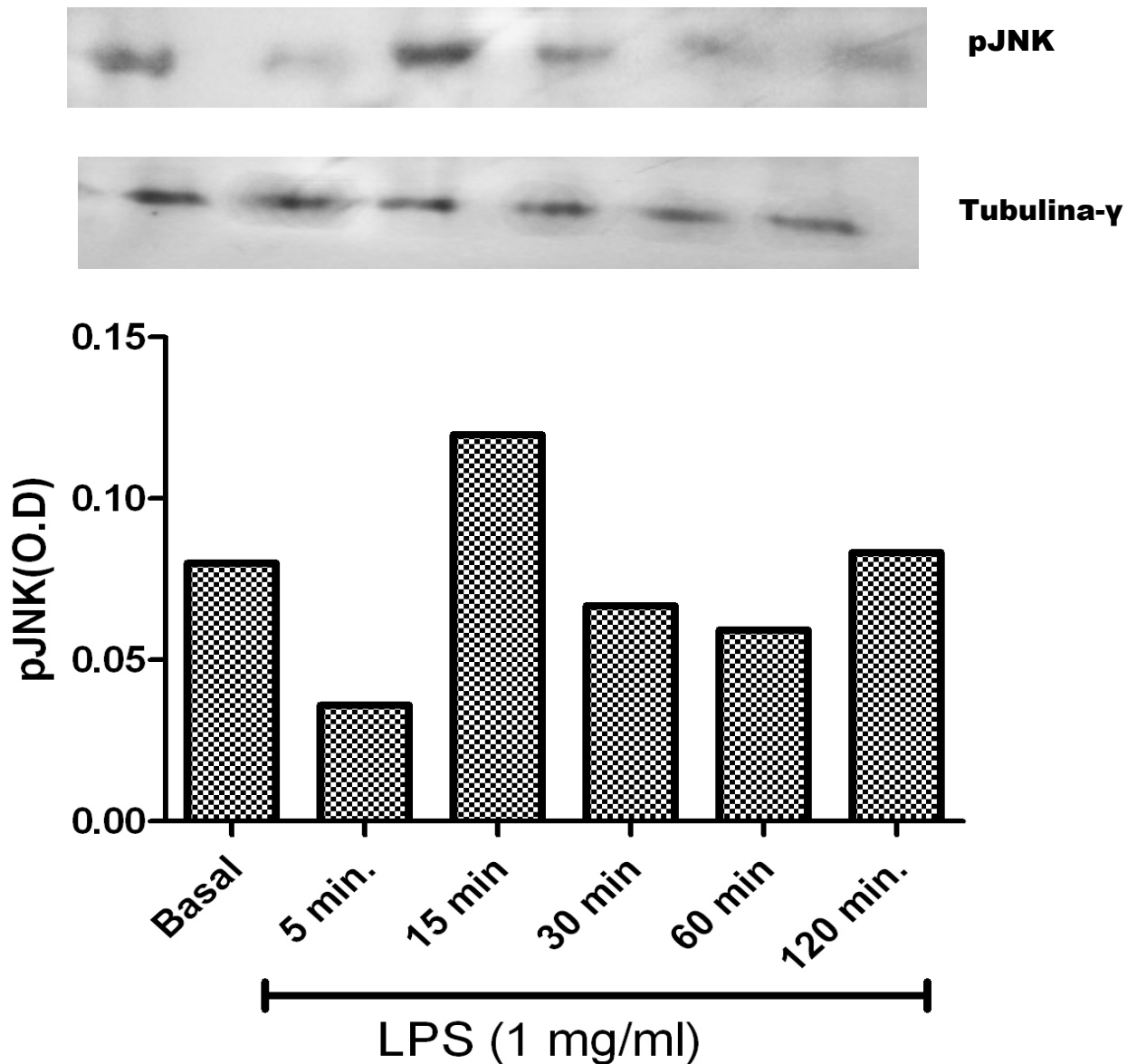


Fig.3 Efecto de LPS en curso-temporal sobre la fosforilación de pJNK en Fibroblastos Gingivales Humanos, las células fueron sembradas en cajas de seis pozos. Las células fueron estimuladas con 1mg/ml de LPS por los tiempos indicados. Las células fueron analizadas por método de Western Blot usando un anticuerpo pJNK (p46). Los datos mencionados se observaron en cinco diferentes experimentos. La fosforilación de las proteínas fueron cuantificadas por densitometría con Lab Works 4.0

Efecto del LPS sobre la fosforilación de pAKT en fibroblastos gingivales humanos

Usando en método de Western Blot, se encontró que a la estimulación de LPS a (1mg/ml) en Fibroblastos gingivales humanos pAKT se fosforiló a los cinco minutos; obteniendo su máxima fosforilación a los quince minutos de ser estimulado con lipopolisacáridos. Posteriormente desciende drásticamente esta inducción a los 30 minutos de la estimulación con 1mg/ml de LPS.

Así mismo consecutivamente se desnudó la membrana con control de Tubulina- γ .

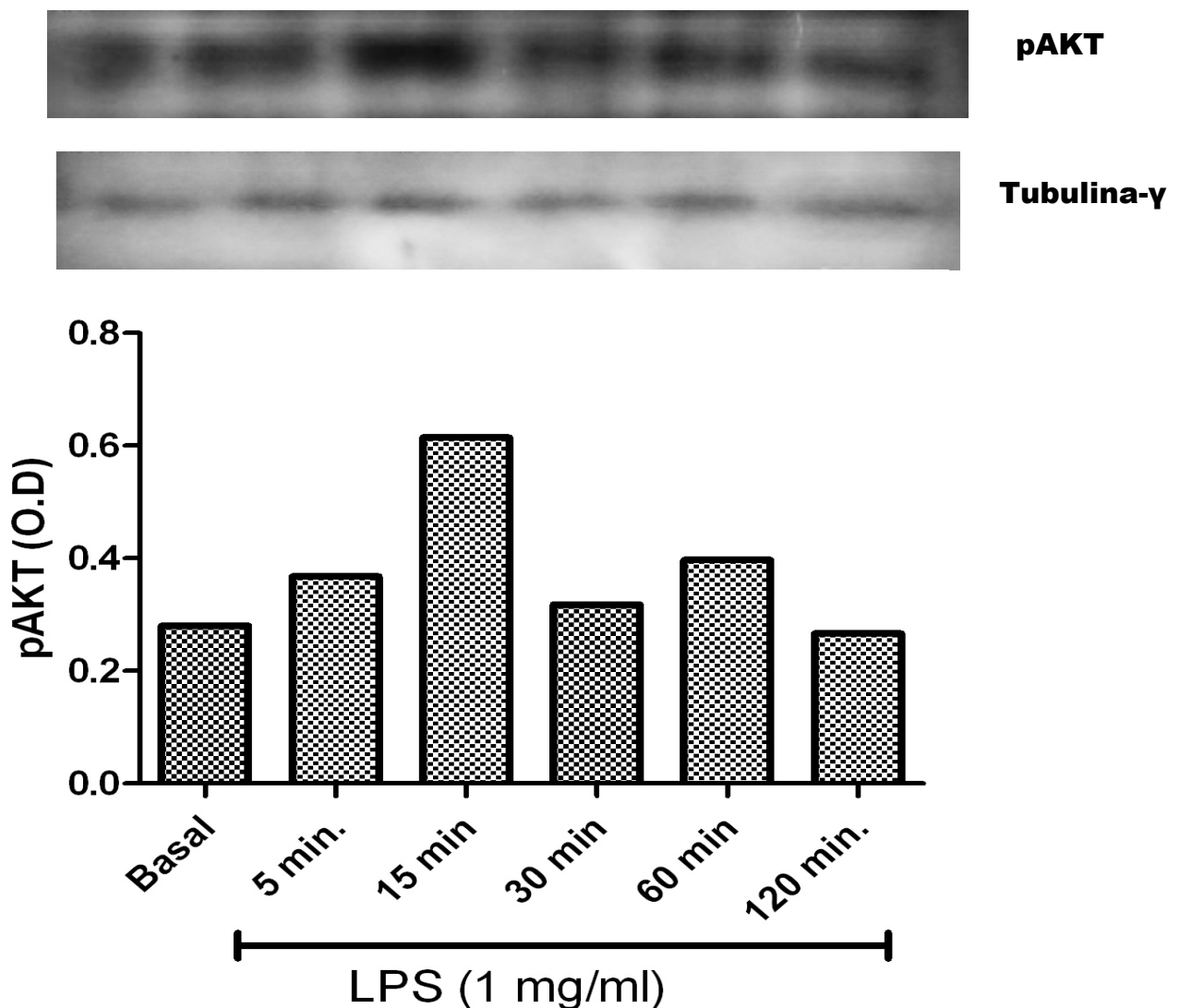


Fig.4 Efecto de LPS en curso-temporal sobre la fosforilación de pAKT en Fibroblastos Gingivales Humanos, las células fueron sembradas en cajas de seis pozos. Las células fueron estimuladas con 1mg/ml de LPS por los tiempos indicados. Las células fueron analizadas por método de Western Blot usando un anticuerpo pAKT (p55). Los datos mencionados se observaron en cinco diferentes experimentos. La fosforilación de las proteínas fueron cuantificadas por densitometría con Lab Works 4.0

Efecto del LPS sobre la degradación de IκB en fibroblastos gingivales humanos

Por medio del ensayo de Western Blot, se encontró que a la estimulación de LPS a (1mg/ml) en Fibroblastos gingivales humanos, IκB se degrada y por lo tanto se trasloca al núcleo cuando se estimula con la toxina a los quince minutos.

Así mismo consecutivamente se desnudó la membrana con control de Tubulina-γ.

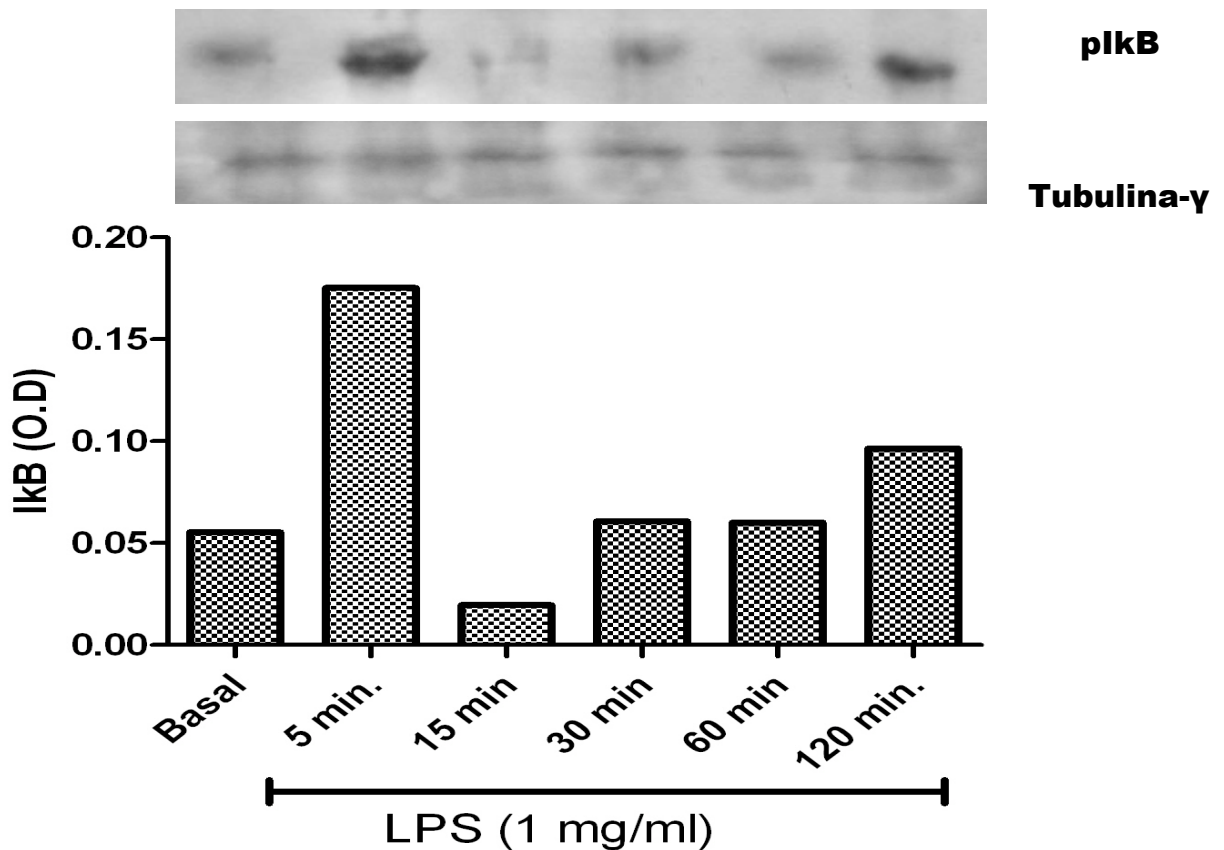


Fig.5 Efecto de LPS en curso-temporal sobre la degradación de IκB en Fibroblastos Gingivales Humanos, las células fueron sembradas en cajas de seis pozos. Las células fueron estimuladas con 1mg/ml de LPS por los tiempos indicados. Las células fueron analizadas por método de Western Blot usando un anticuerpo IκB (p50, p65). Los datos mencionados se observaron en cinco diferentes experimentos. La degradación de las proteínas fueron cuantificadas por densitometría con Lab Works 4.0

Efecto de los flavonoides en la fosforilación de las MAPK inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos

Efecto de los flavonoides en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos

Para determinar la acción de los flavonoides en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS, las células fueron preincubadas por 30 minutos con los siguientes flavonoides: luteolina, fisetina, myricetina y morina, seguidas con el tratamiento de LPS.

Los resultados mostraron que el tratamiento con LPS (1mg/ml) durante quince minutos incrementaron la fosforilación de ERK 1/2.

La luteolina y myricetina (10µl) casi completamente bloquearon la fosforilación de p44 y p42 inducida por LPS.

Para verificar que se utilizó la misma cantidad de proteína la membrana fue desnudada y tratada con anticuerpos ERK 1/2.

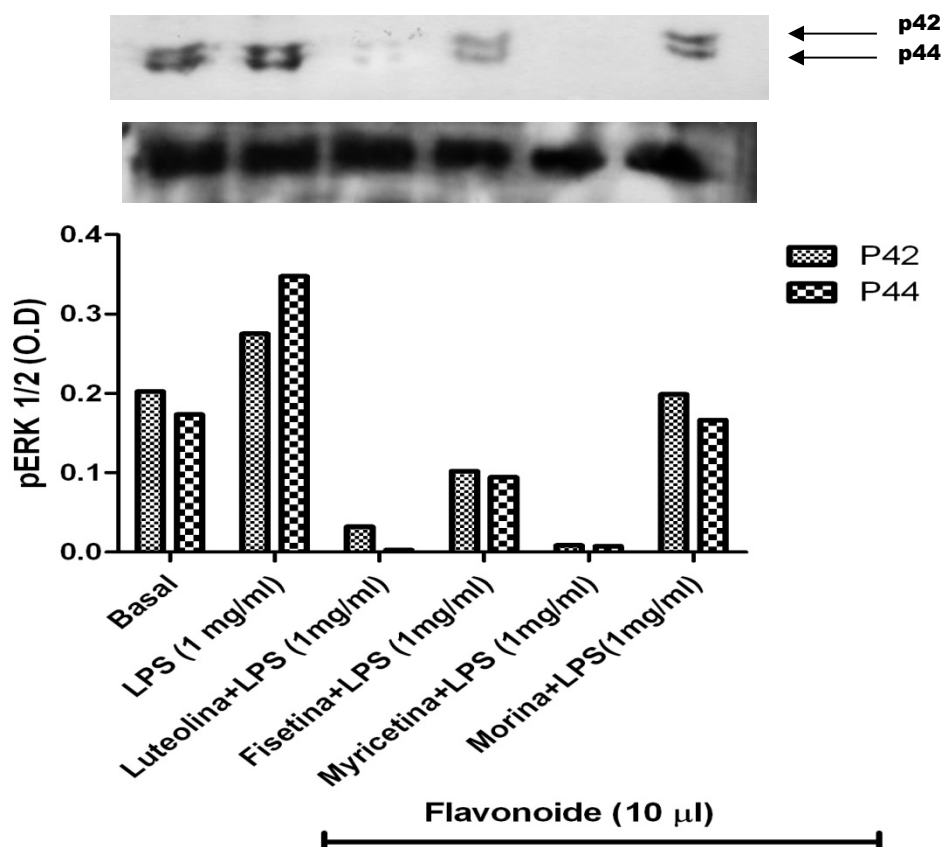


Fig.6 El efecto de la luteolina, fisetina, myricetina, morina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de pERK 1/2 inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con diferentes flavonoides (10 µM) por 30 min y posteriormente con LPS (1 µg/ml). Estas células fueron tratadas por el Análisis de Western Blot utilizando antifosfo ERK 1/2. Las membranas fueron desnudadas e incubadas con γ-Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.

Efecto de los flavonoides en la fosforilación de p38 inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos

Se probó la capacidad de los flavonoides en la inhibición de la fosforilación de p38. Se expusieron los fibroblastos gingivales humanos con LPS a (1 μ g/ml) durante 15 minutos, y se colocaron 10 μ l de cada flavonoide durante 30 minutos.

Se encontró que se produjo un incremento en la fosforilación de pp38; todos los flavonoides mostraron un efecto inhibitorio en la fosforilación de p38 inducida por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humano.

Así mismo el flavonoide que presento mayor efecto inhibitorio fue la fisetina.

Para verificar que se utilizo la misma cantidad de proteína, las membranas fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos γ -Tubulina.

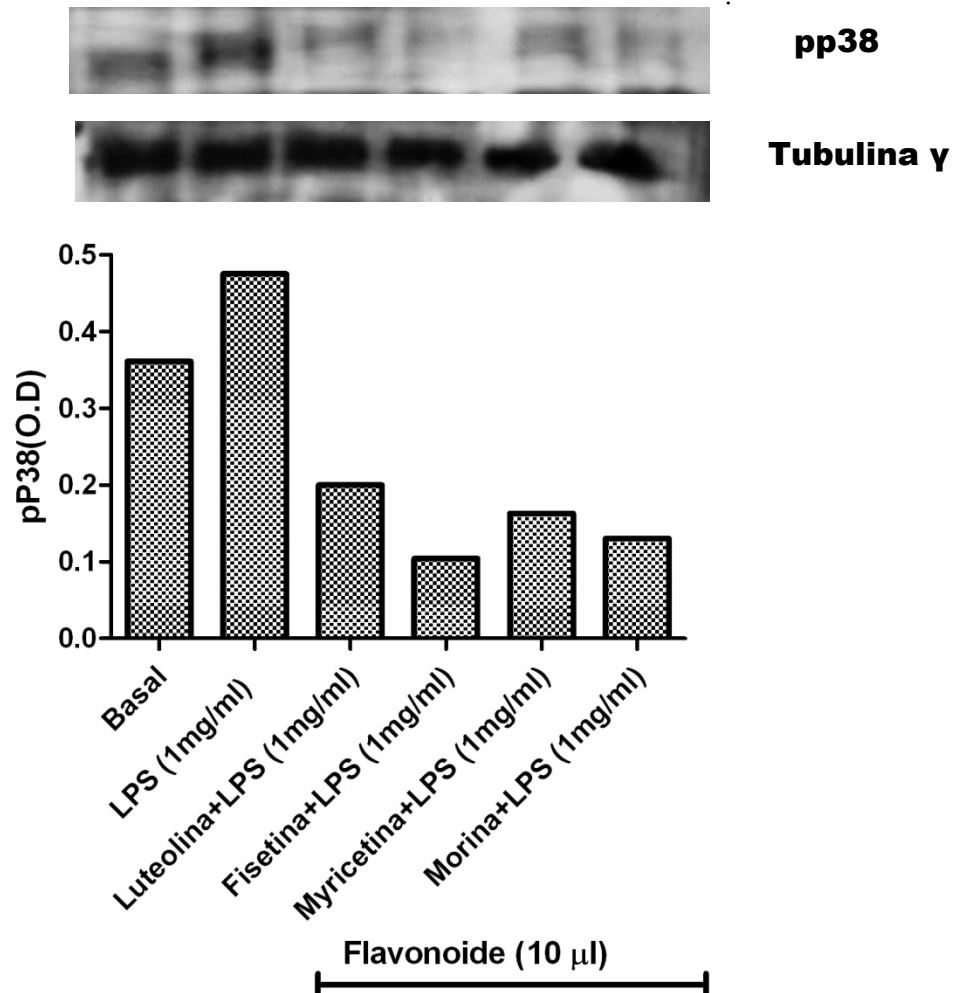


Fig.7 El efecto de la luteolina, fisetina, myricetina, morina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de p38 inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con diferentes flavonoides (10 μ M) por 30 min y posteriormente con LPS (1 μ g/ml). Estas células fueron tratadas por el Análisis de Western Blot utilizando antifosfo p38.

Las membranas fueron desnudadas e incubadas con γ -Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.

Efecto de los flavonoides en la fosforilación de JNK inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos

Se estudio el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de JNK. La exposición de fibroblastos gingivales humanos (HGF) en LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 15 minutos y con los diferentes flavonoides (10 μM) durante 30 minutos incremento la fosforilación de JNK por debajo de la actividad basal.

El flavonoide que muestra mayor fosforilación sobre JNK es la fisetina, seguida por la luteolina y morina. En el caso de la myricetina muestra poca inhibición en la fosforilación de JNK.

Para verificar que se utilizo la misma cantidad de proteína, las membranas fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos γ -Tubulina.

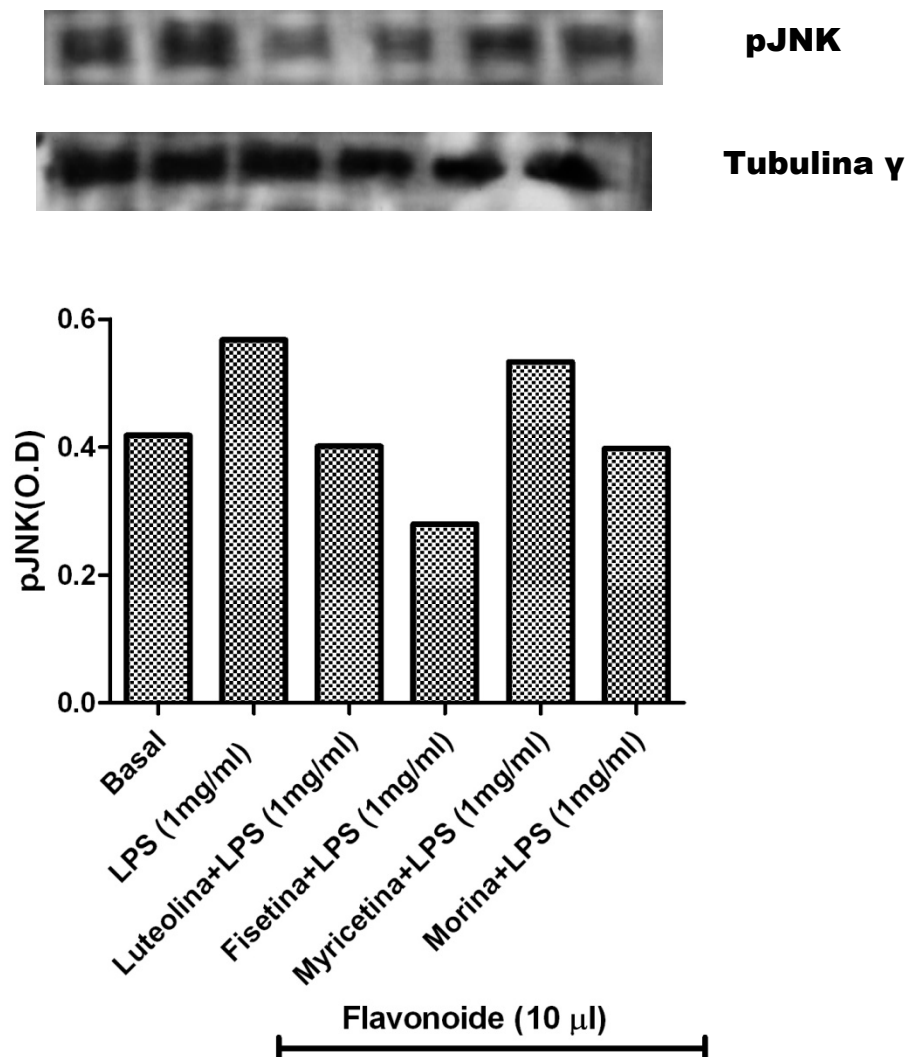


Fig.8 El efecto de la luteolina, fisetina, myricetina, morina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de pJNK inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con diferentes flavonoides (10 μM) por 30 min y posteriormente con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). Estas células fueron tratadas por el Análisis de Western Blot utilizando antifosfo pJNK.

Las membranas fueron desnudadas e incubadas con γ -Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.

Efecto de los flavonoides en la fosforilación de AKT Inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos

En el mecanismo de traducción AKT es un importante efector de fosfatidilinositol kinasa (PI3K), la activación de AKT resulta de la fosforilación de un gran número de sustratos que son importantes en la señalización de LPS.

La activación de AKT se relaciona al mantenimiento de la viabilidad celular durante la liberación de mediadores inflamatorios. (5)

Debido a esto se decidió estudiar los efectos de los flavonoides en la activación de AKT inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos (HGF).

Por medio del ensayo de Western Blot, con un tratamiento de los flavonoides (10 μ l) durante 30 minutos, así mismo estimulada con LPS (1 μ g/ml) durante 15 minutos.

Se observo que la myricetina mostró una mayor inhibición de la activación de AKT inducida por lipopolisacáridos, seguida de morina y fisetina. Luteolina mostro la menor inhibición de todos los flavonoides.

Para verificar que se utilizo la misma cantidad de proteína, las membranas fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos γ -Tubulina.

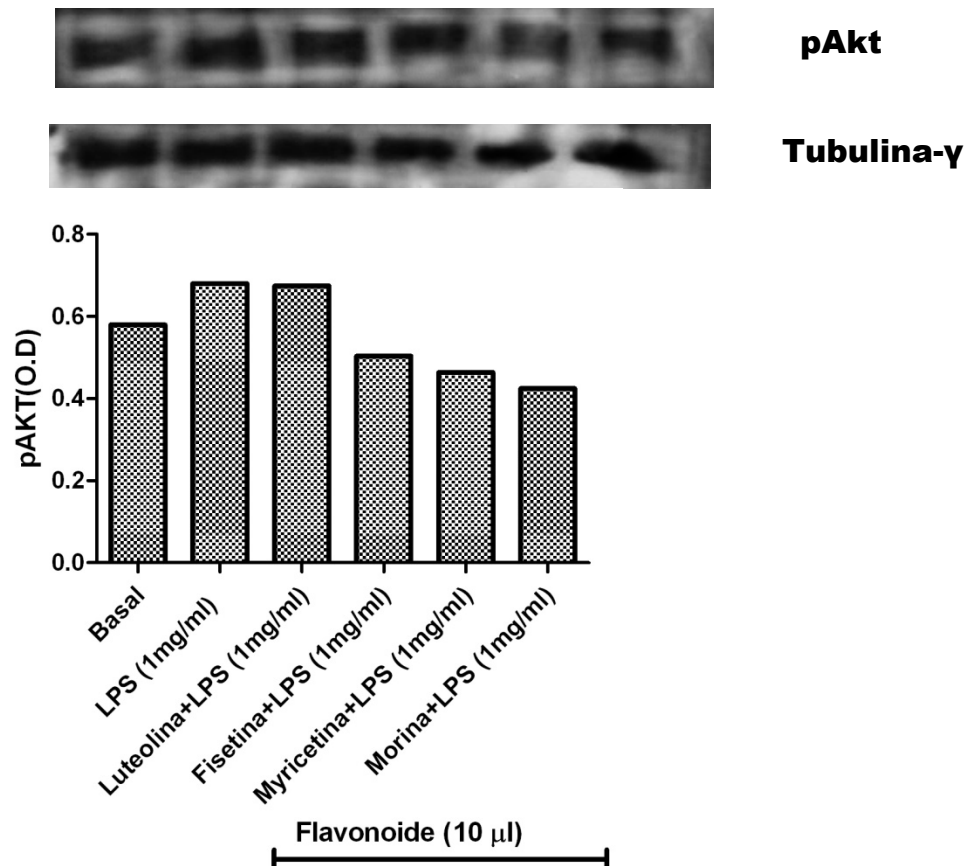


Fig.9 Los flavonoides inhiben la fosforilación AKT inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos. Las células fueron tratadas con flavonoides a (10 μ M) durante 30 minutos y LPS (1 μ g/ml) durante 15 minutos. Las membranas fueron bloqueadas e incubadas con anticuerpo pAKT. Para corroborar que se utilizo la misma cantidad de proteína fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos control. Se utilizó el ensayo de Western Blot.

Efecto de los flavonoides en la fosforilación de IκB inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos

El factor nuclear Kb es un factor de transcripción, después de la estimulación con LPS y los diferentes flavonoides utilizados IκB es fosforilado y degradado.

La degradación de IκB permite la translocación de NF-κB al núcleo, donde esta asociada con elementos inmunes y de inflamación involucradas en regiones de genes promotores.(5)

Para determinar si los flavonoides utilizados interfieren con los efectos de LPS sobre la fosforilación de IκB se realizó un ensayo de Western Blot.

Se observó que el tratamiento con los flavonoides (10 μl) durante 30 minutos y LPS (1 μg/ml) por 15 minutos; inhibe considerablemente la fosforilación de IκB principalmente luteolina siguiéndole myricetina, fisetina y morina.

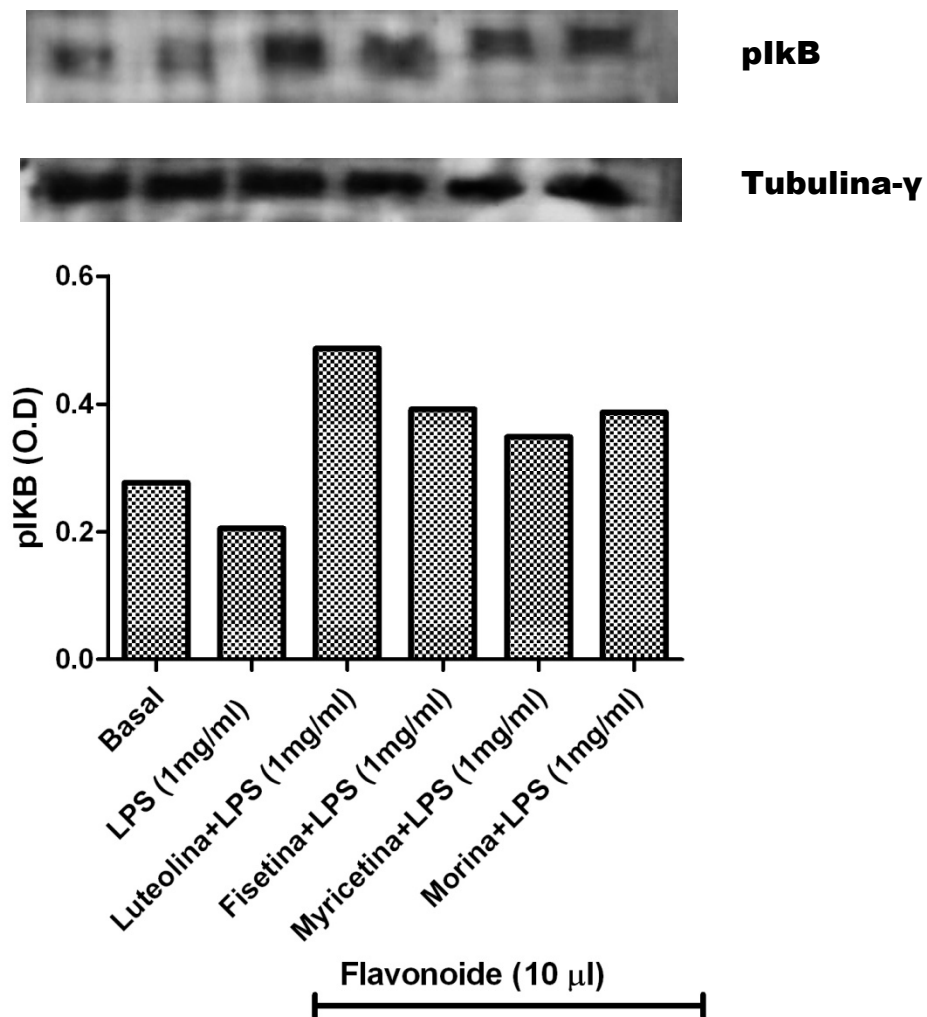


Fig 10. El efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de IκB. Los flavonoides inhiben la acción de los lipopolisacáridos inducida por la fosforilación de IκB. Las células fueron tratadas con flavonoides (10 μM) por 30 minutos y después expuesta con LPS (1 μg/ml) por 15 minutos

Efecto de los flavonoides en la expresión de COX 2 inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es una proteína que actúa como una enzima que cataliza específicamente la producción de ciertos mensajeros químicos que son las prostaglandinas. Algunos de estos mensajeros son responsables de promover la inflamación, las cuales juegan un papel importante en el proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal. Así mismo se estudió el efecto de los flavonoides en la expresión de COX-2 cuya expresión génica fue evaluada a partir de un ensayo de RT-PCR.

Dichos experimentos demostraron que los flavonoides inhiben la inducción de LPS en la expresión de COX-2.

El flavonoide que presentó bloqueo de esta inducción fue la luteolina, así mismo la fisetina, myricetina y morina mostraron una notable inhibición en la inducción de LPS en la expresión de COX-2.

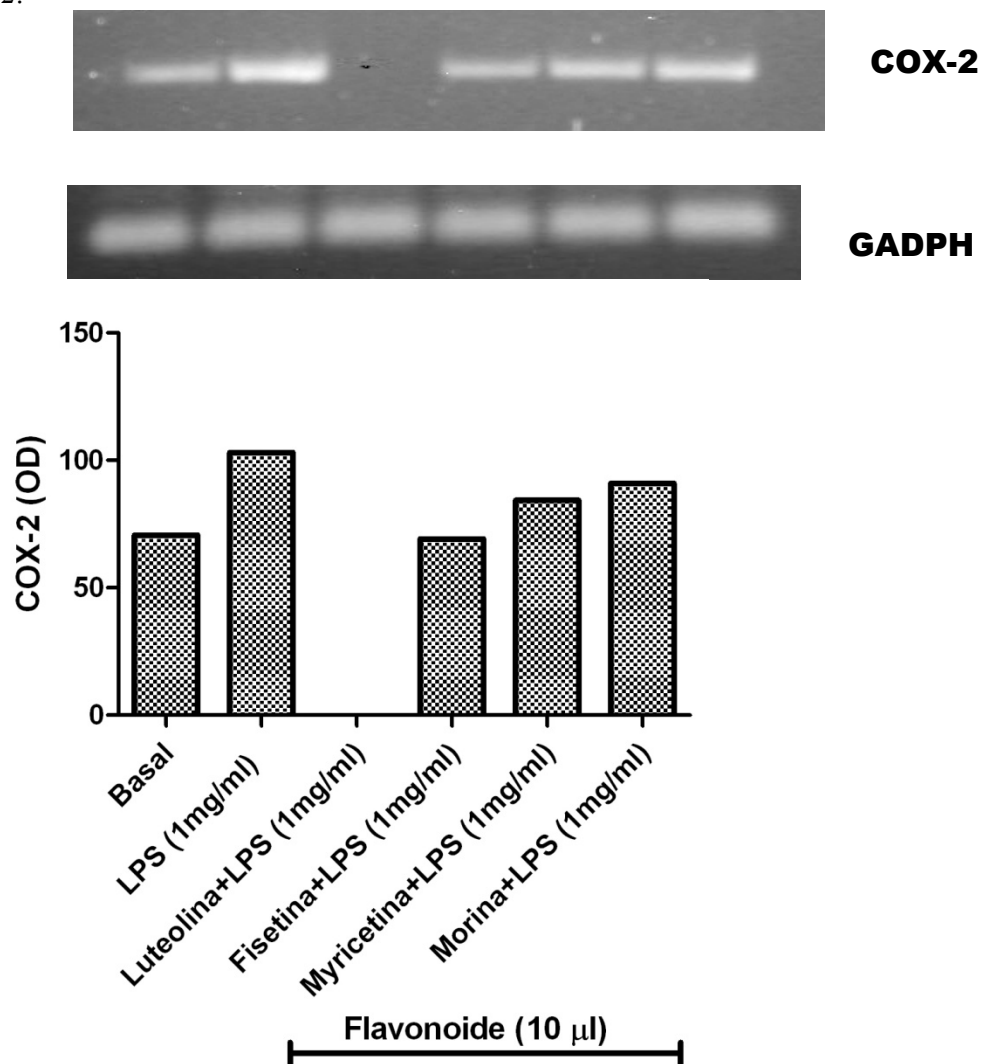


Fig 11. Efecto de los flavonoides sobre la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron tratadas con flavonoides (10 μ M) por 30 minutos y después incubada con lipopolisacáridos (LPS) (1 μ g /ml) por 4 horas .El RNA total fue extraído de estas células, y la expresión de COX-2 en RNA fue medida por el ensayo de (RT-PCR). Reacción de cadena de polimerasa en Transcriptasa Reversa. (GADPH) Glyceraldheído 3-fosfato deshidrogenasa fue usado como control.

The

INMUNOCITOQUÍMICA:

Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de IκB en fibroblastos gingivales humanos

El factor nuclear-κB es un complejo de proteína que controla la [transcripción](#) del [ADN](#). NF-κB se encuentra en casi todos los tipos celulares de animales y está involucrada en la respuesta celular a estímulos como citocinas, radicales libres, radiación ultravioleta y antígenos bacterianos o virales. NF-κB desempeña un papel clave en la regulación de la respuesta inmunitaria a la infección

El NF-κB se encuentra en el citoplasma unido a proteínas inhibidoras (IκB). Las IκB son fosforiladas por diferentes cinasas como NF-κB. Esta cinasa al ser activadas por señales dependientes de citocinas y luz ultravioleta, fosforilan las IκB provocando su ubiquitinación, su degradación por proteosoma y la subsecuente liberación y translocación al núcleo de NF-κB.

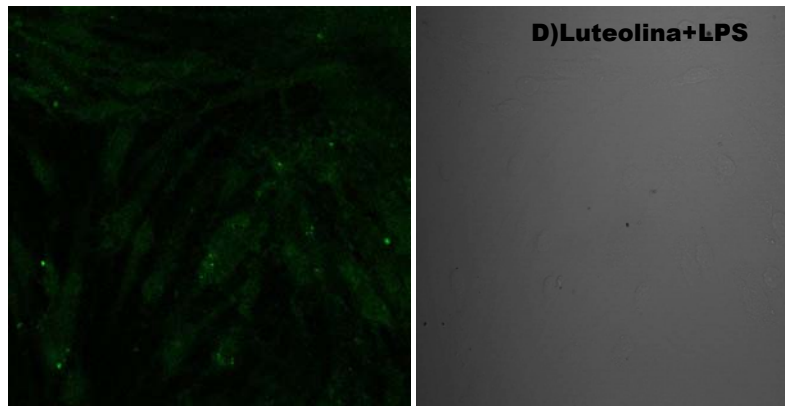
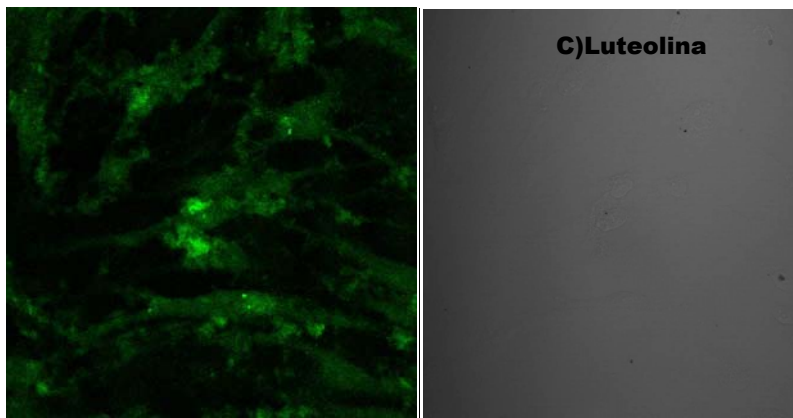
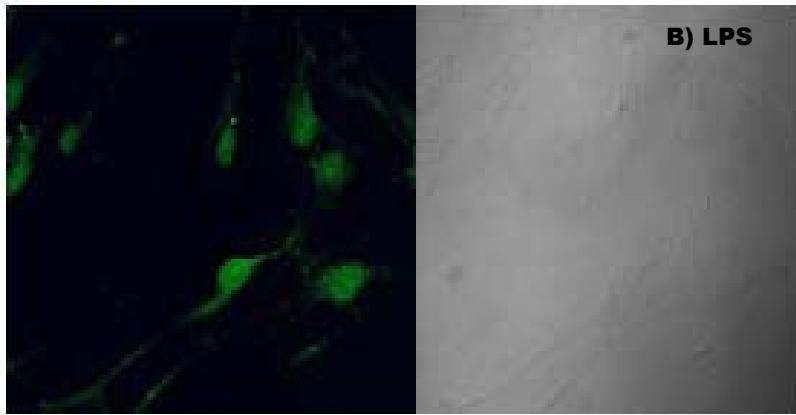
En los ensayos de inmunocitoquímica se observa NF-κB en el citoplasma de los fibroblastos gingivales humanos (A). El tratamiento con LPS causa la concentración del material teñido en el núcleo celular (B). Luteolina no tiene efecto alguno sobre la translocación de NF-κB (C); pero inhibe la translocación del núcleo de NF-κB ante los efectos de LPS (D).

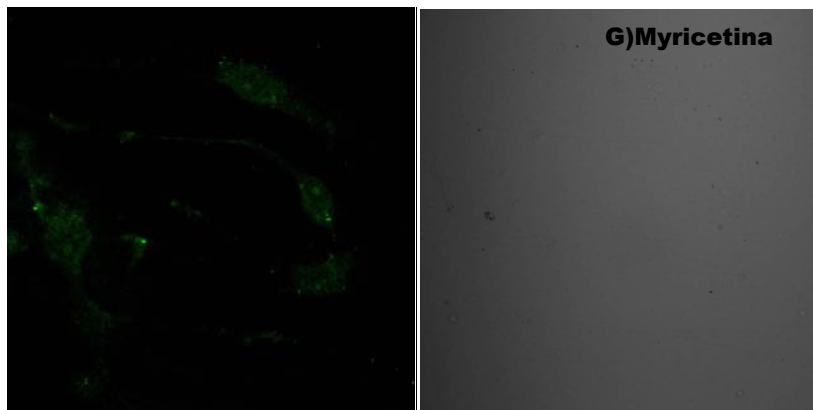
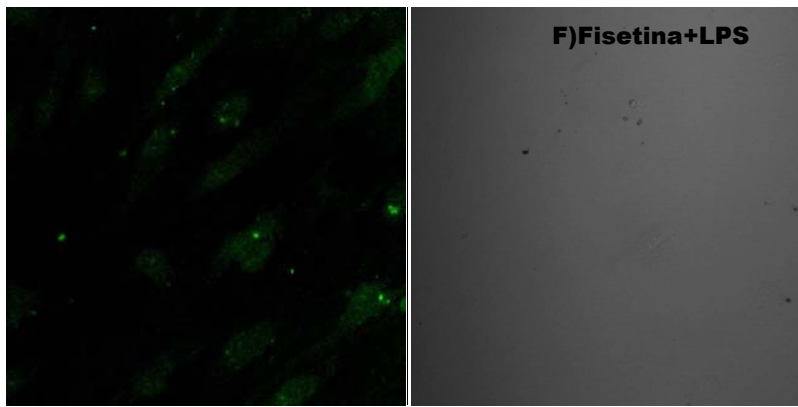
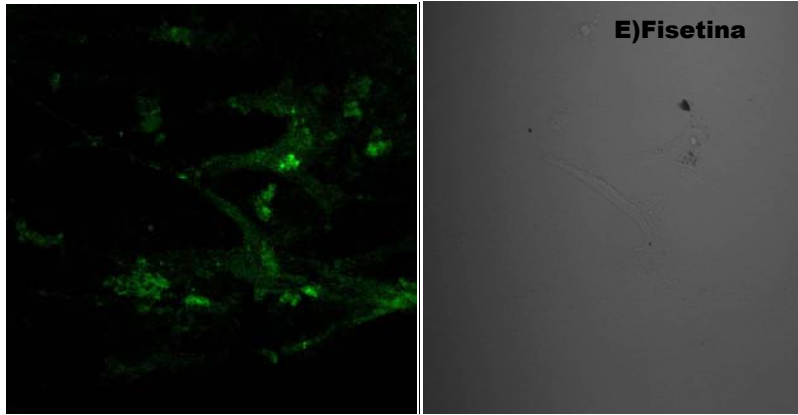
Se observó que la fisetina por sí sola no tiene efecto sobre la translocación de NF-κB (E); así mismo se observa que tiene una inhibición en los efectos de LPS en la translocación nuclear de NF-κB (D).

Myricetina no tiene efecto sobre la translocación al núcleo de NF-κB (G); pero tiene una mínima inhibición en la translocación nuclear ante la estimulación con LPS (H).

Morina no muestra efectos sobre la translocación al núcleo de NF-κB por sí sola (I) ni muestra inhibición ante la estimulación con LPS (J).







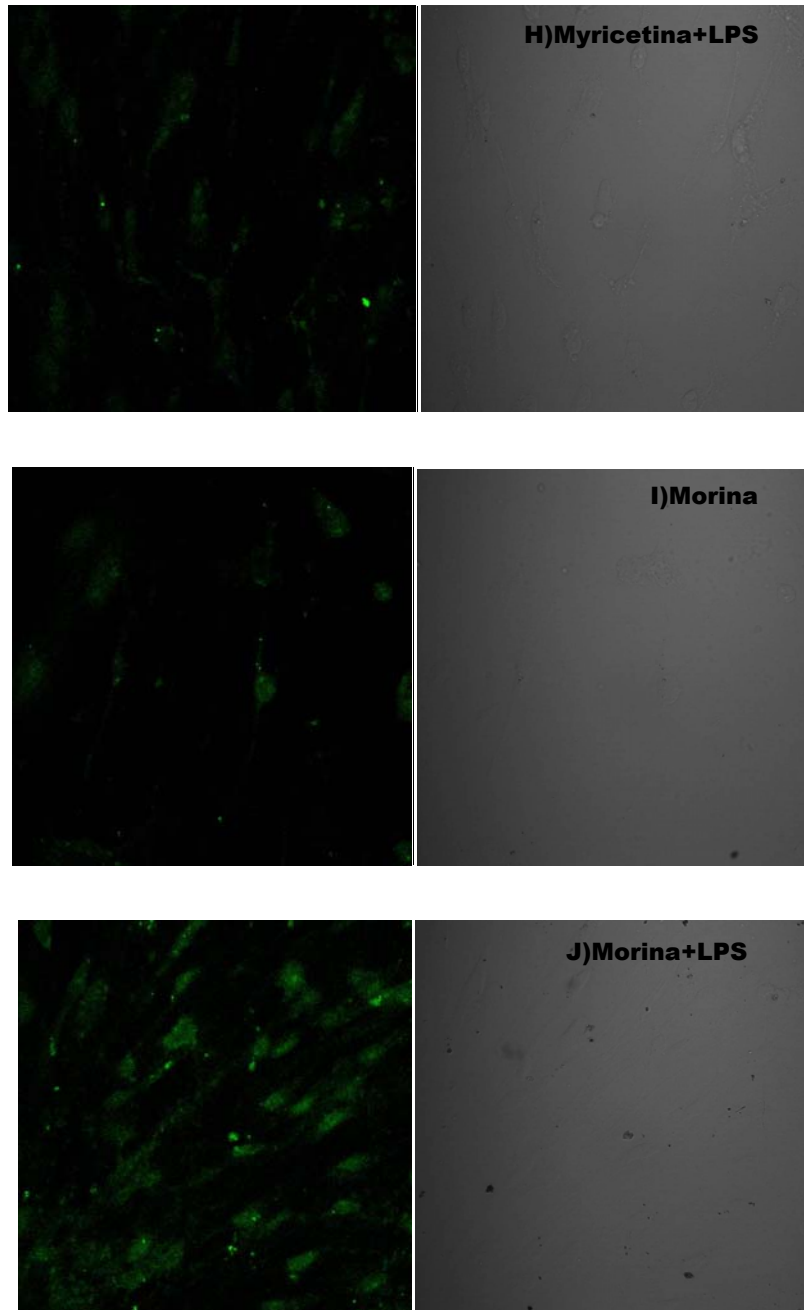


Fig.12 Inmunocitoquímica: Las células fueron procesadas como se describe en materiales y métodos. Las células fueron tratadas con 1 μ g/ml de LPS y10 μ M de los respectivos flavonoides

20.0 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Carranza FA, Newman MG, Takei HH. *Periodontología clínica*. 10ª ed. México: McGraw Interamericana; 2007
- (2) Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológicas*. 5ª ed. México: Médica Panamericana; 2008.
- (3) Hyun Pyo K., Kun Ho S. *Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms* *J Pharmacol Sci* (2004)
- (4) Middleton E, Kandaswami C. *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. *Pharmacol Rev*. 2000.
- (5) Gutiérrez-Venegas G. *The effect of flavonoids on transduction mechanisms in Lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts* .*International Immunopharmacology* (2007)
- (6) Xagoari A, Papapetropoulos A. *Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation. Cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages*. *J Pharmacology* 2001.
- (7) Forehand JR, Johnston Jr R, Bomalaski S. *Phospholipase A2 activity in human neutrophils. Stimulation by lipopolysaccharide and possible involvement in priming for an enhanced respiratory burst*. *J. Immunology* 1993.
- (8) Gutiérrez-Venegas G. *Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts* *International Immunopharmacology* (2006)
- (9) Graziani, Y., Erikson, E. *The effect of quercetin on the phosphorylation of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo*. *Eur. J. Biochem*. 1993.
- (10) Bodet C., V. D. *Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models* *J Periodont Res* 2008.
- (11) Hiroaki I. *Identification of Hop Polyphenolic Components Which Inhibit Prostaglandin E2 Production by Gingival Epithelial Cells Stimulated with Periodontal Pathogen* *Biol. Pharm. Bull.* (2008)
- (12) Armitage G. *Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions*. *Annals of Periodontology*. December 1999.
- (13) Arteaga .O, Gamonal J. *Epidemiological Research on Periodontal Diseases in Latin America* .*Mendoza Rev Chil Period Oseoint Vol 3 ; 2006*.
- (14) Okada H. *Cytokine expression in periodontal health and disease*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998
- (15) Roger A., O.D. *Terapia periodontal* .*Colombia Médica Vol. . 2004*
- (16) Farias Rodríguez F. *Enfermedad periodontal y microorganismos periodontopatógenos* .*Revista de la Universidad de Carabobo*. 2004
- (17) Bermejo A. Y Duarte J. *Mechanisms of transduction of lipopolysaccharide* . *Ars Pharmaceutica Departamento de Farmacología*. 2007
- (18) Nelson, Lehninger y Cox. *Principios de bioquímica*. Editorial Omega; 1992 y 1999.
- (19) Clemente P. *Infección e inmunidad Unidad de Inmunodeficiencias*. Departamento de Pediatría. Hospital 12 de Octubre. Madrid
- (20) Beutler B, Poltorak A. *Sepsis and evolution of the innate immune response*. *Crit Care Med* 2000; 29:S2-S7.
- (21) Janeway JCA, Medzhitov R. *Introduction: the role of innate immunity in the*

- adaptive innate response. Semin Immunol 1998;10:349-350.*
- (22) Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med 2002;30:S1-S11.*
- (23) Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today 1992;13:11-16.*
- (24) Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science 1996;272:50-53.*
- (25) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science 1990;249:1431-1433.*
- (26) Frey EA, Miller DS, Jahr TG, et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med 1992;196:1665-1671.*
- (27) Wright SD, Levin SM, Jong MT, et al. CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med 1989; 169:175-183.*
- (28) Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, et al. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol 2001;166:574-581*
- (29) Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med 1999;189:1777-1782.*
- (30) Schromm AB, Lien E, Henneke P, et al. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin induced signaling. *J Exp Med 2001;194:79-88.*
- (31) Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell 1985;42:791-798.*
- (32) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell 1996; 86:973-983.*
- (33) DeLotto Y, DeLotto R. Proteolytic processing of the *Drosophila* Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. *Mech Dev 1998; 72:141-148.*
- (34) Kidd S. Characterization of the *Drosophila* *cactus* locus and analysis of interactions between *cactus* and dorsal proteins. *Cell 1992; 71:623-635.*
- (35) Taguchi T, Mitchman JL, Dower SK, et al. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics 1996; 32:486-488.*
- (36) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature 1997; 388:394-397.*
- (37) Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:588-593.*
- (38) Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, et al. TLR6: a novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene 1999; 231:59-65.*
- (39) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host defense mechanisms striggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science 1999; 285:732-736.*

- (40) Takeuchi O, Hosmino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11:443-451.
- (41) Acad. Dr. Raúl Carrillo-Esper*. *Inmunidad innata, receptores Toll y sepsis* Cir Ciruj 2003; 71: 252-258
- (42) Keehoon J., Jung-Eun L., Hak-Zoo K., Toll-Like Receptor 4 Decoy, TOY, Attenuates Gram-Negative Bacterial Sepsis.
- (43) Beutler B, Rietschel ET (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3: 169–176.
- (44) Visintin A, Iliev DB, Monks BG, Halmen KA, Golenbock DT (2006) Md-2. *Immunobiology* 211: 437–447
- (45) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394–397.
- (46) Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, et al. (2007) Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130: 906–917.
- (47) Bella J, Hindle KL, McEwan PA, Lovell SC (2008) The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol Life Sci* 65: 2307–2333.
- (48) Ohto U, Fukase K, Miyake K, Satow Y (2007) Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVA. *Science* 316: 1632–1634.
- (49) Pugin J, Stern-Voefferly S, Daubeuf B, Matthay MA, Elson G, et al. (2004) Soluble MD-2 activity in plasma from patients with severe sepsis and septic shock. *Blood* 104: 4071–4079.
- (50) Visintin A, Halmen KA, Latz E, Monks BG, Golenbock DT (2005) Pharmacological inhibition of endotoxin responses is achieved by targeting the TLR4 coreceptor, MD-2. *J Immunol* 175: 6465–6472.
- (51) Riedemann NC, Guo RF, Ward PA (2003) The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112: 460–467.
- (52) Fort MM, Mozaffarian A, Stover AG, Correia Jda S, Johnson DA, et al. (2005) A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 174: 6416–6423
- (53) Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885–891.
- (54) Kawai T, Akira S (2007) TLR signaling. *Semin Immunol* 19: 24–32.
- (55) Beutler B (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257–263.
- (56) Beutler B (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257–263.
- (57) León C. .Rita.Jessica Jia.Olena Sivak. Kishor M Wasan. *Discovery and development of Toll-Like receptor 4 (TLR4) Antagonists: A new Paradigm for Treating sepsis and other disease.Pharmaceutical Research .Vol 25 No 8 August 2008*
- (58) S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras* y M.ª J Tuñón Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Departamento de Fisiología, Universidad de León y *Hospital de León. España. *Rev Nutr. Hosp.* (2002) XVII .
- (59) Pérez Trueba G. Los flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. Centro de Investigaciones Biomédicas. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 2003 :22(1)
- (60) Giuseppe M. , Avenoso, Salvatore A, Paola Traina, Angela D'Ascola, Alberto Calatroni. *Archives of Biochemistry and Biophysics*

- Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes . Medical Chemistry. Messina, Italy.2006*
- (61) D.E. Zak, A. Aderem, *Immunol. Rev.* 227 (2009) 264–282.
- (62) Y. Kumagai, O. Takeuchi, S. Akira, *J. Infect. Chemother.* 14 (2008) 86–92.
- (63) M. Fischer, M. Ehlers, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1143 (2008) 21–34.
- (64) T.M. Watters, E.F. Kenny, L.A. O’Neill, *Immunol. Cell Biol.* 85 (2007) 411–419.
- (65) M. Rescigno, F. Granucci, S. Citterio, M. Foti, P. Ricciardi-Castagnoli, *Immunol. Today* 20 (1999) 200–203.
- (66) T. J. Beveridge. *Use of the gram stain in microbiology. Biotech. Histochem.* 76:111–118 (2001).
- (67) C. A. Janeway Jr, and R. Medzhitov. *Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol.* 20:197–216 (2002).
- (68) J. C. Chow, D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, and F. Gusovsky. *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. J. Biol. Chem.* 274:10689–10692 (1999).
- (69) J. A. Yethon, and C. Whitfield. *Lipopolysaccharide as a target for the development of novel therapeutics in gram-negative bacteria. Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 1:91–106 (2001).
- (70) J. E. Parrillo, M. M. Parker, C. Natanson, A. F. Suffredini, R. L. Danner, R. E. Cunnion, and F. P. Ognibene. *Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. Ann. Intern. Med.* 113:227–242 (1990).
- (71) N. J. Gay, and M. Gangloff. *Structure and function of toll receptors and their ligands. Annu. Rev. Biochem.* 76:141–165 (2007).
- (72) S. L. Doyle, and L. A. O’Neill. *Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. Biochem. Pharmacol.* 72:1102– 1113 (2006).
- (73) L. A. O’Neill, and A. G. Bowie. *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol.* 7:353–364 (2007).
- (74) De Vos A., Jennie M. Pater, Petra S. van den Pangaart, Martijn D. de Kruif, Cornelis van ’t Veer, and Tom van der Poll. *J. Immunol.* 2009;183;533-542
In Vivo Lipopolysaccharide Exposure of Human Blood Leukocytes Induces Cross-Tolerance to Multiple TLR Ligands.
- (75) Akira, S., and K. Takeda. 2004. *Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol.* 4: 499–511.
- (76) Marinovic M. *Inmunología Clínica.Receptores de Tipo Toll y su Implicancia en Autoinmunidad.Universidad de Chile*
- (77) Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M y Roy S: *Oxygen, Oxidants, and Antioxidants in Wound Healing: A Emerging Paradigm. Ann N Y Acad Sci,* 2002, 957:239-249.
- (78). Garcia Gonzalez, *Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. Mini Rev Med Chem.* 2009 Jan;9(1):31-59 , Sevilla, Spain
- (79) Yong Lin, Ranxin Shi, Xia Wan, and Han-Ming Shen. *Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and Therapy Curr Cancer Drug Targets.* 2008

November ; 8(7): 634–646. China

(80) Bokyung Sung, Manoj K. Pandey, and Bharat B. Aggarwal Fisetin, an Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 6, Down-Regulates Nuclear Factor- κ B-Regulated Cell Proliferation, Antiapoptotic and Metastatic Gene Products through the Suppression of TAK-1 and Receptor-Interacting Protein-Regulated I κ B Kinase Activation. *Molecular Pharmacology* Vol. 71, No. 6 71:1703–1714, 2007

(81) Sung Keun J., Ki Won Lee, Sanguine Byun, Myricetin Suppresses UVB-Induced Skin Cancer by Targeting Fyn. *Cancer Research*. 2006

(82) V. Sivaramakrishnan, S. Niranjali Devaraj. Morin regulates the expression of NF- κ B-p65, COX-2 and matrix metalloproteinases in diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Chemico-Biological Interactions*. 2009

(83) Kim JM, Lee EK, Park G, Kim MK Morin modulates the oxidative stress-induced NF- κ B pathway through its anti-oxidant activity. (*Free Radic Res*. 2010).

(84) Maher P, Akaishi T, Abe K. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory.

INDICE

1.0 Resumen.....	6
2.0 Planteamiento del Problema.....	7
3.0 Justificación de Estudios.....	8
4.0 Introducción.....	9
5.0 Antecedentes.....	10
6.0 Periodonto.....	11
6.1 Encía.....	11
6.1.1 Encía libre o marginal.....	11
6.1.2 Encía adherida o insertada.....	11
6.1.3 Encía interdentaria.....	12
6.2. Ligamento Periodontal.....	12
6.3. Cemento radicular.....	12
6.3.1. Cemento primario o acelular.....	13
6.3.2 Cemento secundario o celular.....	13
6.4. Hueso alveolar.....	13
7.0. Enfermedad Periodontal.....	14
7.1. Definición.....	14
7.2 Clasificación de enfermedad periodontal.....	14
7.3 Prevalencia de la enfermedad periodontal.....	18
7.4. Factores de riesgo de la enfermedad periodontal.....	19
7.4.1. Edad.....	19
7.4.2. Género.....	19
7.4.3 Factores Genéticos.....	19
7.5. Prevención.....	19
7.5.1. Higiene Bucal.....	19
7.5.2 Nutrición.....	19
7.5.3. Floruros.....	20
7.5.4. Hábitos adversos.....	20
7.5.5. Cuidado dental profesional.....	20
7.6. Etiología y patogénesis de la enfermedad periodontal.....	20
7.7. Procesos inflamatorios de la enfermedad periodontal.....	22
7.7.1 Expresión de las citocinas en la enfermedad periodontal.....	23
7.7.1.1. Proteinasas e inhibidores.....	23
7.7.1.2. Metaloproteinasas de la matriz.....	23
7.7.1.3 Leucocitos Polimorfonucleares.....	24
7.7.1.4. Citocinas proinflamatorias.....	25
7.7.1.4.1 Interleucina-1 (IL-1), IL-6 y TNF.....	20
7.7.1.5. Citocinas quimiotácticas.....	26
7.7.1.5.1 Interleucina-8 (IL-8).....	26

7.7.1.6. Citocinas señaladoras de linfocitos.....	27
7.7.1.7 Linfocitos (Células T y B).....	27
7.7.1.8. Prostaglandinas.....	28
7.7.1.9. Monocitos y Macrófagos.....	28
7.8. Microbiología de la enfermedad periodontal.....	29
7.8.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans.....	29
7.8.2 Porphyromonas gingivalis.....	29
7.8.3 Bacteroides forsythus.....	30
7.8.4 Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens.....	30
7.8.5 Fusobacterium nucleatum.....	30
7.8.6 Campylobacter rectus.....	31
7.8.7 Eikenella corrodens.....	31
7.8.8 Peptostreptococcus micros.....	31
7.8.9. Especies de Selenomonas.....	31
7.8.10. Especies de Eubacterium.....	32
7.8.11 Streptococcus intermedius	32
7.8.12. Espiroquetas.....	32
8.0. Lipopolisacáridos.....	32
9.0 Respuesta inmune y receptores Toll.....	33
9.1 Respuesta inmune innata.....	34
9.2. Respuesta inmune adaptativa.....	35
9.3 Receptores Toll.....	37
9.3.1. Receptores Toll en Drosophila melanogaster.....	37
9.3.2 Receptores Toll en humanos.....	38
9.4 Receptores Toll y Lipopolisacáridos.....	39
10.0 Flavonoides.....	43
10.1. Propiedades y acciones de los flavonoides.....	43
10.2. Estructura química.....	44
10.3. Síntesis, absorción y metabolismo.....	45
10.4. Flavonoides que se utilizaron en la investigación.....	45
10.4.1 Luteolina.....	45
10.4.2. Fisetina.....	46
10.4.3. Mirycetina.....	47
10.4.5 Morina.....	47
11.0. Objetivo General.....	48
12.0 Objetivo Específico.....	48
13.0 Hipótesis Verdadera.....	48
14.0 Hipótesis Falsa.....	48
15.0 Tipo de estudio.....	48
16.0 Materiales y Métodos.....	48

16.1 Métodos.....	48
16.1.2. Ensayo de Western Blot.....	49
16.1.2. RT-PCR.....	49
16.1.3 Inmunocitoquímica.....	50
16.2. Material y Equipo a emplear.....	50
16.2.1 Población de estudio.....	50
16.2.2. Selección y tamaño de la muestra.....	50
16.2.3. Cultivo de fibroblastos gingivales.....	50
16.2.4. Equipo y Marca.....	51
16.3 Reactivos.....	51
17.0 Análisis Estadístico.....	52
18.0 Resultados.....	52
19.0 Discusión.....	68
20.0 Bibliografía.....	70

19.0. Discusión

En esta investigación estudiamos el efecto de los flavonoides (luteolina, myricetina, morina y fisetina) sobre los efectos del lipopolisacárido obtenido de Porphyromonas gingivalis en fibroblastos gingivales humanos.

La enfermedad periodontal consiste en un conjunto de afecciones en el periodonto, lo que conlleva daños en los tejidos de soporte del diente y en ocasiones a la pérdida del órgano dentario. Las bacterias presentes en la placa dentobacteriana son las responsables de la enfermedad sin embargo, otros factores entre los que se encuentra la predisposición genética, sistémicos como la desnutrición, tabaquismo, estrés, edad, inmunodepresión y factores locales como sarro o enfermedades como la diabetes, promueven el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Como la enfermedad periodontal afecta y daña las encías y el hueso de soporte, decidimos utilizar como modelo de estudio a los fibroblastos gingivales que son las células más abundantes y determinar las acciones del lipopolisacárido obtenido de un periodontopatógeno muy agresivo como Porphyromonas gingivalis, sobre proteínas involucradas en la señalización intracelular y la regulación de la expresión de genes. Nos interesó evaluar a proteínas con actividad cinasa como los miembros de las proteínas activadas por mitógeno (ERK, p38, AKT y JNK) I κ B y sobre la expresión de ciclooxigenasa-2, enzima que sintetiza prostaglandina E2 y que promueve procesos inflamatorios.

Por otra parte deseamos evaluar así mismo el efecto de un grupo de moléculas polifenólicas presentes en nuestra dieta en frutas, vegetales, cereales, té y vinos denominados flavonoides a los que históricamente se les han atribuido actividades antioxidantes por su actividad depuradora de especies reactivas del oxígeno. Aunque estudios recientes han mostrado que su actividad antioxidante no se presente en modelo in vivo en el cerebro pero que protegen a las neuronas para aumentar su función neuronal y estimular su regeneración.

Los flavonoides se clasifican en: flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavonoles. Todas estas moléculas consisten en dos anillos bencénicos unidos por una piranosa y presentan modificaciones en la posición de los grupos oxi y del doble enlace entre los carbonos 2 y 3.

En esta investigación encontramos que el LPS induce la activación de p38, ERK y JNK todas estas proteínas son miembros de las proteínas activadas por mitógeno y de la expresión de ciclooxigenasa-2.

Nuestros resultados muestran que los flavonoides inhiben la activación de ERK y JNK inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos. Luteolina y myricetina mostraron un alto efecto inhibitorio incluso por debajo de la actividad basal, lo que sugiere que posiblemente regulen sus efecto mediante la activación de fosfatasa, aunque hasta el momento no existen reportes por lo que en el futuro deberán realizarse mayores investigaciones a fin explorar el efecto de estos polifenoles sobre la actividad de ERK. Por otra parte, fisetina y morina mostraron un menor efecto inhibitorio. Efecto que ya ha sido reportado en células endoteliales. (83)

En otra serie de resultados encontramos que los flavonoides inhiben la activación de JNK inducida por LPS. En lo que se refiere a fisetina, diversos estudios señalan que fisetina

regula actividad metastásica en células PC-3 mediante la vía de señalización de PI-3K y JNK. Sin embargo, luteolina y morina muestran efectos inhibitorios.

Finalmente, los resultados obtenidos de esta investigación muestran que los flavonoides presentan efectos opuestos a reacciones inflamatorias, lo que motiva a realizar una mayor investigación con el propósito de caracterizar el efecto de alguno de estos flavonoides en la regulación de los genes involucrados en regular la respuesta inflamatoria en la encía, misma que al inicio es una mecanismo de defensa pero cuya acción crónica conlleva al desarrollo de la enfermedad periodontal. (84)