



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

REGULACIÓN DE I κ B POR ENDOTOXINAS
BACTERIANAS

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:

KARLA DANIELA CARDOSO MORENO

TUTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

MÉXICO, D.F.

2009



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.

**Tu preciosa sonrisa sin duda aceptará
este cuento como regalo de amor**

Lewis Carrol

*A mis padres Marco y Gloria,
a mis hermanos Ericka y Marco,
a Leo, Evaristo y el bebé
y a Daniel, por todo su apoyo y su cariño.*

Quisiera agradecer a la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por sus enseñanzas, por permitirme trabajar con usted y por su paciencia en todo este tiempo.

Y también agradecer a mi universidad, a la cual pertenezco orgullosamente, por ser la máxima casa de estudios, puma de corazón, orgullosamente UNAM.

INDICE

1. RESUMEN.	6
2. INTRODUCCIÓN.	6
3. ANTECEDENTES	7
3.1 PERIODONTO	8
3.1.1 Encía	8
3.1.2. Ligamento Periodontal.....	12
3.1.3. Cemento	12
3.1.4. Hueso Alveolar	13
3.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL	14
3.2.1 Etiología.....	14
3.2.2 Placa Bacteriana	15
3.2.3. Factores Predisponentes.....	21
3.3 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL	22
3.3.1 Procesos destructivos microbianos.....	25
3.3.2 Proceso Inflamatorio: moléculas y células implicadas	27
3.3.3 Proceso Inflamatorio.....	34
3.3.4 Inflamación Aguda	34
3.3.5 Inflamación Crónica. Mecanismos Específicos de Defensa.	40
3.3.6. Respuesta Inmune Humoral	41
3.3.7. Respuesta Inmune Celular	43
3.3.8 Anticuerpos Específicos	44
3.3.9 Receptores Toll.....	47
3.3.10 Vías de Transducción de señales intracelulares	49
3.3.11 Cascadas de señalización	50
3.3.12 Expresión génica	51
3.3.13 $\text{NF}\kappa\text{B}$	52
4. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.	54
5. JUSTIFICACIÓN	55
6. HIPÓTESIS	55
7. OBJETIVO	55
8. MATERIALES Y MÉTODO.	56
9. RESULTADOS	59

9.1 Efecto del lipopolisacárido sobre la expresión de MyD88.	59
9.2 Efecto del Lipopolisacárido sobre la degradación I- κ B.	60
9.3 Efecto de inhibidores sobre la regulación de la degradación de I- κ B inducida por LPS.	62
9.4 Efecto del LPS sobre la expresión de IL-1 β	63
10. DISCUSION	63
11. CONCLUSIONES	65
12.- BIBLIOGRAFIA	66

1. RESUMEN.

Los lipopolisacáridos (LPS) están asociados al desarrollo de la enfermedad periodontal actuando como mediador proinflamatorio. Objetivo: El objetivo de este trabajo es probar la hipótesis que el tratamiento con lipopolisacáridos promueve la degradación de I κ B y la expresión de mediadores inflamatorios como IL-1 β . Método: Fibroblastos gingivales humanos fueron expuestos a LPS in vitro. La expresión de genes proinflamatorios se determinó por RT-PCR, la degradación de I κ B se estudió por ensayo de Western Blot. Resultados: En fibroblastos gingivales humanos, la modulación de la vía I κ B afecta respuestas a la estimulación con LPS. Sin embargo, la inhibición farmacológica de la vía NF κ B suprime fuertemente la expresión de genes proinflamatorios inducida por LPS. Conclusiones: LPS induce la expresión de genes proinflamatorios y esta inducción está regulada por la vía de NF κ B. Los resultados sugieren que el periodonto está fuertemente predispuesto a respuestas proinflamatorias.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una enfermedad progresiva causada por una mala higiene oral y uno de los principales problemas de salud bucal en la población adulta mexicana.

La falta de prevención y de programas de salud bucal que difundan información precisa, sencilla y concreta entre la población mexicana y el aumento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas han contribuido al mantenimiento y desarrollo de ésta enfermedad dentro de nuestra población. Su prevención constituye uno de los mayores retos que enfrenta la Odontología moderna en México.

La enfermedad periodontal se caracteriza por reacciones inflamatorias e inmunes que afectan a los tejidos de sostén del diente. Todo esto como

respuesta del hospedero ante la presencia de las toxinas liberadas por las bacterias presentes en la placa dentobacteriana¹.

La flora bucal normal es parte importante en la salud y enfermedad del individuo ya que contribuye a la resistencia para la colonización de microorganismos patógenos. Las enfermedades bucales asociadas a placa dentobacteriana aparecen ante un desequilibrio entre los microorganismos nativos de la boca lo que conlleva a la pérdida de la homeostasis y al desarrollo de la enfermedad gingival y periodontal².

1. ANTECEDENTES

Las últimas investigaciones han demostrado que padecimientos como la sepsis bacteriana y la muerte por choque séptico son causadas por las endotoxinas de bacterias Gram-negativas así como también presencia de los componentes de la pared de las bacterias Gram-positivas específicamente ácido lipoteicoico y peptidoglucano.

De igual manera, durante los primeros estadios de la enfermedad periodontal resulta trascendental la presencia de bacterias Gram-positivas ya que ellas van a ser las primeras colonizadoras de los tejidos bucales y van a dar lugar a las primeras formaciones de placa dentobacteriana supragingival; todo este proceso facilita la adhesión de otras bacterias de mayor virulencia para el hospedero como las del grupo de las Gram-negativas¹.

3.1 PERIODONTO

3.1.1 Encía

La encía es esa parte de la mucosa masticatoria que recubre al proceso alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. La encía adquiere su forma y textura finales con la erupción de los dientes. (Fig. 1)



Fig. 1. Características Macroscópicas de la encía.

odontoweb.espaciolatino.com/pacientes/cavoral/encias.html

Cuando se inserta una sonda periodontal en esta invaginación apicalmente hacia el límite cementodentinario, el tejido gingival se aparta del diente y se abre una cavidad virtual o “surco gingival”. Por esto, en la encía clínicamente sana no hay en verdad un “surco gingival”, sino que la encía está en el estrecho contacto con la superficie adamantina. Terminada la erupción dental,

el margen gingival libre se ubica sobre la superficie adamantina aproximadamente 0.5-3 mm hacia oclusal o incisal del límite cementoadamantino (Fig. 2).

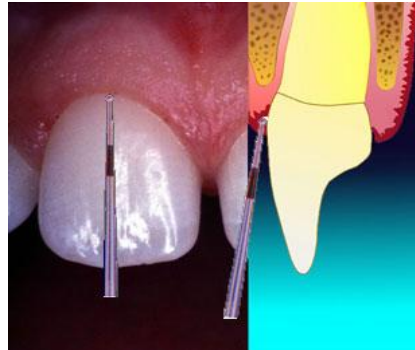


Fig.2. Sondeo periodontal de una encía sana.

http://www.igb.es/Odonto/LTAas/cap1/c1_165sm.htm

Tejido Conectivo

El tejido predominante de la encía y el ligamento periodontal es conectivo. Los componentes principales del tejido conectivo son las fibras colágenas (60%), fibroblastos (5%), vasos, nervios y matriz (35%).

Células. Los diferentes tipos presentes en el tejido conectivo son:

- 1) Fibroblastos. Célula del tejido conectivo que más predomina (65%). Es una célula fusiforme o estrellada con núcleo de forma ovalada; su citoplasma contiene un retículo endoplásmico granuloso bien desarrollado con ribosomas. Está dedicado a la producción de diversos tipos de fibras halladas en el tejido conectivo, pero además interviene en la síntesis de la matriz de este tejido (Fig. 3).

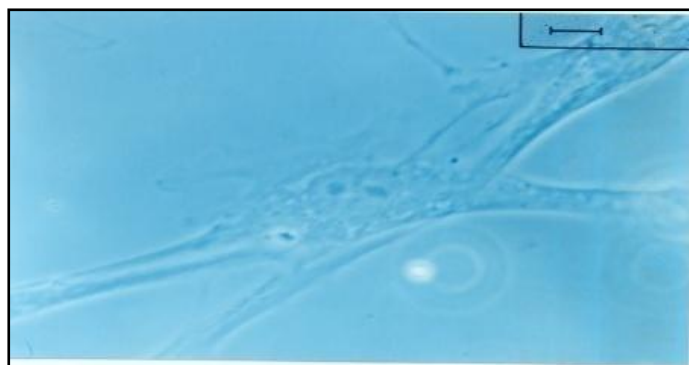


Fig. 3. Fibroblasto gingival humano.
Microscopía de interferencia de Nomarski. Aumento 100x.

- 2) Mastocitos. Es responsable de la producción de ciertos componentes de la matriz. Esta célula produce asimismo sustancias vasoactivas, que pueden afectar la función del sistema microvascular y controlar el flujo de sangre a través del tejido. El citoplasma se caracteriza por tener gran cantidad de vesículas de tamaños variables que contienen enzimas proteolíticas, histamina y heparina (Fig. 4).

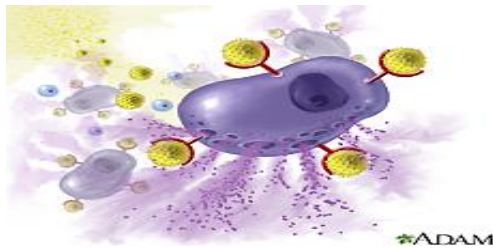


Fig.4. Esquema de Mastocito.

www.zonamedica.com.ar/.../susceptibilidad.htm

- 3) Macrófagos. Sus funciones son fagocíticas y sintéticas dentro del tejido. Abundan en especial en el tejido inflamado. Derivan de los monocitos sanguíneos migrados dentro del tejido. A menudo se encuentran restos de material fagocitado en sus vesículas lisosómicas: fagosomas (Fig. 5).

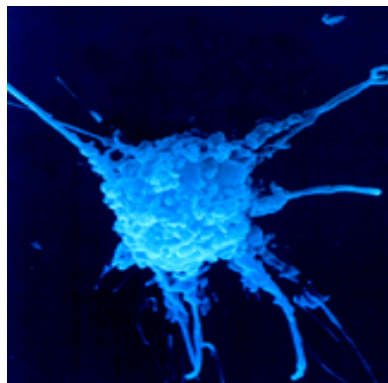


Fig.5. Macrófago

<http://www.mingha-africa.org/img/progetti/foto1.gif>

- 4) Leucocitos Polimorfonucleares. El núcleo es lobulado y en el citoplasma se encuentran numerosos lisosomas. (Fig. 6)

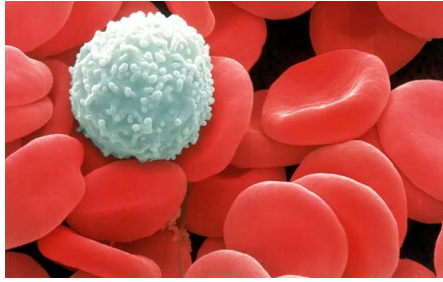


Fig. 6. Leucocito PMN.
es.encarta.msn.com

- 5) Linfocitos. Se caracterizan por presentar un núcleo esférico que contiene zonas localizadas de cromatina densa (Fig. 7).



Fig. 7. Linfocito saliendo de la médula.
soko.com.ar/Biología/ Sida/lmg_linf_B_1.htm

- 6) Plasmocitos. Contienen un núcleo esférico ubicado excéntricamente con cromatina densa desplegada radialmente (Fig. 8).

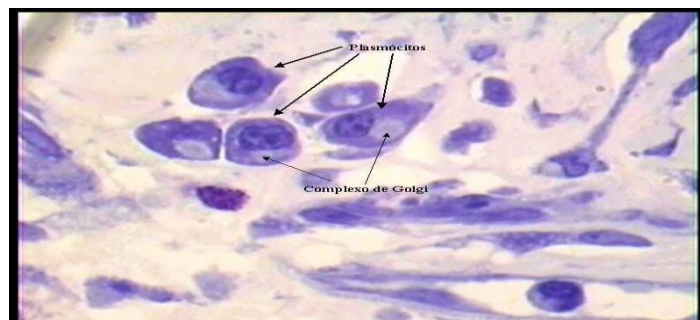


Fig. 8. Plasmocitos.

www.unifal-mg.edu.br/.../

Matriz del Tejido Conectivo.

La matriz del tejido conectivo es producida primero por los fibroblastos, aunque algunos componentes son generados por los mastocitos y otros provienen de la sangre. La matriz es el medio en el cual están incluidas las células del tejido

conectivo y es esencial para el mantenimiento de la función normal del tejido conectivo. De tal modo, el transporte de agua, electrolitos, de nutrientes, de metabolitos, etc. desde y hacia las células conectivas individuales se produce dentro de la matriz².

3.1.2. Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo que rodea la raíz del diente relacionándolo de forma directa con el hueso, éste se continúa con el tejido conectivo de la encía y se comunica con el hueso mediante los canales vasculares que se encuentran ubicados en los espacios medulares del mismo (Fig. 9).

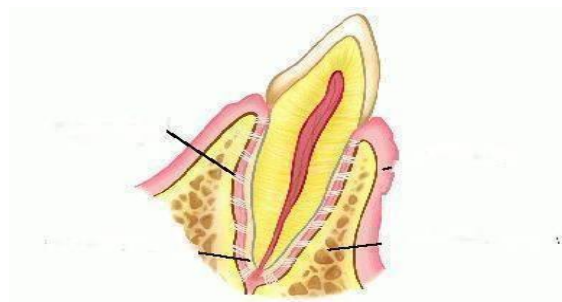


Fig. 9 Ligamento periodontal

<http://www.mercksource.com/ppdocs/common/dorland/chapters/images>

3.1.3. Cemento

El cemento es un tejido avascular que carece de inervación propia, calcificado y mesenquimático que constituye la porción externa de la raíz anatómica. El cemento cubre y protege la totalidad de la superficie radicular del diente desde el cuello anatómico hasta el ápice, aunque en ocasiones puede extenderse sobre el esmalte en la región cervical (Fig. 10).

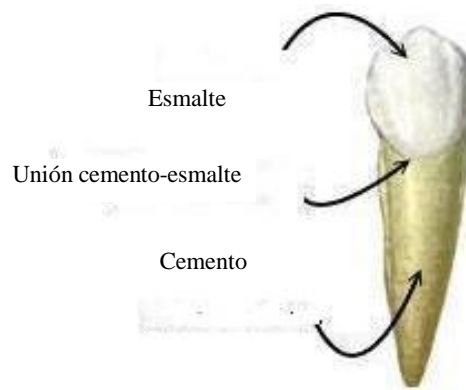


Figura. 10. Cemento.

www.doctorspiller.com

3.1.4. Hueso Alveolar

El proceso alveolar es la porción del maxilar y mandíbula que forma y soporta los alvéolos dentales. El proceso alveolar se forma cuando los dientes erupcionan y se reabsorbe gradualmente cuando los dientes se pierden. 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, por ejemplo, por la masticación y por otros contactos dentarios (Fig. 11).



Fig. 11. Hueso Alveolar.

bioanthropology.huji.ac.il

3.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL

El término enfermedad periodontal, se refiere a un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan los tejidos de soporte del diente, encía, hueso y ligamento periodontal. Se considera el resultado del desequilibrio entre la

interacción inmunológica del huésped y la flora de la placa dental marginal que coloniza el surco gingival³.

3.2.1 Etiología

Durante siglos los libros de texto odontológicos recomendaban la higiene bucal correcta como medida de prevención contra las enfermedades dentarias. Sin embargo la importancia de los depósitos dentarios para la generación de enfermedad periodontal careció de bases científicas hasta mediados del siglo pasado, cuando se realizaron estudios epidemiológicos bien trazados. A partir de tales estudios quedó establecido que la presencia de depósitos dentarios, mineralizados o no es sin duda el factor más importante en la generación de enfermedad periodontal (OMS 1961).

La evidencia definitiva para esta afirmación fue el producto de estudios clínicos en los que se inició gingivitis experimentalmente mediante la abolición de los procedimientos de higiene bucal. Cuando se reinstituyó un régimen correcto de higiene bucal, la inflamación gingival se resolvió en una semana con recuperación de la salud gingival.

Se ha extraído una evidencia adicional del papel de los depósitos dentarios en el hombre a partir de estudios en los cuales el progreso de la enfermedad periodontal se retrasó muchísimo mediante la introducción de las medidas de higiene bucal. En personas altamente motivadas, el correcto control de placa puede prácticamente detener el progreso de la enfermedad periodontal y, tras la terapéutica, induce una considerable reparación ósea en pacientes que perdieron el sostén óseo a causa de la enfermedad periodontal. De tal modo, hay excelentes razones para afirmar que los depósitos de placa son el factor principal para el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad periodontal³.

3.2.2 Placa Bacteriana

Se ha definido a la placa bacteriana (microbiana o dental) como agregados microbianos a los dientes u otras estructuras bucales sólidas. Otra definición distingue la placa microbiana de la materia alba; ésta última estaría constituida

por agregados microbianos, leucocitos y células epiteliales bucales descamadas que se acumulan en una boca no limpia sobre la superficie de placas y dientes (OMS, 1961). Según esta definición, la distinción entre la placa microbiana y materia alba está determinada por la intensidad de la adhesión del depósito. Si la acción mecánica de un chorro fuerte de agua lo elimina, este material se denomina materia alba; si soporta el chorro de agua, se trata de placa microbiana.

Se puede apreciar clínicamente la placa supragingival cuando ya ha alcanzado cierto espesor y aparece entonces como una capa blancuzca, amarillenta, sobre todo a lo largo de los márgenes gingivales de los dientes (Fig. 12). Puede ser difícil identificar la placa cuando se halla presente en cantidades pequeñas. En este caso, se puede confirmar su presencia por raspado de la superficie dentaria a lo largo del margen gingival con el extremo de una sonda o mediante la utilización de una solución reveladora. Ésta puede ser un colorante convencional, que pigmente la placa, o un colorante fluorescente que puede ser visto con iluminación con luz ultravioleta².



Fig. 12. Placa Dentobacteriana.

http://corygre2myweb.uga.edu/links/plaque_pic.JPG

La placa ubicada en subgingival no puede ser diagnosticada directamente *in situ* y como suele estar en capas delgadas, no es posible diagnosticar estos depósitos por inspección clínica. Se puede formar placa en cualquier punto de las estructuras sólidas de la boca, si el lugar está protegido de la acción de la limpieza mecánica normal por la lengua, los carrillos y los labios.

De tal modo, los depósitos de placa se encuentran irregularmente presentes en las fisuras de las caras oclusales, en las fosas e irregularidades, y

aún en las superficies dentales lisas, en obturaciones y coronas artificiales y sobre todo, en restauraciones mal adaptadas, bandas ortodóncicas, aparatos ortodóncicos y prótesis removibles y mal ajustadas¹(Fig. 13).



Fig. 13. Enfermedad Periodontal por prótesis mal ajustadas
www.iqb.es/odonto/altas/cap3/ppics/c3_775sm.jpg

Ecología de la microflora bucal

La cavidad bucal es estéril en el momento del nacimiento, pero entre las 6 y 10 horas se establece una flora principalmente aerobia. Los anaerobios aparecen en algunas bocas en los 10 primeros días, y se encuentran presentes en casi todas a los cinco meses de edad, antes de la erupción de los dientes y en 100% de las bocas cuando aparecen los incisivos. Con la edad, aumentan los anaerobios, pero los de tipo facultativo siguen predominando numéricamente. El cálculo microscópico en la saliva oscila de 43 millones a 5 500 millones de microorganismos por mililitro, con un promedio de 750 millones. En la tabla 1 está un censo representativo de la población bacteriana de la saliva. Asimismo, en la boca hay hongos, incluso *Candida*, *Cryptococcus* y *Saccharomyces* y protozoos como *Entamoeba gingivalis* y *Tricomonas texas*. En algunos casos, en la cavidad oral se encuentran virus.

Grupo Bacteriano	Aislados predominantes del grupo	Porcentaje
Cocos facultativos grampositivos	Los estreptococos representan 41% de todos los aislados y se componen de <i>S. salivarius</i> , <i>S. mitis</i> y pequeñas cantidades de enterococos; el resto son estafilococos	46.2

Cocos anaerobios gramnegativos	<i>Veillonella</i>	15.9
Cocos anaerobios grampositivos	<i>Peptostreptococcus</i> o peptococos	13
Bacterias facultativas grampositivas	Difteroides, <i>Actinomyces</i>	11.8
Bacterias anaerobias gramnegativas	<i>Campylobacter sputorum</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i>	4.8
Bacterias anaerobias grampositivas	<i>Propionibacterias</i> , <i>Actinomyces</i>	4.8
Bacterias facultativas gramnegativas	No identificadas	2.3
Cocos facultativos gramnegativos	No identificadas	1.2

Tabla 1. Bacterias que conforman la microflora bucal.

La mayoría de las bacterias salivales provienen del dorso de la lengua, del cual son desprendidas por acción mecánica; cantidades menores vienen del resto de las mucosas bucales. El número de microorganismos aumenta temporalmente durante el sueño, y decrece después de las comidas y el cepillado.

Placa Supragingival

Las superficies dentarias, tanto el esmalte como el cemento expuestos, están normalmente cubiertos por una delgada película adquirida de glucoproteínas. Si se retira, por ejemplo, mediante instrumentación mecánica, se vuelve a formar en pocos minutos. Se cree que la película desempeña un papel activo en la adhesión selectiva de las bacterias a la superficie dentaria.

En la zona supragingival, las bacterias vinculadas con la salud periodontal llegan a acumular hasta aproximadamente 12 células de espesor en la superficie dental, y son principalmente cocos y bacilos Gram-positivos. La colonización de la superficie dental por las bacterias de la placa supragingival parece ser bastante específica y dependería de la interacción de la superficie bacteriana con la glucoproteína salival de la película. Se comprobó que es *Streptococcus sanguis* y los bacillos Gram-positivos son los grupos principales de bacterias que inician la placa supragingival (Fig. 14).

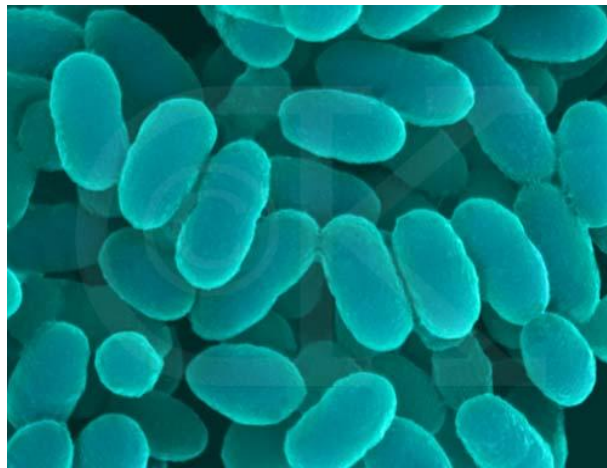


Fig. 14. Microfotografía de *Streptococcus sanguis*.

<http://www.osel.cz/soubory/358/3.jpg>

Una vez iniciado el crecimiento de la placa supragingival, se produce el crecimiento secundario y maduración. Durante esta fase hay un desplazamiento de la población bacteriana. La proporción de microorganismos filamentosos y bacterias Gram-negativas aumenta.

En general, esta placa aparece más compacta (Fig. 15). También son más evidentes las interacciones bacterianas adherentes.



Fig. 15. Placa supragingival

Los microorganismos encontrados comúnmente en dichos sitios en adultos incluyen *Streptococcus mitis*, *S. sanguis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* y a veces especies de *Neisseria* y *Veillonella*.

Placa Subgingival

Los mecanismos involucrados en la formación de la placa subgingival han sido parcialmente dilucidados. Una razón es la dificultad para obtener muestras con la placa subgingival conservada en su posición original entre los tejidos blandos de la encía y los tejidos del diente (Fig. 16).



Fig. 16. Placa subgingival
dpovey.tripod.com/cause.html

La estructura de la placa subgingival tiene cierta similitud con la variedad supragingival, en particular cuando concierne a placa asociada a gingivitis sin formación de bolsas profundas. Se observa un acumulo de microorganismos densamente apretados adyacentes al material cuticular que recubre la superficie dentaria. Los microorganismos comprenden cocos y bacilos Gram-positivos y negativos y organismos filamentosos. También se pueden encontrar espiroquetas y diversas bacterias flageladas, en especial en la extensión apical de la placa. La capa superficial suele estar menos densamente apretada y hay leucocitos interpuestos regularmente entre la placa y el recubrimiento epitelial del surco gingival.

Cuando la enfermedad periodontal generó una bolsa patológica, el aspecto del depósito microbiano subgingival se torna mucho más variado. En este caso, la superficie dentaria puede representar el esmalte o el cemento del

cual se desprende el tejido conectivo periodontal. La acumulación de placa en la porción del diente antes cubierta por los tejidos periodontales no difiere marcadamente de la observada en la gingivitis. En esta capa, predominan los microorganismos filamentosos, pero también existen cocos y bacilos. Sin embargo, en el fondo de la bolsa, se reduce el número de los organismos filamentosos y en la porción más apical están virtualmente ausentes.

Las capas superficiales de microorganismos de la bolsa periodontal que miran hacia el tejido blando son claramente diferentes de la capa adherente a la superficie dentaria, y no se aprecia una matriz intermicrobiana definida. Los microorganismos comprenden una gran cantidad de espiroquetas y bacterias flageladas. También hay cocos y bacilos gram-negativos. La multitud de espiroquetas y organismos flagelados son bacterias con motilidad, y como no existe una matriz intermicrobiana entre ellos, es probable que esa parte externa del acumulo microbiano se adhiera muy laxamente, con la pared del tejido blando de la bolsa como elemento responsable de su retención³.

3.2.3. Factores Predisponentes

Los factores como el no reemplazo de dientes ausentes, protrusión lingual, bruxismo, tabaquismo, respiración bucal, traumatismo del cepillado dentario, el uso incorrecto del hilo dental, palillos o estimuladores dentales de madera, irritación química, maloclusión, entre otros hábitos, y restauraciones dentales inapropiadas, son factores totalmente predisponentes para la aparición de la enfermedad periodontal.

3.3 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Los conceptos actuales sobre etiología y patogenia de la enfermedad periodontal derivan de los resultados de los estudios epidemiológicos, análisis de material de autopsia, experiencia clínica y experimentación en animales. Tomados en conjunto, los datos de las investigaciones indican con claridad que la mayoría de las formas de enfermedad periodontal son trastornos asociados a la placa. Más aún, hay razones para suponer que la mayoría, si no todos, los trastornos periodontales con placa se inician con una inflamación manifiesta de

la encía. No tratada, la lesión se puede extender en sentido apical y terminar en pérdida de inserción del tejido conectivo y hueso alveolar de sostén³.

La acumulación de la 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 desecho, enzimas y componentes superficiales de las bacterias colonizantes. Al aumentar la carga bacteriana, aumenta la irritación de los tejidos del hospedero 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 el seno de los tejidos una respuesta inflamatoria que corresponde a la respuesta inflamatoria clásica. Se produce una tumefacción de los tejidos al acumular líquido y se genera la gingivitis clínica.

En las primeras etapas, los neutrófilos PMN predominan debido a la movilidad y flexibilidad de estas 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 la muy potente formal metionil leucil fenilalanina (FMLP) y factores quimiotácticos del huésped, como las quimioquinas (IL-8), moléculas producidas por neutrófilos, como leucotrieno B4 y moléculas derivadas del desencadenamiento del sistema del complemento. (C5a).

De esta manera, los PMN son atraídos a la zona junto con otros leucocitos, como monocitos, macrófagos y linfocitos. Los macrófagos son probablemente el único tipo de célula aparte del neutrófilo que tiene una función útil en el surco, es decir, que pueden fagocitar PMN muertos y agonizantes y así retirarlos de la zona (Fig. 17). Esto es muy útil para el hospedero, pues los PMN agonizantes o sobreactivados son capaces de degranular, es decir, liberar sus enzimas de manera descontrolada, con lo cual causan más daño e irritación a los tejidos del hospedero y una exacerbación posterior de la inflamación.

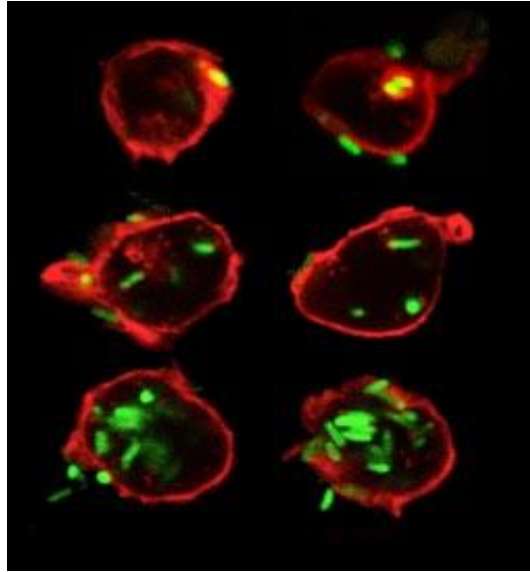


Fig. 17. Bacterias fagocitadas por un macrófago.

http://www.ludwig.ucl.ac.uk/buzz_html/assaysphago_content.htm

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 el surco puesto que no puede regresar a los tejidos del hospedero, donde completaría esa función.

Esto nos lleva a la conclusión de que 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 asociadas a los tejidos por la capacidad de las moléculas de adhesión, como la CD44, para que puedan funcionar allí y no se pierdan en el surco. Estas moléculas aumentan en número durante la inflamación por diversas citocinas proinflamatorias producidas por una variedad de células.

No es sorprendente que los leucocitos que necesitan permanecer en el tejido conectivo para desempeñar sus funciones posean grandes cantidades de estas moléculas de adhesión a los tejidos, mientras que células como los PMN, que funcionan en estrecha proximidad con los microorganismos, tengan menos moléculas de adhesión.

Al aumentar la inflamación, el proceso inmunitario se inicia (si es la primera respuesta a los antígenos) o se reinicia (respuesta típica). 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

tejido linfoide, donde se produce la presentación de los antígenos a los linfocitos.

Esta presentación tiene como resultado el compromiso de los linfocitos 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 o sistemáticamente y actúan agregando o aglutinando los microorganismos y, junto con los PMN, permiten una fagocitosis eficiente (opsonización).

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 hospedero, 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.

Mas aún, 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 dejar 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 reprime, los microorganismos continuarán generando productos perjudiciales para el huésped, éste continuará dando una respuesta fallida, la bolsa profundizará, el tejido de granulación se extenderá, se perderá hueso y ligamento y, finalmente, desaparecerán bastantes estructuras de sostén del diente originándose la exfoliación².

La patogenia de la enfermedad periodontal origina la destrucción de los tejidos de soporte del diente y es consecuencia de las acciones fallidas e ineficaces de los sistemas de defensa del hospedero en respuesta a la acumulación de placa. Este proceso patogénico difiere en extensión y gravedad de un individuo a otro y en el mismo individuo con razones multifactoriales³.

3.3.1 Procesos destructivos microbianos.

Los microorganismos producen una gran variedad de enzimas solubles con el fin de digerir las proteínas extracelulares del huésped y otras moléculas y así producir nutrientes para su desarrollo. También liberan numerosos productos metabólicos, como amoníaco, indol, anhídrido sulfúrico y ácido butírico. Entre las enzimas liberadas por las bacterias hay proteasas capaces de digerir colágeno, elastina, fibronectina, fibrina y otros componentes de la matriz intercelular de los tejidos epitelial y conectivo.

El efecto de los productos estructurales, enzimáticos y de desecho es estimular, probablemente de forma perjudicial, la producción de citocinas del hospedero. Las citocinas así producidas son predominantemente proinflamatorias y poseen efectos múltiples que sirven para reforzar la respuesta inflamatoria. También alientan la actividad de la metaloproteínasa de la matriz, aparte de reclutar leucocitos en esta zona.

Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) endotoxinas de los microorganismos Gram-negativos son capaces de provocar tanto la respuesta inflamatoria e inmunitaria como de interactuar con las células del hospedero. Muchas de las funciones atribuidas a los LPS en el pasado eran debidas no sólo a sus acciones estimulantes de las citocinas, sino además a las muchas moléculas de la membrana externa, proteínas y enzimas unidas a las moléculas de LPS. También se demostró que los LPS tienen efectos profundos sobre el sistema de coagulación sanguíneo y el sistema de complemento, produciendo una alteración de la homeostasis y formación de péptidos proinflamatorios.

Las propiedades de los LPS y de los ácidos lipoteicoicos (LTA) de los microorganismos Gram-positivos son numerosas y, pueden deberse a las muchas moléculas asociadas con estas estructuras membranosas externas. Los LPS, LTA y proteínas o polisacáridos específicos producidos y liberados por los microorganismos subgingivales activan a los mediadores químicos de la inflamación para que produzcan permeabilidad vascular e induzcan, mediante

acciones quimiotácticas, a las células inflamatorias a que se muevan hacia los tejidos y provoquen que las células defensivas liberen sustancias proinflamatorias y citocinas.

Las respuestas inmunitarias frente a los microorganismos estarán dirigidas principalmente contra las proteínas y polisacáridos de la membrana externa y contra las enzimas y toxinas liberadas extracelularmente. Estas reacciones inmunitarias tendrán como resultado una mayor liberación de citocinas y mediadores proinflamatorios, que a su vez aumentarán la inflamación y así serán más nocivas para el hospedero.

3.3.2 Proceso Inflamatorio: moléculas y células implicadas.

La enfermedad periodontal origina degradación tisular, por lo cual las proteasas, del hospedero y microbianas son elementales en los procesos destructivos. Las proteasas, como su nombre lo indica, son aquellas moléculas que dividen las proteínas por hidrólisis de las uniones peptídicas. Estas enzimas proteolíticas pueden dividirse en dos clases principales: a) endopeptidasas (proteinasas) y b) exopeptidasas, de acuerdo con la localización de la actividad de la enzima en el sustrato. Las enzimas de la primera categoría dividen las uniones en su sustrato dentro de la cadena polipeptídica, mientras que las exopeptidasas dividen el sustrato solo en uno o dos residuos del extremo de la cadena de polipéptidos⁵.

La liberación de proteasas en la encía y en la zona del surco promueve reacciones inflamatorias y contribuye al daño del tejido conectivo por distintas vías. Por el contrario, los inhibidores de proteasa sirven como moduladores de la función proteasa en el área y dificultan el proceso inflamatorio. Todas las endopeptidasas provenientes del huésped, de las cuales se sabe que se liberan en el surco, pueden ser inhibidas por la función combinada de la -1-antitripsina (1-AT). De hecho, se ha demostrado la inhibición de la colagenasa gingival por la 2-M y la colagenasa leucocitaria polimorfonuclear (PMN) es además inhibida por la 1-AT. Las colagenasas bacterianas también pueden ser inhibidas por inhibidores de proteinasa humana, pero también hay posibilidades de que potentes proteinasas, como la que posee *P. gingivalis* sean capaces de degradar a estos inhibidores⁶.

Metaloproteínas de la matriz (MMP)

Poco después del descubrimiento de la colagenasa a principios de la década de los sesenta, se introdujo una nueva línea de investigación en el campo periodontal. Se demostró que tanto las células epiteliales como el tejido conectivo gingival inflamado son capaces de producir colagenasa en cultivos de tejidos.

Una de las metaloproteínas de la matriz (MMP) que fueron objeto de mucha atención es la colagenasa de neutrófilos (PMN), que se encuentra en concentraciones más elevadas en muestras gingivales inflamadas que en las encías clínicamente sanas. La presencia de colagenasa fue demostrada en homogeneizados de encía obtenidos de pacientes con periodontitis, midiendo la actividad de la colagenasa. La inmunolocalización de los tejidos con colagenasa demostró que las biopsias gingivales tomadas de los pacientes con enfermedad periodontal presentaban algo de enzima, mientras que las muestras gingivales obtenidas de los sujetos tratados no tenían la enzima. El aumento de estas enzimas MMP en sitios enfermos en comparación con los sanos, su incremento durante la gingivitis experimental y su reducción después del tratamiento periodontal sugieren que las mmp participan en la degradación del tejido periodontal.

Entre las MMP, tanto la colagenasa fibroblástica como la de PMN tienen la singular capacidad, no compartida por los otros miembros de la familia, de dividir la triple hélice de los colágenos de tipo I, II y III, iniciando así la degradación de la matriz extracelular.

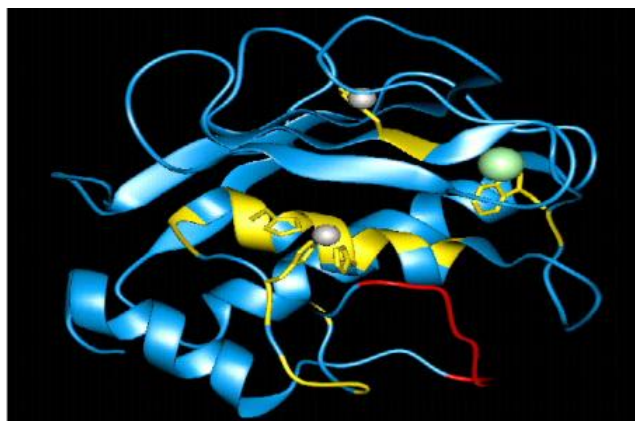


Fig.18. Representación de la Metaloproteinasa fibroblástica.

En rojo sitio activo, en amarillo región inhabilitada por la unión del inhibidor.

http://bionmr-c1.unl.edu/MMP1/figure/MMP-1_dynamics.jpg

Leucocitos Polimorfonucleares (PMN)

El PMN es el leucocito predominante en el surco gingival, tanto en estado de 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. Sin embargo, también se encuentran PMN en la encía clínicamente sana y son reclutados en respuesta a los factores quimiotácticos en la región de el surco gingival.

Los números de PMN aumentan en el surco gingival con el desarrollo de la gingivitis y se encuentran más PMN en los sitios de periodontitis si se compara con los de gingivitis, aunque su viabilidad y función están disminuidas en la primera. Como en otros tejidos, la migración de los leucocitos hacia el tejido conectivo gingival, y a través del epitelio de unión hacia el surco gingival, está controlada por la vía de las moléculas de adhesión, en un estudio en el cual se pidió a los voluntarios que interrumpieran las prácticas normales de higiene bucal durante varias semanas (estudio de gingivitis experimental), demostraron que los vasos en el tejido conectivo gingival expresan ELAM-1 e ICAM-1 en estado de salud y de inflamación gingival y se encontraron PMN en mayor abundancia en las áreas que expresan tinción intensa de ELAM-1 e ICAM-1. Además, el epitelio del surco y de unión se tiñó positivamente para ICAM-1, lo que sugirió la importancia de esta molécula de adhesión para permitir la migración de los PMN a través del epitelio hacia el surco.

Citocinas

Las citocinas son proteínas solubles, segregadas por células, que actúan como moléculas mensajeras que transmiten señales a las otras células. Desempeñan numerosas acciones, como la iniciación y el mantenimiento de las respuestas inmunitarias e inflamatorias y la regulación del desarrollo y la diferenciación de las células.

Las interleucinas son miembros importantes del grupo de las citocinas y participan fundamentalmente en la comunicación entre los leucocitos y las otras células implicadas en los procesos inmunitarios e inflamatorios, como las epiteliales, las endoteliales y los fibroblastos. Estas moléculas son liberadas en pequeñas cantidades y ejercen diversas acciones sobre las células portadoras del receptor específico de esta citocina. Las citocinas son numerosas, muchas tienen funciones que se superponen y están ligadas entre sí formando una red activa que controla la respuesta del hospedero.

El control de la liberación y acción de la citocina es complejo y depende de inhibidores y receptores. Muchas citocinas son capaces de actuar sobre la célula que las produjo, de manera que autorregulan su propia producción y la producción de otras citocinas.

Citocinas proinflamatorias

Las citocinas IL-1, IL-6 y Factor de Necrosis tumoral (TNF) estimulan la reabsorción e inhiben la formación ósea. Los estudios del mecanismo de acción de IL-1 sobre los fibroblastos sugieren que la IL-1 puede actuar sobre los fibroblastos para promover la reparación o destrucción de la matriz celular.

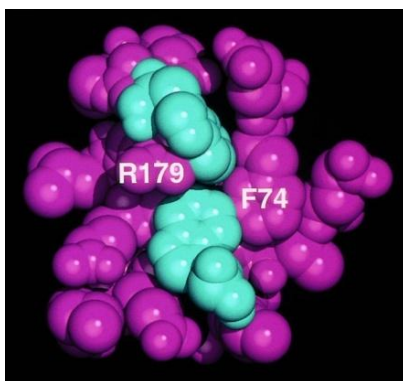


Fig. 19. Esquema representativo de IL-6. En magenta se presenta el sitio 1, en azul los triptófanos 104 y 169.

http://www.nature.com/emboj/journal/v16/n5/fig_tab/7590092f5.html

Citocinas quimiotácticas

Ha sido identificada una serie de más de 20 moléculas entre las cuáles la más famosa y mejor caracterizada es la interleucina-8 (IL-8), que tiene poderosas funciones quimiotácticas para los leucocitos, particularmente para los

neutrófilos, pero también para los linfocitos y macrófagos. Estas moléculas actúan reclutando células de defensa en zonas donde se necesita y son importantes en las respuestas con mediación celular. Se utiliza el término quimioquina para describir estas moléculas y es una forma abreviada de citocina quimiotáctica.



Fig. 20. Representación de IL-8. En verde se observa el primer monómero, en azul el segundo monómero
Citocinas señaladoras de linfocitos

Los linfocitos T colaboradores (helper) (TH1 y TH2) son linfocitos que regulan en los tejidos las respuestas inmunitarias humoral y de mediación celular por la vía de las citocinas. La respuesta inmunitaria humoral es promovida por TH2, que produce citocinas características, a saber, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Los linfocitos TH liberan IL-2 e interferón- γ (IFN- κ) que refuerzan las respuestas de mediación celular. Estas citocinas constituyen un mecanismo preciso para el control de la respuesta inmunitaria, de modo que sea suficiente para enfrentarse al patógeno. Las citocinas pueden influir sobre la respuesta inmunitaria determinando la clase de inmunoglobulina producida, lo que puede tener un efecto profundo sobre la función de los anticuerpos. Por ejemplo, las moléculas IgM son más eficaces para la bacteriolisis y las moléculas IgG para la opsonización.

Las células TH2 refuerzan la respuesta inmunitaria humoral antes que las respuestas mediadas por células y esto confirma que estas lesiones son dominadas por plasmocitos y que la respuesta inmunitaria humoral es más notable que la respuesta de mediación celular en la periodontitis crónica.

Prostaglandinas

Las prostaglandinas, derivadas del ácido araquidónico, son mediadores importantes de la inflamación. No es sorprendente, por lo tanto, que hayan sido implicadas en la patogenia de la enfermedad periodontal. Las citocinas proinflamatorias son capaces de estimular a los macrófagos y a otras células para producir cantidades elevadas de prostaglandinas, en particular PGE2 que son vasodilatadores potentes e inductores de la producción de citocinas por diversas células.

Esta prostaglandina actúa sobre los fibroblastos y osteoclastos, junto con las citocinas para inducir la producción de MMP de la matriz, lo cual es relevante para el recambio tisular y para el proceso destructivo periodontal.

Proteína C-Reactiva (PCR)

Se sabe que la Proteína C Reactiva (PCR) se produce en el hígado cuando hay una infección o inflamación aguda en el cuerpo, sin embargo nuevas investigaciones indican que los adipocitos también pueden liberarla en respuesta a citocinas inflamatorias.

La PCR es una proteína de fase aguda y se incrementa en el suero ante un proceso inflamatorio o infeccioso como la enfermedad periodontal y desaparece en la etapa de recuperación (solamente aumenta en la fase activa del proceso). Se le reconocen efectos proinflamatorios y está catalogada como factor de riesgo cardiovascular por la Asociación Americana del Corazón.

Un gran número de estudios han reportado cierta asociación entre la enfermedad periodontal y las condiciones cardíacas. Las evidencias sugieren que los efectos sistémicos de la infección con patógenos periodontales son comunes durante la progresión de la enfermedad cardíaca coronaria. Por ejemplo, los estudios de los mecanismos que implican a *P. gingivalis* han mostrado que este organismo es capaz de causar agregación plaquetaria, incremento de lípidos, aumento en la formación de ateromas e incremento de calcificaciones.

El Dr. Robert Genco, de la Universidad de Buffalo, Departamento de Biología Oral ha reportado el papel de los mediadores de la inflamación en asociaciones perio-cardíacas. El mediador de la inflamación conocido como Proteína C-Reactiva (CRP), incrementa unas 500 veces o más durante un

proceso severo de inflamación. Bioquímicamente juega un papel importante en la coagulación, incrementa los niveles de colesterol y se une a los lípidos de las membranas celulares para reparar los tejidos dañados.

3.3.3 Proceso Inflamatorio

Las lesiones inflamatorias producidas en la encía no difieren de lesiones similares en otros tejidos. La ubicación, extensión y composición de las lesiones inflamatorias gingivales están influidas empero la morfología y fisiología de los tejidos de la región dentogingival.

La reacción inflamatoria aguda puede ser considerada la primera línea de defensa del tejido tras la irritación o daño, en tanto que la reacción inflamatoria llamada crónica puede ser vista como una segunda línea de defensa. Las características de ambas líneas de defensa servirán para ilustrar los mecanismos que operan cuando la encía sana se convierte en tejido inflamado y, subsiguientemente, cuando la lesión gingival manifiesta progresa a lesión asociada con pérdida de inserción de tejido conectivo y hueso alveolar, es decir enfermedad periodontal destructiva⁵.

3.3.4 Inflamación Aguda

La reacción inflamatoria aguda se inicia en el tejido conectivo tras una irritación o lesión, de origen microbiano, químico, térmico o mecánico. La reacción inflamatoria es caracterizada por la presencia de alteraciones vasculares y celulares bien definidas y predecibles resultantes en lesiones transitorias o permanentes de los componentes tisulares normales (células, fibras, matriz), con el siguiente impedimento o pérdida de la función normal del tejido afectado.

La curación es un rasgo importante de la reacción inflamatoria aguda. La curación va a continuación cuando el agente iniciador de la respuesta inflamatoria ha sido eliminado o parcialmente inactivado.

El objetivo principal de la reacción inflamatoria local es proteger el tejido expuesto contra la penetración de sustancias (o lesiones) nocivas, así como para establecer condiciones favorables para la regeneración o reparación de las estructuras tisulares dañadas por ese combate. La reacción inflamatoria local, por tanto, debe ser contemplada como beneficiosa en el sentido de que

aísla las sustancias lesivas y, con ello, protege las partes más distantes del cuerpo.

Aún cuando la reacción inflamatoria aguda tenga un curso comparativamente “estereotipado”, a menudo se ven variaciones en la intensidad de la respuesta local. Esas variaciones pueden estar relacionadas con las diferencias entre las personas o los tejidos en su capacidad para responder al irritante. Factores como la vascularización del tejido y el recambio de los diferentes componentes tisulares en el punto inflamado influyen también en la intensidad de la reacción inflamatoria aguda. Más aún, la naturaleza del factor dañino (microbiano, químico, térmico, mecánico) puede influir sobre el curso y duración de la reacción inflamatoria aguda. Finalmente, la duración de la exposición a la irritación también influye sobre el carácter de la reacción tisular.

Reacciones vasculares

Las reacciones vasculares se generan muy rápidamente después de la lesión; su propósito es proporcionar al área dañada las proteínas y líquidos plasmáticos necesarios para un pronto aislamiento tanto del irritante como el tejido dañado. Asimismo, aportan velozmente tanto sustancias antimicrobianas como mediadores del proceso inflamatorio hacia el punto dañado. Las reacciones vasculares pueden ser contempladas como una parte de la reacción defensiva inicial (primera línea de defensa) del tejido y se caracterizan por la dilatación vascular y una reducción de la velocidad del flujo sanguíneo en todo el sistema microvascular de la parte afectada del tejido.

Concomitantemente con las alteraciones dimensionales del sistema microvascular, aumenta la permeabilidad de los vasos. Primero se aprecia este cambio en las vénulas poscapilares del sistema microvascular del área afectada. Durante la función normal, hay transporte libre (pinocitosis; por un sistema de vesículas pinocitósicas en las células endoteliales) de agua, electrolitos, y sustancias de bajo peso molecular entre el sistema vascular y el tejido conectivo circundante, en tanto se impide la penetración de las moléculas mayores. La permeabilidad vascular incrementada en la inflamación aguda es

el resultado en parte de la presión hidrostática incrementada en el sistema microvascular y en parte de la contracción de las células endoteliales ubicadas en los aspectos interiores de las paredes de las vénulas poscapilares. En este último proceso las uniones entre las células endoteliales se abren y las macromoléculas pueden dejar el sistema vascular y entrar en el tejido circundante.

La permeabilidad vascular alterada suele ser mediada por sustancias bioquímicamente activas (mediadores). Las aminas vasoactivas, la histamina y la serotonina, son las responsables primarias de la incrementada permeabilidad durante la fase primera o “rápida” de la reacción inflamatoria aguda. Existen precursores inactivos de esos mediadores en la matriz del tejido conectivo y en los gránulos de los mastocitos. Tras la exposición del tejido a un irritante, se liberan aminas vasoactivas de los mastocitos. Otras sustancias que pueden incrementar la permeabilidad vascular en la inflamación aguda son las prostaglandinas. Estas sustancias están presentes en el plasma, pero también pueden ser producidas por las células del tejido conectivo. Los mediadores de la permeabilidad incrementada también son liberados durante el proceso de coagulación y de los sistemas de complementos. Además, las células inflamatorias, los leucocitos, contienen y producen sustancias que, cuando son liberadas, pueden inducir alteraciones en la permeabilidad vascular.

Los diferentes mediadores involucrados en el proceso de incremento de la permeabilidad vascular cooperan, y en una fase dada pueden estar activos uno o más. Se puede producir una mayor permeabilidad vascular sin esos mediadores, por ejemplo, tras un traumatismo tisular se verá inducido mecánica o térmicamente con daño directo al sistema vascular. Por lo tanto los mecanismos responsables de la permeabilidad vascular incrementada en la inflamación aguda están relacionadas con la naturaleza e intensidad del irritante.

Se puede captar un aumento inmediato de la permeabilidad vascular unos segundos o minutos después de la exposición del tejido a la irritación o traumatismos y prosigue por unos 15-30 minutos. Este tipo de reacción vascular afecta sobre todo las vénulas poscapilares de un diámetro de menos de 100 micrones. Los mediadores responsables de la llamada “fase rápida” de

la reacción inflamatoria aguda suelen ser liberados de los mastocitos o de la matriz tisular lesionada.

Después de la lesión directa del sistema vascular se produce un incremento inmediato pero prolongado de la permeabilidad. Persiste varios días y no desaparece antes del bloqueo del vaso lesionado, por ejemplo, por coagulación. Este tipo de daño vascular ocurre con frecuencia cuando se exponen los tejidos a un calor intenso (quemadura).

Reacciones Celulares

La reacción inflamatoria aguda causa que los leucocitos, granulocitos, neutrófilos y monocitos dejen el sistema vascular y entren en el tejido conectivo adyacente. En el proceso de migración, los leucocitos se adhieren primero a las paredes de las vénulas del sistema microvascular; después de la adhesión, migran a través de las uniones de las células endoteliales. Es importante comprender que esta migración no es el resultado ni la causa de permeabilidad vascular aumentada.

La migración de los leucocitos se inicia y mantiene por la presencia de los llamados factores quimiotácticos, que atraen las células, ubicados se cree en las uniones de las células endoteliales así como en los compartimentos extravasculares. Los leucocitos adheridos a la pared vascular son quimiotácticamente estimulados para que pasen a través de las uniones endoteliales.

Cuando los tejidos reciben una irritación relativamente leve, la migración de los granulocitos neutrófilos alcanza el máximo aproximadamente 4-6 hrs después de la lesión y declina a continuación. Los leucocitos mononucleares (monocitos) comienzan a migrar desde los vasos alrededor de 4 hrs. después del daño, con un pico a las 18-24 hrs.

Como se ha mencionado, la migración de los granulocitos neutrófilos y las células mononucleares es el resultado de una estimulación quimiotáctica. En la primera fase de la reacción inflamatoria, los granulocitos neutrófilos son responsables de la fagocitosis de cuerpos extraños, material nocivo y microorganismos. Estas células contienen en su citoplasma numerosos gránulos (lisosomas) que encierran enzimas y sustancias antimicrobianas así

como mediadores de la inflamación. También contienen los neutrófilos grandes cantidades de glucógeno, lo cual significa que por glucólisis pueden funcionar en medios de baja tensión de oxígeno.

La fagocitosis de los microorganismos por los granulocitos es fásica. Primero el microorganismo se adhiere a la membrana celular. Ésta se invagina y, por fusión de pseudópodos, se produce un fagosoma, el microorganismo es transportado hasta su contacto con los lisosomas. La membrana del fagosoma y las membranas de uno o varios lisosomas se fusionan. Las enzimas lisosómicas se vacían en el fagosoma y se forma un fagolisosoma. Después de la fagocitosis y la exposición a las enzimas lisosómicas, la mayoría de los gérmenes resultan inactivados y después se desintegran.

Una deficiencia en la cantidad o función de los granulocitos neutrófilos reduce la capacidad para combatir la infección y pueden generarse situaciones potencialmente letales. Son ejemplos de situaciones así: neutropenia, agranulocitosis y/o ciertas formas de leucemia.

La presencia en el tejido de anticuerpos humorales contra los microorganismos invasores estimula y alienta el proceso de fagocitosis. La superficie del granulocito neutrófilo alberga receptores específicos (receptores Fc) para las moléculas de anticuerpos. Por estos receptores Fc el microorganismo queda firmemente adherido al leucocito, con lo cual facilita la fagocitosis.

Durante y después del proceso de fagocitosis, parte del material lisosómico del leucocito es liberado hacia el tejido huésped. Así, la fagocitosis no sólo contrarresta al irritante (por ejemplo, la infección) en el tejido huésped, pero el material lisosómico puede causar nuevos daños tisulares.

Los monocitos y su forma transmutada, los macrófagos (formados cuando aquellos son estimulados durante la reacción inflamatoria local), son células en general de funciones similares a las de los granulocitos neutrófilos. Así, contienen grandes cantidades de lisosomas y participan en la fagocitosis de microorganismos y material nocivo. También participan los macrófagos de la primera fase de un proceso que conduce a una reacción inmunitaria. Los antígenos fagocitados por los macrófagos son alterados por procesos activos en la célula y cambiados a una forma molecular que pueda ser reconocida por las células del sistema inmunitario, los linfocitos.

Cuando el exudado y la fagocitosis, es decir la inflamación aguda, sean eficaces para eliminar el irritante, pronto se inicia la curación. Durante la cicatrización de las lesiones del tejido conectivo, se liberan sustancias que median una proliferación y actividad metabólica incrementada de los fibroblastos.

3.3.5 Inflamación Crónica. Mecanismos Específicos de Defensa.

Cuando la reacción inflamatoria local es insuficiente para eliminar el material infeccioso (antígenos), se puede suscitar una respuesta inmunitaria. El propósito principal de ésta es identificar y fijar el agente nocivo (antígeno) y activar los fagocitos (granulocitos, neutrófilos, macrófagos). Por estas funciones, segunda línea de defensa, se neutraliza y descompone el antígeno y se protege al huésped. Monocitos, macrófagos linfocitos y plasmocitos se acumulan localmente en el tejido en el punto de depósito del antígeno. Una sustancia de propiedades no antigénicas causará una reacción por cuerpo extraño caracterizada por la acumulación de macrófagos en el punto de reacción. Las reacciones inmunitarias así como la reacción inflamatoria aguda deben ser contempladas como mecanismos de defensa que limitan la posibilidad de las sustancias nocivas o las bacterias de penetrar más en el tejido. Las reacciones inmunitarias tienen dos partes principales e incluyen:

1. Producción de anticuerpos (reacción humoral)
2. Participación de ciertos linfocitos (reacción celular)

En la mayoría de las situaciones ambas reacciones se producen simultáneamente pero una u otra predominan según el carácter del antígeno al que está expuesto el tejido.

3.3.6. Respuesta Inmune Humoral

Reacción antígeno-anticuerpo.

Los anticuerpos son el producto de los plasmocitos que se generan a partir de linfocitos pertenecientes a la serie linfocitaria B. Por la influencia de esta estructura, los linfocitos diferenciados tienen la capacidad de reaccionar con un antígeno para la producción de anticuerpos. La generación de linfocitos B por la vía de un estado de blastos hacia plasmocitos maduros se produce en distintas etapas. Se ha demostrado que los linfocitos también pueden producir ciertas linfocinas.

Los anticuerpos son producidos por plasmocitos presentes ya en el lugar de la reacción y en el tejido linfoide (ganglios linfáticos, amígdalas, bazo, placas de Peyer en el intestino). Los anticuerpos contra algunos antígenos pueden ser sintetizados por plasmocitos sin la participación de células T. En muchos casos, no obstante el plasmocito requiere ayuda de la célula T. Los plasmocitos liberan anticuerpos y se depositan ya en los tejidos del punto de reacción, ya en el ganglio linfático desde el cual entran en circulación. Los plasmocitos producen anticuerpos, inmunoglobulinas (IG) de una sola especificidad, y la mayoría de las células producen inmunoglobulinas de la clase IgG o IgM. Comparativamente, pocos plasmocitos contienen IgD e IgE. Algunos plasmocitos próximos a las mucosas producen anticuerpos IgA. Las inmunoglobulinas del tipo IgA son importantes en la protección del recubrimiento mucoso.

Las moléculas de anticuerpos y antígenos se combinan en un complejo inmunitario. Así resulta fijado el antígeno y su efecto biológico, en muchos casos, es neutralizado.

Los complejos inmunitarios desempeñan un papel importante en la producción y mantenimiento de la reacción inflamatoria local. La activación del sistema de complemento es un resultado muy importante de la formación de complejos inmunitarios. El sistema de complemento es una serie de por lo menos 9 proteínas diferentes presentes en plasma. Durante la fase temprana de la reacción inflamatoria aguda, las proteínas plasmáticas, incluidos los componentes del sistema de complemento, se acumulan fuera de los vasos. Las proteínas del sistema de complemento, después del contacto con la

mayoría de los complejos antígeno-anticuerpo, se transforman en sustancias biológicamente activas (la forma clásica de activación del complemento).

Los componentes del sistema de complemento pueden ser descritos mejor como enzimas activadas en una secuencia predeterminada. La activación del complemento da por resultado la formación de mediadores para la reacción inflamatoria local. Los factores liberados por la inactivación del tercer componente del complemento, C3, inducen una permeabilidad vascular incrementada y refuerzan la fagocitosis de los granulocitos neutrófilos y macrófagos. Un factor de propiedades similares es producto de la activación de C5. Mas aún, una combinación de componentes C5, C6 y C7 también es quimiotáctica para los neutrófilos. Además se liberan productos similares a las mismas que inducen una permeabilidad vascular incrementada.

A parte de la inducción de la reacción inflamatoria local, el complemento activado, aunque sea una defensa activa contra las bacterias, también puede inducir lesiones de las membranas celulares cuando la activación se produce en las membranas fibroblásticas del tejido huésped.

Así por la producción de anticuerpos se identifica y neutraliza la sustancia antigénica, y el sistema de complemento se activa por el complejo antígeno-anticuerpo. El complejo inmunitario es posteriormente eliminado por la reacción inflamatoria aguda (exudado y fagocitosis) iniciada y mantenida por los componentes activados del complemento.

Las enzimas microbianas y las enzimas lisosómicas de los granulocitos neutrófilos pueden, sin la participación de los complejos inmunitarios, también activar el sistema de complemento así como la endotoxina de las bacterias Gram-negativas. Así se generan factores quimiotácticos para leucocitos y sustancias vasoactivas generadas por la vía alternativa de la activación de complemento. También puede ser activado el sistema de complemento por factores involucrados en el proceso de coagulación. Es importante comprender que por la activación del sistema de complemento, por la vía de los complejos inmunitarios o por las reacciones inespecíficas, se liberan mediadores que son importantes para los dos procesos fundamentales de la reacción inflamatoria aguda: permeabilidad vascular incrementada, y la activación y migración de neutrófilos y macrófagos⁴.

3.3.7. Respuesta Inmune Celular

La reacción inmunitaria celular se cumple por células pertenecientes a la serie linfocitaria T (las que se diferencian en el timo). La reacción celular no involucra la producción de anticuerpos en el sentido tradicional. En vez, los linfocitos T sintetizan y liberan unas sustancias, las linfocinas, cuando estas células se ponen en contacto con un antígeno con el cual están programadas para reaccionar (sensibilizadas). Las linfocinas participan en la defensa del huésped contra las bacterias y células extrañas y tienen el potencial de mediar distintas fases de la reacción inflamatoria local. Algunas linfocinas impiden que los macrófagos migren del punto de reacción y estimulan la actividad sintética y fagocitaria de los macrófagos. También se han demostrado sustancias quimiotácticas para los granulocitos neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos con las linfocinas. La linfoxina es una linfocina que tiene un efecto citotóxico inespecífico sobre otras células, con lo cual puede dañar las células del huésped. Otras linfocinas estimulan la proliferación de los linfocitos no sensibilizados y activan los osteoclastos para producir reabsorción ósea.

Debo mencionar que muchos procesos inmunitarios involucran una combinación de reacciones de células B y células T, aunque algunos antígenos provocan sólo una u otra reacción inmunitaria; otras dan reacciones primariamente de células B y otras de las T. Mas aún, una reacción de células B depende de la presencia de células T (T ayudadas y T suprimidas). Esta dependencia puede ser una de las razones para la relativa ausencia de reacciones celulares puras B o T.

3.3.8 Anticuerpos Específicos

La reacción local crónica (específica) está íntimamente ligada al reconocimiento de los LPS de membrana por parte del sistema inmune mediante un mecanismo especial que no necesita de la participación directa ni de las células presentadoras de antígenos ni de los linfocitos.

La respuesta inmune específica, también conocida como adaptativa, tiene como función el reconocimiento y eliminación de antígenos específicos mediante la producción de anticuerpos o a través del entrenamiento de

linfocitos T CD8 (linfocitos T citotóxicos) capaces de destruir por señales de apoptosis cualquier célula del organismo infectada y capaz de mostrar dicho antígeno.

En condiciones normales, el primer paso de la respuesta inmune adaptativa es el reconocimiento, adquisición, procesamiento y presentación del antígeno por parte de células especializadas denominadas "células profesionales presentadoras de antígeno o APC" (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas). Este primer paso es particularmente cierto cuando el antígeno es de tipo proteico, es decir, proteínas de la cápside viral, proteínas de la membrana bacteriana, etc, ya que este tipo de biomolécula puede ser degradada proteolíticamente hasta pequeños fragmentos de 8–12 residuos de aminoácidos que son presentados a otras células inmunes en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 (MHC-1) o las del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (MHC-2). Cuando el antígeno es de naturaleza viral será procesado por la célula APC y presentado en forma de complejo con la molécula MHC-1 a los linfocitos T citotóxicos (CD8) y cuando es de naturaleza bacteriana será procesado por la célula APC y presentado en forma de complejo con la molécula MHC-2 a los linfocitos T CD4 o ayudadores que llevarán esta señal a los linfocitos B que finalmente se convertirán en células plasmáticas productoras de anticuerpos contra esta antígeno.

En el caso de la enfermedad periodontal, la respuesta inmune contra los LPS bacterianos difiere de estas dos vías clásicas, ya que los LPS no pueden ser procesados como las proteínas y por ende no pueden ser "mostrados" vía moléculas del MHC. En otras palabras, la respuesta inmune contra los LPS no involucra la participación directa de los linfocitos (ni T ni B). De hecho, los LPS bacterianos se conocen como antígenos independientes del timo (IT) en conjunto con otros antígenos como los ácidos nucleicos, glucolípidos y polisacáridos que tienen la capacidad de generar anticuerpos sin la participación de los linfocitos T. El significado práctico de los antígenos IT es que muchos polisacáridos y lipopolisacáridos de la pared celular bacteriana pertenecen a esta categoría y la inmunidad humoral es la principal defensa contra ellas.

De esta forma, es claro que los LPS tienen una vía especial para la estimulación del sistema inmune: En ratones, una baja concentración de LPS estimula la síntesis de anticuerpos específicos, pero a una elevada concentración son capaces de la activación policlonal de las células B independiente de su unión a inmunoglobulinas de membrana. Llevando este hecho al contexto humano, se debe resaltar que desde hace tiempo se conoce que los linfocitos B no son el blanco de los LPS, sino los monocitos, gracias a la unión de los LPS al receptor CD-14 de estas células.

La interacción de los LPS bacterianos con el receptor CD-14 de los monocitos requiere el pre-requisito de la formación de un complejo proteico entre el LPS y su proteína transportadora LBP, que permite una unión de alta afinidad con la proteína CD-14 que desemboca en la activación del monocito caracterizada por la liberación de IL-1, PGE₂, TNF- α y metaloproteinasas con los siguientes efectos locales:

- Resorción del hueso alveolar: TNF- α , IL-1 β , PGE₂
- Destrucción de la matriz extracelular: MMP
- Activación de fibroblastos: IL-1 β y TNF α , que estimulan a una mayor resorción ósea por secreción de PGE₂ por el fibroblasto y una mayor secreción de MMP's que incrementa la degradación de la matriz extracelular.

Por mucho tiempo se consideró que padecimientos como el síndrome de Disfunción Multiorgánica y el Choque séptico eran ocasionados por bacterias Gram-negativas, en particular por los componentes de su pared celular como son los lipopolisacáridos (LPS). Actualmente se sabe que los LPS por sí mismos no pueden producir todas las características del Síndrome de Disfunción Multiorgánica y que se requiere de la participación de bacterias Gram-positivas, las cuales carecen de LPS y que están asociadas al desarrollo de enfermedades: endocarditis, gonorrea, escarlatina, fiebre reumática, neumonía, meningitis, endocarditis y septicemia, lo que sugiere que estas bacterias presentan otros factores de virulencia.

Los peptidoglucanos y el ácido lipoteicoico (LTA) son los principales componentes de las bacterias Gram-positivas que tienen actividades

relacionadas con el desarrollo de sepsis. En modelos experimentales in vivo e in vitro, se ha mostrado que el LTA estimula respuestas inflamatorias, y que se encuentra asociado a infecciones específicas.

Se han identificado tres eventos ocasionados por bacterias Gram-positivas que conducen a la liberación de citocinas por parte de diferentes células del hospedero como monocitos, macrófagos y células dendríticas:

1. El primero se produce por presencia de componentes provenientes de las bacterias Gram-positivas
2. Interacción con receptores presentes en las células inmunes
3. Activación de mecanismos de transducción que conducen a la expresión de moléculas proinflamatorias



Fig. 21. Modelo de reconocimiento del LPS

www.uji.es/bin/infoest/estudis/titols/esp/pdf/lps

3.3.9 Receptores Toll

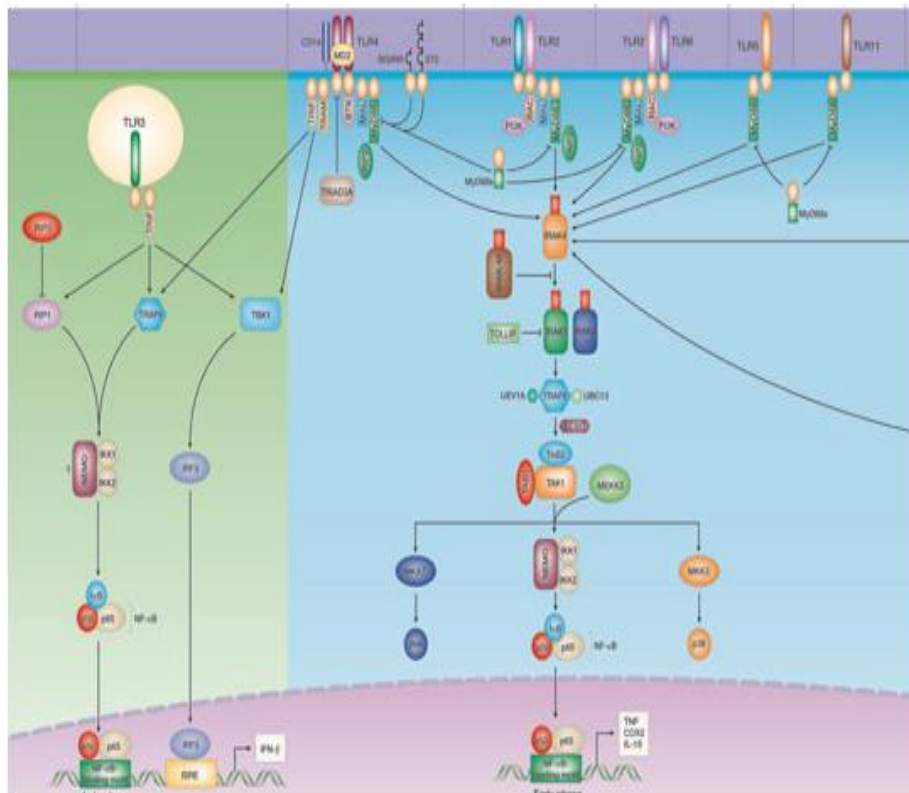


Fig. 22. Receptores tipo Toll y las vías de señalización que activan
www.nature.com/nri/focus/tlr/nri1397-v1.html

A finales del siglo veinte se encontró que los receptores Toll se activaban en defensa contra las infecciones por hongos en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*; organismo que solamente tiene inmunidad innata. En ese año Tagushi descubrió el primer TLR en humanos al que denominó TIL y que actualmente corresponde al receptor TLR1. Un año después se descubrió un homólogo del receptor Toll en mamíferos (actualmente denominado TLR4) y se mostró que la activación del receptor inducía la expresión de genes involucrados en respuestas inflamatoria.

Después de la caracterización del primer receptor tipo Toll (TLR) se identificaron diversas proteínas que estructuralmente estaban relacionadas con TLR4. Actualmente los TLR comprenden una amplia familia conformada por al menos 12 miembros. Los únicos presentes en fibroblastos son TLR2 y TLR4.

Los receptores Toll son proteínas transmembranales con un dominio extracelular que contiene una región de repeticiones de leucina y un dominio intracelular homólogo al receptor de interleucina 1 denominado Toll/receptor IL-1 (TIR).

El receptor TLR2 reconoce una gran variedad de componentes microbianos. Entre los que se encuentran las lipoproteínas y lipopéptidos de

varios patógenos, peptidoglucano y ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas, lipoarabinomano de micobacteria y glucolípidos de Treponema.

Los receptores TLR2 reconocen un amplio rango de productos bacterianos debido a la cooperación con diversas proteínas. Se ha demostrado que forma heterodímeros con otros TLRs como TLR1 y TLR6 los cuales estructuralmente están relacionados con TLR2. De igual forma colabora con distintos tipos de receptores como dectina-1, receptor de la familia de las lectinas para β -glucano componente de la pared celular de hongos. Los receptores TLR2 responden a diversos productos bacterianos como lipoproteínas y peptidoglucanos.

En células humanas el TLR2 se expresa predominantemente en monocitos, macrófagos, neutrófilos, células T y células B. Sin embargo, otros tipos de células sintetizan RNA mensajeros para TLR2 y otros tipos de TLR. La expresión y actividad de TLR para la activación de señales de transducción es regulada MD-1 y MD-2. El receptor CD14 actúa en concierto con TLR4/MD-2 para iniciar las respuestas a lipopolisacárido. Los peptidoglucanos se asocian a CD14 y cuando se bloquea este receptor se inhibe la señalización inducida por LTA lo que sugiere que CD14 está involucrado en el reconocimiento de bacterias Gram-positivas. También se ha demostrado que el sitio de reconocimiento entre el LTA y los receptores TLR2 es por la región de los carbohidratos.

3.3.10 Vías de Transducción de señales intracelulares

Las respuestas desencadenadas por las señales de transducción incluyen la regulación de la expresión génica, la regulación de vías metabólicas y la locomoción celular.

Los componentes que contribuyen al proceso de señalización intracelular y que estimulan el crecimiento, muerte y división celular tienen importancia médica cuando se intenta aislar los factores causales de cánceres y muerte celular.

Existe un grupo de cinasas que han sido implicadas en las vías de señalización intracelular y que tienen efectos en la muerte y longevidad celulares. Las proteínas cinasas más destacables relacionadas con este tema,

son algunas MAP Kinasas: ERK1/2, p38 y JNK, (Las MAP kinasas son “proteínas cinasa activadas por mitógenos”, un mitógeno es un inductor de proliferación y diferenciación celular) y otras proteínas como AKT, GSK3 y PI3-k.

3.3.11 Cascadas de señalización

Después del reconocimiento entre TLR2 y el LTA se produce un amplio espectro de señales intracelulares como la activación de la familia de MAPK, proteína cinasa B (PKB) y de la cinasa I κ B (IKK). El incremento en la actividad de estas cinasas consecuentemente activa a diversos factores de transcripción como NF- κ B (p50 y p65), Jun/Fos, factor de activación de transcripción (ATF), factor de respuesta a suero (SRF), proteína semejante a Ets (ELK), proteína de unión y aumento de CCAAT (C/EBP) y la proteína de fijación del elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB). El primer evento que inicia la cascada de transducción consiste en la co-localización y agrupamiento de receptores y señales de transducción en la membrana plasmática.

En respuesta al tratamiento con *Streptococcus*, los receptores TLR2, TLR6 y CD14 se agrupan y la primera molécula intracelular reclutada por el complejo es el factor de diferenciación mieloide (MyD88) el cual recluta y activa a la cinasa asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK). IRAK forma multímeros que se autofosforilan y reclutan grandes complejos consistentes en el factor activado por el receptor a TNF (TNF/TRAF6), cinasa activadora del factor de crecimiento transformante β -1 (TAK1), proteína de asociación a TAK1 (TAB1) y TAB2.

IRAK 4 fosforila a IRAK1, esta fosforilación es indispensable para la activación de la transducción de señales, recientemente se ha descrito que la forma IRAK-M actúa como inhibidor. Así mismo, la activación de TAK1 promueve su liberación del complejo y de esta forma activa a IKK β y a MAPK cinasa cinasa (6/MKK6). La cinasa inductora de NF- κ B (NIK) se requiere para la activación de la cinasa de I κ B (IKB) que promueve la fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma 26S de I κ B y la translocación de

NF- κ B al núcleo. La proteína cinasa MAP- β (MKK β) es responsable de la activación de las MAPK, p38 y la cinasa terminal N-JUN (JNK).

En presencia de la proteína adaptadora denominada intermediario conservado evolutivo de la vía de Toll (ECSIT) y MEK cinasa (1/MKK1), TRAF6 puede activar a ERK 1/2. Sin embargo, ERK 1/2 también puede activarse por un mecanismo independiente de TRAF6, que involucra a la forma atípica de PKC la PKC ζ que está asociada a la acumulación de ácido fosfatídico, lo que conlleva a la activación de ERK 1/2. Finalmente, se ha demostrado también la activación de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) de una manera dependiente de PKB lo que conduce a la activación de NF- κ B.

3.3.12 Expresión génica

La respuesta inmune a las toxinas bacterianas implica un patrón complejo de respuestas celulares y humorales que se clasifican en primarias, secundarias y terciarias. Las respuestas primarias son mediadas por citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y la interleucina-1 (IL-1); los mediadores proinflamatorios secundarios como interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) son inducidos por TNF e IL-1; por último, los mediadores terciarios comprenden factores diferentes como las proteasas, factores de coagulación, cininas, eicosanoides, óxido nítrico entre otros.

Existe evidencia reciente que sugiere que no solo los mecanismos proinflamatorios contribuyen a la muerte y falla de órganos sino que existen mediadores antiinflamatorios que también tienen efectos importantes en el sistema inmune del hospedero. Los mediadores anti-inflamatorios inducen un estado de inmunosupresión durante la sepsis (inmunoparálisis). Este estado de inmunoreactividad deprimida está acompañada por LTA, los niveles de citocinas anti-inflamatorias como la interleucina-10 (IL-10) y el receptor antagonista de la interleucina 1 (IL-1). Los síntomas de inmunosupresión comprenden una disminución en el número de monocitos circulantes.

Las respuestas pro y anti inflamatorias al mismo tiempo contribuyen a la sepsis por toxinas bacterianas. Además todos los genes que codifican proteínas implicadas en las respuestas inflamatorias son genes candidatos

para determinar a los posibles responsables de las diferencias individuales de la respuesta inflamatoria a la infección.

La capacidad de liberar y producir citocinas, la expresión de proteínas al shock térmico, la actividad de óxido nítrico, el polimorfismo de genes y los factores de la coagulación está genéticamente determinada y contribuye a un gran rango de manifestaciones clínicas en estados de enfermedad inflamatoria.

Las principales citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β inducen como consecuencia la producción de IL-6 e IL-10. Se ha demostrado que todas ellas contribuyen de manera importante a la respuesta primaria del hospedero ante una infección. Ambas, TNF- α e IL-1 β son capaces de inducir los mismos síntomas y la misma severidad de shock séptico y disfunción orgánica.

3.3.13 NF κ B

NF κ B es un heterodímero compuesto por las subunidades p65 y p50 en la mayoría de los casos. Se involucra en la respuesta celular a estímulos como el estrés, citocinas, radicales libres, radiación UV y antígenos bacteriales y virales, es importante en la regulación de la respuesta inmune en la infección, una incorrecta regulación de NF κ B se relaciona con cáncer y enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En células no estimuladas NF κ B se encuentran mayoritariamente en el citoplasma, asociado con una familia de moléculas inhibitorias llamadas I κ Bs1, 2.

La activación de NF κ B es iniciada por una señal inducida por la degradación de proteínas de I κ B. Esto ocurre por la vía de activación de la cinasa "I κ B cinasa" (IKK). Esta cinasa está compuesta por un heterodímero de la catálisis de IKK alpha e IKK beta y una proteína reguladora llamada "NEMO" (NF κ B essential modulador, por sus siglas en ingles) o IKK gamma. Cuando las señales son activadas I κ B kinasa fosforila 2 serinas, con esto los inhibidores moleculares de I κ B son modificados por un proceso de ubiquitinación donde son degradados por una proteosoma. Entre las respuestas celulares involucradas con la activación de NF κ B se encuentran: la activación de células del sistema inmune a través de la inducción de citoquinas, la migración celular y reparación de tejidos a través de la inducción de moléculas de adhesión,

inflamación a través de la inducción de proteínas de fase aguda, inhibición de la apoptosis y tumorigénesis a través de la regulación de proto-oncogenes⁶.

Con la degradación del inhibidor de I κ B, el complejo de NF κ B queda libre para entrar en el núcleo donde puede promover la expresión de genes específicos. La activación de estos genes por NF κ B conduce a una respuesta fisiológica como una respuesta inflamatoria o inmune, proliferación celular, etc.

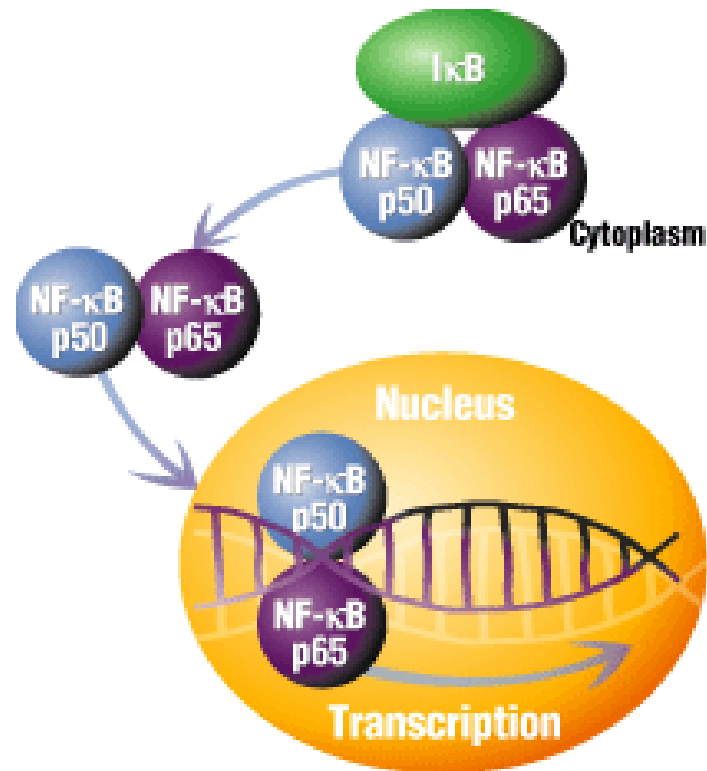


Figura 23. NF κ B

employees.csbsju.edu/.../nf-kb.gif

4. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.

Una de las enfermedades que más se presenta en la población adulta mexicana es la enfermedad periodontal, la cual es de etiología bacteriana y afecta a los tejidos de sostén del diente como la encía, el hueso alveolar, cemento radicular y el ligamento periodontal, lo que puede provocar la pérdida del órgano dental.

Las bacterias que provocan este tipo de infecciones pueden ser Gram-negativas y Gram-positivas, se encuentran en la placa dentobacteriana que se acumula en las superficies de los tejidos orales blandos y duros, esta placa dentobacteriana al no ser retirada con la higiene diaria provoca la enfermedad periodontal.

Se ha demostrado que algunos componentes de la pared bacteriana (LPS en bacterias Gram-negativas y LTA en bacterias Gram-positivas) son responsables de la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte del huésped, las cuales regulan la inflamación causada por la enfermedad periodontal. Para que ésta producción de citocinas sea efectiva se necesita una serie de eventos intracelulares conocidos como vías de señalización que al ser activadas por la unión del lipopolisacárido o el ácido lipoteicoico a su respectivo receptor en la célula van a dar como resultado la activación de factores de transcripción los cuales son capaces de reconocer una región promotora del ADN y de regular la expresión génica en la célula estimulando así de manera continua la síntesis de proteínas cinasas reguladoras del proceso inflamatorio.

Dentro de los procesos inflamatorios estimulados por componentes bacterianos como el lipopolisacárido se encuentra el factor de transcripción $\text{NF}\kappa\text{B}$ el cual regula expresión de moléculas (como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$) que participan en estos procesos inflamatorios. La molécula $\text{I}\kappa\text{B}$ es clave en la regulación de la activación de $\text{NF}\kappa\text{B}$ y el interés de este estudio es ver como funciona $\text{I}\kappa\text{B}$.

5. JUSTIFICACIÓN

Debido a la cada vez más alta incidencia de enfermedad periodontal y a que los procesos inflamatorios no están bien definidos, nos interesamos en identificar y buscar las moléculas que potencian la inflamación como LPS, los cuales promueven la expresión de moléculas proinflamatorias.

6. HIPÓTESIS

Los fibroblastos gingivales humanos son las principales células presentes en los tejidos blandos. Estos tejidos están expuestos de forma permanente a la placa dentobacteriana, entre los componentes presentes en esta se encuentran los LPS y LTA, los cuales promueven la expresión de moléculas proinflamatorias. Si el factor de transcripción NF- κ B regula la expresión de moléculas promotoras de la inflamación entonces este estudio está evaluando la hipótesis de que LPS activa a NF- κ B y que la activación de este factor se realiza mediante señales intracelulares.

7. OBJETIVO

- Determinar el efecto de LPS sobre la expresión de moléculas promotoras de la inflamación
- Caracterizar el efecto de la endotoxina sobre la expresión de TNF
- Caracterizar el efecto de la endotoxina sobre la expresión de interleucina 1
- Determinar la cinética de activación de NF κ B por LPS

Tipo de estudio: experimental, comparativo y prospectivo.

8. MATERIALES Y MÉTODO.

a. Material y Equipo:

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)
Campana de flujo laminar (Nuair)
Centrifuga (Sorvall)
Espectrofotómetro (Perkin Elmer)
Gendarme (Costar)
Gradillas (Nalgene)
Incubadora (Nuair)
Megatoscopio
Microscopio de objetos invertidos C22 (Olympus)
Orbit Shaker (Labline)
Pipetas de 10ml y 5 ml (Finnpipette)
Potenciómetro (Equipar)
Probetas graduadas
Propipeta (Pipet-aid)
Sonicador (Lab-Line instruments)
Timer
Tubos clínicos
Tubos de ensayo
Tubos Eppendorff
Vasos de precipitado
Vortex (Scientific industries)

b. Reactivos:

Acrilamida (Sigma)
Antibiótico-Antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomina, anfotericina B (GIBCO BRL).

Anticuerpos primarios : p-AKT, p-GSK-3, PI3-K p-85, PDK-1, β -catenina, γ -tubulina y AKT.

Glicina (Baker)

Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology)

Marcador de peso molecular (Bio-rad)

Medio de cultivo Eaggle modificado por Dubelcco (GIBCO BRL)

Medio de cultivo de Hanks (GIBCO BRL)

Membrana de PVDF (Amersham Biosciences)

PBS (SIGMA)

Persulfato de amonio

Suero bovino fetal (GIBCO BRL)

Trisma (Sigma)

NaCl (GIBCO BRL)

Tripsina

Tween (Sigma)

Vanadato de sodio

c. Análisis de Datos y Métodos estadísticos.

Los experimentos se realizaron en 2 ocasiones por separado. Se analizaron con el software Labworks el cual obtiene la densidad óptica. Se obtuvo el promedio de los experimentos y se compararon con el control de cada caso, el cual se tomó como el 100% del basal. Sobre estos datos se obtuvo el análisis del gráfico. Se muestra en los resultados un experimento representativo y el análisis gráfico del total de los casos. Se representaron como la media \pm Error Standard.

d. Población en estudio.

Fibroblastos gingivales humanos de pacientes sanos de la Clínica de Cirugía de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.

- Selección y tamaño de la muestra: la muestra se toma durante un procedimiento quirúrgico y se elige de encía insertada. El tamaño depende de la zona donante sin embargo oscila entre .5 y 1 cm.

- Criterios de inclusión, exclusión y eliminación. La encía donadora debe estar libre de inflamación, sangrado y cualquier otra patología identificable. El paciente debe declarar en la historia clínica que se encuentra libre de enfermedades sistémicas.
- Cultivo de fibroblastos gingivales humanos: El tejido obtenido quirúrgicamente se coloca temporalmente en solución de Hanks (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.), posteriormente se procesa y se obtienen las células (HGF) que se colocan en cajas de 6 pozos con medio de Eagle modificado por Dulbecco (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.) adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.) y 1% de antibiótico antimicótico (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.). Se mantienen hasta la confluencia en una incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C
- Detección de la fosforilación de las proteínas por medio del ensayo Western Blot: Se realizarán experimentos dosis-respuesta (1,5,10,15,25 ml) y curso-temporal (5, 10, 15, 30 y 60 min.). Los HGF se sembrarán en cajas de 6 pozos con medio de Eagle modificado por Dulbecco adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal y 1% de antibiótico antimicótico, cambiando el medio todos los días hasta llegar a la confluencia. Se procederá a ayunar las cajas 1 h antes del experimento con DMEM libre de suero bovino fetal con 1% de antibiótico antimicótico (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.). Posteriormente se tratará cada pozo con LTA de *S. sanguis* (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA). Después del tratamiento, se retirará el medio y se colocarán 500 µl de buffer de fosfato salino (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, H₂O, KH₂PO₄) adicionado con 1 mM de ortovanadato de sodio (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.) y se rasparán los pozos con gendarme recolectando las células en tubos eppendorf etiquetados que se centrifugarán durante 15 min a 10 000 rpm a 4°C. El sobrenadante será desechado y la pastilla se resuspenderá en 20 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM, Triton 1%, NaCl 137 mM, EDTA 2mM, Vanadato de sodio 1 mM, Glicina, pH 8). Las muestras fueron sonicadas durante 30 W, 30

segundos. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford. Se tomaran 50 mg/ml de cada muestra para su hidrólisis con jugo azul desnaturalizante para fosfoproteínas y se colocaron en baño seco a 65°C. Se realizará la electroforesis en gel de acrilamida (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA) al 10% a 80 V. Las proteínas serán transferidas a membrana de PVDF (Amersham Biosciences) durante 1 hr 0.30 Amp. y 20 V. Posteriormente se utilizará solución de bloqueo durante 30 min y 3 lavados de 10 min. cada uno.

9. RESULTADOS

9.1 Efecto del lipopolisacárido sobre la expresión de MyD88.

Con el propósito de estudiar el efecto del lipopolisacárido sobre la expresión de MyD88 los fibroblastos gingivales se trataron con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos (Fig.24). Nuestros resultados muestran que las células expresan a MyD88 y su expresión es estable al tratamiento con el LPS. Por este motivo decidimos evaluar el efecto del LPS sobre la degradación de I κ B. Y posteriormente determinar si la degradación de I κ B es dependiente de MAPK o hay una vía alterna.

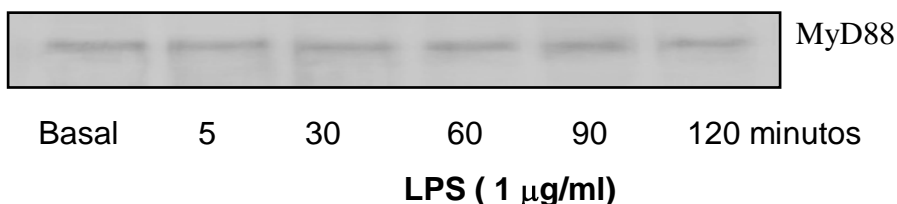


Fig. 24. Efecto del LPS sobre la expresión de MyD88

Las células se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia y se ayunaron durante toda la noche en DMEM + 2% SBF. Posteriormente se trataron a los tiempos indicados y las células se procesaron para el ensayo de Western-Blot.

9.2 Efecto del Lipopolisacárido sobre la degradación I- κ B.

Con el propósito de evaluar el efecto del LPS sobre la expresión de I- κ B realizamos ensayos dosis respuesta y curso temporal. En ensayo curso temporal encontramos que a los 5 minutos de tratamiento se produce la degradación de I κ B y se recupera después de 10 minutos de tratamiento Fig. 35-A). Al tratamiento durante 5 minutos y diferentes dosis de LPS encontramos que la dosis máxima de degradación se produce a la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$. (Fig. 25-B). Lo siguiente que decidimos evaluar fue efecto de los inhibidores.

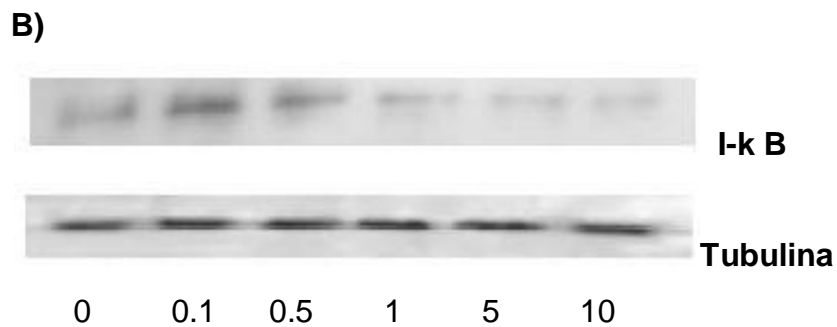
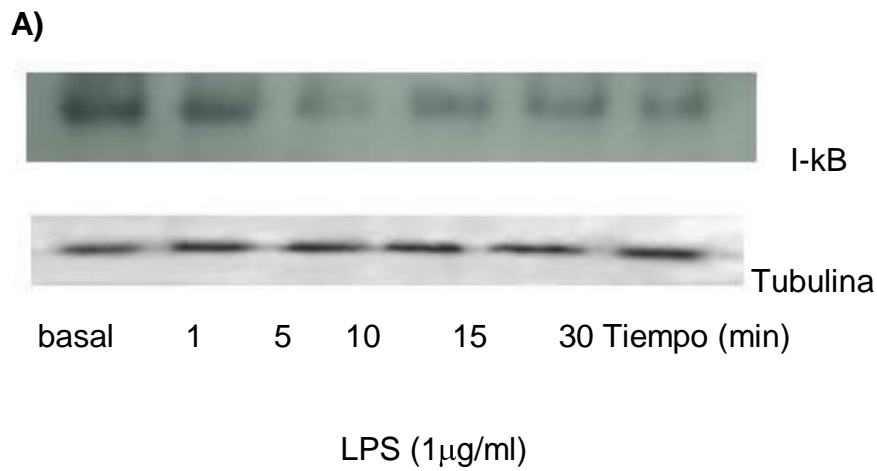


Fig. 25 Efecto del LPS sobre la degradación de I-kB en fibroblastos gingivales humanos.

A) Las células se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia y se ayunaron durante toda la noche en DMEM + 2% SBF. Posteriormente se trataron a los tiempos indicados y las células se procesaron para el ensayo de Western-Blot. B) Las células se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia y se ayunaron durante toda la noche y se trataron con LPS a diferentes tiempos.

9.3 Efecto de inhibidores sobre la regulación de la degradación de I- κ B inducida por LPS.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con PD98059 (inhibidor de MEK) y LY941000 (inhibidor de PI3K) son los transductores intracelulares involucrados en la regulación de la degradación de I κ B. Por lo que podemos concluir en fibroblastos gingivales humanos la degradación de I κ B se efectúa mediante la vía convencional de PI3K/AKT y por MAPK. Por lo que decidimos evaluar el efecto de estos inhibidores sobre la expresión de IL-1 β que es una citocina cuya expresión es regulada por NF- κ B.



LPS (1 μ g/ml)	-	+	+	+	+	+
SB203580 (10 μ M)	-	-	+	-	-	-
CalfostinC (1 μ M)	-	-	-	+	-	-
PD98059 (5 μ M)	-	-	-	-	+	-
LY94100 (1 μ M)	-	-	-	-	-	+

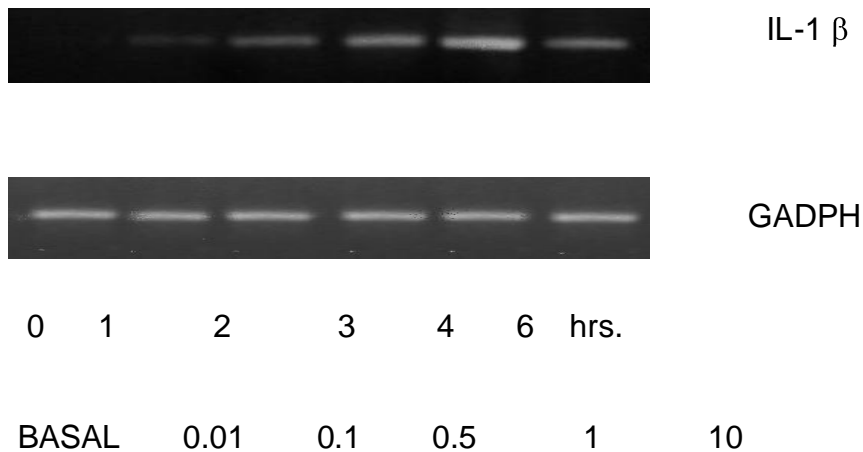
Fig. 26 Efecto de los inhibidores sobre la degradación de I κ B.

Las células se crecieron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia y se ayunaron durante toda la noche en DMEM + 2% SBF. Posteriormente se trataron con los inhibidores a las dosis señaladas en la figura durante 30 minutos. Y se incubaron con LPS durante 5 minutos. Las células se procesaron para el ensayo de Western-Blot

9.4 Efecto del LPS sobre la expresión de IL-1 β

Encontramos que el tratamiento con LPS promueve la expresión de IL-1 β (Fig. 27 A-B) y que la expresión de IL-1 β es regulada por LY941000 lo que sugiere que la vía PI3K/AKT es la responsable de regular de la expresión de IL-1 β .

B) CT- LPS



10. DISCUSION

La regulación de la expresión de genes por la familia del factor de transcripción NF κ B/Rel, constituye un complejo mecanismo que tiene el propósito de mantener a la célula alerta ante posibles cambios en el medio ambiente y de esta forma pueda responder de manera apropiada (Arenzana-Seisdedos, 1995). NF κ B es un factor de transcripción cuya activación de en extremo compleja, debido a que es un importante regulador en la expresión de un amplio espectro de genes en particular los involucrados en respuesta inmune, reclutamiento de leucocitos y respuestas inflamatorias. En células de mamífero se han caracterizado cinco proteínas Rel, p50, p52, p65 (RelA), Rel (c-Rel) y RelB, todas estas proteínas contienen la región homóloga denominada Rel, ésta región incluye sitios de asociación al DNA, dominios de dimerización y señales de localización nuclear. Los miembros de la familia Rel forman homo o heterodímeros (NF κ B es un heterodímero p50/p65) el cual se asocia de manera a un decámero en el DNA a esta secuencia se la denomina motivo κ B.

Como la mayoría de los factores de transcripción NF κ B se localiza en el citoplasma (Beauparlant, 1996). Se han caracterizado dos proteínas I κ B (I κ B α e I κ B β), ambas proteínas contiene el motivo ankirina para su interacción con la región de homología a Rel (Beg, A. A., 1993). NF κ B forma un complejo con I κ B que se encuentra en el citoplasma de las células enmascarando el sitio de localización nuclear mediante una interacción proteína-proteína y de esta forma

I κ B previene la movilización de NF κ B al núcleo y su asociación con el DNA. Después de las células son expuestas a una amplia variedad de estímulos las proteínas I κ B son degradadas por el mecanismo ubiquitina/proteosoma y de esta forma NF κ B se transloca al núcleo en donde activa la transcripción de genes (Chu, Z.-L., 1996).

I κ B α e I κ B β comparten propiedades comunes pero también muestran algunas diferencias. Ambas interactúan con el mismo espectro de proteínas Rel, inhiben la asociación al DNA y restringen la distribución de NF κ B en el citoplasma.

Después del estímulo I κ B α se degrada ante cualquier estímulo. Sin embargo I κ B β solo responde ante algunos estímulos. El tratamiento con interleucina-1, lipopolisacárido o Tax I provoca la degradación de ambos y la activación de NF κ B perdura por horas después del estímulo a pesar de que la célula haya sintetizado nuevo I κ B α .

Lo que nos sugiere que un importante componente en el sistema NF κ B consiste en regular manera positiva al gene I κ B. Debido a que la rápida reaparición de I κ B α después de su destrucción es el resultado de la expresión del gene I κ B α por NF κ B (Good, L., 1996). En este estudio se determina el mecanismo de degradación de I κ B α para inhibir la transcripción de NF κ B y establecer si I κ B α bloquea fuertemente a NF κ B.

Encontramos que la máxima degradación de I κ B α se produce después de los cinco minutos tratamiento y a dosis de 0.5 μ g/ml, encontramos también de la degradación de I κ B es regulada por la vía AKT y proteína cinasa C. En otra serie de resultados encontramos que el la degradación de I κ B α a tiempos cortos no impide que NF κ B promueva la expresión de IL-1beta en periodos prolongados de incubación ya que observamos que después de 4 hrs de tratamiento se expresa IL-1. A la incubación con los inhibidores encontramos que la expresión de IL-1 es regulada por AKT.

Finalmente los resultados muestran que las endotoxinas regulan la activación del factor de transcripción NF κ B mediante la degradación de I κ B es la transducción participa la vía PI-3K y promueve la expresión de IL-1b.

11. CONCLUSIONES

- 1.- Encontramos que LPS induce la degradación de I κ B
- 2.- Nuestros resultados muestran que la degradación de I κ B depende de ERK $\frac{1}{2}$ y de PI3K /AKT.
- 3.- La expresión de IL-1B depende de PI3K /AKT.

12.- BIBLIOGRAFIA

1. Lindhe Jan. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. 4ª ed. 2006. Editorial: Medica Panamericana. España. Pp12-52
2. Carranza Fermín A. Newman Michael G. *Periodontología Clínica*. 9ª ed. 2003 Editorial: Mc Graw-Hill Interamericana. Pp 9-38
3. Thomas G. Wilson. *Fundamentals of periodontology*. 2ª ed. 2003. Editorial: Quintessence Publishing. Pp 7-21
4. Javier Lazo. *Patología General*. 2004. Editorial: Masson. Pp 36-47
5. Perez Arellano, J.L. *Manual de patología general*. 6ª ed. 2006 Editorial: Masson. Pp 28-39
6. Delhase M, Li N, Karin M.(2000) *Kinase regulation in inflammatory response*. Nature. 406 (6794) : 367-368.
7. Aradhya SHayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J., Nelson LD (2001) *NF-kappaB signaling ad human disease*. Current opinion in genetics y development. 11 (3) :300-306.
8. G, Piette J, Merville MP, Bours V. (2000) *Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interieukin- 1*. Bonizzi Biochemical pharmacology. 59(1): 7-11.
9. Bowie A, O'Neill LA. (2000) *Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries*. Biochemical pharmacology. 59(1): 13-23.
- 10.. Chang L, Karin M. (2001) *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature. 410 (6824) : 37-40.
- 11.Chen F, Castranova V, Shi X. (2001) *New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation*. The American journal of pathology. 159 (2): 387-397.

Fuentes de información

1. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) *Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6*

requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell. 103 (2) 351-361.

2. Hehner SP, Hofmann TG, Ushmorov A, Dienz O, Wing-Lan Leung 1, Lassam N, Scheidereit C, DrAge' Schmitz ML (2000) *Mixed-lineage kinase 3 delivers CD3/CD28-derived signals into the I κ B kinase complex.* Molecular and cellular biology. 20 (7): 2556-2568.
3. Hofmann RM, Pickart CM (2001) *In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains.* The Journal of biological chemistry. 276 (30) 27936-27943.
4. Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr (2000) *Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase.* Cancer research. 60 (13) : 3477-3483.
5. Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M (2001) *IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B.* Nature. 410 (6829) : 710-714.
6. Isra'el A (2000) *The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B?* Trends in cell biology. 10(4): 129-133.
7. Jaspers 1, Zhang W, Fraser A, Samet JM, Reed W (2001) *Hydrogen peroxide has opposing effects on IKK activity and I κ B α breakdown in airway epithelial cells.* American journal of respiratory cell and molecular biology. 24(6): 769-777.
8. Kapahi P, Takahashi T, Natoli G, Adams SR, Chen Y, Tsien RY, Karin M (2000) *Inhibition of NF- κ B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of I κ B kinase.* The Journal of biological chemistry. 275 (46) : 36062-36066.
9. Karin M, Ben-Neriah Y (2000) *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity.* Annual review of immunology. 18 : 621-663.
10. Korn SH, Wouters EF, Vos N, Janssen-Heininger YM (2001) *Cytokine-induced activation of nuclear factor- κ B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of I κ B kinase.* The Journal of biological chemistry. 276 (38): 35693-35700.
11. John C. Marshall. Crit. (2001) *Inflammation, Coagulopathy, and the Pathogenesis of Multiple Organ Dysfunction Syndrome.* Care Med Vol 29, No. 7 . 99-106

12. Kopp EB, Ghosh S (1995) *NF-kappa B proteins in innate immunity*. Advances in immunology. 58 : 1-27.
13. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999) *Induction of NF-kappaB by the Akt/PKR kinase*. Current biology : CB. 9(11): 601-604.
14. Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT (1998) *SUMO-1, modification of Ikappa B alpha inhibits NF-kappaB activation*. Molecular cell 2 (2) : 233-239.
15. Cohen L, Henzel WJ, Baeuerle PA. (1998) *IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex*. Nature. 395 (6699) 292-296
16. Chen F, Demers LM, Vallyathan V, Ding M, Lu Y, Castranova V, Shi X. (1999) *Vanadate induction of NF-kappaB involves I kappa B kinase beta and SAPK/ERK kinase 1 in macrophages*. The Journal of biological chemistry. 274 (29): 20307-20312.