



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EFFECTO DE LA MIRICETINA Y Fisetina SOBRE LA ACCIÓN DE  
LIPOPOLISACÁRIDO EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**ANABEL CONTRERAS SÁNCHEZ**

**TUTORA: Dra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS**

MÉXICO, D.F.

**2012**



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.

## INDICE

1.0. Resumen.....	6
2.0. Introducción.....	7
3.0. Planteamiento del problema.....	9
4.0. Justificación del Estudio.....	10
5.0. Antecedentes.....	11
5.1. Enfermedad periodontal.....	11
5.2. Inmunidad innata en la enfermedad periodontal.....	11
5.2.1. Respuesta inmune innata a través de la regulación génica postranscripcional.....	14
5.3. Inmunidad adaptativa en la enfermedad periodontal.....	15
5.3.1. Expresión de citocinas (linfocinas) por células T en la enfermedad periodontal.....	15
5.3.1.1. Citocinas TH1 y TH2 (linfocinas) en la enfermedad periodontal.....	16
5.3.1.2. Expresión de citocinas por células T CD8+.....	19
5.3.1.3. Expresión de citocinas por células T $\gamma\delta$ .....	19
5.4. Citocinas.....	20
5.4.1. Expresión de citocinas en salud periodontal.....	21
5.4.2. Expresión de citocinas en la enfermedad periodontal.....	22
5.4.2.1. Citocinas inflamatorias en la enfermedad periodontal.....	22
5.4.2.2. Mecanismo de expresión de citocinas en el estado de enfermedad periodontal.....	23
5.4.3. Citocinas que llevan a la resorción ósea .....	24
5.4.4. Vía RANK/RANKL.....	24
5.4.4.1. Vía RANK/RANKL/OPG en la resorción ósea de la enfermedad periodontal .....	25
5.5. Quimiocinas involucradas en la pérdida ósea periodontal.....	27
5.5.1. Quimiocinas .....	27
5.6. Fibroblastos gingivales en la enfermedad periodontal.....	27
5.6.1. Fibroblastos gingivales como células inmunocompetentes.....	28

5.7. Actividad biológica de Interleucina-1 (IL-1).....	29
5.7.1. Familia de interleucina 1.....	30
5.7.2. Expresión y regulación de IL-1 $\beta$ .....	31
5.7.3. IL-1, principalmente IL-1 $\beta$ en la enfermedad periodontal.....	32
5.9. Ciclooxygenasa COX2.....	33
5.9.1. Regulación postranscripcional de COX2.....	36
5.9.2. Determinante estructural de la degradación proteosomal de COX-2.....	36
5.9.3. Retículo endoplásmico asociado con la degradación de COX2.....	37
5.10. Síntesis de prostanoïdes.....	38
5.11. Prostaglandinas.....	39
5.11.1. Señalización de PGE2.....	39
5.11.2. Receptores de Prostaglandina E2.....	39
5.12. COX2 y PGE2 en la enfermedad periodontal.....	40
5.12.1. Ciclooxygenasa 2 en la producción de prostaglandina E2 en la enfermedad periodontal.....	41
5.12.2. Efecto de COX-2 y prostaglandina E2 sobre el metabolismo óseo y regeneración de tejido periodontal.....	42
5.13. COX2 en la percepción del dolor inflamatorio.....	44
5.14. Patogénesis de la enfermedad periodontal.....	45
5.14.1. Respuesta del huésped en la enfermedad periodontal.....	45
5.14.2. La respuesta destructiva del huésped en el daño del tejido tisular .....	46
5.15. Bacterias periodontopatógenas.....	47
5.16. <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	48
5.16.1. <i>P.gingivalis</i> en la enfermedad periodontal.....	49
5.17. Lipopolisacárido de <i>Porphyromonas gingivalis</i> para la producción de citocinas en fibroblastos gingivales.....	51
5.17.1. Lipopolisacárido (LPS) de <i>Porphyromonas</i> <i>Gingivalis</i> .....	51
5.17.2. Acción de LPS de <i>P.gingivalis</i> sobre la enfermedad periodontal.....	53
5.18. Señalización de Lipopolisacárido (LPS).....	53



5.19.	Complicaciones sistémicas de <i>P.gingivalis</i> inducen la inflamación crónica.....	54
5.20.	Mecanismos moleculares de interacciones huésped-microorganismo en la enfermedad periodontal.....	54
5.20.1.	La vía de señalización de LPS de <i>Porphyromonas gingivalis</i> vía CD14 y receptor TOLL-tipo-4 (TLR4).....	56
5.20.2.	Vías de señalización en patógenos periodontales que inducen inflamación.....	61
5.20.2.1.	<i>P.gingivalis</i> induce cascadas de señalización inflamatorias.....	61
5.21.	Riesgos para el hueso con el uso de AINES.....	65
5.21.1.	Riesgos en el uso de AINES en odontología clínica.....	66
5.22.	Miricetina.....	66
5.22.1.	Propiedades antioxidantes.....	67
5.22.2.	Efecto en la degradación del DNA.....	68
5.22.3.	Anticarcinogénico.....	69
5.22.4.	Antiviral.....	69
5.22.5.	Efecto en la inhibición de la replicación y reparación del DNA/RNA.....	70
5.22.6.	Antitrombótico.....	70
5.22.7.	Antiarterioesclerótico.....	71
5.22.8.	Antidiabético.....	71
5.22.9.	Antiinflamatorio.....	71
5.22.10.	Otros efectos terapéuticos.....	72
5.22.11.	Efecto de miricetina en la enfermedad periodontal.....	72
5.23.	Fisetina.....	73
5.23.1.	Propiedades de oxidación.....	74
5.23.2.	Antioxidante.....	75
5.23.3.	Anticarcinogénico.....	75
5.23.4.	Antiinflamatorio.....	76
5.23.5.	Otros efectos terapéuticos.....	77
6.0.	Objetivo General.....	78
7.0.	Objetivos Específicos.....	78
8.0.	Hipótesis Verdadera.....	78
9.0.	Hipótesis Falsa.....	78
10.0.	Tipo de estudio.....	78

11.0. Materiales y Métodos.....	79
11.1. Cultivo de fibroblastos gingivales humanos.....	79
11.2. Viabilidad Celular.....	79
11.3. Ensayo de Western Blot.....	79
11.4. RT-PCR.....	80
11.5. Ensayo de ELISA.....	80
12.0. Análisis Estadístico.....	81
13.0. Resultados.....	82
14.0. Discusión.....	96
15.0. Bibliografía.....	101

## 1.0. Resumen

---

La enfermedad periodontal es un proceso infeccioso, en la que participan ciertos microorganismos presentes en la placa dentobacteriana entre los que se encuentra *Porphyromonas gingivalis* que es una bacteria Gram-negativa, asociada a la periodontitis; este patógeno presenta en su membrana externa lipopolisacáridos (LPS) que tienen actividad pro-inflamatoria.

Por otra parte, los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en semillas, frutas, flores y en extractos de plantas. Poseen diversas propiedades entre las que se encuentran las antiinflamatorias. Por lo que la presente investigación tiene el objetivo de caracterizar el efecto de fisetina y miricetina sobre la expresión de ciclooxigenasa-2 y síntesis IL-1 $\beta$  en fibroblastos gingivales humanos (HGF) estimulados con lipopolisacáridos. Una vez tomando en cuenta la problemática del estudio, se decidió caracterizar el efecto de los flavonoides sobre las acciones del LPS en HGF. En particular la activación de las MAPK y posteriormente en la expresión de COX2, síntesis de IL-1 $\beta$ , degradación de I $\kappa$ B y translocación de NF $\kappa$ B.

Se utilizaron cultivos celulares primarios de HGF, técnica de Western-blot, RT-PCR e inmunocitoquímica. Nuestros resultados mostraron que fisetina y miricetina no presentaron efectos citotóxicos de manera dependiente de la dosis y del tiempo, así como estos flavonoides regulan de manera negativa la fosforilación de las diferentes MAP cinasas y la expresión proteica y génica de COX 2 en fibroblastos gingivales humanos ante la estimulación con lipopolisacárido de *P. gingivalis*; de igual manera se observó una disminución de la síntesis de IL-1 $\beta$  inducida por estos flavonoides.

En conclusión estos resultados muestran una alternativa en el tratamiento de la enfermedad periodontal, coadyuvada por las diferentes fases de tratamiento.

## 2.0. Introducción

---

Entre las enfermedades bucodentales más comunes y con más prevalencia a nivel mundial son la caries dental y la enfermedad periodontal. La enfermedad periodontal afecta a los tejidos de soporte del diente, los cuales son cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar, esta enfermedad provoca un grupo de infecciones que van desde la inflamación gingival hasta la destrucción de tejidos periodontales, y es acompañada por la pérdida del hueso alveolar hasta llegar a una eventual exfoliación dentaria.

El principal factor etiológico de la enfermedad periodontal es la presencia de la placa dentobacteriana o también denominado biofilm, aunque se puede decir que es una enfermedad multifactorial, que se caracteriza por la presencia de una variada serie de bacterias periodontopatógenas.

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

Hace casi 25 siglos, Hipócrates, el padre de la medicina, proclamó: "Deja Que la comida sea tu medicina y la medicina sea tu alimento".

Como resultado compañías farmacéuticas han incrementado su interés en desarrollar terapias multidiana.

En la literatura existe una gran variedad de trabajos de investigación científica que hablan acerca de los mecanismos de acción de los flavonoides, los cuales, son sustancias de origen vegetal, que en cuyas propiedades se ha demostrado que posee características, antiinflamatorias, antineoplásicas, antioxidantes entre otras, y se ha demostrado su acción en diferentes tipos de células, además estos productos son menos costosos. Algunas de estas sustancias están actualmente en ensayos clínicos, pero otras han sido aprobadas para uso humano.

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

Y se ha planteado las acciones que tienen los diferentes flavonoides en los procesos de inflamación de los tejidos periodontales., ya que se ha demostrado que dichos flavonoides tienen un efecto inhibitorio en la activación de las proteínas activadas por mitógeno (MAPK) que son inducidas por diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

En el presente estudio se analizan las acciones que tienen estas sustancias en especial la miricetina y fisetina, ante el tratamiento de la enfermedad periodontal, principalmente en células de fibroblastos gingivales humanos (HGF), y como actúan estos flavonoides ante lipopolisacáridos inducidos por bacterias periodontopatógenas gram negativas.

Así mismo se caracteriza el efecto de miricetina y fisetina en la activación de LPS en el mecanismo de transducción en la regulación en fibroblastos gingivales humanos (HGF).

Existen estudios que muestran que la fisetina en dosis de (30-120 mM) induce la expresión de COX2 en células HT29 de cáncer de colon , resultando la inducción de apoptosis celular, con la afectación de COX1 y la inhibición de secreción de PGE2.

También se ha encontrado que la fisetina inhibe la activación de EGFR y el factor nuclear NF-kB. (129)

Otros estudios reportan que se ha utilizado la fisetina sobre la producción de citocinas proinflamatorias y en la producción del factor angiogénico en la estimulación de IL-1 $\beta$  en fibroblastos de células sinoviales .Se ha encontrado que fisetina disminuye considerablemente la inducción de IL-1 $\beta$  en citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , interleucina 6, quimiocinas, IL-8, MCP-1). (130)

Se ha planteado que la miricetina no solo inhibe citocinas proinflamatorias por apoptosis celular, si no también bloquea TNF- $\alpha$  e IL-1. La inhibición de la apoptosis de la miricetina esta asociada con la inhibición de TNF- $\alpha$  e interleucina-1 regulada por la expresión de Fas. Así mismo como que la miricetinapreviene la osteoporosis por inhibición de citocinas proinflamatorias, regulada por apoptosis de osteoblastos. (131)

### 3.0. Planteamiento del problema

---

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

La importancia fisiológica de prostanoídes y de las moléculas de la inflamación las cuales se encuentran incrementadas en los tejidos periodontales en pacientes con enfermedad periodontal, es destacada por el uso de drogas antiinflamatorias no esteroideas inhibidoras de ciclooxigenasa en el tratamiento clínico de esta enfermedad.

Las tradicionales drogas antiinflamatorias no esteroideas inhiben la actividad tanto de ciclooxigenasa 2 (COX 2) y posee adversos efectos secundarios que incluyen citotoxicidad gastrointestinal. La expresión de ciclooxigenasa 2, la activación de las MAP cinasas y la síntesis de IL-1 $\beta$  es inducible en respuesta a citocinas inflamatorias y a diferentes estímulos como lipopolisacárido.

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

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

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

## 4.0. Justificación del Estudio

---

La placa dental juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal, la cual resulta en la inflamación y destrucción de tejidos periodontales y pérdida dental.

Un gran esfuerzo se ha hecho para encontrar efectivos agentes antiplaca y antiinflamatorios de una variedad de componentes químicos y biológicos para ser incorporados en productos dentales, reduciendo de esta manera las enfermedades reguladas por la placa dental.

A la fecha, clorhexidina u otras sustancias como Listerine (una combinación de “aceites esenciales”) han ganado la aprobación del “American Dental Association Council on Dental Therapeutics”. Sin embargo son comúnmente observados varios efectos adversos como la tinción dental y el incremento en la formación de cálculo con los químicos utilizados actualmente. (6,7)

Así mismo la utilización de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) ha presentado numerosos efectos secundarios ante el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Estos inconvenientes justifican una mayor investigación y desarrollo de fármacos alternativos que sean seguros para el huésped, manteniendo la especificidad y la eficacia.

Diversas plantas han mostrado ser agentes antimicrobianos y antiinflamatorios, aunque pocos reportes están disponibles con respecto a su actividad contra los patógenos orales, ya que por ejemplo la actividad antiinflamatoria de fisetina en modelos *in vivo* se ha observado mucho más pronunciado comparado con los efectos observados del antiinflamatorio glucocorticoide dexametasona.

El estudio del efecto de miricetina y fisetina sobre la acción del lipopolisacárido obtenido de *Porphyromonas gingivalis*, es de gran relevancia por su efecto a nivel de salud pública, debido a su papel en la regulación de la vía de transducción de señales, ya que caracterizar la acción de estos flavonoles sobre la fosforilación de las MAPK y su acción sobre la expresión y síntesis de COX 2 e IL-1 $\beta$  inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos, es un importante y determinante elemento en el tratamiento de pacientes con enfermedad periodontal.

Así mismo este estudio nos ayudará en un futuro a promover la investigación de estos compuestos polifenólicos en el campo de la odontología, para la aplicación de sus propiedades.

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

## 5.0. Antecedentes

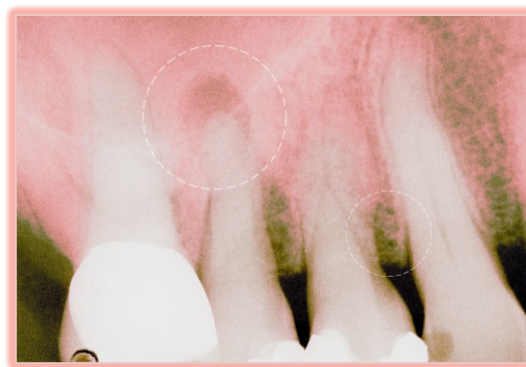
### 5.1. Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa, inflamatoria crónica que se caracteriza por la destrucción de las estructuras de soporte del diente, siendo la forma más prevalente de patología ósea en humanos un factor de modificación de la salud sistémica de los pacientes. Interesantemente la presencia de periodontopatógenos es requerida pero no suficiente, para el inicio de la enfermedad.

En efecto, se ha demostrado que la persistente respuesta inmune inflamatoria del huésped contra los patógenos resulta en la destrucción de tejidos periodontales blandos y mineralizados

Los mediadores de la inflamación han sido asociados con destrucción tisular, mientras los mediadores antiinflamatorios pueden contrarrestar y atenuar la progresión de la enfermedad. Las células T las cuales tienen distintas propiedades inmunoregulatorias en el escenario pro y antiinflamatorio, y se les han adjudicado papeles protectivos y destructivos para polarizar subpoblaciones de linfocitos (Th1, Th2, Th17, y Tregs).

Esta relación protectora/destructiva está relacionada con la destrucción tisular y progresión de la enfermedad, recordando que la enfermedad periodontal es una condición infecciosa inflamatoria. (27)



**Fig 1: Enfermedad periodontal.** La enfermedad periodontal, es un proceso infeccioso que afecta las estructuras de soporte de los dientes. (scielo.org.ve)

### 5.2. Inmunidad innata en la enfermedad periodontal

Mientras la presencia de patógenos periodontales es requerida, pero no suficiente, para el inicio de la enfermedad, se ha demostrado que la respuesta del huésped juega un papel importante en el daño de los tejidos periodontales.

La respuesta innata del huésped inicialmente involucra el reconocimiento de



componentes microbianos como “señales de peligro” por las células huésped y la subsecuente producción de mediadores de la inflamación y citocinas proinflamatorias que señalan los signos clínicos y síntomas de las respuestas inmunes.<sup>(27)</sup>

Además bacterias gram negativas como *Porphyromonas gingivalis* la cual contiene LPS produce una respuesta ante sus interacciones con la respuesta inmune innata del huésped, activando diferentes vías de señalización, por lo tanto LPS es reconocido por células huésped las cuales producen respuestas de las citocinas.

En términos biológicos la existencia de las PAMPs (Patrones moleculares asociados a patógenos) dentro de especies patogénicas individuales puede comprometer las defensas del huésped y promover la infección.

La respuesta inmune innata reconoce y responde a todos los microorganismos colonizadores, tanto comensales como patógenos. Las bacterias comensales estimulan un bajo nivel de respuestas de citocinas en el periodonto, necesario para la inmunidad del huésped y para mantener la integridad del tejido, y la respuesta inmune es amplificada en respuesta a cambios en la composición microbiana de la placa en el cual las bacterias patógenas dominan.

Los receptores tipo Toll (TLRs) son expresados por células residentes y leucocitos en el ambiente periodontal, y activa la respuesta inmune innata por la unión de varios componentes bacterianos (LPS, DNA bacteriano, lipopéptidos, peptidoglicanos etc).

Las PAMPs son detectadas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) los cuales como los receptores tipo Toll TLRs y sus vías de señalización intracelular son altamente conservadas, y son de gran importancia en la respuesta del huésped.

Se reconoce que existen diez moléculas funcionales de TLR en humanos, las cuales son consistentes con las PAMPs expresados por microorganismos infecciosos.

La vía mas estudiada es la del reconocimiento de LPS por un complejo macromolecular que involucra CD14, MD-2 y TLR4, la subsecuente activación de vías de señalización intracelular que permiten la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B al núcleo, consecuente síntesis de citocinas proinflamatorias incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 migración de leucocitos y osteoclastogénesis.

La mayoría de los estudios se enfocan en receptores de la superficie celular como TLR-2 y TLR-4 en el reconocimiento de patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis*, y *Tannerella forsythensis*, pero otros receptores tipo Toll son intracelulares y ocupan el citoplasma, constitutivamente o como resultado de la internalización como parte de procesos de señalización.

Además otras clases de PRRs por ejemplo receptores tipo Nod (NLRs) han sido reconocidos y estos receptores tienen importantes papeles en la detección de infecciones intracelulares.

Es conocido que las moléculas NLR NOD1/2 son expresadas en células orales epiteliales y los agonistas NOD1/2 sinergizan con proteasas de *P.gingivalis* para

inducir secreción de IL-6 e IL-8 de monocitos.

Macrófagos de tejido y células dendríticas (DC) juegan un papel importante en la detección inicial de microorganismos, estas células están presentes en el periodonto.

Un gran número de estudios han mencionado que las células dendríticas tienen un papel importante en la periodontitis, así mismo hay poca presencia de monocitos en la enfermedad periodontal.

Los tejidos epiteliales de la boca y del periodonto también juegan un papel importante en la defensa del huésped; las células epiteliales son elementos esenciales de la integridad del tejido en las superficies mucosas y ellas responden a las bacterias mediante regulación positiva de secreción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión.

Varias bacterias periodontales invaden y colonizan células epiteliales y remarcan la importancia de los PPRs intracelulares y las vías de señalización que ellas activan.

Los fibroblastos son células prominentes dentro del periodonto y son capaces de montar una repuesta de citocinas que produce y amplifica la inflamación.

La activación de la respuesta inmune innata es un prerrequisito para la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, pero también puede permitir o llevar a la inflamación destructiva (crónica), si el factor etiológico original persiste.

El papel que juegan las citocinas en la patogénesis de la enfermedad es preponderante, no solo actúan como iniciadores y reguladores de la inmunidad innata y adaptativa sino también regulan el daño al tejido, el cual lleva a la pérdida de la función y signos clínicos de la enfermedad.

Tipos celulares no inmunes de el periodonto (por ejemplo queratinocitos y fibroblastos) sintetizan citocinas en respuesta a bacterias y a otras citocinas, y las citocinas también influyen en el recambio de los componentes de la matriz extracelular y en las fibras del ligamento periodontal (PDL), así mismo estas también tienen un papel central en la activación de osteoclastos.

La inflamación es una respuesta que no se limita a las infecciones, por ejemplo fragmentos de cromatina liberadas como resultado de la apoptosis ineficiente puede desencadenar señalización de TLR.

También los productos de la descomposición de los componentes de la matriz extracelular como el ácido hialurónico puede activar macrófagos vía TLR-2 y TLR-4 para inducir la secreción de citocinas.

Es posible que la inflamación y el daño del tejido en el periodonto resulte de la respuesta no solo de la bacteria sino también del contenido celular y producto de la degradación del tejido lo que induce a la pérdida de la función del tejido y la exacerbación de los signos clínicos de la enfermedad. (21)

Las citocinas involucradas en la inmunidad innata están involucrados tanto en los procesos de resorción y formación ósea.

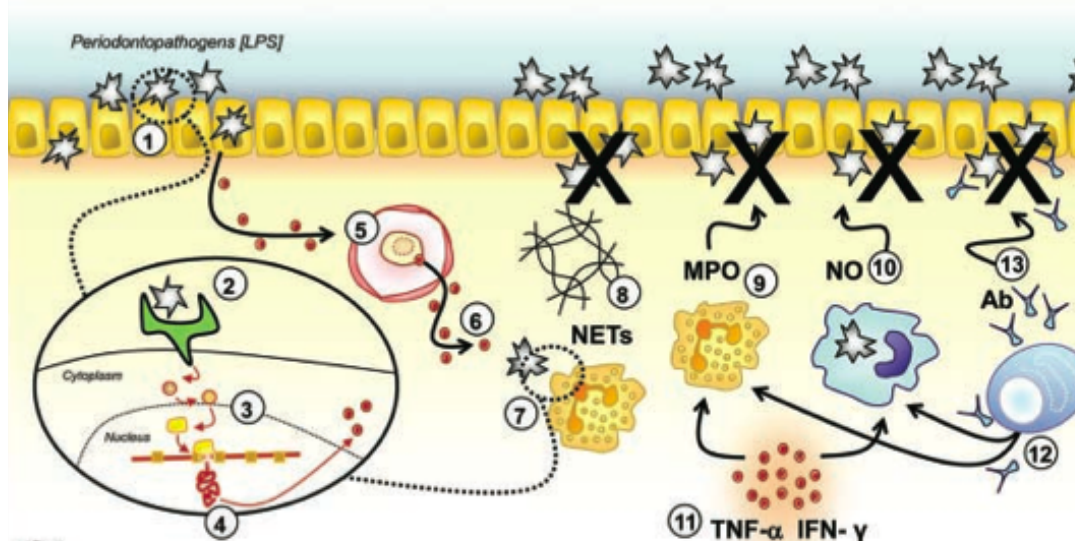
Las citocinas proinflamatorias inhiben la diferenciación ontogénica, y también inducen la activación de los TLRs en osteoblastos induciendo la producción

de citocinas osteoclastogénicas.

Las citocinas de la respuesta inmune innata son producidas por células residentes (células epiteliales, fibroblastos) y fagocitos (neutrófilos y macrófagos) en el ambiente periodontal. Estas células están asociadas con un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias en periodontitis agresiva y crónica.

Las células residentes participan en la pérdida de hueso periodontal, fibroblastos del ligamento periodontal y osteoclastos los cuales actúan sinérgicamente en el incremento de RANKL, TNF- $\alpha$ , e IL-1 en la expresión de genes relacionados a la osteoclastogénesis.

Los fibroblastos gingivales producen citocinas inflamatorias después de la estimulación con LPS. (27)



**Fig 2:** Vías celulares y moleculares que se vinculan con las respuestas inmunes inflamatorias del huésped para el control de la infección periodontal. El reconocimiento de estructuras periodontopatógenas (1) por células residentes en el medio periodontal que involucra receptores de la inmunidad innata como los TLRs y NODs (2). La unión de componentes microbianos a estos receptores desencadena una serie de eventos de señalización intracelular bioquímica (3), la cual culmina en la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas (4). La acción de mediadores pro-inflamatorios en vasos sanguíneos y en leucocitos (5) esto conduce a su quimioatracción selectiva (6) al espacio periodontal. Una vez en el tejido, los fagocitos usan un conjunto similar de TLRs y NODs (7) reconocer blancos microbianos, para activarse, y desencadenar la producción de una serie de componentes antimicrobianos, como trampas de neutrófilos NETs (8), mieloperoxidasa MPO (9) y NO óxido nítrico (10). Citocinas de la inmunidad innata (como TNF- $\alpha$ ) y adaptativa (como IFN $\gamma$ ) incrementa la actividad fagocítica (11) y consecuentemente cuenta para el control de infección periodontal. Además la producción de anticuerpo incrementa la actividad fagocítica contra los patógenos periodontales (12) y los anticuerpos también actúan directamente contra dichos patógenos. (13).(27)

### 5.2.1. Respuesta inmune innata a través de la regulación génica postranscripcional

Las células del sistema inmune se mantienen en un rígido control sobre la producción de las citocinas por la represión de la expresión a nivel postranscripcional.

La adenina, e uridina elementos ricos en (AU) (ARE), localizados en la región no traducida 3' (UTR) de varias citocinas como (GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-6) y de otros factores proinflamatorios como (COX-2 y MMP-13), juegan un

papel principal en la represión post-transcripcional. La presencia de un ARE en un transcrito particular se orienta en una rápida degradación o inhibición de la traducción.

Estímulos inflamatorios (LPS, IL-1 $\beta$ , o TNF $\alpha$ ) dictan la estabilidad del RNAm a través de mecanismos de señalización. En la presencia de estímulos inflamatorios, AREs de 3' UTRs de IL-6, IL-8, COX-2, y TNF- $\alpha$  median la regulación de la estabilidad del RNAm por las MAPK.

p38 MAPK es fosforilado y activado por cinasas MKK3 y MKK6 cuando son estimuladas por IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o LPS;<sup>(36)</sup> p38 MAPK posteriormente fosforila MK2<sup>(37)</sup> la cual fosforila proteínas de unión de RNA para controlar estabilidad del RNAm.<sup>(38,39,30)</sup>

### 5.3. Inmunidad adaptativa en la enfermedad periodontal

#### 5.3.1. Expresión de citocinas (linfocinas) por células T en la enfermedad periodontal

Mientras la inmunidad innata comprende macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, monocitos, células epiteliales y células endoteliales que identifican y responden temporalmente a las PAMPs, la respuesta inmune adaptativa depende del reconocimiento de las células T y B de estructuras de antígenos específicos, resultando en respuestas inmunes las cuales son altamente específicas y sostenidas (por la generación de memoria inmunológica). La combinación de citocinas generadas por macrófagos y células dendríticas crean un medio, la cual determina la diferenciación de subconjuntos particulares de células T efectoras así como la clase y subclase de anticuerpos inmunoglobulinas (Ig) sintetizados.

Las citocinas no logran esto en forma aislada pero actúan en concierto con otras vías de señalización y en particular, interacciones célula-célula través de la presentación de antígeno y función de moléculas coestimuladoras.<sup>(21)</sup>

Entre las células inmunocompetentes, las células T (particularmente células T helper) juegan un papel crucial en la regulación de una variedad de respuestas inmunes por la secreción de varias citocinas, formalmente conocidas como linfocinas.

Aproximadamente entre el 40-50% de células gingivales mononucleares de pacientes con periodontitis adulta son células T CD3+, así mismo las células B y las células plasmáticas son dominantes en lesiones periodontales progresivas.

Lo que sugiere que las células T probablemente juegan un papel importante en la regulación o modulación de la respuesta inmune local en sitios de enfermedad.<sup>(20)</sup>

### 5.3.1.1. Citocinas TH1 y TH2 (linfocinas) en la enfermedad periodontal

Se ha reportado que las células T CD4<sup>+</sup> pueden ser clasificadas en dos grupos, TH1 y TH2 basadas en sus perfiles de citocinas y sus actividades funcionales relacionadas.

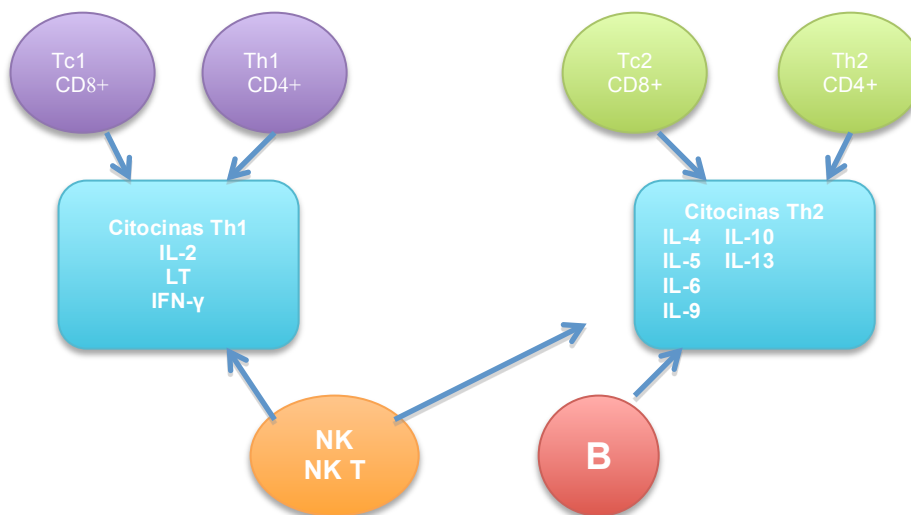


Fig. 3: Fuentes de liberación de citocinas. Las células Th1 secretan IL-2, linfotoxina (LT) e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), mientras que las Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. [scielo.org.ar](http://scielo.org.ar)

La diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> en Th1 o Th2 es un evento crucial en determinar si la inmunidad celular o humoral predominaría.<sup>(20)</sup>

Las citocinas que se generan en estas interacciones son importantes para la función y diferenciación de las células T; células T nativas pueden diferenciarse en células T helper 1 (Th1), o en células Th2 que proveen “ayuda” a las células B o a células Th17, las cuales amplifican las respuestas proinflamatorias, o en células T reguladoras (células Treg), las cuales regulan las respuestas inmunes.

Células Th17 secretan citocinas como IL-17 (las cuales tienen un número de actividades proinflamatorias en común con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) e IL-22, y son importantes en inmunidad contra bacterias extracelulares y contribuye a la inflamación.

Las células Treg secretan el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-10, y tienen un papel regulatorio en otros subconjuntos de células T manteniendo la tolerancia contra antígenos propios, de este modo previenen autoinmunidad.

Las células Th0 expresan algunas funciones efectoras diferenciadas que son características de células T inflamatorias y cooperadoras; los subconjuntos funcionales de células T son ampliamente definidos en la base de la expresión de moléculas de superficie celular como (CD4 o CD8) o receptores particulares de antígenos de células T; ha sido propuesto que las alteraciones en el balance de subconjuntos de células T efectoras CD4 dentro de la población CD4 puede ser un importante evento en la progresión de la enfermedad. Las

citocinas tienen un importante papel en la regulación del desarrollo de subconjuntos de células Th efectoras CD4 y regulan su función.

Las células Th1, secretan interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y promueven inmunidad regulada por células, por activación de macrófagos, células NK, y células T CD8 citotóxicas, mientras que células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13 y regulan inmunidad humoral y actividad de mastocitos.

Se ha sugerido que existe una dinámica interacción entre subconjuntos de células T las cuales pueden resultar en fluctuaciones en la actividad de la enfermedad y que una respuesta Th1 (proporciona protección por inmunidad mediada por células) subyace en una lesión periodontal “estable” (gingivitis), y una respuesta Th2 (que lleva a una activación de células B) regula una lesión destructiva posiblemente a través de la activación de células B derivados de IL-1 $\beta$  (periodontitis).

Además se ha mostrado que las células T se infiltran en tejidos gingivales en pacientes con periodontitis, en donde pueden expresar RNAm tanto para citocinas Th1 y Th2 así como citocinas regulatorias simultáneamente.

Las citocinas juegan un papel importante en la regulación de subconjuntos de células T, así como en reforzar el desarrollo de subconjuntos de células T que tienen un papel en su diferenciación. (21) Se ha reportado que IL-4 estimula la diferenciación en células Th2, mientras IFN- $\gamma$ , IL-12 y TGF- $\beta$  favorecen el desarrollo de Th1; las células Th1 producen IL-2, IFN- $\gamma$  y linfotóxina (LT), mientras células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 IL-10 e IL-13.

Las actividades de la periodontitis y/o susceptibilidad a la enfermedad puede ser causada por una inducción preferencial o sesgada de células Th1 y Th2.

En la producción de citocinas tipo Th1 y Th2 en tejidos gingivales inflamados su expresión génica presenta dos distintos perfiles de citocinas basadas en la expresión de Th1 y Th2, observándose la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e IL-13. La falta de IL-4 puede ser responsable de la acumulación de macrófagos en la enfermedad periodontal. El efecto de IL-4 sobre las respuestas de células B en lesiones inflamatorias periodontales son compensadas por la producción de IL-13, la cual también induce proliferación de células B.

La población de células B en lesiones periodontales produce anticuerpos protectores, y resulta en la eliminación de bacterias patógenas donde la progresión de la enfermedad puede cesar, sin embargo la activación excesiva de células B es responsable de la destrucción del tejido periodontal. (20)

Además se considera que las células T muestran una plasticidad funcional y su fenómeno es influenciado por el medio de citocinas, por ejemplo bajo la influencia de IL-12, células Th17 pueden diferenciarse en células Th1, y células T foliculares (TFH), las cuales residen en folículos de células B o linfonodos, son dependientes de IL-6 e IL-12 para su desarrollo, y puede potencialmente secretar un perfil citocínico que corresponde a células Th1, Th2 y Th17.

En el desarrollo de las células T las células presentadoras de antígenos (APCs)

actúan como una fuente de citocinas que influyen la diferenciación de células T.

Así mismo las células NK son importantes para la producción de IFN- $\gamma$  que induce la diferenciación de Th1, enfatizando la importancia de la respuesta inmune adaptativa; así mismo se ha reportado que no solo células T $\alpha\beta$  sino también células T $\gamma\delta$  de pacientes con periodontitis adulta expresan IFN- $\gamma$ .

Las citocinas también juegan un papel importante en el desarrollo y función de células B, los estadios importantes en el desarrollo de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos son incluyendo activación y proliferación, selección del destino de diferenciación, aspectos cualitativos de secreción de anticuerpos y finalmente, longevidad de células plasmáticas.

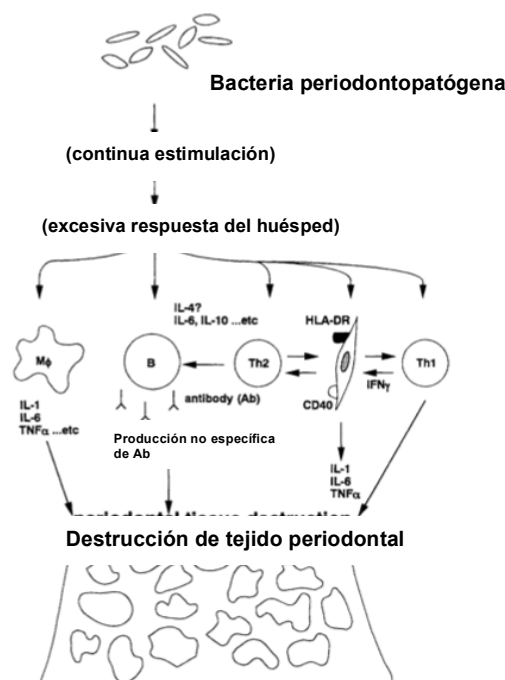
Este proceso es influenciado por un gran número de factores incluyendo compromiso del antígeno, coestimulación de células T, vía de señalización de PRRs y la influencia del medio citocinico.

Quimiocinas y receptores de quimiocinas son centrales en la distribución de linfocitos, incluyendo células B en tejidos linfoides secundarios. IL-2, IL-4, IL-6 e IL-21 son citocinas importantes en la regulación de la diferenciación y refuerzo de otras señales derivadas de células B.

IL-5, IL-6 and TNF- $\alpha$  promueven la supervivencia de células plasmáticas y la presencia de inflamación provee de señales que mantienen células plasmáticas en tejidos periféricos.

Las células B y la diferenciación de células plasmáticas caracterizan una lesión establecida en la enfermedad periodontal y altos niveles de anticuerpos están presentes en el fluido crevicular gingival, (21) así mismo los niveles de IFN- $\gamma$  son detectados en tejidos gingivales inflamados, encontrándose en pacientes con periodontitis agresiva.

La producción de citocinas derivadas de células Th1 y Th2, pueden ser responsables de la destrucción de tejidos periodontales a través de respuestas inmunes humorales y /o celulares; la estimulación de ambos tipos celulares puede potencialmente participar en la destrucción del tejido periodontal. (20)



**Fig 4: Modelo de inmunopatogénesis de la periodontitis.** Continuo estímulo de bacteria periodontopatógena en las bolsas periodontales causa un continuo y/o excesiva respuesta del huésped la cual incluye activación celular de células residentes como células epiteliales gingivales, fibroblastos y células inmunocompetentes localmente infiltradas como macrófagos, células T y células B. Esto conduce a una hiperproducción de citocinas en tejidos periodontales inflamados, resultando en la destrucción de tejidos. (20)

### 5.3.1.2. Expresión de citocinas por células T CD8+

Células T CD8+ (citotóxicas y supresoras) se presentan en lesiones periodontales inflamadas. Se ha demostrado que las células T CD8+ citotóxicas (Tc) son también divididas en células Tc1 y Tc2 basadas en el patrón citocínico que ellas producen. Como con células Th1 y Th2, las células Tc1 secretan IL-2 e IFN- $\gamma$  y las células Tc2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10. (20)

### 5.3.1.3 Expresión de citocinas por células T $\gamma\delta$

Proporciones anormales de células T  $\gamma\delta$  son frecuentemente encontradas en sangre periférica en pacientes con enfermedad periodontal y tienen un papel en la primera línea de defensa contra infecciones.

Existe un incremento en la proporción de células T  $\gamma\delta$  comparadas con células T  $\alpha\beta$ , con un incremento en el tamaño del infiltrado en lesiones gingivales y periodontales, estas células reconocen una proteína propia que es expresada por células infectadas en el epitelio gingival, y que las células T  $\gamma\delta$  matan a la célula infectada para prevenir la propagación de la infección.

Así mismo las células T  $\gamma\delta$  están localizadas en el epitelio tanto de encía inflamada y normal.

Células T  $\gamma\delta$  constituyen la primera línea de defensa en la encía previniendo la entrada de patógenos por citotoxicidad contra células epiteliales infectadas y por control de crecimiento de células epiteliales a través de la secreción de citocinas reguladoras. (20)



## 5.4. Citocinas

Varios eventos biológicos son estrictamente regulados por interacciones célula-célula, las cuales son categorizadas en dos formas:

Interacciones afines (adhesivas), logradas por el reconocimiento mutuo entre moléculas de superficie unidas a la membrana celular e interacciones reguladas por citocinas.

Las citocinas son pequeñas proteínas solubles producidas por una célula que altera el comportamiento o propiedades de otra célula de manera local o sistémica; incluido en el grupo de citocinas están, las interleucinas, interferones, factores de crecimiento, factores citotóxicos, factores activadores o inhibitorios, factores estimulantes de colonias e intercrinas.

Las citocinas son responsables del mantenimiento de una intrincada red de comunicación entre tipos celulares homotípicos y heterotípicos.

De esta manera, las citocinas juegan un papel importante en numerosas actividades biológicas incluyendo proliferación, supervivencia, desarrollo, diferenciación, homeostasis, regeneración, reparación e inflamación.

Las células productoras de citocinas están a menudo localizadas inmediatamente adyacentes a las células que responden, (20) varias citocinas se unen a elementos de la matriz extracelular, así limita su propagación a través del sitio de acción e incrementa su biodisponibilidad a las células que responden. (29)

Normalmente, la síntesis de citocinas es inducible, aunque algunos factores son conocidos por ser producidos constitutivamente; las células activadas usualmente sintetizan diferentes citocinas al mismo tiempo, la mayoría de estas células también expresan receptores específicos ya sea inducible o constitutivamente para que puedan reaccionar con un amplio espectro de citocinas.(20)

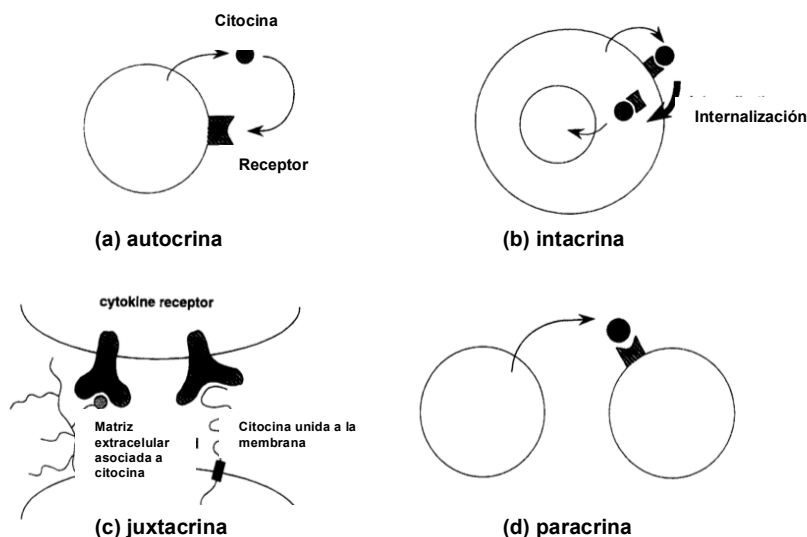
Varias citocinas son clasificadas basándose en su origen celular o sus funciones, sin embargo es conocido que las citocinas son usualmente multifuncionales y son producidas por varios tipos celulares.

Los mecanismos por los cuales citocinas actúan sobre células diana son clasificadas en cuatro tipos: autocrinas, intracrinas, juxtracrinas y paracrinas.

Las citocinas son importantes para la homeostasis del tejido, las cuales son secretadas constitutivamente por células residentes que componen el tejido, (20)

y así mismo son producidas transitoriamente a concentraciones generalmente bajas, actúan y son degradadas en un ambiente local.(29)

Por otro lado, en estados de enfermedad, las citocinas pueden ser secretadas no solo por células residentes sino también por infiltrado local de células inmunocompetentes.(20)



**Fig 5: Mecanismo por el cual citocinas actúan sobre las células dianas. (a) Autócrina:** un mecanismo que involucra la síntesis de una citocina por una célula que influencia las actividades funcionales y de crecimiento de las células productoras de citocinas a través de un receptor específico en su superficie. **(b)Intacrina:** un mecanismo que involucra la acción directa de una citocina dentro de una célula. **(c)Juxtacrina:** un mecanismo que involucra un contacto específico célula-célula, esto ocurre a través de la interacción de la membrana y de una citocina que es normalmente secretada con un receptor sobre una célula adyacente. **(d)Paracrina:** mecanismo que involucra la síntesis de una citocina por una célula que influencia el crecimiento y actividades funcionales de células cercanas que expresan el receptor de estas citocinas.(20)

#### 5.4.1. Expresión de citocinas en salud periodontal

La homeostasis del tejido representa un balance entre mecanismos anabólicos y catabólicos, dentro de los principales aspectos de la homeostasis se encuentran la regulación de la migración, proliferación y diferenciación de células residentes y de la producción del tejido de la matriz en un estado de salud del tejido periodontal.

Existe abundante evidencia de que citocinas, las cuales son secretadas por fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales juegan un papel importante en la homeostasis del tejido, ante la expresión de RNAm de citocinas en tejidos gingivales clínicamente sanos, la expresión de RNAm de una variedad de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) esta presente.

La expresión de RNAm de las llamadas citocinas inflamatorias (como IL-1, IL-6, y TNF- $\alpha$ ) es detectada en tejido gingival clínicamente sano, aunque sus densidades son relativamente bajas en comparación con la de los sitios de inflamación. Esto sugiere que numerosas citocinas pueden estar involucradas en el recambio y la integridad del tejido periodontal.

Los niveles proteicos y de RNAm de moléculas como factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), PDGF, factor de crecimiento insulínico (IGF), TGF- $\beta$  y factor de crecimiento derivado de cemento (CGF), son constitutivamente expresados en tejidos normales periodontales.(20)

## 5.4.2. Expresión de citocinas en la enfermedad periodontal

Las citocinas juegan un papel importante en la homeostasis del tejido; además se ha mostrado que un incremento en la producción de citocinas puede conducir a la aparición de la enfermedad y/o daño en el tejido.<sup>(20)</sup>

### 5.4.2.1. Citocinas inflamatorias en la enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal, es una enfermedad infecciosa crónica, la cual es caracterizada por un proceso destructivo inflamatorio que afectan los tejidos de soporte del diente produciendo resorción del hueso alveolar, formación de bolsas periodontales, y que conlleva a una eventual pérdida dental.

Histológicamente, la enfermedad periodontal, también es caracterizada por la acumulación de células inflamatorias en el tejido conectivo gingival extravascular.

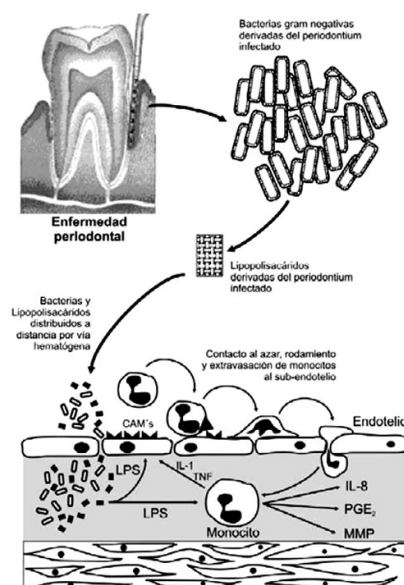
Numerosas especies bacterianas han sido aisladas de la placa subgingival, y algunas de ellas se cree que están estrechamente asociadas con la aparición y la progresión de la enfermedad.

Dado que la mayoría de las bacterias periodontopatógenas residen en las bolsas periodontales e invaden los tejidos periodontales existe en una inflamación crónica, una continua y excesiva respuesta del huésped, que resulta en la destrucción del tejido. La respuesta local del huésped a estas bacterias incluye el reclutamiento de leucocitos y la subsecuente liberación de mediadores de la inflamación y citocinas, las cuales parecen jugar papeles cruciales en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

Una citocina inflamatoria se define como una citocina la cual es inducida durante el curso de una respuesta inflamatoria y es estrechamente asociada con la aparición y la progresión de la enfermedad, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  son clasificadas como citocinas inflamatorias y estas actúan durante la resorción alveolar ocurrida en la enfermedad periodontal.

De hecho la expresión de RNAm de citocinas que han sido asociadas con la periodontitis son constitutivamente detectadas, en cierta medida en tejidos gingivales clínicamente sanos, por ejemplo en tejidos periodontales sanos, IL-1 estimula la proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales.

Además IL-1 favorece la síntesis de fibroblastos de procolágeno tipo1, colagenasa, hialuronato y fibronectina. Aunque las citocinas son producidas por el infiltrado local de células inmunocompetentes como células T y monocitos en sitios de la enfermedad, tipos celulares que normalmente componen los tejidos, como fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales, están también involucradas en la producción de citocinas durante la respuesta inflamatoria. <sup>(20)</sup>



**Fig 6: Migración de monocitos al sub-entotelio mediante estímulo de LPS bacteriano (actaodontologica.com).**

#### 5.4.2.2. Mecanismo de expresión de citocinas en el estado de enfermedad periodontal

Las respuestas inflamatorias son generadas en cualquier tejido, donde la expresión de una variedad de citocinas es incrementada en el sitio de la lesión y posteriormente regulada negativamente para controlar la respuesta inflamatoria local.

Se ha observado que una producción descontrolada de citocinas conduce la aparición y progresión de ciertas enfermedades.

Se ha investigado la posible relación, entre niveles de varias citocinas inflamatorias en fluido crevicular gingival y en la condición de enfermedad periodontal; se han detectado IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en GCF.

Los niveles de citocinas en GCF, están íntimamente asociados con la severidad de la respuesta inflamatoria y/o destrucción del tejido periodontal. Así mismo los niveles de IL-1 son elevados en GCF en sitios con periodontitis y periodontitis refractaria y es marcada su reducción después del tratamiento periodontal, IL-1 $\beta$  es detectada de manera más frecuentemente que IL-1 $\alpha$  en GCF de pacientes sin tratar con periodontitis. También se encuentra presente la expresión de RNAm de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA).

Existe un genotipo específico en el grupo de genes de IL-1, que incluye un locus asociado con un incremento en la producción de IL-1 correlacionado con una periodontitis severa. Esto sugiere que un mecanismo genético existe por el cual algunos individuos, pueden tener una mayor respuesta inmuno-inflamatoria, permitiendo una periodontitis más severa produciendo una correlación entre los niveles de producción de citocinas y susceptibilidad de periodontitis severa. (20)

### 5.4.3. Citocinas que llevan a la resorción ósea

La resorción del hueso alveolar ocurre cuando los niveles de mediadores inflamatorios en el recubrimiento de los tejidos blandos llega a un cierto umbral en una distancia crítica de la superficie ósea y activa las vías permitiendo la resorción ósea.

La infiltración de células como macrófagos y linfocitos, así como células residentes (fibroblastos y macrófagos del tejido) secretan un amplia variedad de citocinas y mediadores como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ -, IL-6, IL-11, IL-17 y PGE2, la cual puede regular la actividad osteoclástica a través de la vía de RANK/RANKL/OPG, o puede contribuir a la pérdida ósea a través de la vía independiente de RANK, este último incluye la capacidad de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de activar osteoclastos independientemente de la vía de RANK a través de IL-1R1 y TNFR1 permitiendo la diferenciación y la activación de osteoclastos a través de la vía de NF-kB, con acoplamiento de las vías de señalización de TNFR1 y RANK.

IL-1 $\beta$  es un potente estimulador de la resorción ósea y juega un papel en los múltiples pasos de diferenciación osteoclástica, multinucleación, activación y supervivencia. La inhibición de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  ya sea sistémica o localmente ha mostrado inhibir la pérdida de hueso alveolar en modelos animales con periodontitis.

IL17 juega un importante papel en inducir la pérdida del hueso alveolar en la periodontitis y también en el reclutamiento de neutrófilos en los tejidos periodontales.

En ausencia de osteoblastos o células estromales y en presencia de linfocitos, TGF- $\beta$  promueve la osteoclastogénesis; así mismo los linfocitos T regulan la resorción ósea y la respuesta inmune adaptativa.

Las células dendríticas las cuales son responsables de la activación de células T también juegan un papel importante en la osteoinmunología ósea.

### 5.4.4. Vía RANK/RANKL

La integridad de tejido óseo depende de la manutención de un delicado equilibrio entre la resorción ósea por osteoclastos y formación ósea por osteoblastos. Los mayores mecanismos de regulación de la actividad osteoclástica es llevada por el receptor RANK (receptor activador del factor nuclear kB), su ligando RANKL y su contraparte soluble OPG (osteoprotegerina). La unión de RANKL al receptor RANK se presenta sobre la superficie de pre-osteoclastos, lo que lleva a su maduración y activación, mientras que OPG actúa como un receptor señuelo e inhibe la interacción RANK-RANKL. Por lo tanto, el balance entre RANKL y la expresión de OPG es esencial para la determinación de toda la actividad osteolítica.<sup>(27)</sup>



Fig 7: Vía RANK/RANKL/OPG. Ciclo de remodelación del hueso, los osteoblastos orquestan un proceso ordenado de remodelación ósea a través de la activación de señales de factores sistémicos incluyendo la hormona del crecimiento, interleucinas (IL-1, IL-6), hormona paratiroidea (PTH) etc. RANKL regula el reclutamiento y la diferenciación de los osteoclastos. (Osteoprotegerina también es sintetizada por osteoblastos y sirve como un receptor señuelo que bloquea la activación de RANK. La inhibición de estas señales de osteoblastos, osteoclastos resulta en la reducción de la resorción ósea. (endotext.org)

#### 5.4.4.1. Vía RANK/RANKL/OPG en la resorción ósea de la enfermedad periodontal

La vía RANK/RANKL/OPG juega un papel importante en la regulación del metabolismo óseo, y funciona en una red que es esencial para controlar el desarrollo y función de osteoclastos.

Varias citocinas permiten el incremento de la expresión de RANKL y esta es incrementada en tejidos periodontales inflamados, ya que IL-1 $\beta$  estimula la liberación de PGE2 de fibroblastos y osteoblastos, que a su vez estimula la resorción ósea a través del incremento de la expresión de RANKL.

IL-6, IL-11, factor inhibidor de leucemia LIF estimulan la formación de osteoblastos y la resorción ósea a través de la regulación positiva de RANKL, por lo tanto las citocinas en los tejidos periodontales determinan el equilibrio entre MMPs/ TIMPs y RANKL/OPG.

Linfocitos T y B activados en los tejidos gingivales de pacientes con periodontitis expresan RANKL, en efecto estas células son la fuente primaria de RANKL en lesiones de resorción del hueso alveolar. Estos descubrimientos remarcan la importancia de la unión entre la inmunidad innata y adaptativa en el daño de los tejidos periodontales.

Las células B regulan la resorción ósea y la producción de inmunoglobulinas produciendo CD20, las células B contribuyen a la pérdida del hueso alveolar por la expresión de RANKL.

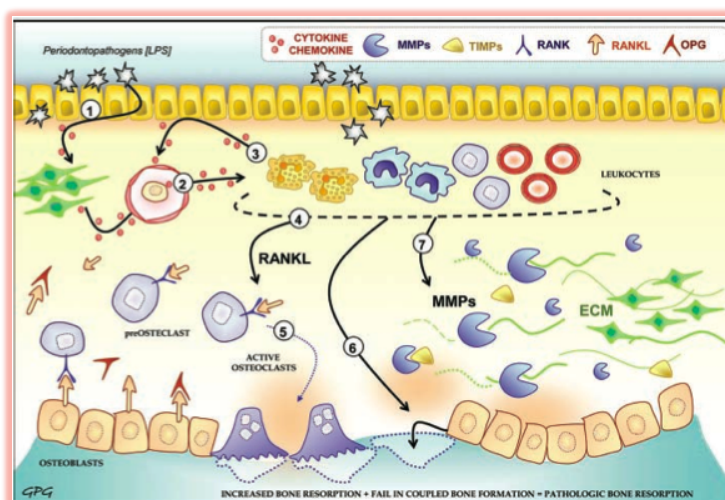
Las células B activadas y CD4 inducen la diferenciación osteoclástica en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y RANK, induciendo la formación de osteoclastos e incrementando la resorción ósea.

Linfocitos TH1 y TH7 juegan un papel importante en la inflamación que induce la resorción ósea, e IL-17 contribuye a incrementar la expresión de RANKL en osteoblastos.

Existe evidencia de que existe una sinergia entre las familias de citocinas de TNF y IFN, y soporta el concepto que las células T activadas contribuyen a mantener la homeostasis ósea a través de controlar el efecto de la actividad de RANKL además de sus actividades de resorción a través de la expresión de RANKL y secreción de citocinas.

Las células dendríticas pueden actuar como precursores de osteoclastos bajo condiciones inflamatorias en la presencia de M-CSF y RANKL como parte de la respuesta inmune innata y seguida de la estimulación de RANKL en la expresión de células T durante la respuesta adaptativa.

La señalización de RANK RANKL en células dendríticas también favorece su supervivencia, promueve las funciones presentadoras de antígenos y favorece las interacciones con las células T; por lo tanto las células residentes en el periodonto inducen la expresión de RANKL/OPG. (21)



**Fig 8: Vías celulares y moleculares que se vinculan con la respuesta inmune inflamatoria del huésped en la progresión de la enfermedad periodontal.** El reconocimiento de LPS por células residentes en el medio periodontal (1) lleva a los eventos inflamatorios iniciales, resultando en la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que actúan en un reclutamiento selectivo (2) de leucocitos al espacio periodontal. Una vez en el tejido, la activación de leucocitos lleva a la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, contribuyendo a la generación de un bucle de amplificación de migración de leucocitos (3). Además de las citocinas, subconjuntos de leucocitos también producen cantidades substanciales de RANKL (4), o induce su producción por células residentes, y el incremento de niveles de RANKL resultan en un desequilibrio en los niveles de OPG (5), resultando en el incremento de la resorción ósea característica de lesiones periodontales activas. Mediadores inflamatorios producidos por leucocitos también interfieren en la formación de hueso (6), las cuales sería de esperar para contrarrestar el incremento de la actividad osteoclastica. Finalmente, la reacción inflamatoria crónica local también resulta en un significativo desequilibrio en MMP/TIMP (7), que representa la destrucción de ECM (matriz extracelular) de tejidos periodontales suaves y mineralizados. (27)

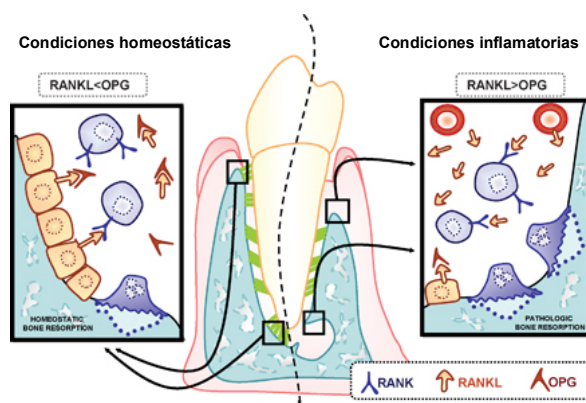


Fig 9: El equilibrio entre RANKL/OPG es un factor importante en la regulación de la resorción ósea en el ambiente periodontal y periapical. La diferenciación y activación de osteoclastos es llevada a cabo por la interacción de RANK con su ligando RANKL, Osteoprotegerina, OPG es un receptor señuelo de RANKL que inhibe la interacción RANK-RANKL. En condiciones homeostáticas (lado izquierdo), los niveles de RANKL y OPG se cree que están en equilibrio de modo que existe la osteoclastogénesis de manera limitada. Con un estímulo inflamatorio, la interacción RANKL/OPG incrementa en tejidos periodontales y periapicales y lleva a la estimulación de actividad osteoclástica y resorción ósea. (journaloforalmicrobiology.net)

## 5.5. Quimiocinas involucradas en la pérdida ósea periodontal

### 5.5.1. Quimiocinas

Las quimiocinas son una larga familia de citocinas quimiotácticas que estimulan el reclutamiento de células inflamatorias y son producidas por un gran número de diferentes tipos celulares en el periodonto, como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, osteoclastos, células epiteliales, leucocitos polimorfonucleares, monocitos, linfocitos y mastocitos.

Las quimiocinas son divididas en dos principales familias basadas en su estructura del ligando, son referidas como CC y quimiocinas CXC, mientras que sus receptores son referidos como receptor de quimiocinas CC (CCR) y (CXCR).

Algunas quimiocinas contribuyen a inducir inflamación y resorción ósea debido a que ellos pueden estimular uno o varios pasos de la resorción ósea, incluyendo el reclutamiento, diferenciación o fusión de células precursoras para formar osteoclastos y mejorar su supervivencia.

Las quimiocinas también pueden afectar la pérdida del hueso periodontal por su papel en el reclutamiento celular, como neutrófilos los cuales protegen contra invasión bacteriana; por lo tanto las quimiocinas son importantes en proteger al huésped de bacterias que inducen la pérdida ósea. (28)

## 5.6. Fibroblastos gingivales en la enfermedad periodontal

Los fibroblastos gingivales son las células más abundantes en los tejidos periodontales, con la capacidad para inducir una producción local de citocinas



con funciones inmunoregulatorias y catabólicas así como mediadores químicos, (20)siendo responsables de la síntesis y degradación del tejido conectivo. (32)

El papel de esta célula es producir proteínas estructurales de tejido conectivo como colágeno y elastina así como glicoproteínas y glicosaminoglicanos que comprenden la sustancia fundamental en el tejido conectivo periodontal.

Normalmente, los fibroblastos periodontales producen y modifican la matriz extracelular y juegan un papel en la manutención de la integridad del tejido y homeostasis. Los fibroblastos son capaces de fagocitar cuerpos extraños y producir la ingesta de colágeno reticulado y juegan un papel importante en el proceso de cicatrización de las heridas. (32)

### 5.6.1. Fibroblastos gingivales como células inmunocompetentes

Los fibroblastos gingivales secretan una gran variedad de citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ) y mediadores químicos cuando ellos están activados con estímulos fisiológicos y patológicos.

Los fibroblastos gingivales humanos estimulados con LPS de especies de *Prevotella* y *Porphyromonas* producen IL-1, IL-8 e IL-6. (20, 40)

Interesantemente se ha mostrado que las células del ligamento periodontal responden a las fuerzas de tensión mecánica por una elevada síntesis de IL-1 $\beta$ . Existe una interacción directa entre linfocitos y fibroblastos gingivales los cuales regulan positivamente la red de citocinas en tejidos gingivales inflamatorios donde se produce una expresión de RNAm de citocinas incluyendo IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en fibroblastos gingivales.

La expresión de RNAm de IL-1 $\beta$  en fibroblastos gingivales incrementa de manera sinérgica cuando los fibroblastos gingivales adhesivamente interactúan con linfocitos en presencia de IL-1 $\beta$  exógeno.

Por otra parte CD40 juega un papel importante en las interacciones tipo-afín con células T, que expresan el ligando CD40 en fibroblastos gingivales los cuales traducen las señales que inducen la producción de IL-6.

Estos datos sugieren que la interacción linfocitos-fibroblastos gingivales pueden facilitar la activación de la red de citocinas en tejidos gingivales inflamados. (20)

Los fibroblastos gingivales aislados de tejido enfermo produce grandes cantidades de IL-6, tanto constitutivamente y después de la inducción de LPS, que las de tejido sano.

Bajo condiciones de inflamación, los fibroblastos gingivales contribuyen la inactivación de la circulación de TNF- $\alpha$  a través de la inducción preferencial y del receptor de TNF.

En nivel genético el DNA de *P.gingivalis* y sus motivos CpG internos palindrómicos estimulan la expresión de IL-6 en fibroblastos gingivales por estimulación de la unión de NF $\kappa$ B, y su DNA bacteriano funciona como factor de virulencia del organismo en la enfermedad periodontal

El lípido A asociado a proteínas (LAPs) de *P.gingivalis* estimula la producción de IL-6 en fibroblastos gingivales. Por lo tanto todos estos acontecimientos producen una cascada de señalización involucrada en la inflamación crónica que acompaña la resorción ósea. (32)

## 5.7. Actividad biológica de Interleucina-1 (IL-1)

IL-1 es un polipéptido con un gran número de diversas actividades y papel en la inmunidad, inflamación, daño y homeostasis del tejido.(20)

IL-1 es el principal mediador de la inflamación y en general inicia y/o incrementa una amplia variedad de función no estructural asociada a genes que son característicamente expresados durante la inflamación, particularmente otras citocinas. Es uno de los principales mediadores de la respuesta del cuerpo a la invasión microbiana, inflamación, reacciones inmunológicas y lesión de tejido. (29)

Seguida de la activación esta es sintetizada por varios tipos celulares incluyendo macrófagos, monocitos, linfocitos, células vasculares, células neuronales, células de piel y fibroblastos.

Así mismo IL-1 es conocida por estimular la proliferación de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales y favorecer la síntesis de fibroblastos de procolágeno tipo1, colagenasas, hialuronato, fibronectina, y prostaglandina E2(20), sin embargo IL-1 no tiene efecto directo sobre los osteoclastos maduros por lo tanto los precursores de osteoclastos responden a las citocinas; de esta manera IL-1 promueve la formación de células osteoclásticas y regula la inducción de IL-6 en la formación de células osteoclásticas .

Un efecto consistente de IL-1 sobre el hueso es la estimulación de la producción de prostaglandina osteoblástica. También se ha observado que IL-1 induce la supresión de la expresión de fosfatasa alcalina mientras que otros reportan estimulación.

IL-1 inhibe la síntesis de osteocalcina osteoblástica, mientras que esta estimula la producción osteoblástica de osteopontina (41, 42, 43), y parece inhibir la expresión de osteocalcina a nivel post transcripcional.

La producción local de dichos factores como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  por células osteoblásticas, contribuye a la resorción ósea, a través de mecanismos de transducción de señales; además IL-1 sinergiza las acciones de resorción ósea de TNF-  $\alpha$ .(29)

La familia de citocinas de interleucina 1 (IL-1) tiene cuatro principales miembros IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , receptor agonista de IL-1 (IL-1ra) e IL-18; miembros de la familia de IL-1 pertenecen a lo que se conoce actualmente como superfamilia  $\beta$ - trébol debido a la presencia de 12 hojas  $\beta$  de su estructura de la proteína madura la cual se pliega o forma una estructura de trébol.; otros miembros de esta superfamilia incluyen factores de crecimiento de fibroblastos.

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1ra contienen el patrón de la familia de IL-1 o motivo, tomado de una región conservada de la sección C-terminal.(26)

### 5.7.1. Familia de interleucina 1

Se ha demostrado que IL-1 $\alpha$  permanece en gran medida asociada a las células, mientras que IL-1 $\beta$  es liberada de las células; las dos formas de interleucina se unen al receptor, la cual se encuentra en varios tipos de células.

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) estimulan la resorción ósea e inhiben la formación ósea, así mismo IL-1 $\beta$ , es significativamente mas potente que incluso IL-1 $\alpha$  o TNF-  $\alpha$  en efectos mediadores del hueso. (20)

Tanto experimentos in vivo como in vitro han mostrado que IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , tienen similares pero no idénticos múltiples efectos biológicos (44, 45, 46, 25) y ambas formas afectan íntimamente cada tipo celular y muestran un común receptor en las células diana.

El papel endógeno de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , es diferente donde IL-1 $\beta$ , pero no IL-1 $\alpha$  es un potente activador de la respuesta inmune.(47,25) IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , son producidos por diferentes tipos celulares incluyendo neutrófilos, células NK, linfocitos B y T y células del sistema nervioso central pero son hechos principalmente por monocitos de la sangre y macrófagos tisulares.(48, 49, 25)

Los monocitos/macrófagos son una importante fuente debido a sus localizaciones estratégicas, su habilidad de sintetizar grandes cantidades de IL-1 y procesar el precursor de IL-1 más efectivamente que otras células.

IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  difieren substancialmente en relación a localización, maduración y secreción, ambas formas son traducidas a RNAm en las formas inmaduras, proIL-1 $\alpha$  y proIL-1 $\beta$ , la cual debido a la falta de una secuencia líder peptídica hidrofóbica permanecen en el citosol y no se acumula en cualquier organelo, por lo tanto ambas formas pueden someterse a las escisión por enzimas, para producir formas maduras, las cuales aumentan la actividad de estos péptidos.

Pro-IL-1 $\alpha$  pero no pro-IL-1 $\beta$  puede ser escindida por proteasas de membrana dependientes de calcio llamadas calpainas para dar un péptido maduro de 17 kDA.

Pro-IL-1 $\beta$  se mantiene primariamente citosólico y no es completamente activo hasta su escisión proteolítica y transportación fuera de la célula. Una cisteína proteasa, enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE), también conocida como caspasa-1, ha sido identificada como la enzima específica responsable por su escisión de pro - IL-1 $\beta$ ; las caspasas son principalmente involucradas en la apoptosis y la sobreexpresión de ICE, por si mismas pueden permitir el incremento de la apoptosis en células transfectadas con este gen.

La capacidad de ICE y pro- IL-1 $\beta$  coexiste sin maduración de IL-1 $\beta$  sugiriendo que la actividad ICE debe ser regulada; para generar IL-1 $\beta$  maduro, ICE específicamente escinde el aspartato (posición de aminoácido 116) y alanina (aminoácido posición 117);(50,25) así mismo la escisión de pro-IL-1 $\beta$  es un paso obligatorio de la liberación de IL-1 $\beta$ .

En el proceso involucrado en la secreción de la forma madura de IL-1 $\beta$ , pro-

ICE esta presente en el citoplasma y es activado, ensamblado e insertado dentro de la membrana celular donde lo haría escindir pro- IL-1 $\beta$  y liberar la forma madura en el medio extracelular. (51, 25)

IL-1 $\beta$ maduro es liberado por una vía de secreción, en parte, dentro de vesículas intracelulares que protegen de la digestión de proteasas y secreción activa de IL-1 $\beta$  requerida en su translocación a través de la membrana.

La liberación de IL-1 $\beta$  es regulada por adenosina 5'-trifosfato (ATP) y requiere un paso cebado por LPS la cual es independiente de la escisión de la caspasa1; además, los mecanismos alternativos están presentes para el procesamiento de pro-IL1 $\beta$ . (52)

Existen varios sitios en pro-IL1 $\beta$  los cuales han sido mostrados ser vulnerables a la escisión por enzimas en la vecindad de alanina 117. El DNAC de IL-1rs codifica 117 aminoácidos las cuales contienen 25 aminoácidos péptido señal y permite la proteína ser secretada en el ambiente extracelular, llamada IL-1ra secretoria (sIL-1ra); una segunda forma de icIL-1ra también es generada por splicing alternativo de RNAm y ha sido denominado icIL-1ra tipo II. (53, 54, 25)

Estas isoformas intracelulares pueden representar un depósito de IL-1ra, liberado después de la muerte celular, cuya función es limitar la acción proinflamatoria de los restos celulares.(25)

Enzimas proteolíticas incluyen quimasa, elastasa, catepsina G, colagenasa y matriz metaloproteinasa las cuales escinden pro- IL-1 $\beta$  en una forma similar en tamaño y actividad específica como ICE procesado de IL-1 $\beta$ ; estas proteasas son liberadas en sitios inflamatorios y daño tisular por una variedad de células inmunes. (55, 56, 25)

IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  maduros se unen al receptor de IL-1 (IL-1RI) en dos sitios, contactando los primeros dos dominios del receptor (sitio A) o el tercer dominio (sitio B) (57, 25)

El IL-1ra es un antagonista específico de IL-1, en que este une el receptor de IL-1 sin transmitir cualquier señal dentro de la célula.(58, 25) IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1ra tienen solo un sitio de unión para el receptor de IL-1.(59, 25)

### 5.7.2. Expresión y regulación de IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  es producida en respuesta a varios estímulos los cuales incluyen LPS bacteriano, numerosos productos microbianos, citocinas (TNF, IFN- $\gamma$ -, GM-CSF e IL-2), interacciones de células T/ células presentadoras de antígenos y complejos inmunes. (60, 25)

NF-kB es conocido por tener una actividad crucial dentro del promotor inmediato río arriba de IL-1  $\beta$  de mamíferos y de los enhancer río arriba.

Se sabe que IL-1  $\beta$  es un fuerte inductor de NF-kB y se cree que autorregula positivamente su propia síntesis, así mismo el sitio del factor de transcripción NF-kB es requerido para la expresión del gen de IL-1  $\beta$ . (25)

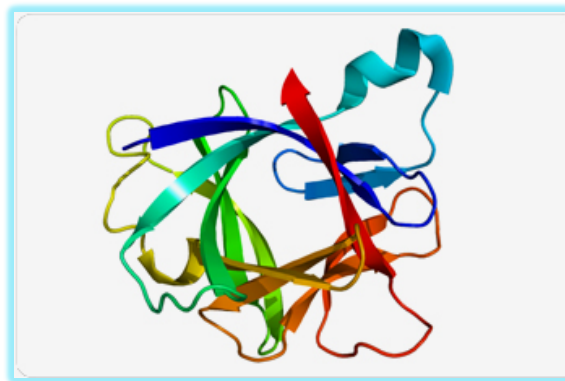


Fig 10: IL-1β. Imagen tridimensional de IL-1β compuesta por α-hélice y β-plegadas (hellotrade.com)

### 5.7.3. IL-1, principalmente IL-1β en la enfermedad periodontal

La producción local excesiva de IL-1 por células que componen el periodonto parece ser capaz de estimular fibroblastos del ligamento periodontal y gingival, de un modo paracrino o autocrino, para inducir la producción de otras citocinas, enzimas que degradan la matriz, y la producción de prostaglandina E2. Estos reguladores pueden ser responsables para producir la destrucción de tejido conectivo, permitiendo la pérdida de unión.

Así IL-1 juega un papel en la patogénesis de varias enfermedades óseas, incluyendo la periodontitis; la participación de IL-1 en el proceso patológico de la periodontitis es inducir la producción de metaloproteinasas de la matriz (MMPs), (20) por lo tanto interleucina 1β (IL-1β) es conocida como uno de los más potentes inductores de MMP-1 y MMP-3 en fibroblastos.(26)

IL-1 da lugar a elevados niveles de procólagenasa tanto en fibroblastos gingivales como en células del ligamento periodontal, además, IL-1 estimula el activador plasminógeno en fibroblastos gingivales, resultando en la generación de plasmina la cual es un putativo, de origen natural, activador de varias metaloproteinasas de la matriz.

Se ha reportado una correlación positiva entre niveles de IL-1β en tejidos gingivales con reciente pérdida de unión.(20)

Existe una fuerte evidencia de que IL-1 regula la pérdida ósea estimulada por patógenos periodontales.

La expresión de IL-1β es elevada en fluido crevicular en sitios de reciente pérdida de inserción en la enfermedad periodontal, (23) de esta manera IL-1 promueve la destrucción del periodonto.(28)

IL-1 también ha sido correlacionada positivamente con un incremento en la profundidad del sondeo debido a la pérdida de unión.(29)

IL-1β estimula la resorción ósea, así como favorece la producción de prostaglandina E2 induciendo la expresión de ciclooxigenasa 2 a través de las vías de señalización tirosin cinasas en varios tipos de células incluyendo fibroblastos gingivales humanos. (26)

## 5.8. Ciclooxygenasa-2 (COX2)

Las Ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2) son proteínas residentes en el retículo endoplásmico que catalizan el paso comprometido en la síntesis de prostanoïdes. COX 1 es constitutivamente expresado en varias células de mamífero en condiciones de reposo apoyando la biosíntesis de prostaglandina requerida para el mantenimiento de homeostasis de órganos y tejidos, mientras COX 2 es expresado usualmente de forma inducible y transitoria, inducido después de la estimulación con moléculas proinflamatorias incluyendo interleucina-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , citocinas, lipopolisacárido, factores de crecimiento y es regulada positivamente durante la inflamación. (17, 15)

Todas las señales convergen en la activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) que regulan niveles de ciclooxygenasa-2 en RNAm tanto transcripcionales y post-transcripcionales.

La región promotora del gen humano de COX-2 contiene varios elementos regulatorios transcripcionales, siendo su expresión de RNAm regulada por varios factores de transcripción incluyendo: Proteína que se enlaza al elemento de respuesta al AMPc (CREB), factor nuclear kappa B (NFkB), NF-IL6 y la proteína potenciadora de unión a CCAAT (C/EBP).

Ciclooxygenasa-2 es también afectada postranscripcionalmente, a nivel de estabilidad de RNAm y puede ser afectada directamente en su actividad enzimática por óxido nítrico y óxido nítrico sintasa (iNOS) (18)

La expresión anormal de COX-2 ha sido implicada en la patogénesis de la inflamación crónica y varios tipos de cáncer, por lo tanto esta sujeta a una regulación estricta y compleja. Diferencias en la regulación enzimática de COX a nivel postranscripcional y postraduccionaI contribuyen significativamente en sus distintos patrones de expresión.

Los prostanoïdes son sintetizados debido a la expresión anormal de COX-2, y han sido implicados en varias patologías como inflamación crónica, fiebre, angiogénesis y tumorigénesis. (61, 62, 15)

Un paso clave en la síntesis de prostanoïdes es su catalización por las isozimas COX-1 y COX-2, las cuales son contenidas en la unión a la membrana del retículo endoplásmico que poseen dos actividades catalíticas secuenciales. (63, 64, 15)

En general, los prostanoïdes son generados como resultado de la actividad de COX-1 que juega un papel como gen housekeeping, mientras aquellos generados por COX-2 son importantes fisiológicamente para el control de la función normal de la respuesta inmune innata y la biología femenina reproductiva. (15)

COX-1 y COX-2 tienen actividad sobre el ácido araquidónico libre (AA) que ha sido liberado de la posición sn-2 de la membrana de glicerofosfolípidos por la acción de fosfolipasa A2, esto permite la formación de prostaglandina

hidroperóxido G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), la cual es reducida al sitio activo de peroxidasa de enzimas de COX para formar prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).

La prostanoide sintasa cataliza la isomerización o reducción de PGH<sub>2</sub> de varios prostanoïdes bioactivos.

COX1 y COX2 son homodímeros estructurales y funcionales, así mismo son proteínas integrales de membrana que son monotípicamente insertadas en la cara luminal de la membrana retículo endoplásmico de manera que la abertura del sitio activo de la ciclooxigenasa en la bicapa lipídica es para permitir la asimilación de los movilizados libres de AA. (65, 66, 15)

A pesar de su similitud funcional y estructural, las enzimas de COX son codificadas por diferentes genes que son diferencialmente regulados y permiten distintos patrones de expresión y distintas funciones biológicas.

En algunos tipos celulares, la estimulación mecánica como la estimulación inflamatoria como el LPS o TNF, resulta en una inducción coordinada de la expresión de COX2 y un dramático incremento en los niveles de PGE<sub>2</sub> (67, 68, 15)

COX2 es constitutivamente expresado en células de cáncer humanas debido a la activación transcripcional intrínseca. (69,70,16) La sobreexpresión de COX2 en células cancerígenas promueve el crecimiento de cáncer y metástasis, así mismo COX2 ejerce cambios celulares a través de sus metabolitos como prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tromboxanos A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y malondialdeído.

Por otra parte produce cambios celulares por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) la cual puede causar daño oxidativo en el DNA, por lo tanto COX2 puede causar la formación de aductos de DNA induciendo mutación y cambios celulares. (16)

La secuencia homóloga de aminoácidos entre ciclooxigenasa 1 y 2 es aproximadamente 60% para las enzimas humanas.; mientras que la región promotora de COX1 carece de una caja TATA o CAAT, la región promotora de COX2 tiene el potencial de los elementos reguladores de la transcripción incluyendo la caja TATA, el factor nuclear de IL-6, dos sitios de AP-2, tres sitios Sp1, dos sitios de factor nuclear-kB, un AMP cíclico que responde a los elementos de motivos, y un E-box. (71,17)

Altos niveles de COX1 son expresados en plaquetas, estómago e hígado y esta involucrado en la agregación plaquetaria, homeostasis gastrointestinal y perfusión renal.

Por otro lado la expresión de COX2 esta asociada con la biosíntesis de grandes cantidades de prostanoïdes observadas durante condiciones patológicas como inflamación y progresión de cáncer. De igual manera ciclooxigenasa 2 se encuentra en algunos tejidos como el endotelio vascular, hígado, o cerebro bajo condiciones normales, sugiriendo el papel de ciclooxigenasa 2 en la regulación de procesos fisiológicos. (72,73,17)

Recientemente se ha sugerido que existe otra ciclooxigenasa formada como una variante de splicing de ciclooxigenasa-1 llamada ciclooxigenasa 3. (17)

La 5'UTR de COX2 esta repleta de elementos regulatorios de acción en cis, la cual sugiere una regulación compleja y estricta del gen por numerosas vías de señalización.

Dependiendo del tipo celular y del estímulo, distintas combinaciones de los elementos de regulación en cis son utilizados para activar la transcripción de COX2; de estos elementos en cis, aquellos que han sido encontrados para jugar un papel regulatorio en la transcripción de COX-2 incluyen E-Box, cAMP, elementos de respuesta (CREB), NFkB, AP-1, CAAT, proteína de unión potenciadora (C/EBP), SP1, elemento de respuesta a suero(SRE), y elemento de respuesta proliferador de peroxisomas (PPRE). (74, 75, 15)

La rápida degradación de COX-2 en mRNA ha sido atribuida a elementos ricos de AU (ARES) en 3' UTR. (15)

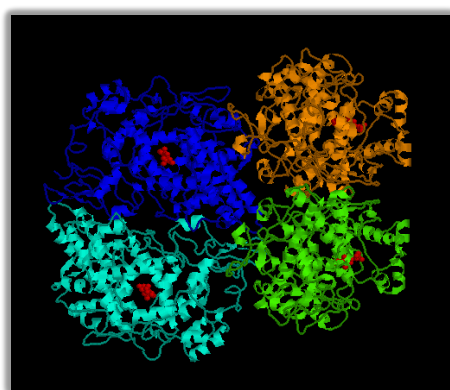


Fig 11: Ciclooxigenasa 2 (COX-2): Imagen tridimensional de COX-2 (personal.kent.edu)

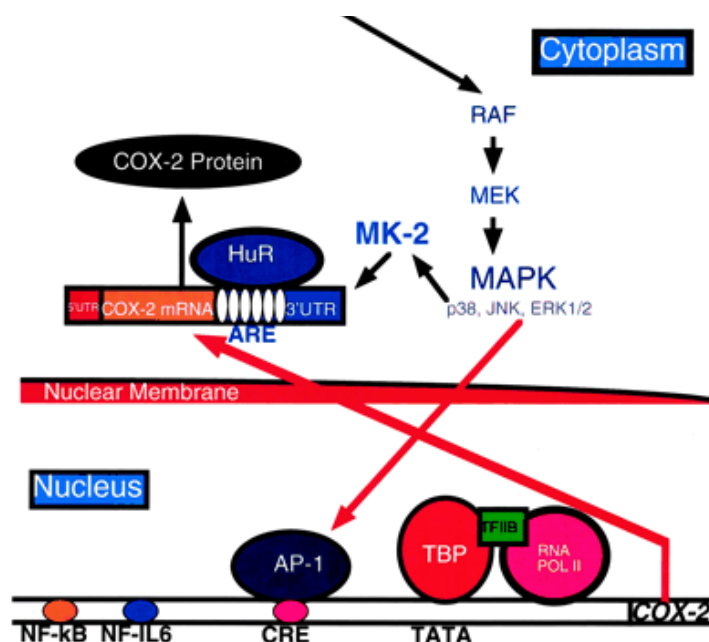


Fig 12: Inducción de la expresión de COX2 por mecanismos transcripcionales y posttranscripcionales. Activación de las MAPKs la cual resulta a su vez en la inducción de AP-1 que regula la inducción de la transcripción de COX-2. PKC → p38 MAPK → MAPKAP-2 (MK-2) responsable del incremento de la estabilidad del mensajero de COX-2. La región 3' (UTR) de RNAm de COX-2 contiene una serie de secuencias (AUUUA) conocidas como elementos ricos de AU (ARE) que confiere inestabilidad del mensajero. Aumentando la unión de HuR, una proteína de unión de RNA al ARE de COX-2 3'-UTR es responsable, al menos en parte del incremento del mensajero de COX-2. (hwmainit.ibc.org)



### 5.8.1. Regulación postranscrpcional de COX-2

La expresión de RNAm de COX2 tiene una vida media muy corta debido a la presencia de múltiples copias de motivos de AUUUA dentro del 3'-UTR de RNAm de COX-2 que son conocidas por directamente descomponer el RNAm.<sup>(76, 77, 15)</sup>, la eliminación de estos motivos de desintegración que actúan en cis de 3'-UTR de COX-2 estabiliza el transcrito.<sup>(74,15)</sup> Proteínas de unión ARE (donde ARE se encuentra en la terminación 3' y es responsable de la estabilidad de RNAm COX-2) son responsables de iniciar la desintegración de RNAm de COX-2.

La activación de p38 de la vía de las MAPK por estimulación proinflamatoria ha sido implicado en la estabilización de COX-2 en RNAm.<sup>(78, 79,15)</sup>, esta estabilización del transcrito de COX-2 por p38 es inhibido por el glucocorticoide dexametasona y se cree que requiere una región de 123 nucleótidos dentro del 3'-UTR e inmediatamente río abajo del codón de terminación, el cual tiene seis copias de ARE.<sup>(79, 15)</sup>

Varias proteínas de unión a ARE como CUGBP2 y HuR han mostrado unir COX-2 3'-UTR y estabilizar el transcrito.

La regulación de HuR en la estabilización de la transcripción de COX-2 también ha sido reportada en células de cáncer de colon, donde HUR se une a ARE incrementando su vida media. <sup>(80, 15,18)</sup>

Niveles proteicos de COX-2 son también regulados a nivel postranscripcional vía regulación de la estabilidad de su RNAm.

Señales de citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o ligandos TLR afectan la estabilidad de RNAm de COX-2, la principal molécula de señalización que parece regular este proceso parece ser p38MAPK. La hipoxia representa otro regulador del RNAm de COX-2, este incrementa su estabilidad mas probablemente a través de la inducción de TNF-  $\alpha$ . <sup>(18)</sup>

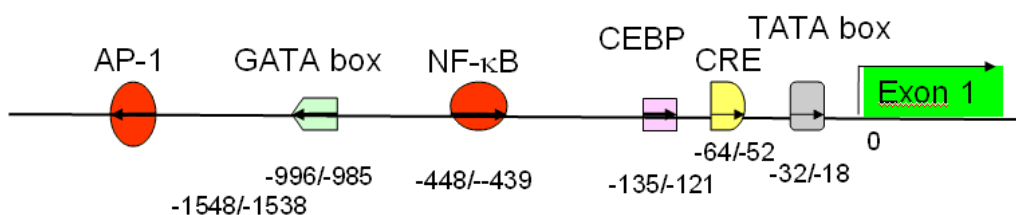


Fig 13: Promotor de COX-2. Factores de transcripción en el sitio promotor de COX-2.(scielo.isciii.es)

### 5.8.2. Determinante estructural de la degradación proteosomal de COX-2

COX2 es mucho mas susceptible a la degradación que COX 1, <sup>(81,15)</sup>COX2 puede ser selectivamente regulado por la vía proteosoma-ubiquitina, la cual ha

sido implicada en la proteólisis de proteínas intracelulares con vidas medias cortas.

COX2 es una proteína integral de membrana que reside en el RE, su degradación por el proteosoma 26s está involucrada en la eliminación de la enzima del lumen de RE y la transportación a través de la membrana del retículo endoplásmico al citosol.

La maduración de COX2 en el lumen de RE implica la escisión de la secuencia señal N-terminal, N-glicosilación en múltiples sitios, formación de enlaces disulfuro, inserción de membrana y dimerización.<sup>(82,15)</sup>

La estructura primaria de COX2 tiene 19 aminoácidos insertados cerca de su extremo C-terminal (Asn-594-Lys-612), esta inserción C-terminal imparte a COX-2 un sitio consenso de N-glicosilación en Asn-594. COX-2 es glicosilado en sus primeros tres sitios de glicosilación y variablemente glicosilados en Asn-594.<sup>(83,15)</sup>

COX 2 muestra que los 19 aa del segmento C-terminal son requeridos para su degradación proteosómica.

El punto de mutación del sitio de glicosilación Asn-594 al principio de la inserción también estabiliza COX2, sin embargo el sitio de glicosilación Asn-594 no es por sí misma suficiente para permitir la degradación proteica de COX2. <sup>(15)</sup>

### 5.8.3. Retículo endoplásmico asociado con la degradación de COX2

La inserción C-terminal N-glicosilada de 19 aa de COX2 es crítica para la iniciación de la entrada de proteína dentro de la vía de ERAD (RE asociado a degradación).<sup>(22, 42, 54)</sup>

ERAD actúa como vía de control de calidad para el espacio de proteínas mal plegadas o estructuralmente dañadas de RE; <sup>(84,15)</sup> pocas proteínas integrales de membrana asociadas a RE que no sean de COX2 han sido identificadas como sustratos de ERAD, estas proteínas incluyen hidroximetilglutaril-CoA reductasa, citocromo hepático microsomal P450 CYP3A4, y receptor de inositol 1, 4,5-trifosfato.<sup>(85,15)</sup>

COX 2 es el único sustrato ERAD debido a que este se degrada del estado nativo, sus características topológicas de ser una proteína integral total de membrana luminal requerida para que la proteína sea transportada afuera de el RE.

El punto de mutación del sitio de glicosilación Asn-594 permite la actividad específica de COX2, <sup>(83)</sup> esto implica que mientras el sitio de glicosilación de Asn-594 no es requerido por el plegamiento proteico apropiado cotransduccional esta es esencial para la degradación de la enzima, de esta manera Asn-594 glicosilada en COX-2 es rápidamente degradada por ERAD. Mutaciones en la inserción de 19 aa previenen N-glicosilación en Asn-594 y estabiliza COX-2.

La interrupción de la conformación helicoidal de Helix A mejora la facilidad

por la cual COX-2 esta glicosilada en Asn-594 concomitante con el aumento de la extensión total de la degradación de proteínas de COX-2, (86) por lo tanto la glicosilación postraducciona de COX-2 puede entonces desencadenar la entrada de la proteína en el sistema ERAD.

En el nivel transcripcional, la expresión de COX2 es íntimamente regulada por 3' UTR actuando en cis AREs y actuando en trans en miRNAs que bloquea la traducción proteica y/o inicia una rápida degradación de RNAm. A nivel proteico, se ha identificado el elemento inestable C-terminal que es crítica para la degradación proteosomal de COX2 vía el sistema ERAD. Un segundo mecanismo diferente para la degradación de COX-2 es precedida por el sustrato de COX2 el cual induce inactivación suicida de la enzima.

La degradación dependiente de sustrato podría complementar la degradación basal proteosomal de COX2 en tejidos de mamíferos que coexpresan significativamente la actividad de fosfolipasa A2 (PLA2).

Por lo tanto, COX 2 es una de las pocas proteínas de mamíferos que son conocidas por someterse a una degradación proteosomal del RE. (15)

## 5.9. Síntesis de prostanoides

Los Prostanoides son moléculas lipídicas bioactivas ubiquitinas derivadas de 20 carbonos de ácidos grasos insaturado del ácido araquidónico que son sintetizados en casi todos los tejidos de mamíferos. La síntesis de prostanoides se lleva a cabo en tres pasos:

(1) La movilización de sustrato de ácidos grasos, típicamente ácido araquidónico de fosfolípidos de la membrana a partir de ella, a través de la acción de fosfolipasa A2, (2) la formación de prostaglandina H<sub>2</sub> de ácido araquidónico por ciclooxigenasa, y (3) la conversión de prostaglandina H<sub>2</sub> a prostanoides específicos por la acción de varias prostaglandinas sintasas, generando cinco prostanoides primarios bioactivos incluyendo prostaglandina D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2a</sub>, I<sub>2</sub> (prostaciclina), y tromboxano A<sub>2</sub>.

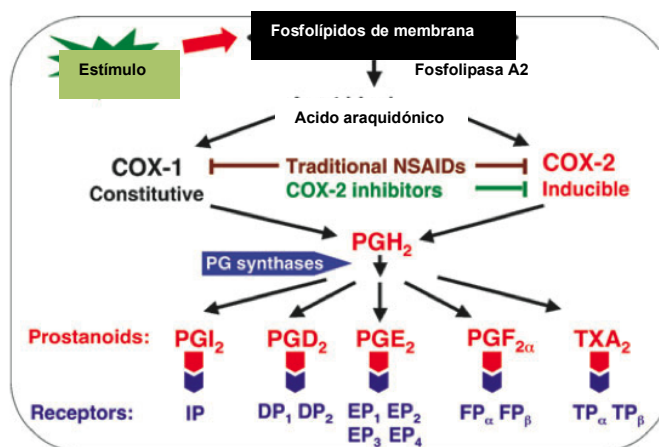


Fig 14: Vía de la síntesis de prostanoides. Ciclooxigenasa-1 (COX-1); ciclooxigenasa-2 (COX-2); PG, prostaglandina; PGH<sub>2</sub>, prostaglandina H<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub>, prostaglandina I<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>, prostaglandina D<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>; PGF<sub>2α</sub>, prostaglandina F<sub>2α</sub>; TXA<sub>2</sub>, tromboxanos A<sub>2</sub>.(17)

Estos prostanooides son hormonas que actúan localmente con acciones paracrina y autocrinas dentro de tejidos y células a través de receptores específicos de prostanooides acoplados a proteína G, una familia de rodopsina similares a siete receptores transmembranales para inducir respuestas fisiológicas y patológicas. Ellos son designados EP por receptores de prostaglandina E2 y FP, DP, IP, y TP por prostaglandina F2a, prostaglandina D2, prostaglandina I2 y receptores de tromboxanos A2 respectivamente. (87, 17)

Los prostanooides regulan importantes funciones homeostáticas como la activación de la inmunidad innata en respuesta a infecciones microbianas, mantenimiento de la función cardiovascular normal y la regulación de la biología reproductiva femenina. (88,15)

Los prostanooides incluyendo prostaglandinas y tromboxanos, tienen una gran variedad de funciones en condiciones fisiológicas y patológicas incluyendo inflamación, función inmunológica, ovulación, implantación, enfermedad cardiovascular y tumorigénesis. (89)

Así mismo contribuyen a inducir los signos y síntomas de la inflamación crónica y aguda incluyendo dolor, fiebre, tumefacción y vasodilatación; ya que en respuesta a varios estímulos, la liberación del ácido araquidónico de fosfolípidos de la membrana es metabolizado a prostaglandinas y tromboxanos por ciclooxigenasa. (17)

## 5.10. Prostaglandinas

Son pequeñas moléculas lipídicas que regulan numerosos procesos en el cuerpo, incluyendo función en riñones, agregación plaquetaria, liberación de neurotransmisores y regulación de la función inmune e inflamación. (24)

### 5.10.1. Señalización de PGE2

PGE2 fue el primero en mostrar estimular la producción de AMPc y resorción en cultivos de órganos óseos, los efectos de PGE2 en el hueso han sido asociados con la producción de AMPc y la activación de la proteínas cinasa A (PKA), indicando un importante papel de los receptores de PGE2, EP2R y EP4R, los cuales están acoplados a Gas. (23)

### 5.10.2. Receptores de Prostaglandina E2

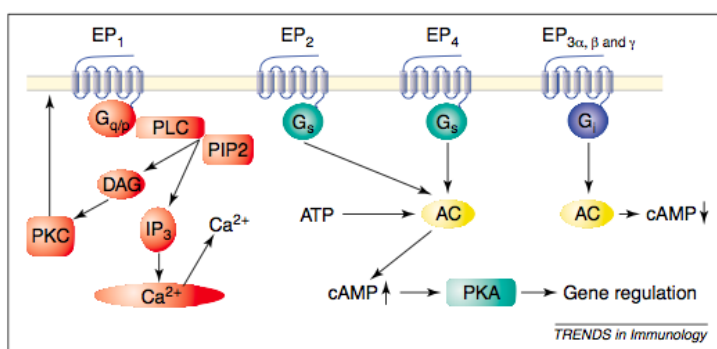
Los prostanooides ejercen sus acciones biológicas a través de receptores específicos de prostanooides en células diana sugiriendo posibles mecanismos de sus efectos.

Prostaglandina E2 es un producto principal de la ciclooxigenasa el cual inicia el metabolismo del ácido araquidónico y puede inducir diferentes mecanismos incluyendo fiebre, dolor, vasodilatación, resorción ósea y formación sobre células y tejidos. (89,17)

Los efectos diversos de prostaglandina E2 son debido a la existencia de múltiples receptores de prostaglandina E2 (receptores EP) sobre la membrana plasmática.

Existen cuatro subtipos de receptores EP, cada uno codificado por distintos genes. Estos receptores son designados EP1, EP2, EP3 y EP4 y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. (17)

Los receptores son receptores tipo rodopsina que contienen siete dominios hidrofóbicos transmembranales, acoplados a través de sus secuencias a proteínas G específicas con diferentes vías de señalización de segundos mensajeros. (24)



**Fig 15: Receptores de prostaglandina E2 (EP-R).** Diferentes receptores de prostaglandina E2 participan en diferentes vías de señalización, los cuales son receptores tipo rodopsina con 7 dominios transmembranales.(24)

## 5.11. COX2 y PGE2 en la enfermedad periodontal

Organismos microbianos en la placa dentobacteriana son considerados como patógenos primarios de la enfermedad periodontal; sin embargo la respuesta del huésped a los patógenos, los cuales inducen la producción de moléculas inflamatorias incluyendo citocinas y prostanoides, esta involucrado en la iniciación y progresión de la enfermedad periodontal.(89,17)

Los prostanoides, en particular prostaglandina E2, están involucrados en la patogénesis de la enfermedad periodontal. En fibroblastos gingivales humanos (HGF), el aumento de síntesis y liberación de PGE2 es una característica prominente de reacciones inflamatorias, debido a que elevados niveles de PGE2 son detectados en la encía y en el fluido crevicular gingival de pacientes con enfermedad periodontal, en comparación con sujetos periodontalmente sanos, y además las concentraciones de prostaglandina E2 en fluido crevicular gingival son efectivos para predecir la progresión de la periodontitis en sitios que presentan pérdida de inserción periodontal reciente y pérdida de unión, con un alto grado de sensibilidad y especificidad. (17, 19)

Goodson et al. (90) reporta un incremento de diez veces en los niveles de prostaglandina E2 en pacientes con periodontitis y tejido gingival inflamado, comparado con tejido gingival sano.

La expresión de ciclooxigenasa 2 se encuentra aumentada en tejidos gingivales inflamados, ya que la ciclooxigenasa es responsable de producción de prostaglandina E2 en las células estimuladas con moléculas proinflamatorias, esta juega un papel crucial para la producción de prostaglandina E2 en la enfermedad periodontal.

### 5.11.1. Ciclooxigenasa 2 en la producción de prostaglandina E2 en la enfermedad periodontal

Ciclooxigenasa 1 y 2 son expresadas en fibroblastos, células epiteliales gingivales, células endoteliales, y células mononucleares inflamatorias.

Tanto en encía sana y enferma existe expresión de ciclooxigenasa 1 y 2 en tejido conectivo subepitelial incluyendo fibroblastos, células endoteliales, y algunas células epiteliales gingivales.

En encía inflamada, las células inflamatorias también son inmunopositivas para ciclooxigenasa 1; sin embargo ciclooxigenasa 2 es detectada en fibroblastos, células gingivales epiteliales, células endoteliales y células inflamatorias en encía inflamada, mientras que en encía clínicamente sana, se han detectado bajos niveles solo en células epiteliales gingivales y fibroblastos. La expresión de ciclooxigenasa-2 es inducida en cementoblastos después de la aplicación de lipopolisacárido a tejidos periodontales.<sup>(90)</sup>

Monocitos/macrófagos producen prostaglandina E2 en respuesta a lipopolisacárido derivados de bacterias periodontopatógenas incluyendo *Porphyromonas gingivalis*.

La producción de prostaglandina E2 se produce ante la estimulación de lipopolisacárido en monocitos de sangre periférica de pacientes con periodontitis agresiva localizada, comparada con sujetos sanos.<sup>(17)</sup>

NFκB es un activador de genes inflamatorios, y parece jugar un papel primario en la regulación de la expresión génica de COX-2.

La citocina proinflamatoria IL-1β induce la liberación de prostaglandina E2 (PGE2),<sup>(19)</sup> vía ciclooxigenasa-2 a través de las vías de señalización tirosin cinasas en fibroblastos gingivales humanos y en células del ligamento periodontal humano.<sup>(91,17)</sup>

El factor de necrosis tumoral-α es un estimulador menos potente para la producción de prostaglandina E2 comparada con interleucina-1β en células del ligamento periodontal, pero TNF-α e IL-1β actuando de manera sinérgica inducen a la producción de prostaglandina E2.<sup>(92,17)</sup>

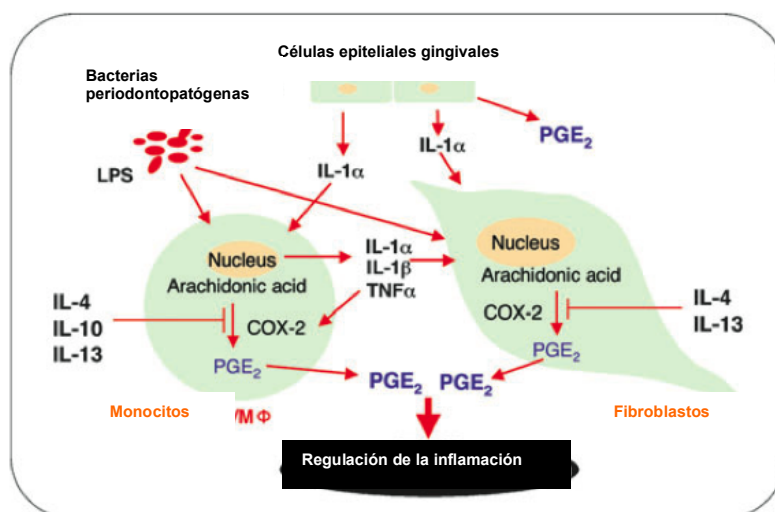
Los fibroblastos gingivales humanos estimulados con lipopolisacáridos de bacterias periodontopatógenas producen prostaglandina E2 a través de la expresión de ciclooxigenasa-2, la cual es regulada por tirosin cinasas. <sup>(93)</sup>

El estrés mecánico también induce COX-2, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induce la expresión de ciclooxigenasa-2 para producir prostaglandina E2 en células epiteliales gingivales.

Citocinas antiinflamatorias como interleucina-4, interleucina-10 e interleucina-13 pueden inhibir la producción de citocinas proinflamatorias como interleucina-1, interleucina-6, interleucina-8 y TNF- $\alpha$  por monocitos y suprimen la resorción ósea. (94,17)

En fibroblastos gingivales humanos y células de ligamento periodontal, interleucina-4 e Interferón- $\gamma$  (96) los cuales son detectados en tejidos periodontales inflamados, disminuye interleucina-11a cual induce la producción de prostaglandina a través de la expresión de ciclooxigenasa 2 sin efecto alguno en la expresión de ciclooxigenasa-1. (95)

Es pausable que en lesiones periodontales hay sistemas inhibitorios que regulan la producción de prostaglandina, como se muestra en la siguiente figura hay sistemas estimulatorios e inhibitorios que regulan la producción de prostaglandina por interacción célula-célula en lesiones periodontales.(17)



**Fig 16: Mecanismo regulador de la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y producción de prostaglandina E2 (PGE2) a través de la interacción célula-célula en lesiones periodontales.** Como un mecanismo estimulatorio de la producción de PGE2 en lesiones periodontales, periodontopatógenos directamente activan monocitos/macrófagos y fibroblastos a inducir la expresión de COX-2, resultando en la producción de PGE2 o puede estimular monocitos/macrófagos y células epiteliales gingivales para producir citocinas proinflamatorias incluyendo interleucina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la cual induce la expresión proteica de COX-2 en monocitos/macrófagos y fibroblastos para producir PGE2.

Las citocinas antiinflamatorias incluyen interleucina-4 (IL-4), IL-10, e IL-13 pueden estar involucrados en la inhibición de la sobreproducción de PGE2 por la regulación negativa en la expresión de COX-2. (17)

### 5.11.2. Efecto de COX-2 y prostaglandina E2 sobre el metabolismo óseo y regeneración del tejido periodontal

COX 2 es normalmente expresado en hueso, mientras la expresión de COX2 es regulada positivamente durante la reparación ósea y bajo condiciones patológicas como inflamación y neoplasia.

El efecto de prostaglandina E2 sobre el metabolismo óseo es complejo y algunas veces contradictorio; generalmente prostaglandina E2 es un potente estimulador de la resorción ósea pero, juega ya sea un papel estimulatorio o inhibitorio en el metabolismo óseo dependiendo de las circunstancias

fisiológicas o patológicas.

Los efectos anabólicos ocurren principalmente en respuesta a fuerzas mecánicas y en la curación de fracturas de huesos, mientras PGE2 regula la resorción y contribuye significativamente a la pérdida ósea relacionada con enfermedades inflamatorias en respuesta a prolongada inmovilización.

Los efectos anabólicos de PGs sobre el hueso han sido demostrados por administración sistemática de PGE2, el cual estimula la formación ósea e incrementa la masa ósea. Bajo condiciones fisiológicas particularmente en respuestas mecánicas, PGs producen la activación de COX2 que puede estimular la formación ósea por un incremento en la multiplicación y diferenciación de osteoblastos, u efecto relacionado a la producción de factores de crecimiento.

La expresión de COX2 y síntesis de PGs en asociación con hormonas, citocinas y factores de crecimiento juegan un importante papel en el proceso complejo y dinámico del recambio óseo.

La elevada secreción de citocinas inflamatorias y PGE2 esta relacionada a la pérdida ósea que toma lugar en algunas enfermedades inflamatorias como artritis y periodontitis.

Así mismo PGE2 se une a EP4 para estimular la osteoclastogénesis o activar a osteoclastogénesis por un incremento de factores transcripcionales específicos requeridos para la formación o resorción ósea. (22)

El mayor efecto de PGE2 sobre la resorción ocurre indirectamente a través de la regulación positiva de la expresión del ligando del receptor activador de NFκB (RANKL) y la inhibición de la expresión de osteoprotegerina (OPG) en osteoclastos. Algunos de las funciones propuestas para la expresión de COX2 y la producción de PGE2 con el apoyo osteoblástico de la diferenciación osteoclástica se encuentran en el siguiente diagrama.

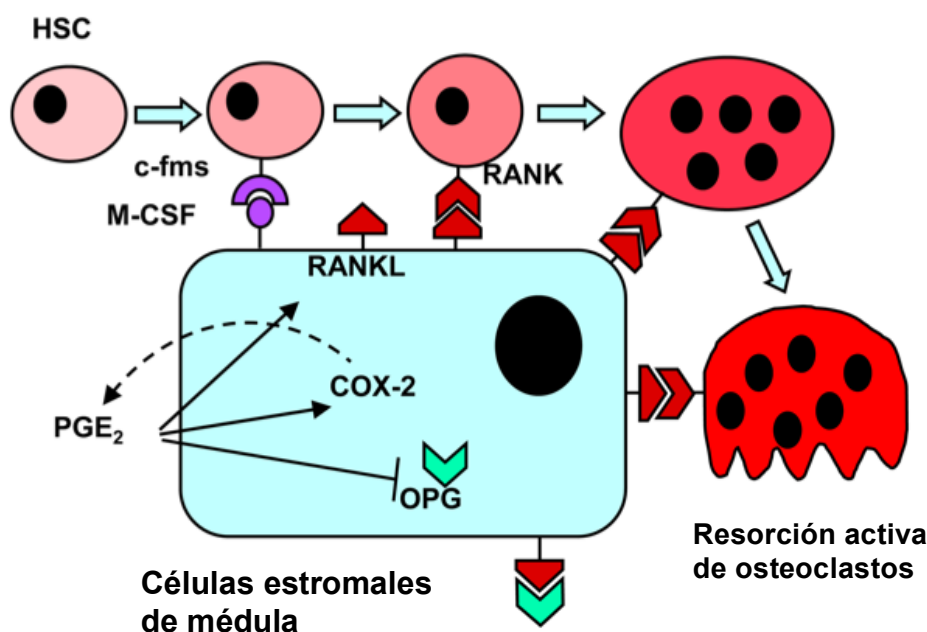


Fig 17: Acción potencial de COX-2 y PGE2 en células osteoblásticas para estimular la diferenciación osteoclástica. PGE2 incrementa la expresión del ligando del receptor activador de NFκB (RANKL), la cuál se une al receptor de RANK sobre células osteoclasticas que lleva a la diferenciación. PGE2 también inhibe la expresión de osteoprotegerina (OPG), el receptor señuelo de RANKL. La unión del factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF) a su receptor (c-fms) es esencial para estimular la proliferación de progenitores osteoclasticos. (23)



PGE2 tiene tanto efectos estimulatorios como inhibitorios sobre RANKL en la estimulación de la formación de osteoclastos.(23) así mismo prostaglandina E2 induce la activación del receptor del factor nuclear KB en osteoblastos y en células estromales para formar osteoclastos.

Interleucina-1 $\alpha$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , lipopolisacárido y factor de crecimiento básico de fibroblastos falla en inducir formación de osteoclastos, sugiriendo que la formación de osteoclastos es regulada vía receptores EP4 por prostaglandina E2, la cual es producida a través de ciclooxigenasa-2. (97)

El receptor EP4 a través de COX-2 es crucial para la resorción ósea después de inducción sistémica de lipopolisacárido.

El lipopolisacárido e interleucina-1 estimulan osteoclastogénesis por la acción del receptor activador del factor nuclear KB y disminuye la producción de osteoprotegerina, la cual es regulada por ciclooxigenasa-2 dependiente de la producción de prostaglandina E2.

Las células de ligamento periodontal y fibroblastos gingivales bajo condiciones de estrés mecánico y bajo estímulos proinflamatorios están involucrados en el metabolismo óseo en el periodonto induciendo osteoclastogénesis por el receptor activador del factor nuclear KB y la expresión de osteoprotegerina, los cuales regulan positivamente a través de la síntesis de prostaglandina E2.(98)

Prostaglandina E2 promueve la expresión génica del factor de crecimiento de insulina-1, siendo este al menos es un mecanismo por el cual prostaglandina E2 promueve la formación ósea. (99)

Así mismo ciclooxigenasa2 es requerida para la formación ósea intramembranosa y endocondral durante la reparación ósea; mientras prostaglandina E2 juega un papel importante en la formación y resorción ósea, y los receptores EP4 y EP2 son responsables de la regulación de prostaglandinaE2 en el metabolismo óseo.

También esta involucrada en la restauración del hueso alveolar y se ha visto que causa la formación de nuevo cemento y ligamento periodontal a través de la activación de la vía de señalización de la proteína cinasa C posiblemente vía receptores EP1 y FP respectivamente. (17)

## 5.12. COX2 en la percepción del dolor inflamatorio

Las prostaglandinas sensibilizan las terminaciones nerviosas sensoriales periféricas en el sitio de la inflamación para transmitir señales de dolor a la médula espinal.

COX-1 y COX-2 parecen ser expresados en los ganglios de la raíz dorsal, en la espina dorsal y en la materia gris ventral y están también presentes en neuronas y células no neuronales como astrocitos.

En conclusión parece ser que la expresión constitutiva de COX2 en la médula espinal juega un papel crucial en la percepción del dolor mientras la inducción de su expresión empeora su percepción de los niveles de

hiperalgesia. (18)

### 5.13. Patogénesis de la enfermedad periodontal

La patogénesis de la enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio que involucra las respuestas inmunes innatas y adaptativas.

La enfermedad periodontal es caracterizada por la destrucción de tejidos blandos y duros causados por la inducción de la producción y la activación de enzimas líticas y la estimulación de la osteoclastogénesis.

Aunque es ampliamente conocido que la enfermedad periodontal es crónica, también es un continuo proceso que consiste en episodios de exacerbación y remisión.

Existe una relación entre la resorción ósea periodontal y las bacterias, el proceso inflamatorio ocurre en la enfermedad periodontal la cual es caracterizada por la infiltración de leucocitos y la invasión bacteriana.

Existe un gran número de factores que promueven el reclutamiento de leucocitos, incluyendo productos bacterianos, citocinas, interrelación entre las respuestas inmunes innatas o adaptativas, quimioquinas, mediadores lipídicos y el complemento.

La distancia  $>2.5$  mm es causada por la invasión bacteriana en el tejido conectivo gingival, la cercanía de las células de la infiltración inflamatoria es en el hueso, el mayor número de osteoclastos formados y la mayor cantidad de degradación ósea. Esta formación de osteoclastos es estimulada por factores secretados (por ejemplo citocinas) de células inflamatorias en el infiltrado las cuales estimulan la resorción ósea. En la enfermedad periodontal hay un desacoplamiento de la resorción ósea con una subsecuente formación ósea de modo que una pérdida neta de hueso ocurre.

Este contraste con condiciones normales en el cual la cantidad de formación ósea es igual a la cantidad de resorción que ocurre y se conoce como acoplamiento; por el uso de ganar o perder la función, la relación causa y efecto entre citocinas y pérdida de tejido periodontal ha sido establecida.

Existe una relación entre la inflamación, mediadores de la respuesta inmune, citocinas inducidas por bacterias y tejido periodontal.

#### 5.13.1. Respuesta del huésped en la enfermedad periodontal

El papel de la respuesta del huésped en la pérdida ósea periodontal es compleja, existe evidencia que una deficiente respuesta del huésped incrementa la destrucción periodontal y esta vigorosa respuesta lleva a la enfermedad periodontal.

IL-1 y TNF inducen la progresión de la pérdida de hueso periodontal y la pérdida de unión, la cual es atribuida al reclutamiento de células inflamatorias (monocitos y linfocitos).

La inhibición de la respuesta inmune del huésped puede disminuir la pérdida de hueso periodontal o incrementar la progresión de la enfermedad

periodontal; así mismo la disminución de neutrófilos contribuye a la destrucción de tejidos periodontales. (100) por lo tanto la respuesta del huésped juega un papel protector y destructivo en el periodonto.

Un aspecto importante en la respuesta del huésped es la detección de las bacterias por los receptores tipo Toll (TLRs). La activación de la respuesta inmune innata por la unión de varios componentes bacterianos (diacil lipopéptidos, peptidoglicanos, LPS, flagelina y DNA bacteriano) a los TLRs resulta en la producción de citocinas y quimiocinas.

Tras la activación de los TLRs, una cascada de señal intracelular es estimulada y lleva a la activación de factores de transcripción como: Factor nuclear -kappa B, proteína activadora-1 (AP-1), p38 y la producción de varias citocinas, varias de las cuales directa o indirectamente estimulan la formación de osteoclastos. (28)

### 5.13.2. La respuesta destructiva del huésped en el daño del tejido tisular

La destrucción de la matriz extracelular es una característica patogénica de tejido conectivo inflamado, ya que en enfermedades inflamatorias colagenasas intersticiales juegan un papel importante en la iniciación de la degradación del colágeno, la proteína más abundante en la matriz extracelular.

En pacientes con lesiones progresivas, la destrucción de fibras de colágeno que proveen un soporte estructural del diente resulta en un daño de unión gingival del diente.

Entre las proteasas del huésped que se dirigen a la matriz extracelular (ECM), metaloproteinasas de la matriz (MMP) han sido especialmente asociadas con la remodelación de los tejidos periodontales. MMPs son una familia de proteasas dependientes de zinc y calcio que degradan la matriz extracelular, son usualmente encontradas con un grupo de proteínas endógenas llamadas inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), que mantienen la remodelación de la matriz altamente regulada.

MMPs son clasificadas por su especificidad de sustrato en cuatro amplias categorías: colagenasas (MMP-1, -8 and -13), gelatinasas o colagenasas tipo IV (MMP-2 and -9), estromelisininas (MMP-3, -10 and -12), y MMPs tipo membranales (MT-MMPs).

La colagenasa intersticial (MMP-1) es la enzima responsable de la degradación de colágeno tipo I y III debido a que el daño inicial de la red de colágeno fibrilar es regulado primariamente por MMP-1, donde esta se encuentra grandemente aumentada en la periodontitis.

MMP-1 e IL-1 $\beta$  están involucrados en la degradación tisular en lesiones periodontales. (26) MMPs y TIMPs son regularmente expresadas en tejidos periodontales sanos, donde controlan el recambio fisiológico de ECM, sin embargo, una falta de balance entre las relaciones de MMPs/TIMPs existe en los tejidos periodontales enfermos y representa la destrucción de tejidos suaves y mineralizantes asociados con enfermedad periodontal.

De acuerdo con la desregulación del sistema MMP/TIMP esta involucrado en la patogénesis de enfermedades osteolíticas. (35)

## 5.14. Bacterias Periodontopatógenas

La cavidad oral es hogar de varias especies bacterianas, es importante tener en cuenta la complejidad del biofilm oral, la cual puede incluir alrededor de 500 especies microbianas diferentes y consecuentemente una multitud de PAMPs que pueden activar varios TLRs.

Solo algunas de estas bacterias, ya sea solas o en combinación tienen un potencial periodontopatógeno y pueden iniciar la enfermedad periodontal; el sobrecrecimiento de patógenos periodontales puede resultar de una deficiencia en el sistema de defensa del huésped o modificación del medio subgingival. (32)

Las bacterias gram-negativas están asociadas con la enfermedad periodontal, incluyendo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescences*, *Fusobacterium nucleatum* entre otras son capaces de inducir la activación de TLR4, mientras que los últimos dos microorganismos pueden también activar TLR2.(30)

Las bacterias inducen la destrucción de tejido indirectamente por medio de la activación de las células de defensa, las cuales a su vez producen y liberan mediadores que estimulan los efectores que dañan el tejido conectivo. Componentes de la placa microbiana tienen la capacidad de inducir un infiltrado inicial de células inflamatorias incluyendo linfocitos, macrófagos y PMNs; así mismo componentes microbianos, especialmente lipopolisacárido (LPS) tienen la capacidad de activar macrófagos para sintetizar y secretar una amplia gama de moléculas incluyendo, citocinas etc.(35)

Especies patógenas individuales tienen efectos característicos sobre las vías de señalización asociados con un rango de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8) y citocinas estimuladoras de células T (IL-12, IL-23).

Las células huésped responden a las bacterias por activación de vías de señalización intracelular que permiten la secreción de citocinas.

Todas las bacterias periodontales han mostrado estimular la secreción de varias citocinas proinflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and IL-12. (21)

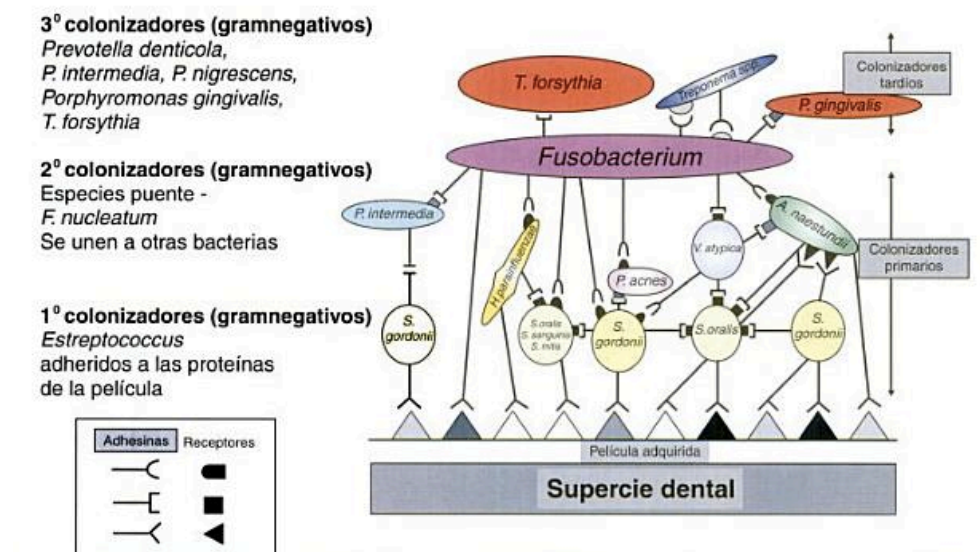


Fig 18: La comunidad microbiana de la biopelícula dental . 1º, 2º y 3º bacterias colonizadoras de la placa dental. (Negroni. Microbiología estomatológica. 2009)

## 5.15. *Porphyromonas gingivalis*

*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) es un agente etiológico primario de la enfermedad periodontal, es una bacteria gram negativa mayormente encontrada en la profundidad de las bolsas periodontales y especialmente en sitios con la enfermedad activa; se ha reportado que los pacientes con periodontitis tiene elevados niveles de anticuerpos contra *P.gingivalis* presente en el suero y fluido gingival crevicular.

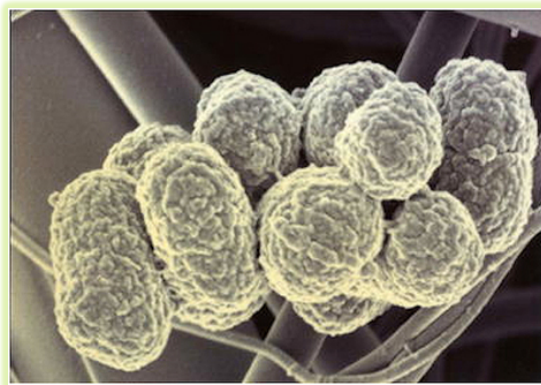
*P. gingivalis* posee materiales bioactivos como membrana citoplásmica, peptidoglicanos, proteínas de la membrana externa, lipopolisacáridos (LPS) cápsulas y fimbrias en su superficie celular. Estos materiales inducen una excesiva producción de citocinas y pueden regular la red de citocinas en los tejidos periodontales.

El suero de pacientes con periodontitis es positivo para anticuerpos contra varios componentes de *P. gingivalis*, incluyendo proteína de la membrana externa, cápsula y fimbria y para anticuerpos contra productos de bacterias biológicamente activas, incluyendo LPS, hemaglutinina, tripsina similar a proteasa. (32)

*P. gingivalis* induce una respuesta inflamatoria crónica local en el huésped que resulta en la destrucción ósea inflamatoria, la cual es manifestada en la enfermedad periodontal. En humanos las lesiones inflamatorias crónicas locales están asociadas a la infección de *P.gingivalis* que es iniciada en el endotelio vascular en la cavidad oral; así mismo durante los estadios agudos o activos de la enfermedad periodontal, existe una inicial infiltración de neutrófilos que cambia a una predominante infiltración de monocitos y linfocitos en lesiones crónicas; los macrófagos en tejidos inflamados diferencian a osteoclastos y también aceleran la resorción ósea a través de la

producción de citocinas proinflamatorias .

Un gran número de mediadores proinflamatorios son expresados en lesiones inflamatorias periodontales y varias de estas son expresadas también sistémicamente; la capacidad de controlar la expresión de estos mediadores proinflamatorios es crucial para controlar la pérdida ósea y la subsecuente patología asociada con la infección de *P.gingivalis*.<sup>(31)</sup>



**Fig 19: *Porphyromonas gingivalis*.**  
(effyeahmicrobiology.tumblr.com)

### 5.15.1. *P. gingivalis* en la enfermedad periodontal

*P. gingivalis* inhibe la secreción de IL-8 y por lo tanto compromete la inmunidad innata del huésped. Se ha observado que *P.gingivalis* hidroliza IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-1Ra, y de esta manera puede alterarla red local de citocinas no solo por estimulación de la liberación de citocinas de las células huésped, sino también por la remoción de ellas del ambiente local.

*P.gingivalis* tiene varios elementos estructurales los cuales pueden ser considerados como PAMPs sobre la base de su capacidad de estimular la inmunidad del huésped; las fimbrias (particularmente la forma mayor FimA) son fundamentales para la adhesión celular y la activación de respuestas del huésped por *P.gingivalis*.

Las fimbrias activan la señalización de las vías de TLR resultando en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 en monocitos; así mismo las células endoteliales responden a las fimbrias por secreción de IL-8, la cual es importante en la señalización de quimiotaxis de neutrófilos. Las células epiteliales y monocitos responden a la activación, mediada por fimbrias, de TLR2 por secreción de citocinas.

Esta vía puede ser particularmente importante en la activación de la secreción de IL-12 con la consecuente activación de células Th1 Cd4 y células NK. La señalización de la inmunidad innata y adaptativa también es promovida por Fim A que regula *P.gingivalis* en células dendríticas con una consecuente regulación positiva de la secreción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 por estas células.<sup>(21)</sup>

*P.gingivalis* se une al receptor del complemento C3 la cual suprime TLR2 que induce la secreción de IL-12 de macrófagos con consecuentes efectos sobre la virulencia de *P.gingivalis*.

*P. gingivalis* también puede estimular la secreción de citocinas a través de la vía de la activación de receptores activadores de proteasa (PARs); RgpB activa dos diferentes PARs (PAR-1 y PAR-2), de este modo estimulando la secreción de IL-6 en células epiteliales.

Las proteasas de cisteína Rgp y Kgp estimulan la secreción de IL-6 e IL-8 por monocitos vía activación de PAR-1, PAR-2 y PAR-3; así mismo el complejo RgpA Kgp de *P.gingivalis* penetra en el tejido conectivo gingival y estimula la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), IL-8, IL-6 y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) en fibroblastos y células epiteliales, aunque una reducción en estos mediadores ha observado que altas concentraciones, sugiriendo que cercano a la placa, donde las concentraciones del complejo RgpA Kgp son altas, la secreción de mediadores de la inflamación son atenuados, mientras que de manera distal a la placa, esta es estimulado.

Las proteasas producidas por *P. gingivalis*, particularmente lisina, pueden trastornar la respuesta inflamatoria del huésped por degradación directa de citocinas.

Ácidos nucleicos bacterianos también funcionan como PAMPs; ya que las regiones CpG hipometiladas de DNA bacteriano compromete a TLR9 y estimula las respuestas citocinicas. DNA de *P.gingivalis*, estimula la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en fibroblastos gingivales humanos, también se ha encontrado que el DNA de *P.gingivalis* puede regular negativamente las vías que permiten la secreción de citocinas Th1 y Th2.

HGFs y fibroblastos de ligamento periodontal responden a *P.gingivalis* por incremento de la expresión génica de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 TNF- $\alpha$  y regulación sobre la activación de células T normales expresadas y secretadas (RANTES), y es importante en determinar susceptibilidad a periodontitis.

La superficie de expresión celular de ICAM-1 es regulada positivamente en HGF presencia de *P. gingivalis* así como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ , y tejidos gingivales de pacientes con periodontitis tienen incrementada la expresión de ICAM-1.

Células humanas endoteliales también responden a *P.gingivalis* por estimulación de OPG vía dependiente de NF-kB y así actúa como una fuente de OPG en la periodontitis. *P.gingivalis* estimula la producción de altos niveles de IL-1 e IL-6 por células gingivales mononucleares. (21)

La vía de señalización inmune innata usada por *P.gingivalis* esta tanto en célula huésped como en el ligando bacteriano específico.

Las proteínas mayores y menores de fimbrias de *P.gingivalis* inducen la expresión de citocinas proinflamatorias y usan tanto TLR2 y TLR4 para su respuesta; así mismo la fimbria mayor usa TLR1 o TLR6 con una cooperativa



activación dependiente de TLR2 en células transfectadas; se ha demostrado que la fimbria se une a TLR2 y produce una señal a través de TLR2.

Aunque la fimbria no se une a TLR4 estas son capaces de producir una señalización a través de TLR4 en la presencia de MD2. (31)

## 5.16. Lipopolisacarido de *Porphyromonas gingivalis* para la producción de citocinas en fibroblastos gingivales

### 5.16.1. Lipopolisacarido (LPS) de *Porphyromonas Gingivalis*

Endotoxinas y LPS de las bacterias Gram negativas son bien conocidas como iniciadores de la inflamación tanto a niveles locales y sistémicos.

Aunque las endotoxinas de las bacterias gram negativas comprenden un grupo diverso de sustancias, hay ciertos componentes conservados en su estructura de proteínas. (32)

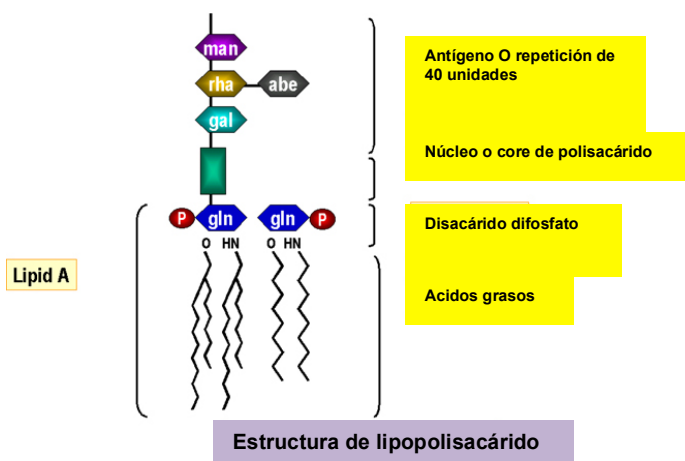


Fig 20: Estructura de lipopolisacárido. El ensamblaje del lípido A se lleva a cabo en la membrana celular y los azúcares centrales se le van uniendo secuencialmente. Las subunidades del antígeno-O son sintetizadas independientemente (sobre un lípido acarreador, como en la síntesis del peptidoglicano). El antígeno-O completamente sintetizado se une entonces a la región central y el lípido A, generándose el lipopolisacárido) en la membrana celular, antes de su paso/inserción a la membrana externa. (bathmicro.med.sc.edu)

LPS de *P. gingivalis* es un importante componente patogénico en el inicio y desarrollo de la enfermedad periodontal, debido a que el LPS bacteriano es conocido ser un potente estimulador en la producción de citocinas inflamatorias y resorción ósea.

Un blanco del LPS son los fibroblastos gingivales, los cuales juegan un papel importante en la remodelación de los tejidos periodontales. (21)

Las moléculas de LPS están localizadas en la cara exterior de la membrana externa, la porción más conservada de la estructura proteica es el lípido A, el lípido A es un motivo conservado típicamente fuerte dentro de un género bacteriano, aunque a menudo existe heterogeneidad en el número de ácidos grasos secundarios presentes; así mismo el lípido A está vinculado a través de la región del núcleo a la cadena lateral específica O, la cual es heterogénea en longitud y bastante variable en la estructura de una cepa bacteriana a la otra, y



proporciona la mayor parte, si no toda la característica antigénica de la bacteria.

La actividad endotóxica del LPS es derivada del lípido A, por lo tanto la estructura del LPS de bacterias gram negativas y lípido A por si mismo incluye un grupo de colas de ácidos grasos hidrofóbicos y, como mínimo, un grupo de cabezas hidrofílicas de azúcares fosforilados, como consecuencia LPS tiene un carácter antipático.

El LPS de *P.gingivalis* difiere de otras bacterias gram negativas en que la estructura proteica carece de heptosa y 2-ceto-3- deoxioctonato, así mismo el LPS de *P.gingivalis* muestra muy poca actividad endotóxica, aunque este es significativamente mitogénico.

La estructura del lípido A de *P. gingivalis* tiene el mismo patrón que el beta (1-6)-unido a disacárido de glicociamina como el lípido A enterobacterial, pero el grupo acyl es variable siendo el lípido A de *P.gingivalis* poseedor de una baja endotoxicidad en contraste con el lípido A de (*E. coli*), así mismo el lípido A de *P.gingivalis* tiene una estructura diferente que e lípido A de enterobacteria, es decir no hay un grupo 4-O-fosforil en la estructura de lípido A de *Bacteroides fragilis* y *B. intermedius*.

LPS de *P.gingivalis* y su lípido A poseen una estructura química única debido a sus actividades endotóxicas, siendo un factor importante en el desarrollo de la periodontitis, así mismo también muestra fosforilación y diferente patrón de acilación que el lípido A de enterobacterias y también causa aglutinación de eritrocitos.

En general la actividad endotoxica del LPS de *P.gingivalis* es muy baja en comparación con el LPS aislado de enterobacterias.

LPS de *P. gingivalis* es un potente inductor de varias respuestas biológicas, como de resorción ósea, activación de células B policlonales, inhibición de la formación ósea y proliferación de fibroblastos, asimismo también activa monocitos y macrófagos produciendo la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y prostaglandina E2.<sup>(32)</sup>

Es importante mencionar que la estructura del lípido A de LPS de *P. gingivalis* es alterada en respuesta a disponibilidad de nutriente, con la consecuente reducción en la señalización de TLR-4, la cual puede ser una característica que ha evolucionado para permitir a la bacteria evadir la respuesta inmune.<sup>(21)</sup>

Lipopolisacárido (LPS) de *P.gingivalis* ha demostrado activar las células huésped a través de TLR2 y TLR4 y esto puede ser dependiente de la expresión de varias formas de lípido A de *P. gingivalis*.<sup>(31)</sup>

Diferentes perfiles de citocinas son regulados por diferentes estructuras del LPS.

HGF son sensibles a LPS, y constitutivamente expresan RNAm por una variedad de TLRs y NLRs, estimulación la cual permite la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y MCP-1.

HGF también responde a las proteínas de la membrana externa y a lipopolisacárido de *P.gingivalis* para producción de citocinas inflamatorias; así

mismo HGF de tejido periodontalmente enfermo produce altas cantidades de IL-1 antes y después de la estimulación con LPS de *P. gingivalis*. Elevados niveles de citocinas pueden también localmente amplificar las respuestas del LPS. (21)

### 5.16.2. Acción de LPS de *P.gingivalis* sobre la enfermedad periodontal

LPS de *P. Gingivalis* induce la producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 a través de diferentes mecanismos de vías de señalización.

HGF responde a LPS de *P. gingivalis* aumentando la expresión de osteoprotegerina (OPG) en pacientes con periodontitis que tienen altos niveles de secreción de citosinas; así mismo IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , ha mostrado favorecer la expresión de CD14/MyD88 en HGF .

Los fibroblastos de ligamento periodontal también responden a la estimulación con LPS de *P.gingivalis* por el incremento en la expresión de RNAm de IL- 1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B, (RANKL) y OPG.

IFN- $\gamma$  ha mostrado estimular a células epiteliales orales para producir IL-8 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) por regulación positiva de TLR-2, TLR-4, MD-2 y MyD88 en la expresión de mRNA ocasionada por la estimulación con LPS, ácido lipoteicoico y peptidoglicanos, de esta manera LPS de *P. gingivalis* ha mostrado favorecer la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-18 en células monocíticas de humanos.

Las células dendríticas también responden a los productos bacterianos, ya que infiltran la lamina propia en los tejidos periodontales y junto con monocitos derivados de células dendríticas donde LPS produce IL-1 $\beta$ , PGE2, IL-10 e IL-12; lo que sugiere que el papel de las células dendríticas en la patofisiología de la periodontitis involucra su activación y maduración inducida por *P.gingivalis*. (21)

LPS es absorbido dentro de las superficies radiculares y tejidos gingivales de pacientes con enfermedad periodontal. Así mismo se ha reportado que LPS de *P. gingivalis* no puede inducir la expresión de moléculas de adhesión, pero puede inducir la necrosis de tejidos locales. (32)

### 5.17. Señalización de Lipopolisacárido (LPS)

La mayoría de los mediadores proinflamatorios inducen la expresión de COX-2; se ha mostrado que CD14 y los receptores tipo Toll juegan un importante papel en la señal de traducción de LPS en respuesta a las células, por lo tanto esto sugiere que LPS está involucrado en reacciones inflamatorias en varios tejidos a través de la vía CD14/TLR en la superficie celular. (32)

Además LPS de *P.gingivalis* es heterogéneo, algunas moléculas de LPS de *P. gingivalis* se unen a TLR-2 y unas a TLR4 y algunas son antagonistas. (21)

LPS y otros ligandos TLR que se unen a receptores MyD88 y vía MEK/ERK

inducen la activación del factor de transcripción de la proteína activadora 1 (AP1). LPS también activa la vía de TRAF6/NIK/Tpl2/IKK/NFκB, la cual también permite la inducción de la transcripción de COX-2.

Las señales de Tpl2 también permiten la activación de ERK1/2, que a su vez activa p90RSK y MSK1, la cual fosforila CREB, un regulador central de la transcripción de COX-2.

LPS activa C/EBPβ and C/EBPδ vía p38MAPK y ERK1/2, cabe señalar que C/EBPβ and CREB juegan un papel importante durante la etapa inicial de la activación transcripcional de COX-2 mientras que C/EBPδ mantiene una ya transcripción inducida.

El complejo transcripcional en el promotor de COX-2 requiere el coactivador transcripcional p300, el cual se une a CREB, AP1, C/EBP y NFκB, controlando el inicio de la transcripción. (18)

## 5.18. Complicaciones sistémicas de *P.gingivalis* inducen la inflamación crónica

Diferentes estudios han demostrado que *P.gingivalis* participa en la regulación de la enfermedad periodontal y que además puede ser considerado como un factor de riesgo que conduce la presencia de enfermedades sistémicas incluyendo arterioesclerosis, enfermedades cardiovasculares etc, ya que existe una asociación entre los patógenos periodontales y estas enfermedades.

Se ha observado que cuando existe un incremento en la profundidad del sondeo, sangrado al sondeo, pérdida de inserción clínica y de número de dientes, y evaluaciones radiográficas han sido relacionadas con disfunción endotelial, estenosis de válvula aórtica y temprana aterosclerosis de la carótida. Mas aún, los estudios relacionados con el tratamiento periodontal han mostrado que favorecen los trastornos como la disfunción endotelial; así mismo estudios clínicos sostienen la evidencia de que el DNA de *P. gingivalis* esta presente en las placas ateroscleróticas inflamatorias.

Existe una especificidad bacteriana en la inducción de patógenos periodontales en infección crónica y aceleración de la aterosclerosis, así como IL-1 juega un importante papel en el patógeno en la aceleración de la aterosclerosis. (31)

## 5.19. Mecanismos moleculares de interacciones huésped-microorganismo en la enfermedad periodontal

El cambio en la población microbiana presente en el biofilm oral de predominantemente bacterias gram negativas y gram positivas que son asociadas con la aparición de la enfermedad periodontal puede llevar a diferentes patrones de respuesta inmune como resultado de el tipo de respuesta de TLRs.

Los TLRs desempeñan un importante papel en la inflamación y en la

respuesta inmune, estos receptores no solo reconocen varios patrones moleculares asociados a patógenos para activar la respuesta inmune innata, sino también pueden unir a moléculas endógenas derivadas del daño tisular y tienen un papel en la inflamación y en la respuesta inmune adaptativa. La familia de los TLR en la actualidad consiste en más de 13 miembros, cada uno capaz de reconocer diferentes PAMPs, estos receptores son expresados por células inmunes como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas así como por células residentes no inmunes como fibroblastos periodontales y células gingivales epiteliales. (101,30)

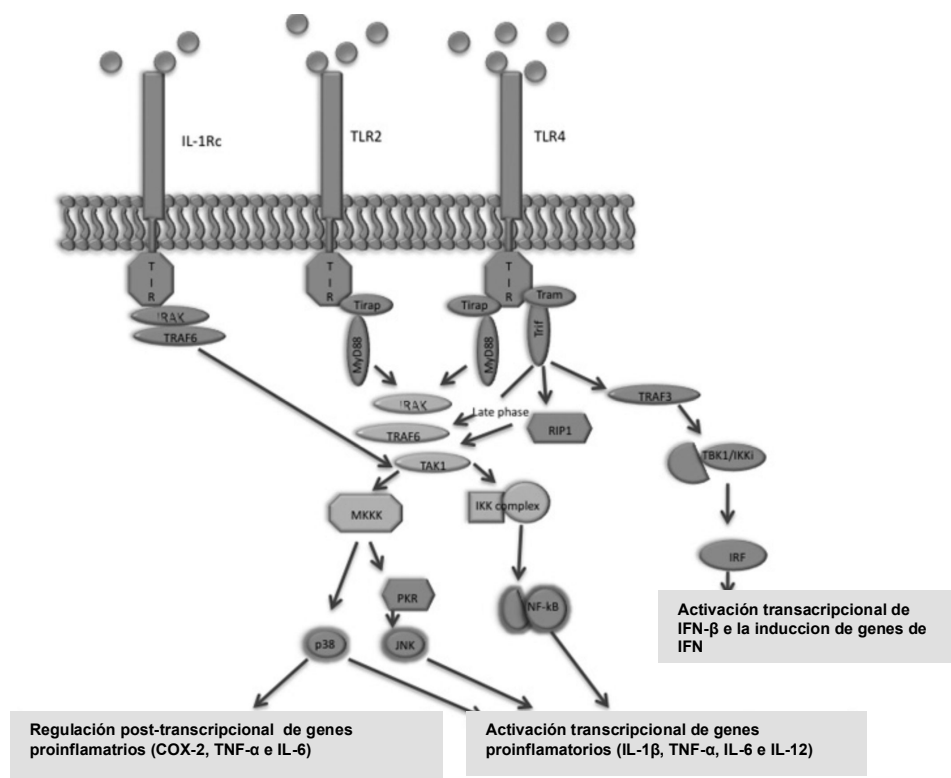
TLRs son proteínas transmembranales con una N-terminal que presenta repeticiones ricas de leucina que son responsables del reconocimiento de sus ligandos y con un dominio C-terminal citoplásmico que es muy similar a la región citoplásmica del receptor de interleucina-1. (102,30)

En tejidos periodontales, la expresión de TLR2 y TLR4 ha sido relacionada con la inflamación y aumenta la expresión de RNA de TLR en la mucosa oral de pacientes con periodontitis, junto con el incremento de la infiltración de la mucosa con TLR positivo en células inflamatorias; esto es debido a la repetida y prolongada exposición de este tejido con las PAMPs, y un intento del huésped de restablecer la homeostasis del tejido, como un mecanismo de tolerancia inmune. (103)

Las proteínas del dominio de oligomerización de nucleótido (Nod) son proteínas citosólicas que también tienen repeticiones ricas en leucina y fueron inicialmente descritas como los “TLRs intracelulares” que reconocen PAMPs asociadas con bacterias que invaden el citosol; sin embargo estas proteínas también han mostrado regular varias vías de señalización como las MAPK y NF- $\kappa$ B. (104)

Nod1 y Nod2 son requeridos para la activación transcripcional de RANKL regulado por la señalización de TLR2 and TLR4, esto ilustra la complejidad de la señalización de TLR y la interrelación con otras vías de señalización involucradas donde el dominio citosólico de TLRs y el receptor de IL-1 son similares.

En el reconocimiento de un ligando por TLRs la señal generada utiliza vías similares a aquellas utilizadas por el receptor de IL-1, sin embargo la señalización de TLR fue originalmente descrita en contexto de la activación de la familia IRF de factores de transcripción y NF- $\kappa$ B, permitiendo la expresión de interferón- $\gamma$  y una respuesta temprana de genes, respectivamente.



**Fig 21:Receptores tipo Toll.** Interesantemente, la participación de al menos cuatro proteínas adaptadoras que contienen dominios de unión al receptor (TIR) de Toll/IL-1, puede ser reclutado por la activación de TLRs lo cual resulta en la inducción de importantes vías de transducción de señales y produce una significativa flexibilidad a la señalización de TLR por permitir la sinergia con otras vías, incluyendo las vías de MAP cinasas, PKR y Notch. (30)

Bacterias gram positivas muestran activar TLR2, las cuales inducen un incremento en la expresión de IL-8, mientras que las bacterias gram negativas activadas predominantemente por TLR4, resultan en un incremento de la expresión de TNF- $\alpha$ .(105,30)

Sin embargo algunos microorganismos gram negativos que están presentes en el biofilm oral y asociados con la enfermedad periodontal son mas bien únicos en su capacidad para activar NF- $\kappa$ B.

La vía de TLR2, es activada por microorganismos presentes en el biofilm oral compuesto por bacterias gram-positivas y las cuales son comúnmente colonizadores del biofilm oral y no son asociadas con señales clínicas de la enfermedad periodontal. (30)

### 5.19.1. La vía de señalización de LPS de *Porphyromonas gingivalis* vía CD14 y receptor TOLL-tipo-4 (TLR4)

Con respecto a la vía de señalización de TLRs en fibroblastos gingivales, se ha demostrado que TLR4 regula la vía de señalización inducida por LPS de *P.gingivalis* en fibroblastos gingivales.

La defensa del huésped contra microorganismos mediada por TLR se basa principalmente en las vías de señalización inducidas por los dominios intracelulares de TLRs que son similares al dominio intracelular del receptor de IL-1 (IL-1R), y esta región se le conoce como el dominio Toll/IL-R.

La unión del ligando a TLRs permite la activación de diferentes vías de señalización que contribuyen a la especificidad de activación del gen diana y de respuestas celulares; así mismo la regulación de la expresión de varios genes inmunoregulatorios requieren mas que una vía de señalización.

TLR4 es el receptor dominante de LPS, TLR4 responde al LPS y al ácido lipoteicoico; la unión de LPS de *P.gingivalis* a TLR4 en fibroblastos gingivales activa sistemas de segundos mensajeros. (32)

La unión de LPS con CD14 induce la activación transitoria de varias proteínas cinasas como la proteína cinasa C, proteína tirosin cinasa y proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK).

CD14 regula la vía de señalización de LPS de *P.gingivalis* en fibroblastos gingivales, varios lípidos contenidos en moléculas incluyendo LPS y lipoproteínas microbianas, pueden unirse con CD14.

Existen dos formas de la molécula de CD14. Uno es glicofosfatidilinositol (GPI) unido a la membrana CD14 (mCD14) y otro es la forma soluble de CD14 (sCD14), la cual carece de estructura de GPI.

Puesto que CD14 no atraviesa la membrana en el citoplasma, debido al anclaje de GPI, este no puede regular los eventos de la señalización de LPS por si solo, pero puede requerir un correceptor para activar la vía de señalización intracelular.

Así mismo LBP esta involucrado en el reconocimiento de LPS por CD14 en fibroblastos gingivales, las moléculas de LPS se unen a través de su lípido A a la proteína de unión a LPS (LBP), la cual grandemente favorece la sensibilidad de diferentes tipos celulares al LPS.

CD14 se expresa sobre superficies de fibroblastos como un receptor del complejo de LPS y LBP. Cuando LPS es despojada de la superficie de la bacteria, LPS se une a la membrana de unión o a la forma soluble de CD14, una unión que es regulada por la proteína del suero, LBP; la prescencia del complejo LPS/CD14/LBP en la membrana resulta en la activación celular de la respuesta del LPS a diferentes tipos celulares.

La expresión de CD14 es correlacionada con el incremento de la sensibilidad de varios tipos celulares a LPS y otras moléculas microbianas en su capacidad de activar eventos de señalización rio abajo y producción de citocinas; así mismo sCD14 regula la inducción de LPS en la expresión de la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) en fibroblastos gingivales.

En pacientes con periodontitis hay un incremento de los niveles de sCD14, ya que los fibroblastos gingivales aislados de tejidos inflamados pueden expresar altos niveles de estos receptores que los fibroblastos gingivales aislados de tejidos no inflamados.

La proteína de diferenciación mieloides MD-2, no abarca a la membrana que se une al ectodominio de TLR4, por lo tanto esta físicamente asociada con TLR4, y es requerida para el reconocimiento de LPS. El complejo TLR4-MD2 sirve

como reconocimiento para la molécula de LPS.<sup>(32)</sup>

Posteriormente las moléculas de TLR4 dimerizan, y TIRAP es reclutado en la membrana por unión a fosfatidilinositol (4,5)- bisfosfato (PIP2).

TIRAP localizado en la membrana recluta MyD88 en el citosol al complejo de señalización de TLR4, donde MyD88 se une a TLR4 a través de las interacciones TIR-TIR.

Después de la unión de MyD88 a TLR4, este recluta IL-1R-asociado a cinasa-4 (IRAK4) al dominio intermedio entre el dominio TIR y DD e IRAK1 a través de las interacciones DD-DD. <sup>(34)</sup>

La participación de al menos cuatro proteínas adaptadoras que contienen dominios de unión a receptor Toll/IL-1 (TIR) que pueden ser reclutados por TLRs activados resulta en un importante derivación de la transducción de señales y produce una significativa flexibilidad a la señalización de TLR permitiendo interrelación con otras vías, incluyendo MAP cinasas, PKR y Notch.

Estas proteínas adaptadoras son reclutadas por TLRs por interacciones homofílicas entre sus dominios TIR y son utilizados de manera diferente por los TLRs. TLR5, TLR7 y TLR9 dependen del reclutamiento de la señal de MyD88, mientras TLR3 es el único de los TLR que no usa MyD88; TLR4, por otra parte, puede usar cuatro proteínas adaptadoras MyD88, TRIF, Mal/TIRAP y TRAM. <sup>(30)</sup>

La unión de un ligando con IL-1R induce dimerización del receptor, reclutamiento de una proteína accesoria, unión de una proteína adaptadora (MyD88), IRAK, seguido por la fosforilación de un factor asociado al receptor de TNF6 (TRAF6).

Cinasa activada por TGF- $\beta$  (TAK-1) muestra regular la activación de NF-KB; la activación de TAK-1 subsecuentemente resulta en la activación de cinasa que induce NFKB (NIK), seguido de la activación de la cinasa IKB (IKK), fosforilación de IKB, y su disociación de NFKB.

La señalización de TLR activa dos vías de ramificación proximales al dominio intracitoplásmico de TLR4, la primera es la vía dependiente de MyD88, la cual subsecuentemente activa IRAK, TRAF6 y NFKB. MyD88 esta asociado no solo con el receptor de citocinas de IL-1 e IL-18, sino también con varios TLRs, incluyendo TLR4, esta vía es esencial para la inducción de citocinas.

La segunda vía es una vía independiente de MyD88 que no puede activar IRAK, esta vía puede también activar NFKB con cinética de retraso, esta activación de NFKB no puede permitir la inducción de citocinas. <sup>(32)</sup>

Ambas vías requieren dimerización del receptor, reclutamiento de adaptadores, y la activación de cinasas específicas y factores de transcripción y resulta en la expresión de genes inflamatorios.<sup>(34)</sup>

MyD88 muestra ser crucial para la producción de citocinas proinflamatorias en estimulación con una variedad de ligandos microbianos;<sup>(33)</sup> así mismo MyD88 también sirve como adaptador de señalización para IL-1R y IL-18R. <sup>(34)</sup>

MyD88 posee tres dominios, C-terminal la cual es similar al dominio TIR y N-terminal dominio muerte-DD y un dominio intermedio. TLR e IL-1R asocia intracelularmente con la proteína adaptadora MyD88 vía interacción entre los respectivos dominios TIR. MyD88 posteriormente recluta a la cinasa serina/treonina IRAK vía interacciones de dominio DD es fosforilado y subsecuentemente asociado con TRAF-6; esta activación a su vez lleva al inicio de dos distintas vías río abajo resultando en la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1.

TIRAP/Mal participa en la activación dependiente de MyD88 de la señalización de LPS-TLR4, esta tiene el TIR C-terminal, sin embargo este carece de N-terminal DD; TIRAP esta asociado con TLR4 a través de la interacción entre sus respectivos dominios TIR.

También TIRAP/Mal forma dímeros con MyD88 seguido por asociación con IRAK y activación de NF- $\kappa$ B. TIRAP/Mal no es específico para la señalización de TLR4 y este toma parte en la señalización de TLR2. (33)

La activación de la vía de NF- $\kappa$ B es usualmente llevada a cabo por todos los TLRs, así mismo la activación tardía de este factor de transcripción es dependiente de TRIF, y ambas vías involucran la activación de TRAF6/TAK1 los cuales son comunes activadores río arriba de otras vías de señalización como las MAP cinasas. (30)

La infección viral a través de la vía TLR3 así como la estimulación de LPS vía TLR4 induce la fosforilación y la subsecuente activación de IRF-3 y su translocación al núcleo, donde conduce a la expresión génica de IFN- $\beta$  por lo tanto TLR3 y TLR4 activan IRF3, la cual regula la respuesta innata antiviral. En la señalización de TLR4, la expresión de IFN- $\alpha/\beta$  puede ser inducida ya sea por la vía dependiente o independiente de MyD88;

TRIF es esencial para regular la vía de señalización de TLR4 independiente de MyD88 en la defensa del huésped antiviral, induciendo la activación de NF- $\kappa$ B.

Por otro lado TRAM interactúa con TLR4 induciendo la activación de NF- $\kappa$ B vía independiente de MyD88, así mismo TRAM físicamente se une a TLR4 y TRIF, y funcionalmente transmite la señalización LPS-TLR4 a TRIF, el cual a su vez activa IRF-3.

Por lo tanto en la señalización de LPS, el TLR4 recluta dos tipos de adaptadores, TIRAP y TRAM a su dominio citoplásmico que esta directamente conectado en dos efectivos adaptadores, MyD88 y TRIF, respectivamente.

De esta manera se puede concluir que LPS-TLR4 regula la activación de IFN- $\beta$ , el complejo adaptador de TRAM y TRIF los cuales juegan un papel importante.

Múltiples GTPasas regulan las vías que emergen de receptores Toll estimulados, controlando diferentes aspectos de NF- $\kappa$ B en la regulación de la transcripción génica; recientemente, dos cinasas relacionadas con IKK, cinasa IKB inducible (IKK-i) y cinasa de unión a TANK-1 (TBK1), actúan como cinasas IRF-3 y están involucradas en la producción de IFN- $\beta$  en la señalización de TLR en infecciones virales. (33)



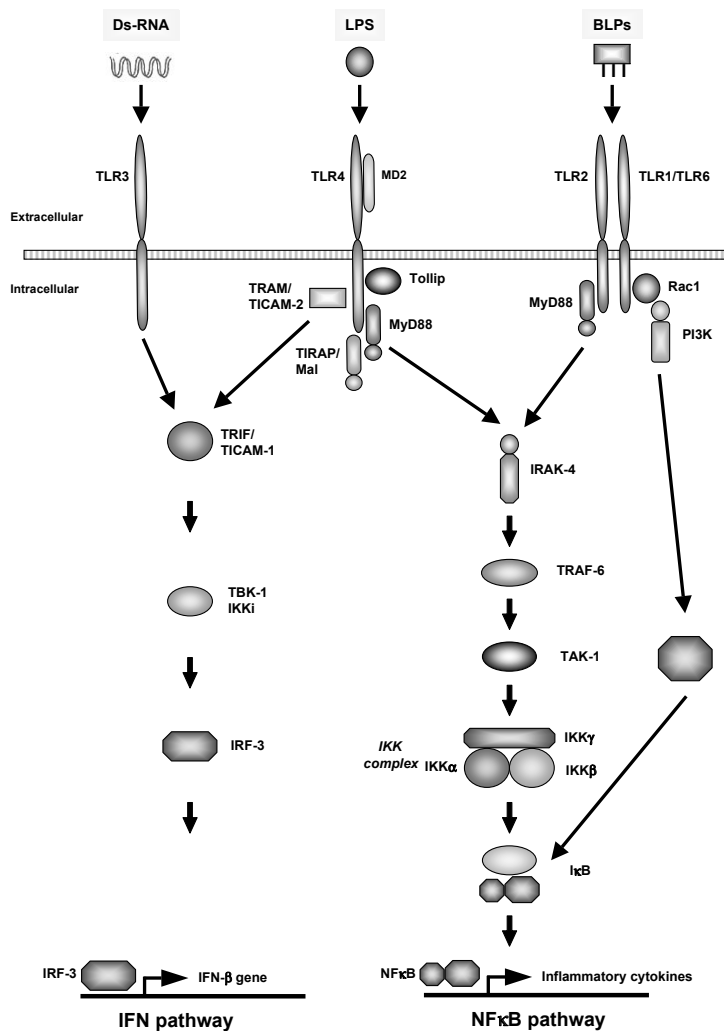


Fig 22: Adaptadores y factores de transcripción en la vía de señalización de TLR.(33)

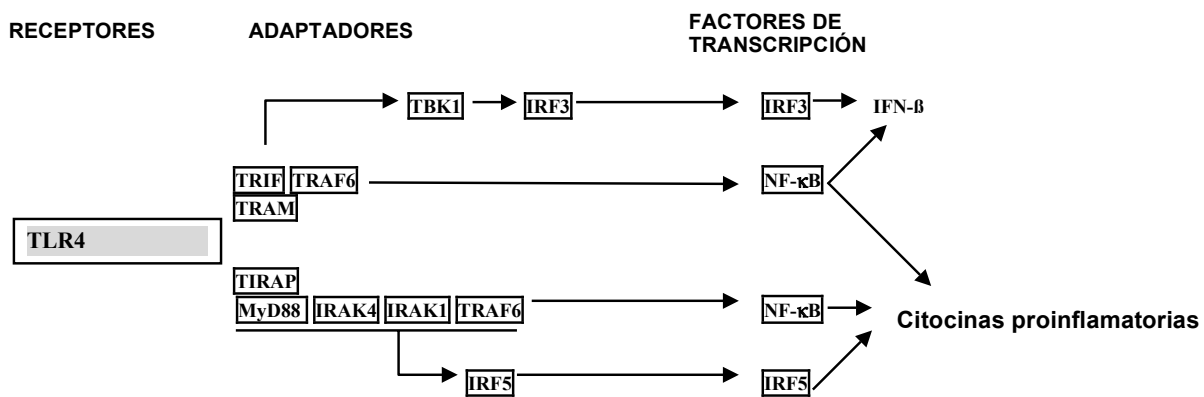


Fig 23: Representación esquemática de la vía de señalización de TLR. (33)

### 5.19.2. Vías de señalización en patógenos periodontales que inducen inflamación

De acuerdo con el paradigma actual de las enfermedades periodontales, la formación de la placa supragingival es requerida para la iniciación de la inflamación marginal y subsecuente maduración y formación de placa subgingival.

La producción de citocinas y mediadores de la inflamación son iniciados por estimulación externa o “señales” que son rápidamente traducidas a través del citoplasma y dentro del núcleo donde la expresión génica empieza con la transcripción de DNA en pre-RNA.

De este comienzo al ensamble final de la proteína biológicamente activa, existen un gran número de mecanismos regulatorios que pueden afectar la expresión génica y varias vías de señalización que pueden participar en varios de estos mecanismos tanto a niveles transcripcionales como postranscripcionales.

Las vías de señalización producen múltiples efectos tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa.

Otras vías de señalización que son activadas y están involucradas en la regulación de la expresión génica durante la inflamación y la respuesta inmune; son las vías Notch (106), Wnt y PI3-cinasa (107) vías que participan en las interacciones huésped-microorganismo.(30)

#### 5.20.2.1. *P.gingivalis* induce cascadas de señalización inflamatorias

La infección bacteriana regula las respuestas inflamatorias que involucran determinadas vías de la inmunidad innata en definidas células huésped y este puede impactar en los resultados inflamatorios en la inflamación crónica y promueve las respuestas inflamatorias a *P.gingivalis*.

La activación de cascadas de señalización que conducen a la expresión de citocinas inflamatorias procede independientemente de las vías que conducen a la captación bacteriana y la generación de moléculas bactericidas.

Existen estrategias de evasión inmune de *P.gingivalis*, los cuales podrían potencialmente contribuir a la persistencia bacteriana e inflamación crónica.(31)

Las MAP cinasas son un grupo de cinasas citoplásmicas conservadas que están organizadas en módulos (MAPKKK MAPKK MAPK) secuencialmente activadas por fosforilación dual en residuos de tirosina/treonina. De las cuatro distintas clases de MAP cinasas descritas a la fecha en mamíferos, p38 (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), cinasas c-Jun N-terminal (JNK1-3) y cinasa regulada por señales extracelulares (ERK1,2) son las más estudiadas.(30)

La cinasa-cinasa.cinasa MAP (MAPKKK), TAK1, parece estar involucrada en la inducción de LPS en la activación río debajo de NF $\kappa$ B de TLR2 y TLR4. (32)

Los sustratos río abajo de las MAPcinasas incluyen una variedad de factores de transcripción, proteínas de unión a DNA y otras cinasas (MAPKAPK

proteína cinasa activada por mitógeno-proteína cinasa activada) que están involucradas en la regulación de la expresión génica por mecanismos transcripcionales, postranscripcionales, traduccionales y post-traduccionales.

MEK3 es también un activador río arriba de MAPK. Existe una interrelación entre las vías de señalización de ERK y p38 en fibroblastos.

Estas proteínas comprenden varias de las vías de señalización que son muy conservadas entre diferentes especies de organismos indicando su papel fundamental en varios procesos esenciales fisiológicos y patológicos.

Las MAPK juegan un papel relevante en la progresión de la enfermedad, es también activada en respuesta a ligandos microbianos, esta vía de señalización es una de los principales efectores río abajo de la señalización de TLR, pero es particularmente relevante para la activación y desarrollo de las respuestas inmunes adaptativas como por su papel sobre la proliferación de células T, la producción de citocinas y diferenciación de las células T inmaduras en células efectoras Th1 y Th2.<sup>(30)</sup>

La inducción de LPS es esencial para la fosforilación de proteínas intracelulares y por lo tanto en la activación funcional de células como monocitos, macrófagos y fibroblastos.

El LPS de *P.gingivalis* activa tirosin cinasas en fibroblastos gingivales humanos vía CD14, llevando a la expresión génica de MCP-1 a través de los factores de transcripción, factor nuclear kB (NFkB) y la proteína activadora-1 (AP-1); LPS de *P.gingivalis* une a CD14 y de esta manera activa la fosforilación de la proteína tirosina de varias proteínas intracelulares.

La sobreexpresión de la forma dominante activa de TLR4 activa no solo NF-KB, sino también AP-1 y cinasa jun N-terminal (JNK), así mismo induce la fosforilación de proteínas 42 y 44 kDA, las cuales corresponden a p42 (ERK2) y p44 (ERK1) MAPK.<sup>(32)</sup>

La vía de MAPK p38 es importante en la señal de stress, estímulo inflamatorio e infeccioso, pero esta también involucrado en el control de procesos fundamentales incluyendo la proliferación celular, diferenciación y migración. Así mismo en alteraciones orales, esta involucrado en desordenes en la articulación temporomandibular, dolor crónico oral y cambios inflamatorios en la mucosa oral. <sup>(108,30)</sup>

p38 MAPK es importante en la regulación de la expresión de citocinas proinflamatorias y enzimas inducidas por señales inflamatorias e infecciosas, incluyendo IL-6, IL-10, MMP-13 y RANKL en fibroblastos y osteoblastos. Así mismo esta involucrada en la activación de células B regulando las respuestas mediadas por IL-4 en células B por cross-talk con STAT6. <sup>(109,30)</sup>

Las citocinas directa o indirectamente reguladas por p38 MAPK incluyen IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , NO, PGE2, MMP-13, RANKL en fibroblastos del ligamento gingival y periodontal asociadas con la respuesta inmune innata y adaptativa.

p38 puede ser activada por señalización a través de diferentes receptores, incluyendo la receptores de la proteína G acoplada, receptores de factor de crecimiento, receptores de citocinas y receptores tipo Toll, los cuales regulan

la respuesta celular del huésped del medio extracelular por regulación de varios genes.

p38 es activado por distintos receptores implicados en varios activadores río arriba en la transducción de señales como ASK1, MLK3, MEKK2-4, Tpl2 y TBK1; en fibroblastos p38 tiene un efecto regulatorio en la inducción de citocinas en la expresión de MMP-13. (30)

La regulación de la señalización de TLR4 induce la activación de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) que a su vez activa la cinasa Akt e induce la activación y translocación de la subunidad dp65 de NF- $\kappa$ B dentro del núcleo en un proceso que es inducido por la degradación de I $\kappa$ B.(33)

PI3K esta involucrado en varias vías celulares importantes incluyendo crecimiento celular, migración y apoptosis; la familia de PI3K consiste en tres clases de enzimas: Enzimas clase I y II que están involucradas en transmitir las señales de los receptores de membrana, mientras las enzimas de clase III contribuyen al tráfico intracelular.

Las enzimas de clase I son subdivididas en Clase IA y IB basados en diferencias estructurales y funcionales. La clase IA de PI3K son cinasas lipídicas heterodiméricas compuesta de una subunidad de dominio reguladora, p85 y un dominio de subunidad catalítica p110 y son activadas después de la estimulación a través de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9, y IL-1R. (110,111)

Aunque la subunidad p85 tiene múltiples papeles que incluyen la unión de proteínas, regulación de la ubicación de la cinasa, protección de p110 de la degradación, y confiere una conformación de la activación de la subunidad de p110, la subunidad 110 es constitutivamente asociado con la subunidad p85 y regula la señalización río abajo por la fosforilación de los lípidos de fosfoinositol.

Una vez activado, PI3K convierte PIP2 en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), que a su vez, activa la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositido (PDK1), que a su vez fosforila y activa la proteína cinasa 1 específica serina/treonina AKT, y se fosforila en serina 473.(34)

El factor nuclear kappaB (NF-kappaB) ha sido asociado con el incremento de la severidad de la enfermedad periodontal. (30)

NFKB y AP-1 están involucrados en la regulación de varios genes proinflamatorios e inmunomoduladores.

AP-1 es activado por la vía de las MAP cinasa, y NF-KB es activado por la vía de IKK. MyD88 es esencial para la respuesta de LPS. (32)

**NF- $\kappa$ B** (factor nuclear kappa B) es esencial para la transcripción de genes de inmunoglobulina de cadena ligera en células B, es un factor de transcripción la cual es activado por varias vías de transducción de señales las cuales están implicadas en la regulación de citocinas proinflamatorias iNOS y COX 2.

La familia de NF- $\kappa$ B de factores de transcripción son expresados en una gran variedad de células. En mamíferos cinco miembros de familias son conocidas:

RelA (p65), RelB, c-Rel, p100/p52, p105/50.

Cada miembro de esta familia juega un papel importante en la regulación de la señalización de TLR; subunidades de NF- $\kappa$ B orquestan el desarrollo y función de varios tipos celulares.

Células que mueren de una manera necrótica son capaces de inducir inflamación; seguido de la muerte celular necrótica proteínas de choque térmico salen de las células y ejercen la expresión de genes inflamatorios y desencadenan la maduración de diferentes tipos celulares vía TLR4 o TLR2 respectivamente.

Es conocido que la expresión de varios genes involucrados en las respuestas inmunes e inflamatorias es reguladas a nivel transcripcional por el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).<sup>(4)</sup>

NF- $\kappa$ B existe dentro del citoplasma en una forma activa asociado con proteínas regulatorias, llamadas inhibidores de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B); tras la estimulación por varias señales intracelulares, incluyendo LPS, la cinasa I $\kappa$ B (IKK) fosforila I $\kappa$ B, induciendo su ubiquitinización y subsecuente degradación. Los mecanismos moleculares de la activación de NF- $\kappa$ B implican una activación de la cascada de proteínas citoplásmicas y la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B donde NF- $\kappa$ B es posteriormente traslocada al núcleo donde facilita la transcripción de varios genes, incluyendo citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores antiapoptóticos.<sup>(8)</sup>

**AP-1** (proteína activadora-1) se refiere a los factores de transcripción compuestos por Jun, Fos o subunidades de ATF que se unen a un común, sitio de unión de DNA de AP-1.

La activación de AP-1 es inducida a través de la fosforilación por las MAP cinasas como JNK y ERK, respectivamente, que estas son activadas por medio de TLR o IL-1R. Ligando de TLR4 LPS y varios ligandos de TLR2 rápidamente activando JNK conzas, las cuales son seguidas por la activación del factor de transcripción AP-1. No solo infecciones bacterianas sino también virales o de darna inducen la cinasa JNK, llevando a la estimulación de AP-1.

<sup>(33)</sup>

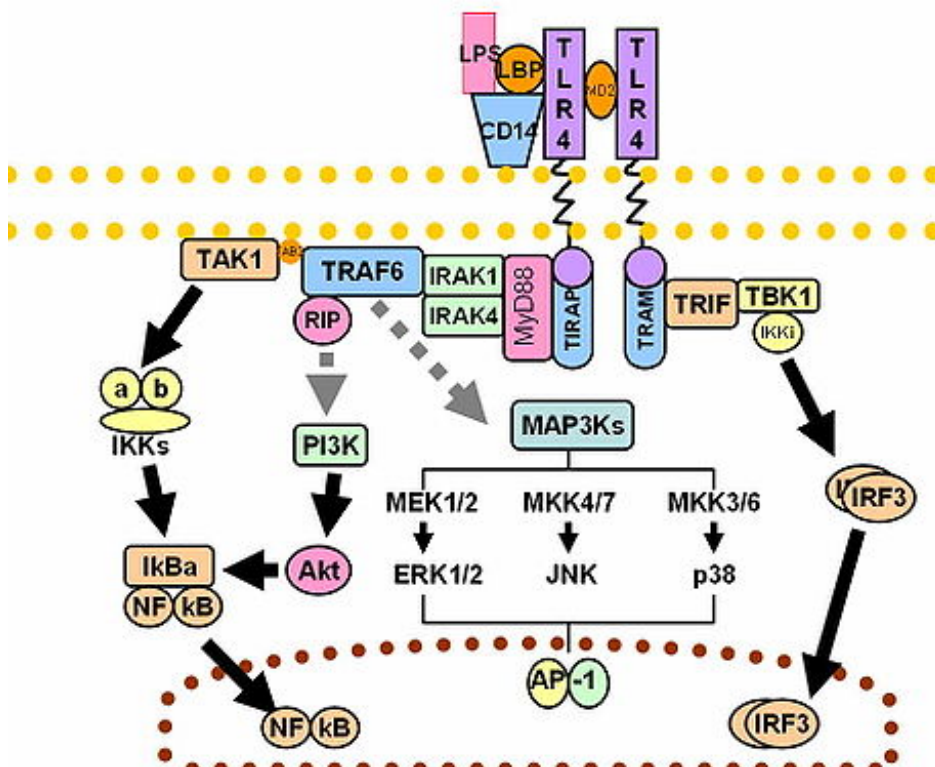


Fig 24: Vía de las MAP cinasas. Vía de señalización de las MAP cinasas a través del receptor tipo Toll 4. (signalwayantibody.com)

## 5.20. Riesgos para el hueso con el uso de Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Aunque PGs regula la función osteoblástica y osteoclástica bajo condiciones fisiológicas, parece que AINES bajo un uso prolongado, causa de forma marginal efectos adversos sobre hueso normal.

Existe evidencia experimental que indica que los AINES convencionales no selectivos (indometacina, ibuprofeno, naproxeno y ketorolaco) tienen efectos inhibitorios en la curación de fracturas de huesos largos y de fusión espinal.

Se ha observado que los AINES selectivos (celecoxib, rofecoxib, parecoxib) afectan la reparación de la formación ósea en humanos.

Existen modelos experimentales que muestran efectos perjudiciales por el uso de AINES selectivos sobre la formación de la reparación ósea, por el uso de altas dosis en periodos largos considerando su uso clínico por control intraoperatorio de dolor agudo.

No obstante el uso a largo plazo de estas drogas para controlar el dolor crónico asociado con desordenes musculoesqueléticos, osteoartritis etc, permanece necesario en la práctica clínica médica. (22)

### 5.20.1. Riesgos en el uso de AINES en odontología clínica

Los metabolitos del ácido araquidónico son reconocidos como importantes mediadores pro-inflamatorios de la resorción ósea en la enfermedad periodontal.

Existen serios efectos secundarios de inhibidores selectivos de COX2 y se debe de evitar su uso como adyuvantes en la terapia periodontal.

Existe un efecto perjudicial en los AINES sobre la curación del hueso alveolar, existiendo un retraso en la formación ósea. (22)

Las tradicionales drogas antiinflamatorias no esteroideas como la aspirina, naproxeno e indometacina inhiben la actividad de ciclooxigenasa 2 y ciclooxigenasa 1 y poseen adversos efectos secundarios que incluyen citotoxicidad gastrointestinal. (17)

Los efectos secundarios no deseados de drogas antiinflamatorias tradicionales no esteroideas, como daño en la mucosa gástrica y sangrado gastrointestinal, son resultado de la inhibición de ciclooxigenasa 1, mientras que efectos terapéuticos antiinflamatorios y antitumorales implican la inhibición de ciclooxigenasa 2. (141)

La combinada inhibición de tanto ciclooxigenasa 1 y 2 es responsable del desarrollo de úlceras gástricas seguida de la administración de drogas antiinflamatorias no esteroideas. (144) Así mismo existen inhibidores selectivos de ciclooxigenasa 2 como rofecoxib, el cual se ha observado que incrementa el riesgo de ataque al corazón y muerte súbita cardíaca después de un largo periodo de consumo. (55)

Aunque PGs regula la función osteoblástica y osteoclastica bajo condiciones fisiológicas, parece que los AINES bajo un uso prolongado, causa de forma marginal efectos adversos sobre hueso normal.(22)

## 5.21. Miricetina

Miricetina (3, 5, 7,3',4',5'-hexahidroxi flavona) es un flavonol de origen natural con grupos hidroxilo en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'.(3)

Su presencia en la naturaleza se extiende entre plantas, como el té, las bayas, frutas como cerezas, uvas; verduras, hierbas medicinales y vino.

La miricetina se encuentra en frutas y vegetales en su mayoría en forma de glucosídicos en lugar de aglicones libres, y su contenido en las bayas aumenta considerablemente a medida que los frutos maduran.

Parte de lo que se consume de miricetina es absorbido en el tracto gastrointestinal mientras que el resto es metabolizado por la microflora gastrointestinal.

El hígado es principalmente responsable por el metabolismo de la miricetina absorbida, con la pared intestinal y el riñón como los sitios secundarios.

El mayor metabolito involucrado en el metabolismo de la miricetina ha sido identificado como 3,5-ácido dihidroxifenilacético el cual es excretado por la

orina. (1)

La actividad de miricetina depende mucho de su estructura química. (2)

El potencial terapéutico de la miricetina, incluye su uso como un potente antioxidante, prooxidantes, antiinflamatorio, antitumorales, agente anticarcinogénico, y en la prevención de agregación plaquetaria, antimutágeno, aunque este ha sido mostrado como un promotor de mutagénesis.

La miricetina naturalmente actúa a nivel citoquímico, y es un potente promotor anticancer. (1, 112)

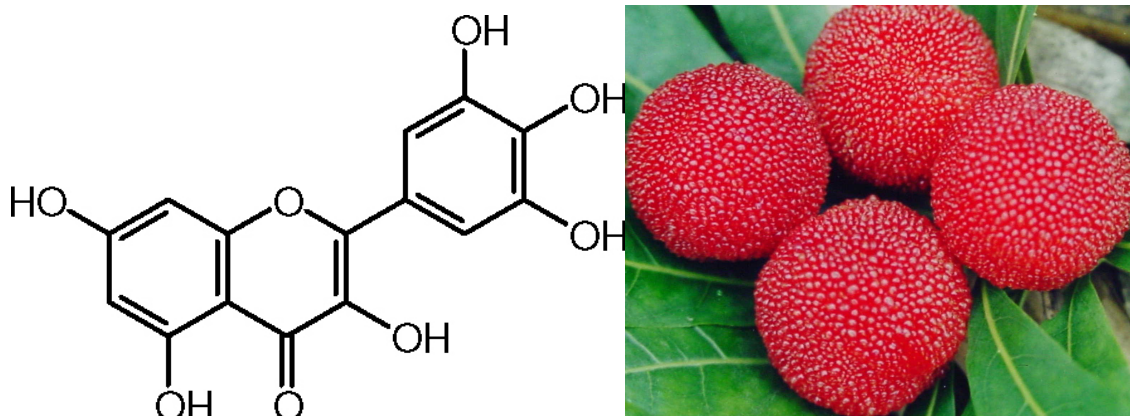


Fig 25: **Miricetina**. Estructura química de la miricetina; la miricetina se encuentra en diferentes frutos como bayas. (scielo.br)

### 5.21.1. Propiedades Antioxidantes

Entre sus aplicaciones medicas, el papel de miricetina como antioxidante tiene una gran relevancia. Se ha encontrado que miricetina es efectiva en la eliminación de los radicales libres generados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos. (1)

El número, posición y sustitución de caracteres son esenciales para sus propiedades antioxidantes, y más importante es la posición y el grado de hidroxilación. (2)

Miricetina tiene los grupos 3',4'-di-OH en el anillo B (catecol) los cuales tienen una significativa y fuerte actividad sobre las especies reactivas de oxígeno, siendo de gran importancia la presencia del grupo catecol para formar dímeros. (8)

Malonaldeído (MDA) es producido cuando los lípidos sufren peroxidación, es una especie reactiva de oxígeno que se encuentra de manera natural e las especies reactivas de oxígeno. (1)

Miricetina inhibe la formación de MDA del ácido araquidónico en microsomas en el hígado e inhibe la formación de MDA estimulada por ascorbato en lípidos hepáticos. También inhibe eficazmente ascorbato y sulfato ferroso, induciendo peroxidación lipídica en mitocondrias de rata.



Así mismo miricetina reduce la oxidación por peróxido de hidrógeno en neuronas cerebrales y el incremento en la oxidación inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Miricetina ha mostrado ser efectivo en la eliminación de aniones superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ) generados por el sistema fenazin metosulfato NADH y radical hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) generado por fotólisis ultravioleta por peróxido de hidrogeno.

Miricetina tiene la capacidad de inhibir la actividad xantina oxidasa elemento importante en la producción de daño hepático.

Así estas propiedades antioxidantes han sido atribuidas debido a su capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno.

Miricetina también ha mostrado inhibir la actividad lipooxigenasa, enzima que catalizan radicales libre de peroxidación del ácido araquidónico, así mismo también se ha encontrado que tiene un efecto sobre la actividad de ciclooxigenasa. Por lo tanto miricetina bloquea lipooxigenasa y ciclooxigenasa, teniendo efectos antiinflamatorios en la reducción del edema.

Existe una relación en la actividad estructura de los flavonoides y esta muestra que las polihroxilaciones sobre los anillos A y B, un doble enlace 2,3 y una sustitución libre 3 hidroxilos, así como el enlace 4-ceto, son esenciales para la actividad antiperoxidante de la miricetina.

Miricetina actúa como un inhibidor de la rotura de la cadena lipídica de peroxidación lipídica por la eliminación de peroxil intermedio y radicales alcoxyl que son producidas durante el proceso de peroxidación.<sup>(1)</sup>

El estatus redox de las células afecta la expresión génica. Los flavonoides como antioxidantes naturales eficientemente regulan este estatus y juegan un papel en la regulación de la inducción en la expresión génica de mediadores de la inflamación.

Miricetina hidroxiflavona la cual presenta una fuerte actividad antioxidante produce una disminución significativa en la expresión de IL-1 $\beta$  en RNAm, indicando que esta hidroxiflavona puede regular la expresión génica de IL-1 $\beta$  en macrófagos por inhibición vía transcripción génica. <sup>(2)</sup>

### 5.21.2. Efecto en la degradación del DNA

Miricetina induce a la degradación del DNA, el cual es favorecido por la presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ .

Miricetina forma un complejo de transferencia de carga con Cu, y la degradación del DNA esta correlacionada con el índice de disminución de este complejo.

Aumenta el daño al DNA cuando antioxidantes como catalasa o superóxido dismutasa son adicionados con miricetina.

También se ha mostrado que el daño esta correlacionado con la capacidad del polifenol de generar especies reactivas de oxigeno. Debido a que los polifenoles son capaces de reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , la inducción de la degradación del DNA es en vez atribuida a su capacidad de reducir,  $\text{Fe}^{3+}$  a

Fe<sup>2+</sup>, permitiendo formar un complejo con el oxígeno y atacar el DNA.

La adición de altas concentraciones de miricetina disminuye el índice de daño de DNA; posiblemente debido a la capacidad de este flavonoide de unirse al hierro, caracterizando a los compuestos polifenólicos como compuestos quelantes de hierro.<sup>(1)</sup>

### 5.21.3. Anticarcinogénico

Otra aplicación farmacológica de la miricetina es en el área de la carcinogénesis.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos producen metabolitos altamente carcinogénicos, como el metabolito benzopirano los cuales son conocidos como causantes de cáncer de piel y pulmones.

Miricetina reduce el riesgo de tumorigenicidad inducida por hidrocarburos aromáticos policíclicos inhibiendo citocromo epidermal P-450 dependiente de monooxigenasa y el metabolismo de benzopirano, sugiriendo que es capaz de inhibir los efectos carcinogénicos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la piel.

La aplicación tópica de miricetina grandemente disminuye aril hidrocarbono hidroxilasa epidermalmente y provee una significativa protección contra tumorigenicidad en la piel.

Además la miricetina retrasa el comienzo y el subsecuente desarrollo de tumores de piel al utilizar agentes iniciantes promotores de tumor.

Miricetina inhibe la hidroxilación de benzopirano en microsomas de hígado humano.

La administración intraperitoneal de miricetina causa inhibición de la producción de tumores pulmonares su, aplicación tópica inhibe la unión de benzo pirano a DNA. La formación de este compuesto penetra en la epidermis y en los pulmones.<sup>(1)</sup>

Miricetina inhibe la unión de benzo pirano de hidrocarburos aromáticos policíclicos que causan daño al DNA, lo cual es esencial para promover el cáncer.

Así mismo miricetina ha demostrado inhibir la mutagénesis inducida por varios mutágenos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos.<sup>(1)</sup>

Varios estudios muestran que miricetina fuertemente inhibe la proliferación de células neoplásicas por una inhibición directa de las MAPK. <sup>(112)</sup>

### 5.21.4. Antiviral

Miricetina tiene un gran potencial como agente antiviral, esta implicado por su capacidad de inhibir la transcriptasa reversa del virus de leucemia murino así como el virus de inmunodeficiencia humana. Funciona como inhibidor competitivo de la transcriptasa reversa de virus de leucemia murino Rauscher con respecto al primer de la hebra templado; así mismo muestra una inhibición no competitiva con respecto al sustrato trifosfato dTTP para ambas

transcriptasas reversas.

Estudios comparativos con otros flavonoides revelan que el doble enlace en la posición 2,3 y los cinco grupos hidroxilo en las posiciones 3, 4', 5, and 7 son esenciales para la capacidad de miricetina en inhibir la actividad transacriptasa reversa.

El análisis de la relación estructura-actividad de los flavonoides revela que los grupos libres hidroxilos en las posiciones 3,4' favorecen la inhibición de la transacriptasa reversa.(2)

### 5.21.5. Efecto en la inhibición de la replicación y la reparación del DNA/RNA

La miricetina puede afectar al RNA y DNA polimerasas, siendo un potente inhibidor de DNA polimerasa  $\alpha$  y  $\gamma$ , así como RNA polimerasas.

Se ha observado que en DNA polimerasas de *E. Coli*, miricetina compite con el primer de la hebra templado, inhibiendo de esta manera las DNA polimerasas, la inhibición de RNA polimerasa de *E. Coli* por miricetina es atribuida a su competencia con el sustrato trifosfato GTP, mientras esta compite con la hebra templada de DNA en su inhibición con RNA polimerasa. La inhibición de la DNA polimerasa puede perjudicar la reparación del DNA, de esta manera resultando en un daño al DNA y muerte celular.

La inclusión de miricetina coincubada con dimetilnitrosamina (la cual causa un daño al DNA en estadios tempranos produciendo muerte celular) la incrementa induciendo daño al DNA y muerte celular, aunque por si misma miricetina no causa daño al DNA o muerte celular.

Miricetina ha mostrado disminuir la acción e inducción de topoisomerasas tipo II de mamíferos *in vitro*. Causando un relajamiento del DNA doble y promueve la regulación enzimática en un sitio específico para la rotura del DNA, por lo tanto miricetina inhibe la actividad de topoisomerasas I y II.

Un estudio comparativo con otros flavonoides indica que los grupos hidroxilo en las posiciones 3,3',4', un doble enlace en las posiciones 2,3, y un grupo ceto en la posición 4 son esenciales para la acción inhibitoria. La presencia de un grupo hidroxilo en el anillo B puede favorecer los efectos inhibitorios sobre las topoisomerasas I.(2)

### 5.21.6. Antitrombótico

Miricetina tiene un gran potencial como agente antitrombótico que surge de sus efectos antiagregatorios sobre las plaquetas sanguíneas tanto *in vitro* como *in vivo*.

En estudios *in vitro* se demuestra que miricetina es capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducido por el ácido araquidónico, colágeno o adenosina difosfato, así como la disgregación de trombos plaquetarios.(113)

El mecanismo por el cual miricetina ejerce sus efectos antiagregatorios no es completamente entendida, aunque se ha sugerido que la modificación del

metabolismo de AMP cíclico de las plaquetas es a través de la inhibición de fosfodiesterasa así como la inhibición de la formación de tromboxanos B<sub>2</sub> podrían ser los mecanismos probables. (114)

### 5.21.7. Antiarterioesclerótico

Se ha observado que miricetina actúa en la prevención de lesiones arterioescleróticas debido a que es un potente inhibidor de modificaciones oxidativas de LDL por macrófagos, ya que la modificación oxidativa de la lipoproteína de baja densidad (LDL) por macrófagos y otros tipos celulares incrementa el consumo de LDL en macrófagos, de esta manera resulta en la formación de células cargadas de colesterol en lesiones ateroscleróticas.

Miricetina conserva  $\alpha$ -tocoferol (antioxidante endógeno en LDL) contenido en LDL, el cual es rápidamente disminuido durante la modificación de LDL por macrófagos.

El incremento en contenido de LDL peróxido de hidrogeno que acompaña la disminución de  $\alpha$ -tocoferol durante la modificación oxidativa es suprimida por miricetina. (115)

Miricetina beneficia en lesiones arterioescleróticas, esto gira alrededor de la formación de células espumosas, la cual es prevenida a través de la inhibición de la oxidación de LDL la cual potencialmente promueve la formación de células espumosas por modificación de LDL, causando un incremento en el consumo de LDL por macrófagos.

Así mismo también se ha reportado que el consumo de miricetina y otros flavonoides reduce el riesgo de enfermedades coronarias de corazón. (116)

### 5.21.8. Antidiabético

Miricetina puede prevenir las cataratas que se observan en pacientes con diabetes por inhibición de aldosa reductasa.

También es capaz de estimular la lipogénesis y favorece la estimulación de la insulina en la lipogénesis en adipocitos.

Además favorece el consumo de glucosa en adipocitos., así mismo este polifenol no tiene un efecto sobre la función del receptor de insulina o la translocación de transportadores de glucosa GLUT4. (117)

Miricetina incrementa la fluidez en regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en membrana plasmática de adipocitos. Así mismo se han encontrado efectos de miricetina sobre el metabolismo de glucosa en animales diabéticos, donde se indica que miricetina posee efectos hipoglicémicos, así como efectos hipogliceridémicos en animales diabéticos y tiene de esta manera un gran valor terapéutico. (118)

### 5.21.9. Antiinflamatorio

Miricetina muestra una variedad de actividades biológicas, entre otras posee

propiedades antiinflamatorias como resultado de la disminución de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies de nitrógeno, prostaglandinas y leucotrienos.

Se sabe que el estado redox de las células afecta la expresión génica, miricetina regula eficientemente este estado y juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes de mediadores de la inflamación. La citocina inflamatoria clave es IL-1 $\beta$ , la cual es producida después de la estimulación de macrófagos y otros tipos celulares por casi todos los agentes infecciosos, IL-1 $\beta$  induce varios genes asociados con inflamación y destrucción de tejidos. Existe un incremento de niveles de IL-1 $\beta$  en el plasma durante la sepsis de bacterias gram negativas, contribuyendo a la muerte celular. (2)

La adición de un grupo OH en la posición 5' del anillo B elimina la actividad biológica de TNF- $\alpha$  e IL-6 en células endoteliales vasculares.(4)

### 5.21.10. Otros efectos terapéuticos

Otros beneficios farmacológicos de miricetina incluyen su uso en el tratamiento de gota y diarrea, así como agente antimicrobiano. Miricetina ha mostrado ser uno de los componentes de *Eugeia uniflora*, una hierba usada tradicionalmente para el tratamiento de la gota. (1, 119)

Se ha reportado también que miricetina inhibe la actividad de IKK y previene la degradación de I $\kappa$ B en células endoteliales. (2, 120)

Miricetina inhibe la acumulación intraluminal del fluido y diarrea inducida por aceite de castor, esto también demuestra propiedades antimicrobianas contra diferentes cepas bacterianas. (1) Es potencialmente terapéutico y beneficioso en enfermedades cardiovasculares y de diabetes mellitus. (112)

### 5.21.11. Efecto de miricetina en la enfermedad periodontal

Diversas plantas han mostrado servir como fuentes de un número diverso de agentes antimicrobianos, aunque pocos reportes están disponibles con respecto a su actividad contra los patógenos orales. (122, 3)

Entre estos, la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias cariogénicas ha sido mayormente investigado y se ha prestado menos atención a la actividad biológica contra patógenos periodontales comunes.(121, 3)

Se ha observado que *Syzygium aromaticum* (clavo), comúnmente usado en odontología clínica para terapia del conducto radicular y obturaciones temporales, la cual contiene miricetina, muestra una actividad antimicrobiana contra bacterias orales que están comúnmente asociadas con caries dental y enfermedad periodontal, de esta manera inhiben el crecimiento contra patógenos orales periodontales anaerobios Gram-negativos incluyendo *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* así como bacterias gram positivas como *Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus*; la actividad

antibacterial de miricetina demuestra ser un potente inhibidor del crecimiento de estos patógenos orales. (121, 3)

Así mismo se ha observado que miricetina posee actividad antimicrobiana contra patógenos orales con actividad preferencial contra bacterias anaerobias Gram-negativas frecuentemente asociadas con la periodontitis. Los componentes antimicrobianos de extractos de miricetina actúan como agentes naturales antiplaca y anti gingivitis. (3)

Tambiéne se ha mostrado una mínima actividad contra la bacteria oral *Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus*.

Así mismo miricetina ha mostrado tener un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. mutans*, y *A. viscosus*

Miricetina demuestra tener una fuerte actividad inhibitoria contra bacterias periodontales, sugiriendo que el grupo hidroxilo libre en la posición C-7 en el anillo A contribuye significativamente a la actividad antimicrobial de este flavonoide estructuralmente relacionado. La ausencia del doble enlace en la posición c-2 en el anillo C esta relacionado a la actividad antimicrobiana en patógenos periodontales.

Miricetina tiene un efecto antibacterial y inhibiendo el crecimiento bacteriano de *S. sobrinus* y *S. mutans*.

Miricetina de *Artemisia capillaris* es capaz de inhibir la actividad glucosiltransferasa (GTF) y la adherencia de *S. mutans* a la superficie dental.

Así mismo también miricetina suprime la síntesis de glucano a partir de sacarosa por la enzima GTF de *S. mutans*.

Miricetina ha mostrado tener propiedades antifúngicas, así mismo son poco conocidos sus actividades contra bacterias orales. (123,3)

Se ha reportado el efecto de miricetina sobre la expresión de la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), involucrada en la inflamación, estimulada por el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ya que miricetina disminuye la expresión de ICAM-1, así como de la actividad I $\kappa$ B cinasa (IKK), la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , del factor nuclear KB, (NF $\kappa$ B), de la unión DNA-proteína y la actividad de luciferasa de NF $\kappa$ B.

Las proteínas cinasas como ERK, p38 y JNK involucradas en la expresión de RNAm de c-fos, y c-jun, así como la actividad transcripcional de AP-1 son inhibidos o disminuidos por miricetina sobre la expresión de ICAM-1.

La relación estructura actividad tiene un rol de importancia en el grupo OH en las posiciones 5 y 7 del anillo A y la posición 4 del anillo B. (4)

## 5.22. Fisetina

Fisetina (3,3',4',7-tetrahidroxiflavona) es un flavonoide que se encuentra principalmente en el árbol del humo (*Cotinus coggygria*) y es también ampliamente distribuida en frutas (fresas, mango, sandía, manzanas y uvas) y vegetales (cebollas, y pepino). (124)

Después de la absorción *in vivo* fisetina es extensivamente metabolizado en

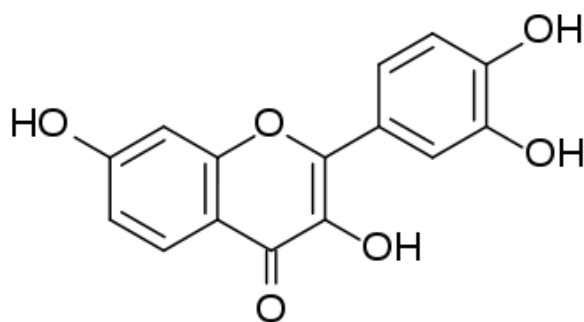
varios órganos como el intestino delgado y el hígado, resultando en la formación de derivados sulfatados, glucoronidados y metilados.

Después de la absorción del tracto gastrointestinal y subsecuente metabolismo, fisetina o sus metabolitos son distribuidos a través del cuerpo y están presentes en grandes cantidades en los tejidos.<sup>(14)</sup>

Fisetina posee los grupos OH en 3'- y 4'-OH en el anillo B (anillo catecol), presenta acción antioxidante, la cual representa protección de tejidos contra la acción de radicales libres y disminución de la peroxidación de lípidos. Sin embargo fisetina no es exclusivamente antioxidante, ya que ha mostrado tener significativos efectos protectores. <sup>(5)</sup>

Fisetina es un flavonoide natural conocido como inhibidor de la proliferación, carcinogénesis e inflamación, así mismo presenta efectos neuroprotectores, antialérgicos y antiangiogénicos.<sup>(6, 124)</sup>

Sin embargo hay que tener en cuenta los efectos potencialmente tóxicos de fisetina a dosis altas ya que de esta manera estos compuestos pueden actuar como mutágenos <sup>(6)</sup> prooxidantes con generación de radicales libres, y como inhibidores de enzimas involucradas en el metabolismo energético y acciones hormonales. <sup>(5)</sup>



**Fig 26: Fisetina.** Estructura química de la fisetina; la fisetina se encuentra en diferentes frutos como en fresas. (es.wikipedia.org)

### 5.22.1. Propiedades de oxidación

Fisetina reduce la relación de lactato a piruvato, el cual es un indicador de citosólico y mitocondrial NADH a NAD. Fisetina cambia el radio citosólico de NADH a NAD<sup>+</sup> debido a que este causa la oxidación de NADH, afectando el radio mitocondrial de NADH a NAD<sup>+</sup>. <sup>(125)</sup>

El origen de este fenómeno es la oxidación de NADH en consecuencia de la interacción de este flavonoide con enzimas celulares como peroxidasas.

El hígado posee sistemas enzimáticos capaces de producir radicales libres de compuestos polifenólicos como fisetina. <sup>(126)</sup>

La fisetina tiene la capacidad de regular el metabolismo energético del hígado y el radio mitocondrial de NADH a NAD<sup>+</sup>.

El cambio en el radio de NADH a NAD<sup>+</sup> es debido al mecanismo por el cual fisetina reduce la producción de cuerpos cetónicos de ácidos grasos

endógenos.

Fisetina tiene un efecto de desacoplamiento sobre la fosforilación oxidativa indicada por sus efectos sobre la respiración mitocondrial y la actividad ATPasa, una disminución en la proporción del control respiratorio, y un incremento en la hidrólisis de ATP en la mitocondria. (127)

La disminución en la relación ADP con los sustratos FAD y NAD<sup>+</sup> y los efectos de fisetina sobre la actividad ATPasa hace que este flavonoide pueda actuar como un inhibidor directo de ATP-sintasa; además posee efectos sobre las actividades enzimáticas de la membrana, donde fisetina inhibe la actividad oxidasa NADH. También tiene la capacidad de autooxidación, generando O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mitocondria. (5)

### 5.22.2. Antioxidante

Los efectos antioxidantes de este flavonol están relacionados con su estructura; se ha observado que fisetina tiene propiedades de captación de radicales libres.

La donación del Hidrógeno, indica la presencia de una fracción 3',4'-catecol en el anillo B correlacionado con alta actividad. El grupo 4'-OH en el anillo B sugiere ser importante para la reducción de xantina/xantina oxidasa la cual genera superóxido mientras un adicional grupo OH en los sitios (3' o 5') atenúa el efecto como la potencia inhibitoria mencionada, esto es debido al papel del grupo 4-ceto, la región 5-OH en Fe<sup>++</sup> quelante y el efecto negativo del grupo pirogalol en el anillo B.

Así mismo presenta actividad inhibitoria contra N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (f-MLP) estimulada por estallido oxidativo en neutrófilos polimorfonucleares (PMN).

La peculiaridad estructural del di-OH e el anillo B le da la potencia como inhibidor de especies reactivas de oxígeno. La capacidad que tiene la estructura para eliminar la actividad de los radicales libres depende del tipo de radical libre. Se ha sugerido que estos flavonoles, los cuales tienen 3-oh, son los más fuertes antioxidantes entre los flavonoides. (8)

### 5.22.3. Anticarcinogénico

Ha sido propuesto el uso de fisetina en el tratamiento del cáncer y esta requiere concentraciones de plasma entre 10 and 120 μM debido a que este es el rango por el cual existen los más fuertes efectos inhibitorios en el crecimiento de tumores.

Así mismo fisetina puede reducir la proporción de NADH/NAD<sup>+</sup> hepático, y de esta manera tener efectos antitumorales, y en humanos las concentraciones requeridas para ello se obtienen por administración endovenosa.

Fisetina es capaz de inducir un estado de mayor oxidación en las células hepáticas y afectar el metabolismo energético, sin embargo los efectos prooxidantes de fisetina en el hígado, están posiblemente combinados con



otros efectos como la inhibición de la gluconeogénesis. (128) Su actividad prooxidante es ventajosa cuando las propiedades de inducción anticancerígenas y de apoptosis de fisetina se consideran, ya que las especies reactivas de oxígeno pueden regular la fragmentación apoptótica del DNA. (5) Se ha encontrado que el tratamiento de la sobreexpresión de COX2 en células humanas de cáncer de colon con fisetina a dosis altas produce la inducción de apoptosis, de esta manera produce una regulación negativa de la expresión proteica de COX2 sin la afectación de COX1 y la inhibición de la secreción de prostaglandina E2.

Por otro lado se ha mostrado que el tratamiento de células con fisetina también inhibe la actividad de las vías de señalización a través de la regulación negativa de  $\beta$ -catenina y la disminución de la expresión de genes diana como ciclina d1 y la matriz metaloproteinasas 7.

También se ha observado que fisetina también inhibe la activación de EGFR, por lo tanto fisetina puede inducir apoptosis y suprime el crecimiento de células de cáncer de colon por inhibición de COX2 y las vías de señalización Wnt/EGFR/NF- $\kappa$ B, sugiriendo de esta manera que fisetina puede usarse como agente para la prevención y tratamiento de cáncer de colon funcionando como quimiopreventivo y quimioterapéutico.(7) Así mismo fisetina mantiene a células en la fase G<sub>1</sub>, disminuyendo ciclinas D1, D2, E, CDK-2, CDK-4, y CDK-6, e inhibe metástasis a través de inhibir la fosforilación de las MAPKs.(12)

#### 5.22.4. Antiinflamatorio

Fisetina reduce significativamente la producción de óxido nítrico (NO) y también inhibe la expresión de mediadores proinflamatorios como el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) así como ciclooxigenasa 2 (COX 2) en niveles proteicos y de RNAm en macrófagos estimulados con LPS.(6) Así mismo fisetina inhibe la liberación de PGE<sub>2</sub>, otro mediador de la inflamación en la activación de macrófagos. (8)

Fisetina reduce la secreción de citocinas proinflamatorias ante la estimulación con LPS como interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Por lo tanto fisetina suprime la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), y la fosforilación de la cinasa c-jun terminal (JNK) en diferentes tipos celulares como macrófagos estimulados con LPS. (6,8)

También tiene actividad antiinflamatoria vía inactivación de JNK y NF- $\kappa$ B en estas células.

Se ha observado que además de la atenuación de la activación de NF- $\kappa$ B, este compuesto polifenólico puede ejercer su actividad antiinflamatoria por inhibición de la fosforilación de ERK1/2 o la activación de JAK/ STAT-1 por la directa interrupción de la unión de LPS a los receptores tipo Toll. (8)

En modelo murino se ha mostrado el efecto antiinflamatorio que ejerce fisetina durante la inflamación aguda pulmonar inducida por LPS.

También se ha observado que fisetina bloquea el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) la cual induce desordenes inflamatorios por la reducción de IL-8 que

promueve la activación en células embrionarias de hígado.

Se ha observado que fisetina inhibe la inflamación relacionada con citocinas y factores angiogénicos en artritis reumatoide en fibroblastos de células sinoviales.

De esta manera fisetina muestra tener un gran potencial antiinflamatorio (6)

Fisetina también inhibe la expresión génica de interleucina (IL)-1 $\beta$  a niveles proteicos y de RNAm, e inhibe la producción de IL-1, e IL-4 en mastocitos humanos. (9)

Fisetina puede proteger contra la progresión de enfermedades inflamatorias por la limitación de las interacciones entre mastocitos y células T activadas.(11)

La actividad antiinflamatoria de fisetina en modelos *in vivo* se ha observado mucho mas pronunciado comparado con los efectos observados del antiinflamatorio glucocorticoide dexametasona. (14)

### 5.22.5. Otros efectos terapéuticos

Fisetina suprime significativamente la degradación de I $\kappa$ B, y la translocación de NF- $\kappa$ B, así como la fosforilación de p38 en células de microglia estimuladas con LPS. Por lo tanto puede ser un potencial agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias.

Fisetina tiene efectos neuroprotectivos y neurotróficos, demostrando que promueve a supervivencia de células nerviosas a través de la activación de ERK; así mismo reduce también los déficits de comportamiento en accidentes cerebrovasculares y en la formación  $\beta$ -amiloide fibril. Los efectos neuroprotectivos de fisetina se correlacionan con sus propiedades antiinflamatorias. (9)

Fisetina disminuye la permeabilidad vascular y la migración leucocítica, reduce la inflamación sinovial y previene el daño al cartílago, tienen acciones antivirales , antitumorales posee efectos inhibitorios sobre la exudación proteica, migración leucocítica, permeabilidad capilar y angiogénesis. (10)

También presenta propiedades antialérgicas, debido a su presencia en cebolla, la fruta japonesa kaki (persimmon) la cual suprime la degranulación y la producción de IL4- e IL-3 en RBL-2H3 células basófilas estimuladas con IgE , de esta manera suprime la hipersensibilidad cutánea retardada, inflamación de vías aéreas y disminución del asma por inhibición de la activación de mastocitos inducidas por la activación de células T. (11)

Además se ha demostrado que es un potente inmunosupresor, ya que suprime la maduración fenotípica y funcional de células dendríticas, interfiriendo en el reclutamiento de macrófagos, mostrando su actividad inmunofarmacológica. (13)

## 6.0. Objetivo General

---

Investigar el mecanismo de acción de fisetina y miricetina sobre la activación de ciclooxigenasa 2 y la síntesis de IL-1 $\beta$  inducida por lipopolisacárido (LPS) obtenida de *P.gingivalis* en fibroblastos gingivales humanos, así como su acción sobre las diferentes MAPKs.

## 7.0. Objetivos Específicos

---

Evaluar si fisetina y miricetina presentan propiedades citotóxicas en fibroblastos gingivales humanos, observando su efecto sobre la viabilidad celular.

Evaluar cual es la dosis efectiva de miricetina y fisetina sobre la regulación de las cinasas en fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacárido.

Evaluar si miricetina y fisetina regulan la expresión de COX-2 y la síntesis de IL-1 $\beta$ , estimulada por lipopolisacárido en fibroblastos gingivales humanos.

## 8.0 Hipótesis Verdadera

---

Si los flavonoles (fisetina y miricetina) tienen un efecto regulatorio en la señalización de la vía de las MAP cinasas, y en la expresión de genes sobre COX-2 y síntesis de IL-1 $\beta$  en HGF estimulados con LPS, tendrán un efecto inhibitorio en los procesos inflamatorios y de lisis celular producidos por endotoxinas de las bacterias gram negativas responsables de la enfermedad periodontal.

## 9.0. Hipótesis Falsa

---

Si los flavonoles (fisetina y miricetina) no tienen un efecto regulatorio en la señalización de la vía de las MAP cinasas, y la expresión de genes sobre COX-2 y síntesis de IL-1 $\beta$  en HGF estimulados con LPS, entonces carecen de efecto inhibitorio en los procesos inflamatorios y de lisis celular inducidas por endotoxinas de las bacterias gram negativas responsables de la enfermedad periodontal.

## 10.0. Tipo de estudio

---

El estudio fue experimental comparativo y prospectivo.

## 11.0. Materiales y Métodos

### 11.1. Cultivo de fibroblastos gingivales humanos

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron de una muestra de tejido sano de pacientes que acuden a la clínica de exodoncia. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente y el proyecto fue sometido a consideración del comité de investigación y de ética de la Facultad de Odontología. El tejido gingival se cortó quirúrgicamente del maxilar y se lavó por 6 ocasiones con solución de Hanks (In vitrogen) suplementado con penicilina/ estreptomycin/ fungizona (In vitrogen). El tejido gingival se cortó en fragmentos de 1 a 2 mm<sup>3</sup> y se colocó en cajas con medio Eagle modificado por Dulbecco (In vitrogen) suplementado con 2mM L-glutamina (In vitrogen), penicilina / estreptomycin / fungizona (In vitrogen) 100 ug/ml, 100 µg/ml y 1 mg/ml respectivamente y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. El explante se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se le adicionó cada tercer día medio de cultivo al cultivo celular hasta que las células fueron confluentes. Los experimentos se desarrollaron con las células que se obtuvieron entre los pases 5 a 7. (132)

### 11.2. Viabilidad Celular

Se determinó la viabilidad celular utilizando el método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se colocaron 1×10<sup>4</sup> células de fibroblastos gingivales humanos en cajas petri. Después de incubar las células toda la noche se lavaron con DMEM y posteriormente se incubaron con varias concentraciones de fisetina y miricetina, incluyendo DMFA: etanol (1:1) el cual fue usado como vehículo. Después de 24 hrs de incubación se adicionaron 10 µl de MTT (5mg/ml) a cada pozo y se incubaron por otras 4 hrs a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Se descartó el sobrenadante, se adicionó 100 µl de DMFA a cada pozo para disolver los cristales de formazán. Se midió la densidad óptica (OD) del formazán fue medido a 540 nm usando un lector de placas de ELISA.(132)

### 11.3. Ensayo de Western Blot

Los fibroblastos gingivales humanos (1x10<sup>6</sup> células/pozo) se cultivaron en cajas de 6 pozos. Después del estímulo con flavonoides y LPS se aspiró el medio y las células se desprendieron ayudados con gendarme en buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio, la muestra se centrifugó a 5,000 rpm durante 10' y la pastilla se colocó con 50 µl de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio), todos estos reactivos se obtuvieron de Sigma

Chemical Co. La muestra se sonicó (1s x 30) en un baño con hielo. Para el ensayo de Western se utilizaron 50 µg de proteína que se mezclaron 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; (todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.), la muestra se cargo en un gel al 10% SDS-PAGE y se corrió a 40V por 2 h. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) 1 hr a 0.3 amperes y 5 V. Para verificar que se colocó igual concentración de proteína, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau (Sigma Chemicals Co.) las membranas se desnudaron para tratar con alguna proteína total. Posteriormente la membrana se bloqueó con 150 mM NaCl, 100mM Tris- HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de suero albúmina de bovino por 1 hr, se lavó y se incubó con el anticuerpo primario se utilizaron los siguientes anticuerpos: ERK, JNK, AKT, y p38 en sus respectivas formas fosforiladas (3:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con TBST y se incubaron durante 2 hrs con el anticuerpo secundario, anti-mouse o anti-rabbit; dependiendo de su anticuerpo primario IgG (3:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Invitrogen) y la autoradiografía se obtuvo después de exponer la película durante 2 min. Los experimentos se realizaron en 3 triplicados. Las muestras se capturaron con el sistema DigiDocit y se analizaron con el sistema digital Labs-Works.<sup>(132)</sup>

#### 11.4. RT-PCR

El RNA total se aisló de los fibroblastos gingivales usando el método de Chomczynski y Sacchi. El RNA total (1µg) fué transcrito en forma inversa (RT) usando el reactivo One Step RT-PCR (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos 5'TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT3' (sentido codificante) y AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT (Sentido anticodificante) derivado de COX-2; 5'GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG3' (Sentido codificante), y 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' (Sentido anticodificante) derivado del gene de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min. El PCR se efectuó por 35 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda sencilla para los productos de cada gene y una banda sencilla de 309 pares de bases para GADPH. La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se realizaron tres experimentos por separado de cada tratamiento.<sup>(132)</sup>

#### 11.5. Ensayo de ELISA

Para la reacción de ELISA, se utilizó el kit TiterZyme™ EIA Human IL-1β

(Assay Designs), el procedimiento se realizó de acuerdo a lo que sugiere el proveedor, puesto a que no se realizaron modificaciones.

## **12.0. Análisis Estadístico**

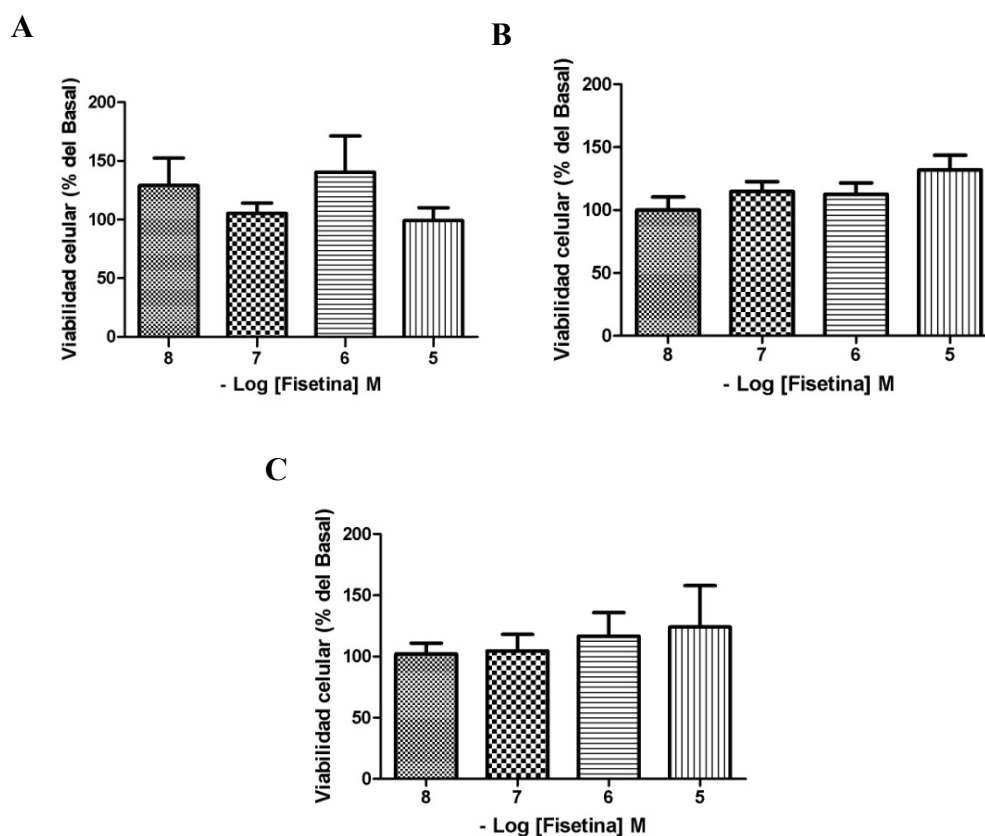
---

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

## 13.0. Resultados

### Efecto de fisetina sobre la viabilidad celular

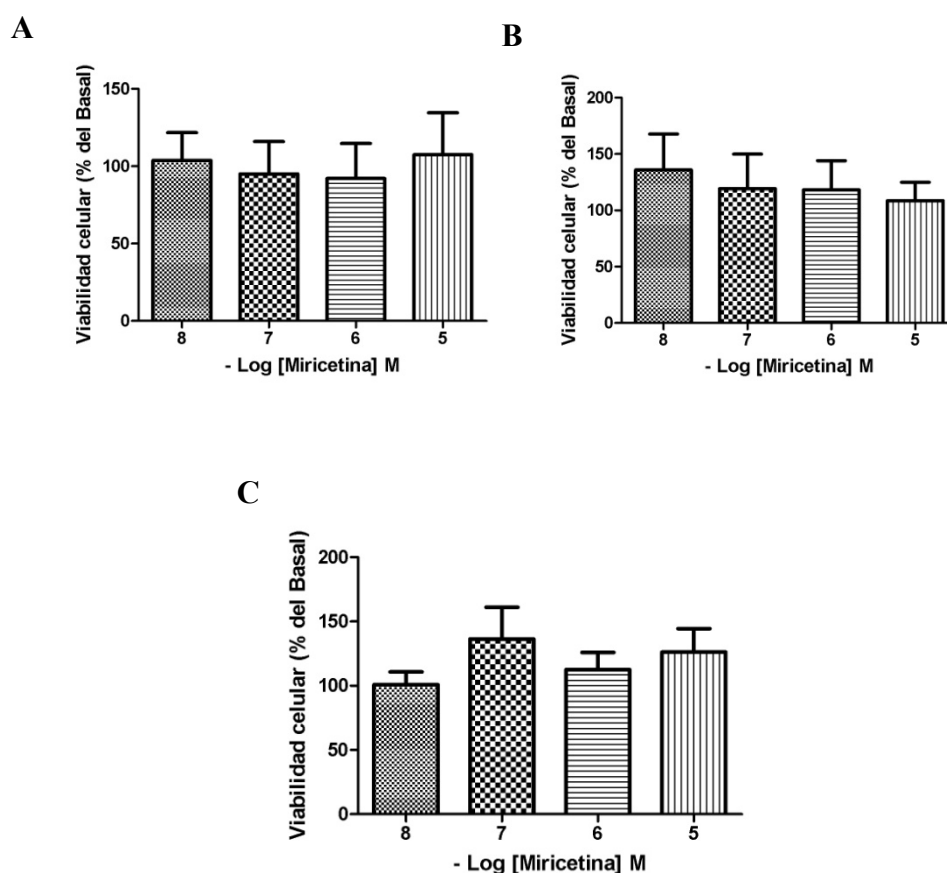
Se realizó el ensayo de viabilidad celular en fibroblastos gingivales humanos, los cuales se sembraron en cajas de 96 pozos y se trataron con diferentes concentraciones de fisetina a diferentes intervalos de tiempo, al termino se retiró el medio y se incubó por dos horas con el reactivo de MTT, posteriormente se adicionó dimetilsulfóxido y se leyó en el lector de placas a 595 nm. En estas condiciones, fisetina no mostró efectos citotóxicos en fibroblastos gingivales tanto en el tiempo como la dosis.



**Fig 27. Efecto de fisetina sobre la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos. Las células fueron incubadas a varias concentraciones de fisetina por A) 24 hrs, B) 48, C) 72 hrs, a diferentes concentraciones 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 100nM y 10nM. La viabilidad celular fue evaluada por medio del ensayo de MTT. Estos datos son la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos realizados en triplicado por medio del análisis de ANOVA \*  $\rho < 0.05$  con respecto al basal.**

## Efecto de miricetina sobre la viabilidad celular

Se realizó el ensayo de viabilidad celular en fibroblastos gingivales humanos, los cuales se sembraron en cajas de 96 pozos y se trataron con diferentes concentraciones de miricetina a diferentes intervalos de tiempo, al término se retiró el medio y se incubó por dos horas con el reactivo de MTT, posteriormente se adicionó dimetilsulfóxido y se leyó en el lector de placas a 595 nm. En estas condiciones, miricetina no mostró efectos citotóxicos en fibroblastos gingivales tanto en el tiempo como la dosis.



**Fig 28. Efecto de miricetina sobre la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos. Las células fueron incubadas a varias concentraciones de miricetina por A) 24 hrs, B) 48, C) 72 hrs, a diferentes concentraciones 10µM, 1µM, 100nM y 10nM. La viabilidad celular fue evaluada por medio del ensayo de MTT. Estos datos son la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos realizados en triplicado por medio del análisis de ANOVA\* $\rho < 0.05$  con respecto al basal.**



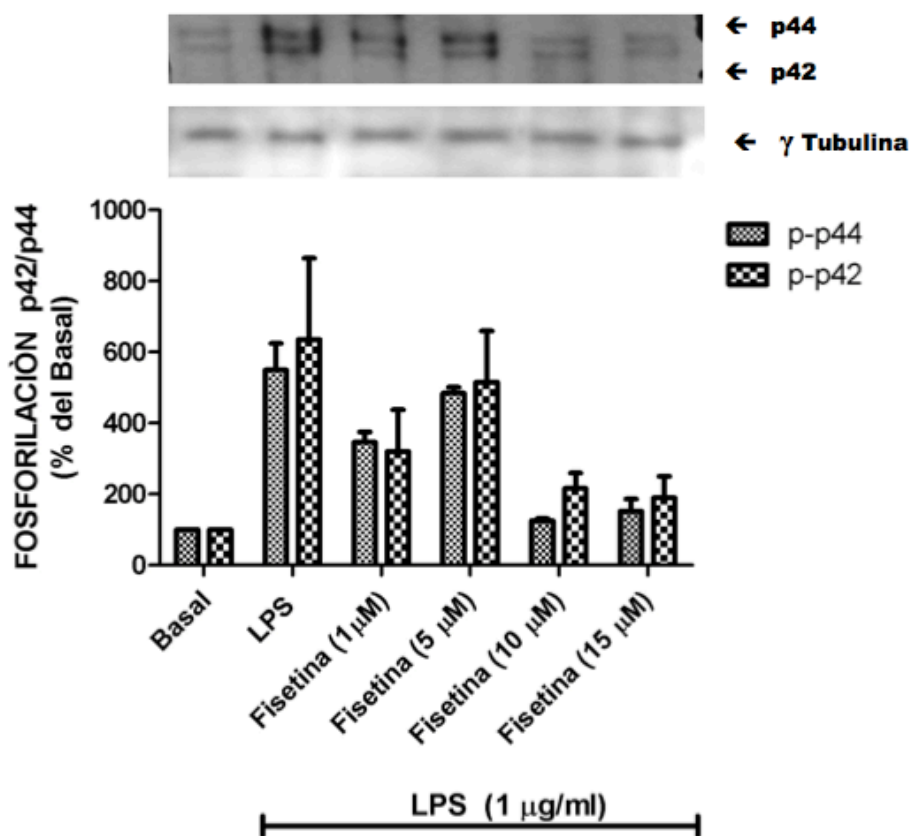
## Efecto de fisetina sobre la fosforilación de ERK 1/2

Para determinar la acción de fisetina en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS, las células se preincubaron por 30 minutos a diferentes concentraciones del flavonoide seguidas con el tratamiento de LPS.

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

Fisetina a concentraciones de 10 y 15 mM disminuyó considerablemente la fosforilación de p44 y p42 inducida por LPS.

Para verificar que se utilizó la misma cantidad de proteína la membrana fue desnudada e incubada con tubulina.



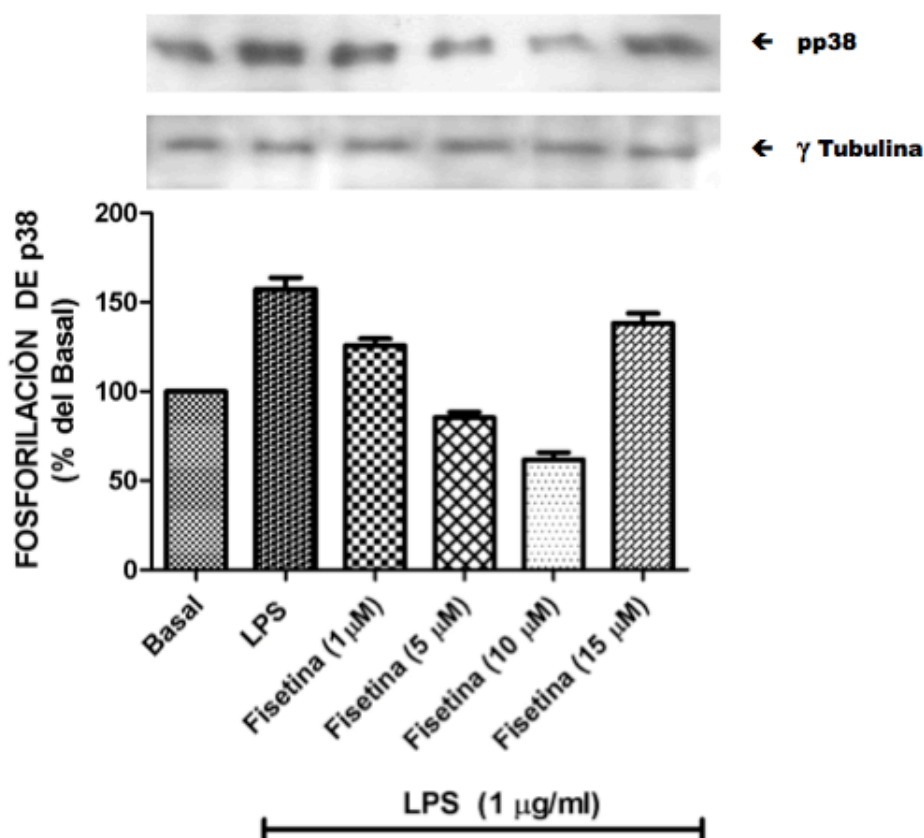
**Fig.29** El efecto de fisetina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de ERK 1/2 inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con fisetina (1, 5, 10, y 15 mM) por 30 min y posteriormente con LPS (1 µg/ml). Estas células fueron analizadas por Western Blot utilizando antifosfo ERK 1/2. Las membranas fueron desnudadas e incubadas con  $\gamma$ -Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.

## Efecto de fisetina sobre la fosforilación de p38

Se probó la capacidad de fisetina en la inhibición de la fosforilación de p38. Se expusieron los fibroblastos gingivales humanos con LPS a (1  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 15 minutos, y se colocaron diferentes concentraciones del flavonoide durante 30 minutos.

Se encontró que se produjo un incremento en la fosforilación de p38 ante la estimulación con LPS; a una concentración de 5 y 10 mM fisetina mostró una disminución en la fosforilación de p38 inducida por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humano, presentandose una mayor disminución a 10 mM.

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

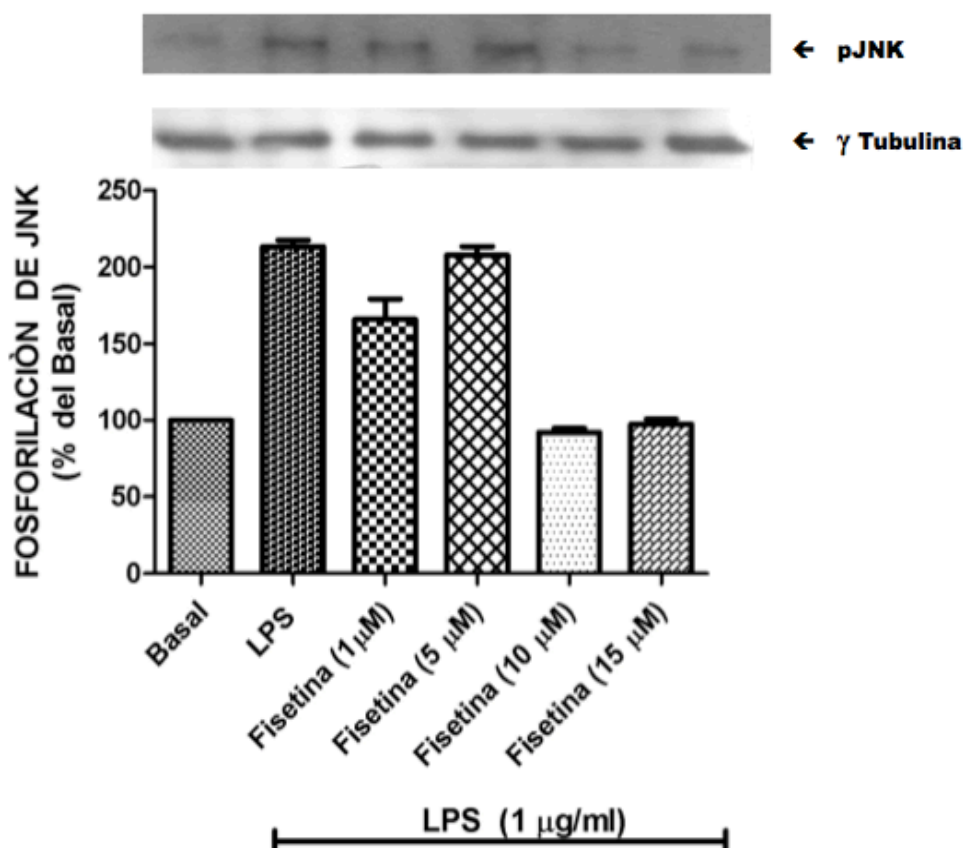


**Fig.30 El efecto de fisetina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de p38 inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con diferentes concentraciones de fisetina (1, 5, 10, y 15 mM) por 30 min y posteriormente con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Estas células fueron analizadas por Western Blot utilizando antifosfo p38. Las membranas fueron desnudadas e incubadas con  $\gamma$ -Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.**

## Efecto de fisetina sobre la fosforilación de JNK

Se estudió el efecto de fisetina sobre la fosforilación de JNK. La exposición de fibroblastos gingivales humanos (HGF) en LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 15 minutos y con las diferentes concentraciones del flavonoide durante 30 minutos, donde se observó que a concentraciones de 10 y 15 mM hubo una disminución en la fosforilación de JNK.

Para verificar que se utilizó la misma cantidad de proteína, las membranas fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos  $\gamma$ -Tubulina.



**Fig.31** El efecto de fisetina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de JNK inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con diferentes concentraciones del flavonoide (1, 5, 10, y 15 mM) por 30 min y posteriormente con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Estas células fueron analizadas por Western Blot utilizando antifosfo pJNK. Las membranas fueron desnudadas e incubadas con  $\gamma$ -Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.

## Efecto de fisetina sobre la fosforilación de AKT

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

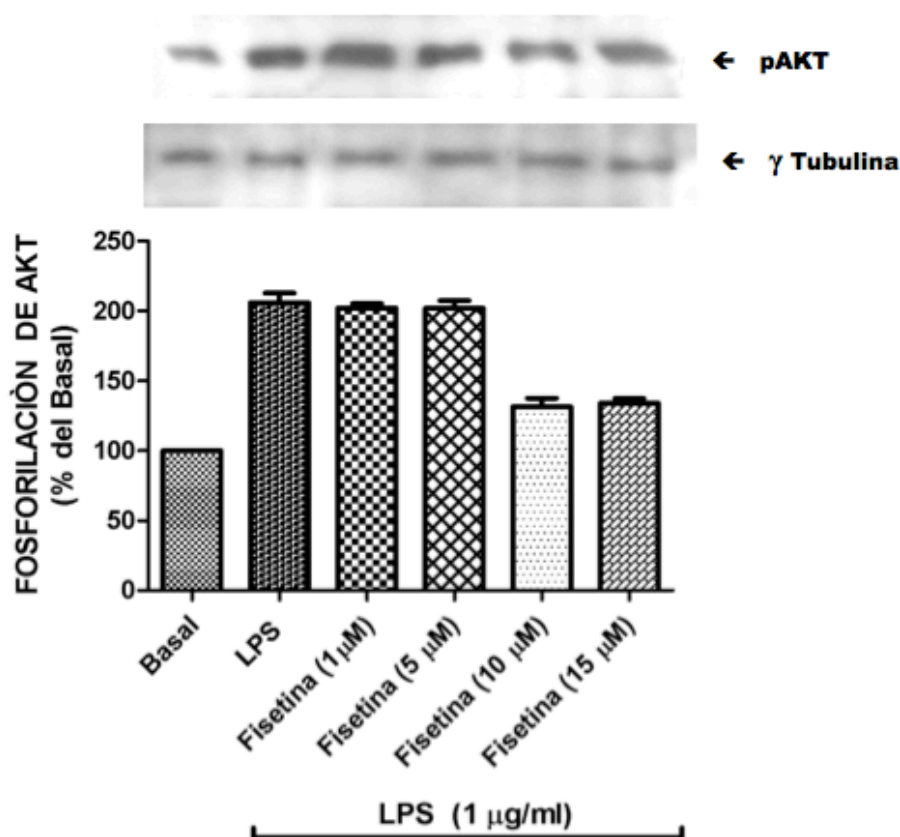
La activación de AKT se relaciona al mantenimiento de la viabilidad celular durante la liberación de mediadores inflamatorios.

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

Por medio del ensayo de Western Blot, las células se trataron a diferentes concentraciones de fisetina durante 30 minutos, posteriormente estimulada con LPS (1µg/ml) durante 15 minutos.

Se observó que a una concentración de 10 y 15 mM fisetina mostró una mayor inhibición de la activación de AKT inducida por lipopolisacárido.

Para verificar que se utilizó la misma cantidad de proteína, las membranas fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos  $\gamma$ -Tubulina.



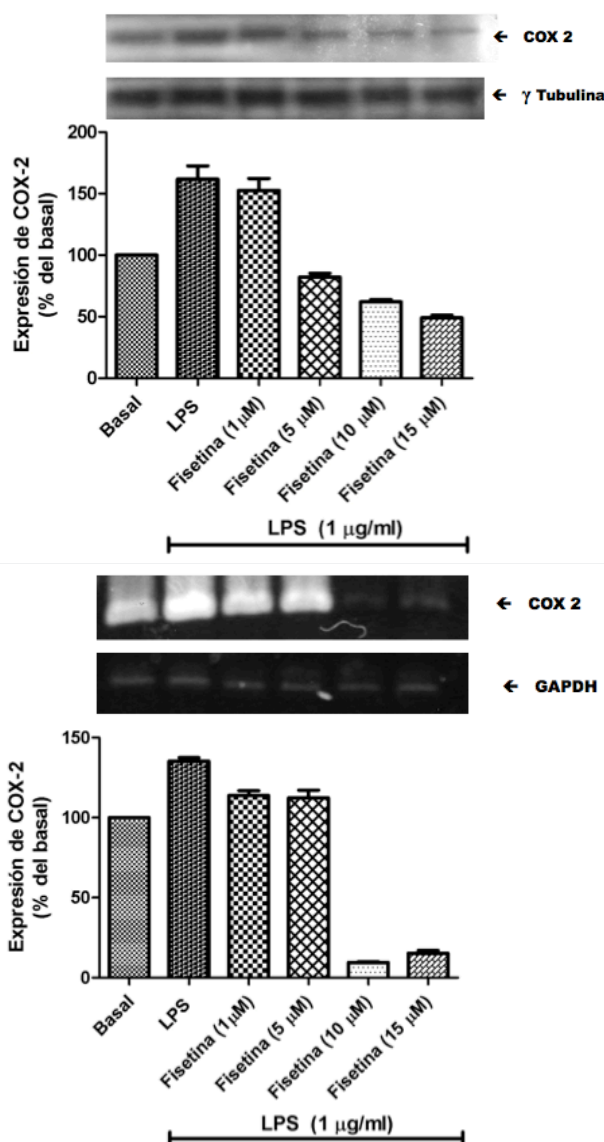
**Fig.32** Las células fueron tratadas con fisetina a (1, 5, 10, y 15 mM) durante 30 minutos y LPS (1 µg/ml) durante 15 minutos. Las membranas fueron bloqueadas e incubadas con anticuerpo pAKT. Para corroborar que se utilizó la misma cantidad de proteína fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos control. Se utilizó el ensayo de Western Blot.

## Efecto de fisetina sobre la expresión de ciclooxigenasa 2

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es una proteína que actúa como una enzima que cataliza específicamente la producción de ciertos mensajeros químicos que son las prostaglandinas. Algunos de estos mensajeros son responsables de promover la inflamación, las cuales juegan un papel importante en el proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal.

Así mismo se estudió el efecto de fisetina en la expresión de COX-2 cuya expresión génica y proteica fue evaluada a partir de un ensayo de RT-PCR y Western Blot.

Dichos experimentos demostraron que fisetina a concentraciones de 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  disminuyen la expresión de COX-2 inducida por LPS.



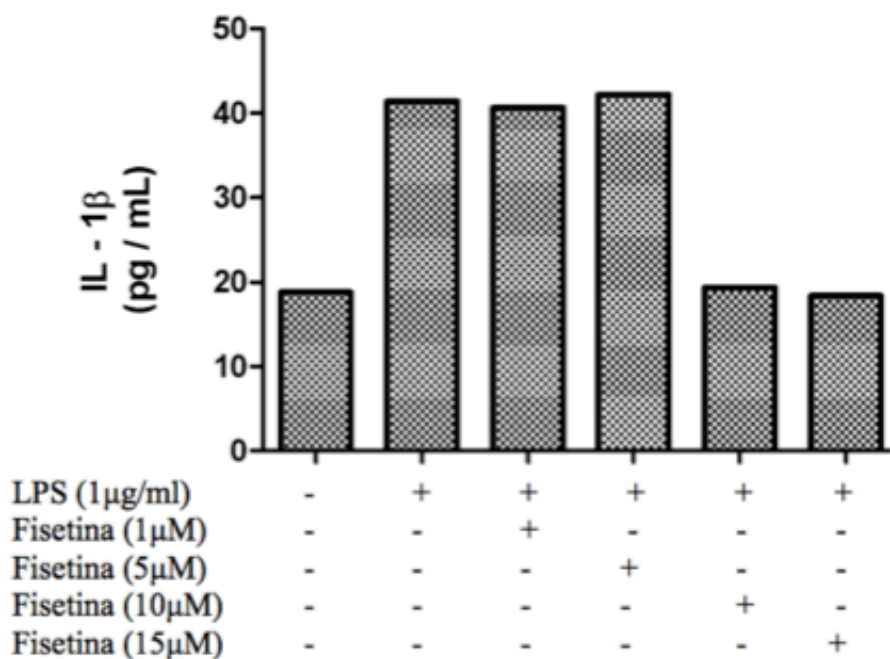
**Fig 33. Efecto de fisetina sobre la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos (HGF).** Las células fueron tratadas con fisetina a (1, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) por 30 min y después incubada con lipopolisacáridos (LPS) (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 4 horas. El RNA total fue extraído de estas células, y la expresión de COX-2 en RNA fue medida por el ensayo de (RT-PCR). Reacción de cadena de polimerasa en Transcriptasa Reversa. (GADPH) Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa fue usado como control. La expresión proteica fue evaluada por medio del método de Western Blot y se utilizó  $\gamma$ -Tubulina como control.

## Efecto de fisetina en la producción de IL-1 $\beta$

La estimulación de diversos tipos celulares con LPS induce a la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  la cual es un importante mediador en la respuesta inflamatoria y esta involucrada en una variedad de actividades celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis celular.

La síntesis de IL-1 $\beta$  está notablemente relacionada con la severidad y progresión de la enfermedad periodontal, estimula a osteoclastos, influye en el aumento de prostaglandina E2 (PGE2) y en la actividad de la reabsorción ósea. De esta manera se decidió evaluar la producción de IL-1 $\beta$  ante la inducción de LPS y la estimulación de fisetina.

Se encontró que el tratamiento con fisetina a concentraciones de 10 y 15  $\mu$ M, el flavonol completamente disminuye la producción de IL-1 $\beta$  inducida por LPS.



**Fig 34. La producción de IL-1 $\beta$  fue medida de la recuperación del medio de cultivo de condiciones anteriormente mencionadas a diferentes concentraciones de fisetina (1, 5, 10 y 15  $\mu$ M) e incubadas con lipopolisacáridos (LPS) (1 $\mu$ g /ml) , las diferentes condiciones se leyeron en el lector de ELISA. Los valores son expresados en pg/mL.**

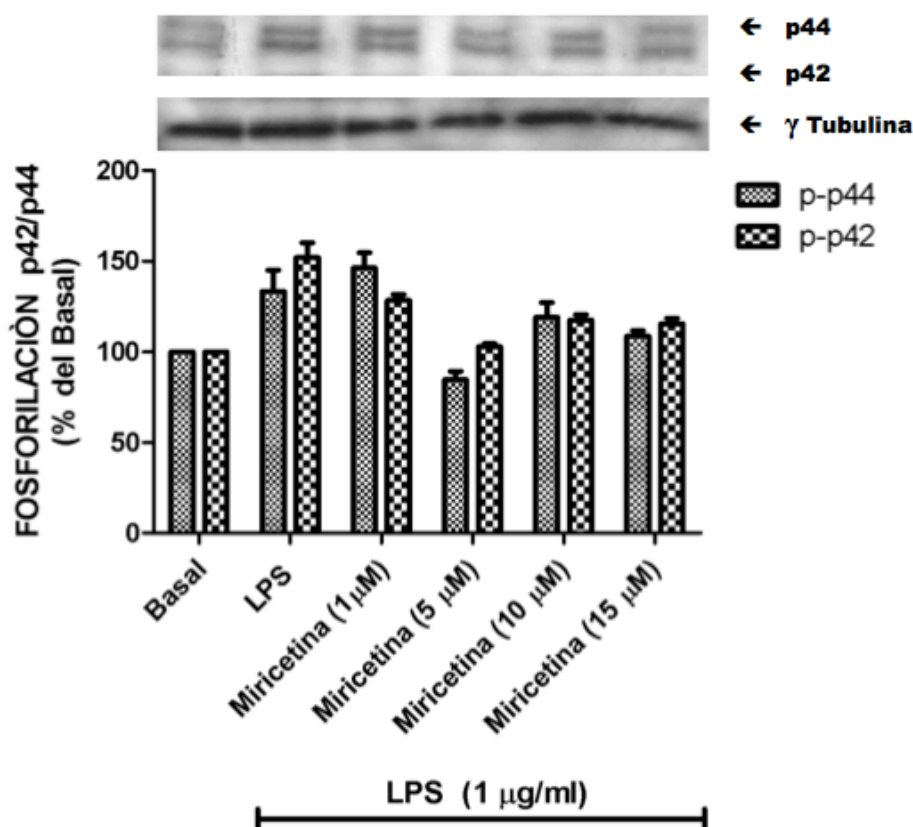
## Efecto de miricetina sobre la fosforilación de ERK 1/2

Para determinar la acción de miricetina en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LPS, las células fueron preincubadas por 30 minutos a diferentes concentraciones del flavonoide (1, 5, 10 y 15 mM) seguidas con el tratamiento de LPS.

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

Miricetina a concentraciones de 5 10 y 15 mM disminuyó considerablemente la fosforilación de p44 y p42 inducida por LPS con respecto a la actividad basal.

Para verificar que se utilizó la misma cantidad de proteína la membrana fue desnudada e incubada con tubulina.



**Fig.35** El efecto de miricetina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de ERK 1/2 inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con fisetina (1, 5, 10, y 15 mM) por 30 min y posteriormente con LPS (1 μg/ml). Estas células fueron analizadas por Western Blot utilizando antifosfo ERK 1/2. Las membranas fueron desnudadas e incubadas con γ-Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.

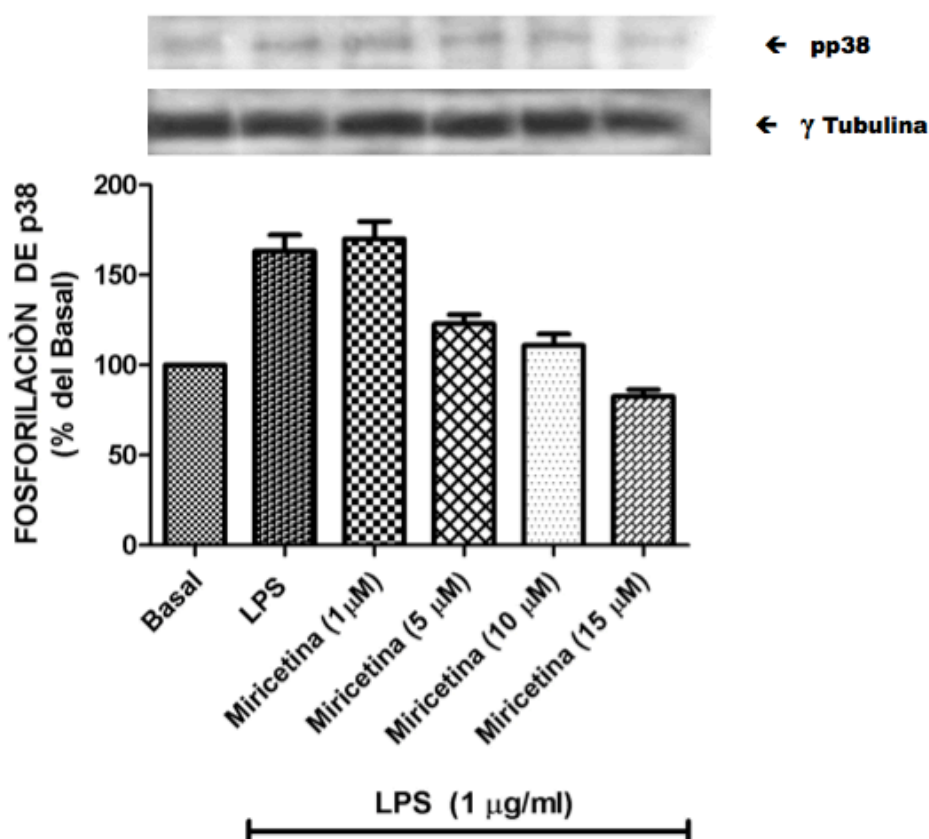


## Efecto de miricetina sobre la fosforilación de p38

Se probó la capacidad de miricetina en la inhibición de la fosforilación de p38. Se expusieron los fibroblastos gingivales humanos con LPS a (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 15 minutos, y se colocaron diferentes concentraciones del flavonoide durante 30 minutos.

Se encontró que se produjo un incremento en la fosforilación de p38 ante la estimulación con LPS; a una concentración de 5, 10 y 15 mM miricetina mostró una disminución en la fosforilación de p38 inducida por lipopolisacáridos en fibroblastos gingivales humano, presentandose una mayor disminución a 15 mM.

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



**Fig.36 El efecto de miricetina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de p38 inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con diferentes concentraciones de fisetina (1, 5, 10, y 15 mM) por 30 min y posteriormente con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Para el análisis de Western Blot las células se incubaron con el anticuerpo antifosfo p38.**

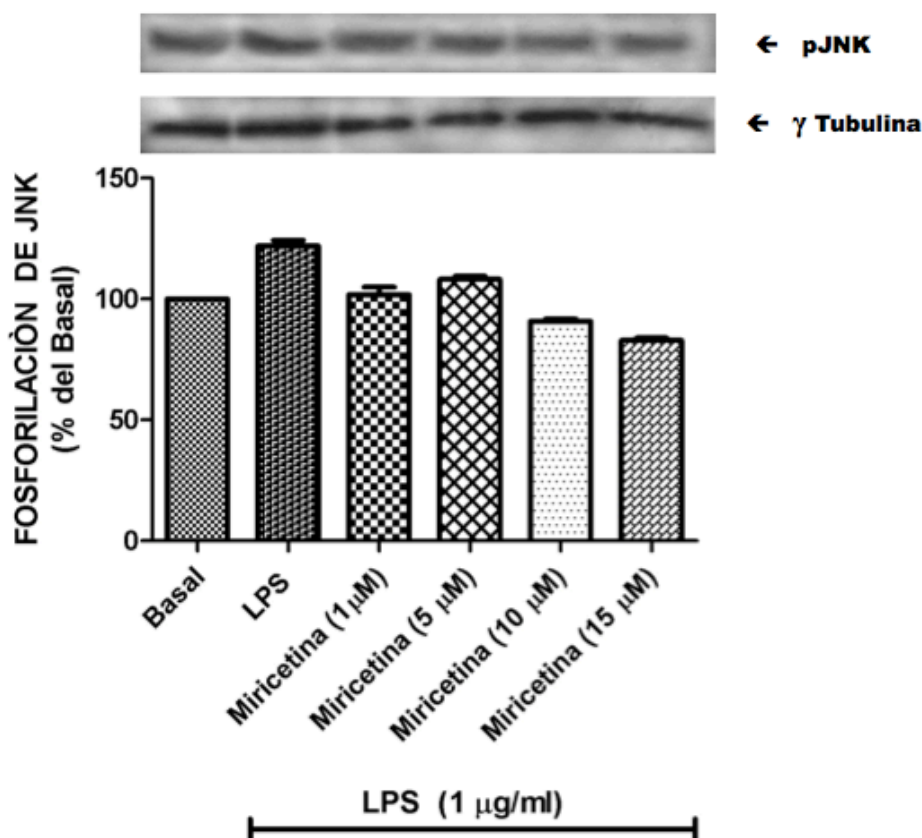
Las membranas fueron desnudadas e incubadas con  $\gamma$ -Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.



## Efecto de miricetina sobre la fosforilación de JNK

Se estudió el efecto de miricetina sobre la fosforilación de JNK. La exposición de fibroblastos gingivales humanos (HGF) con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 15 minutos y con los diferentes concentraciones del flavonoide durante 30 minutos, donde se observó que a concentraciones de 10 y 15 mM hubo una disminución en la fosforilación de JNK.

Para verificar que se utilizó la misma cantidad de proteína, las membranas fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos  $\gamma$ -Tubulina.



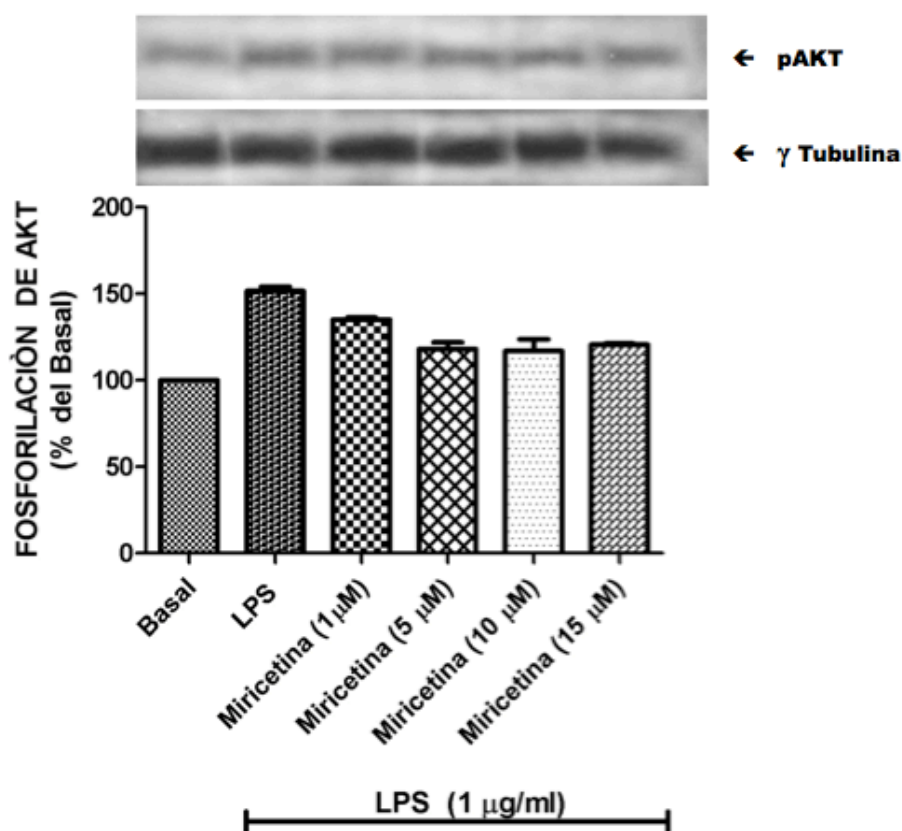
**Fig.37** El efecto de miricetina sobre la fosforilación de la regulación de la señal intracelular de JNK inducida por lipopolisacáridos (LPS) en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron pretratadas con diferentes concentraciones del flavonoide (1, 5, 10, y 15 mM) por 30 min y posteriormente con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Estas células fueron analizadas por Western Blot utilizando anticuerpo pJNK. Las membranas fueron desnudadas e incubadas con  $\gamma$ -Tubulina para verificar que se tomaron las mismas concentraciones de proteína.

## Efecto de miricetina sobre la fosforilación de AKT

Se decidió estudiar los efectos de miricetina en la activación de AKT inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos (HGF).

Por medio del ensayo de Western Blot, con un tratamiento a diferentes concentraciones de miricetina durante 30 minutos, así mismo estimulada con LPS (1µg/ml) durante 15 minutos.

Se observó que a una concentración de 10 y 15 mM de miricetina se mostró una mayor inhibición de la activación de AKT inducida por lipopolisacárido. Para verificar que se utilizó la misma cantidad de proteína, las membranas fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos  $\gamma$ -Tubulina.

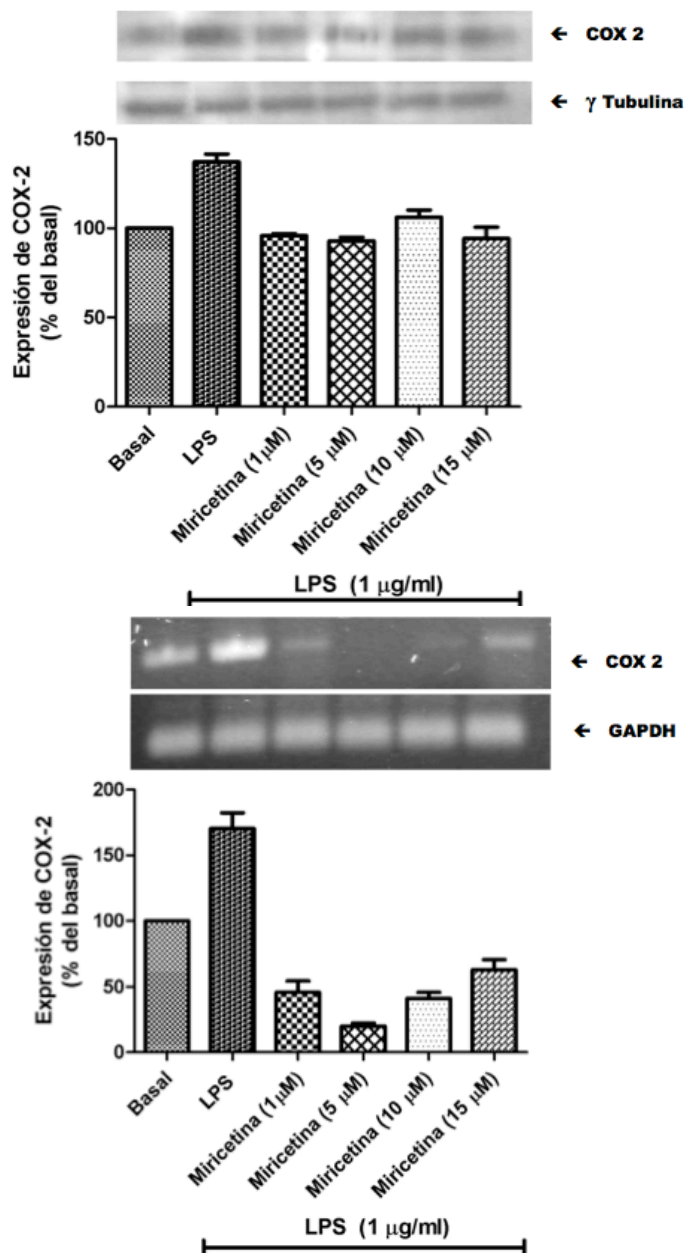


**Fig.38** Las células fueron tratadas con miricetina a ((1, 5, 10, y 15 mM) durante 30 minutos y LPS (1 µg/ml) durante 15 minutos. Las membranas de PVDF fueron bloqueadas e incubadas con anticuerpo pAKT. Para corroborar que se utilize la misma cantidad de proteína fueron desnudadas e incubadas con anticuerpos control. Se utilizó el ensayo de Western Blot.

## Efecto de miricetina sobre la expresión de ciclooxigenasa 2

Se estudió el efecto de miricetina en la expresión de COX-2 cuya expresión génica y proteica fue evaluada a partir de un ensayo de RT-PCR y Western Blot.

Dichos experimentos demostraron que miricetina a concentraciones de 1, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  disminuyen la expresión de COX-2 inducida por LPS.

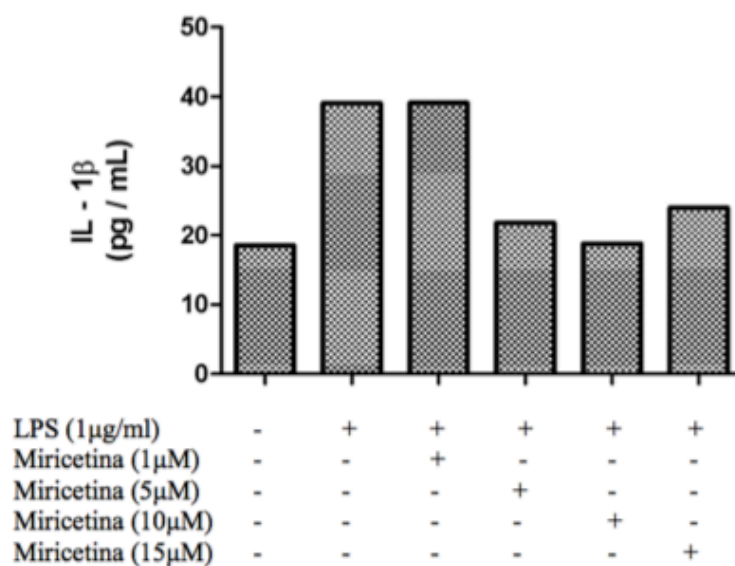


**Fig 39. Efecto de miricetina sobre la expresión de COX-2 en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Las células fueron tratadas con miricetina a (1, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) por 30 min y después incubada con lipopolisacáridos (LPS) (1  $\mu\text{g}$  /ml) por 4 horas .El RNA total fue extraído de estas células, y la expresión de COX-2 en RNA fue medida por el ensayo de Reacción de cadena de polimerasa en Transcriptasa Reversa (RT-PCR). Como control se utilizó Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). La expresión proteica fue evaluada por medio del método de Western Blot y se utilizó  $\gamma$ -Tubulina como control.**

## Efecto de miricetina en la producción de IL-1 $\beta$

Al observarse que la síntesis de IL-1 $\beta$  se relaciona notablemente con la severidad y progresión de la enfermedad periodontal, estimula a osteoclastos, influye en el aumento de prostaglandina E2 (PGE2) y en la actividad de la reabsorción ósea; se decidió evaluar la producción de IL-1 $\beta$  ante la estimulación de miricetina inducida con LPS.

Se encontró que el tratamiento con miricetina a concentraciones de 5, 10 y 15  $\mu$ M, disminuye la producción de IL-1 $\beta$  bloqueando la actividad del LPS.



**Fig 40.** La medición de IL-1 $\beta$  se realizó obteniendo el sobrenadante celular incubado a diferentes concentraciones de miricetina (1, 5, 10 y 15  $\mu$ M) e incubadas con lipopolisacáridos (LPS) (1  $\mu$ g/ml), las diferentes condiciones se leyeron en el lector de ELISA. Los valores son expresados en pg/mL.

## 14.0. Discusión

---

La enfermedad periodontal consiste en un conjunto de afecciones en el periodonto, lo que conlleva daños en los tejidos de soporte del diente y en ocasiones a la pérdida del órgano dentario. Las bacterias presentes en la placa dentobacteriana son las responsables de la enfermedad sin embargo, otros factores entre los que se encuentra la predisposición genética, sistémicos como la desnutrición, tabaquismo, estrés, edad, inmunodepresión y factores locales como cálculo o enfermedades como la diabetes, promueven el desarrollo de la enfermedad periodontal.<sup>(6)</sup>

Se ha observado que en enfermedades infecciosas, la invasión del tejido del huésped por bacterias o sus productos frecuentemente inducen una amplia variedad de reacciones inflamatorias e inmunopatológicas, es decir tanto factores microbianos, como el sistema inmune del huésped han sido implicados en la etiología de la enfermedad inflamatoria crónica oral, la periodontitis. Por ejemplo factores microbianos como LPS y citocinas como IL-1 y TNF- $\alpha$  inducen la expresión de RNAm de IL-6 en fibroblastos.<sup>(32)</sup>

Así mismo se ha reportado que los fibroblastos gingivales pueden también funcionar como reguladores de la red de citocinas en los tejidos periodontales, debido a que ellos producen varios tipos de citocinas cuando son estimuladas por citocinas inflamatorias o componentes celulares bacterianos.

Con respecto a la vía de señalización de TLRs, se ha demostrado que TLR4 regula la vía de señalización inducida por LPS de *P.gingivalis* donde este se une a los fibroblastos gingivales humanos (HGFs), y estas expresan TLR4 y MyD88.<sup>(32)</sup>

Debido a esto nosotros decidimos utilizar como modelo de estudio fibroblastos gingivales humanos que son las células más abundantes en los tejidos de soporte del diente, y así mismo determinar las acciones del lipopolisacárido obtenido de un periodontopatógeno muy agresivo como *Porphyromonas gingivalis*, sobre proteínas involucradas en la señalización intracelular y la regulación de la expresión de genes.

También se ha observado que el cultivo de fibroblastos gingivales humanos estimulados con LPS de especies de *Prevotella* y *Porphyromonas* producen IL-1 e IL-6.<sup>(21)</sup> Ha sido reportado que LPS causa una translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B a través de la degradación de I $\kappa$ B.<sup>(9)</sup>

Basándonos en estas evidencias, en esta investigación se encontró que el LPS induce la fosforilación de p38, ERK, JNK y AKT (proteínas activadas por mitógeno) la expresión de ciclooxigenasa-2 y la síntesis de IL-1 $\beta$  en fibroblastos gingivales humanos.

El proceso inflamatorio en la enfermedad periodontal es una respuesta biológica a la estimulación de daño físico o químico que esta fuertemente asociada con la liberación de mediadores proinflamatorios como óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), óxido nítrico (NO) y ciclooxigenasa 2 (COX-2) así

como citocinas inflamatorias como interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-1 $\beta$ .

La expresión de estos genes relacionados con la inflamación esta controlada por vías de señalización intracelular como las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y el factor nuclear  $\kappa$ B tanto a niveles transcripcional y postranscripcional. (6)

Así mismo se ha reportado que los fibroblastos gingivales humanos estimulados con lipopolisacárido de bacterias periodontopatógenas producen prostaglandina E2 a través de la expresión de ciclooxygenasa 2, la cual es regulada por tirosin cinasas. (93)

Se ha observado que la elevada secreción de citocinas inflamatorias y PGE2 esta relacionada a la perdida ósea que toma lugar en algunas enfermedades inflamatorias como artritis y periodontitis. (22)

Zhang et al. (161) ha demostrado por PCR y western blot que el ARNm de COX-2 y sus niveles proteicos son elevados en tejidos gingivales inflamados de pacientes con periodontitis comparado con tejidos no inflamados de pacientes sanos.

Así mismo Sakuma et al. (120) ha mostrado *in vitro* que prostaglandina E2 induce la activación del receptor del factor nuclear  $\kappa$ B en osteoblastos y en células estromales para formar osteoclastos mostrando que EP4 es crucial para la resorción ósea después de inyección sistémica de lipopolisacárido. (48, 98, 157)

Se ha observado que la activación de la vía de las MAPK por estimulación proinflamatoria ha sido implicado en la estabilización de RNAm de COX-2 (15) observándose que c-Jun juegan un rol esencial en la expresión transcripcional de COX2 inducida por citocinas. (16)

Por otro lado se ha reportado que Interleucina-1 $\beta$  es un potente estimulador de la producción de prostaglandina E2 vía ciclooxygenasa-2 en fibroblastos gingivales humanos a través de la vía de señalización tirosin cinasas.(48, 98, 157)

Suda et al. (129) demuestra que lipopolisacárido e interleucina-1 estimulan la osteoclastogénesis por la acción del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B y disminuye la producción de osteoprotegerina, la cual es regulada por ciclooxygenasa 2 dependiente de la producción de prostaglandina E2.

IL-1 $\beta$  estimula la liberación de PGE2 de fibroblastos y osteoblastos, que a su vez estimula la resorción ósea a través del incremento de la expresión de RANKL. (21)

Se ha observado que NF- $\kappa$ B que es un factor de transcripción que es activado por varias vías de transducción de señales las cuales están implicadas en la regulación de citocinas proinflamatorias iNOS and COX-2. Los mecanismos moleculares de la activación de NF- $\kappa$ B implican una activación de la cascada de proteínas citoplásmicas y la translocación nuclear de la subunidad p65 de este factor de transcripción.(9) También tiene actividad crucial dentro del promotor inmediato rio arriba de IL-1 $\beta$  de mamíferos y de los enhancer rio arriba. Se sabe que IL-1  $\beta$  es un fuerte inductor de NF- $\kappa$ B y se cree que autorregula positivamente su propia síntesis, el sitio del factor de transcripción NF- $\kappa$ B es requerido para la expresión del gen de IL-1 $\beta$ .(26)

También interleucina 1 $\beta$  es conocida como uno de los mas potentes

inductores de MMP-1 y MMP-3 en fibroblastos.<sup>(32)</sup>

Basándonos en estos reportes se puso interés en evaluar proteínas con actividad cinasa como los miembros de las proteínas activadas por mitógeno (ERK, p38, AKT y JNK) así como la expresión de ciclooxigenasa-2, enzima que sintetiza prostaglandina E2 y que promueve procesos inflamatorios; se decidió evaluarse en fibroblastos gingivales humanos estimulados con lipopolisacárido. También se decidió medir la producción de IL-1 $\beta$ , ante la estimulación con lipopolisacárido.

Diversas plantas han mostrado servir como fuentes de un numero diverso de agentes antiinflamatorios, aunque pocos reportes están disponibles con respecto a su actividad contra los patógenos orales, entre estos, la actividad antimicrobial de extractos de plantas contra bacterias cariogénicas ha sido mayormente investigado y se ha prestado menos atención a la actividad biológica contra patógenos periodontales comunes.

Los flavonoides poseen varios beneficios potenciales para la salud debido a sus diferentes capacidades biológicas como antiinflamatorios, a la que se le atribuyen a la presencia de compuestos fenólicos.<sup>(3)</sup>

Basándose en esto se decidió evaluar el efecto de moléculas polifenólicas presentes en nuestra dieta en frutas, vegetales, cereales, té y vinos denominados flavonoides, en este caso fisetina y miricetina.

En primera instancia en esta investigación se observó que miricetina y fisetina no alteraban la viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos de manera dependiente de la dosis.

Se ha observado que miricetina tiene una variedad de potencial terapéutico, aunque ha sido principalmente estudiada como antioxidante, también se ha mostrado con actividad prooxidante *in vitro* que puede permitir un incremento en el daño a carbohidratos y DNA.

De igual manera se ha reportado que miricetina derivado de *S. Aromaticum* (clavo) demuestra tener preferencial actividad antimicrobial contra patógenos periodontales como *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* con 156 y 625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente.<sup>(3)</sup>

Varios estudios muestran que miricetina fuertemente inhibe la proliferación de células neoplásicas por una inhibición directa de las MAPK.

Por otro lado se ha reportado que fisetina reduce la secreción de citocinas proinflamatorias ante la estimulación con LPS como interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), también se ha observado que fisetina suprime la activación del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ), y la fosforilación de la cinasa c-jun terminal (JNK) en diferentes tipos celulares como macrófagos estimulados con LPS a niveles proteicos y de RNAm.<sup>(6,8)</sup>

También fisetina suprime significativamente la degradación de I $\kappa\text{B}$ , y la translocación de NF- $\kappa\text{B}$ , por inhibición de la activación de I $\kappa\text{B}$  cinasa (IKK) bloqueando la fosforilación y degradación de I $\kappa\text{B}\alpha$  subsecuentemente induciendo la supresión de la translocación nuclear de la subunidad p65, así



como la fosforilación de p38 y ERK en células de microglia estimuladas con LPS (9), mostrando que fisetina tiene una fuerte actividad antiinflamatoria, y que el efecto celular de fisetina sobre las MAPKs puede depender del tipo celular y las condiciones estimuladoras. (35,7)

Se ha reportado que fisetina muestra actividades antiinflamatorias sobre la permeabilidad vascular, migración leucocítica e inmunidad celular, así mismo reduce significativamente la incidencia y severidad de la artritis, disminuyendo la fosforilación de ERK 1/2, JNK y p38 MAPK ante la estimulación de IL-1 $\beta$ .(10)

También protege contra la progresión de enfermedades inflamatorias por la limitación de las interacciones entre mastocitos y células T activadas.

Se ha reportado que fisetina tiene efectos inhibitorios sobre la actividad de MMP-9 y la inducción de LPS en la fagocitos en macrófagos, interviniendo con el reclutamiento de estos en el sitio de inflamación. (10)

Nuestros resultados muestran que miricetina y fisetina inhiben o disminuyen la fosforilación de ERK, JNK, p38 y AKT inducida por LPS en fibroblastos gingivales humanos, concordando con los antecedentes anteriormente mencionados que estos flavonoles presentan actividad antiinflamatoria al tener un efecto determinante sobre la fosforilación de las MAPKs y evitar que se desencadene una cascada de señalización que conlleva a la producción de citocinas y mediadores de la inflamación .

Miricetina y fisetina mostraron un alto efecto inhibitorio incluso por debajo de la actividad basal en algunas proteínas cinasas lo que sugiere que posiblemente regulen sus efecto mediante la activación de fosfatasa, aunque hasta el momento no existen reportes por lo que en el futuro deberán realizarse mayores investigaciones a fin explorar el efecto de estos polifenoles sobre la actividad de ERK y p38.

En la literatura fisetina muestra una marcada supresión de la producción de NO, en células de microglia estimuladas con LPS. También inhibe COX2 a través de la regulación negativa de su expresión, la cual suprime la actividad enzimática disminuyendo la síntesis de PG, el cual es fundamentalmente diferente que los mecanismos de inhibidores selectivos de COX 2. (35,7)

Basándonos en estos hechos nuestros resultados concuerdan en que fisetina y miricetina disminuyen la expresión de COX 2 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con lipopolisacárido, a nivel proteico y génico incluso por debajo del basal, sugiriendo que estos flavonoles regulan negativamente la expresión de COX 2 en la inflamación incluso cuando las concentraciones de esta proteína no ameriten su inclusión en el proceso inflamatorio.

Así mismo se ha reportado que miricetina produce una disminución significativa en la expresión de IL-1 $\beta$  en RNAm, indicando que esta puede regular la expresión génica de IL-1 $\beta$  en macrófagos por inhibición vía transcripción génica. (2) Fisetina inhibe la inducción de IL-1 $\beta$  en la proliferación de RA FLS , así como la, proteína quimiotáctica de monocitos



(MCP-1) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) disminuyendo la fosforilación de ERK y c-Jun NH(2)- cinasa terminal (JNK) y factores angiogénicos. (10)

Así mismo basándose en estos datos nuestros resultados muestran que fisetina y miricetina disminuyen la producción de la síntesis de IL-1 $\beta$  de manera dependiente de la dosis con respecto al basal ante la estimulación de lipopolisacárido.

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

Ya que la manipulación de las vías de señalización es potencialmente prometedora para aplicaciones terapéuticas en la enfermedad periodontal debido a que esta puede afectar la expresión de varias citocinas, resultando en una mayor comprensión y exhaustivo cambio en la red de citocinas establecido por la respuesta del huésped a la agresión microbiana.

## 15.0. Bibliografía

- 1) Klan C. OngandHoon-EngKhoo. Biological Effects of Myricetin. *Gen. Pharmac.* Vol. 29. 121-126. 1997.
- 2) M. Blonska, Z. P. Czuba & W. Krol. Effect of Flavone Derivatives on Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA Expression and IL-1 $\beta$  Protein Synthesis in Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Immunology.* Vol. 57. 162-166. 2003.
- 3) Lining Cai y Christine D. Wu. Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens. *J. Nat. Prod.* Vol. 59. 987-990.
- 4) Ching-Chow Chen, Man-Ping Chow, Wei-Chien Huang, Yi-Chu Lin. Flavonoids Inhibit Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Up- Regulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Respiratory Epithelial Cells through Activator Protein-1 and Nuclear Factor- $\kappa$ B: Structure-Activity Relationships. *Molecular Pharmacology.* Vol. 66. 683-693. 2004.
- 5) Rodrigo Polimeni Constantin, Jorgete Constantin, Clairce Luzia Salgueiro Pagadigorria. Prooxidant Activity of Fisetin: Effects on Energy Metabolism in the Rat Liver. *J Biochem Molecular Toxicology.* Vol 25. 117-126. 2010.
- 6) Sun-Chae Kim, Sang-Hun Kang, Soo-Jin Jeong, Sun-Hee Kim, Hyun Suk Ko, and Sung-Hoon Kim. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase and nuclear factor  $\kappa$  B pathways mediates fisetin-exerted anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* Vol. 34. 645-650. 2012.
- 7) Yewseok Suh, Farrukh Afaq, Jeremy J. Johnson. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF- $\kappa$ B-signaling pathways. *Carcinogenesis.* Vol 30. 300-307. 2008.
- 8) Lisu Wang, Yi-Chen Tu, Tzi-Wei Wian, Jing-Ting Hung. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54. 9798-9804. 2006.
- 9) Long Tai Zhenga, Jiyeon Ocka, Byoung-Mog Kwonb, Kyoungcho Suka. Suppressive effects of flavonoid fisetin on lipopolysaccharide-induced microglial activation and neurotoxicity. *International Immunopharmacology.* Vol. 8. 484-494. 2008.
- 10) Jae-Dong Lee a,1, Jeong-Eun Huh, GeumSeon Jeon. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and in vivo models. *International Immunopharmacology.* Vol. 9. 268-276. 2009.
- 11) K Nagai<sup>1</sup>, Y Takahashi, I Mikami, T Fukusima, H Oike. The

- hydroxyflavone, fisetin, suppresses mast cell activation induced by interaction with activated T cell membranes. *British Journal of Pharmacology*. Vol 9. 158-162. 2009.
- 12) Subash C. Gupta & Ji Hye Kim & Sahdeo Prasad & Bharat B. Aggarwal. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev*. Vol. 29. 405-420. 2010.
  - 13) Sheng-Hung Liu, Chao-Hsiung Lin, Shih-Kai Hung. Fisetin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Activation and Dendritic Cell Maturation. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 58. 10831-10833. 2010.
  - 14) Liesbeth Geraets, Astrid Haegens, Karen Brauers, Jane A. Haydock. Inhibition of LPS-induced pulmonary inflammation by specific flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 382. 598-603. 2009.
  - 15) Uri R. Mbonye1 & Inseok Song. Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. *BMB Reports*. Vol. 20. 130-144. 2011.
  - 16) Kenneth K. Wu. Differential cyclooxygenase-2 transcriptional control in proliferating versus quiescent fibroblasts. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. Vol. 83. 175-181. 2007.
  - 17) Kazuyuki Noguchi & Isao Ishikawa. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontology*. Vol. 43. 85-101. 2007.
  - 18) Christos Tsatsanis, Ariadne Androulidaki. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol. 38. 1654-1661. 2006
  - 19) Sumi Nakao, Yorimasa Ogata, Emi Shimizu-Sasaki. Activation of NF $\kappa$ B is necessary for IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 20. 113-118. 2000.
  - 20) H. Okada, S. Murakami. Cytokine Expression in Periodontal Health and Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. Vol. 9. 248-266. 1998.
  - 21) Philip M. Preshaw, John J. Taylor. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontology*. Vol. 38. 60-84. 2011.
  - 22) Ricardo N. Fracon, Juliana M. Teófilo, Rafaela B. Satin. Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. *Journal of Oral Science*. Vol. 50. 247-252. 2008.
  - 23) Katherine A. Blackwell, Lawrence G. Raisz. Prostaglandins in Bone: Bad Cop, Good Cop? *Trends Endocrinol Metab*. Vol 21. 294-301. 2010.

- 24) Sarah G. Harris, Josue Padilla, Laura Koumas. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*. Vol. 23. 144-150. 2002.
- 25) Steve Bird, Jun Zou, Tiehui Wang, Barry Munday. Survey Evolution of interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Vol. 13. 483-502. 2002.
- 26) H Sakaki<sup>1</sup>, T Matsumiya<sup>1</sup>, A Kusumi. Interleukin-1 $\beta$  induces matrix metalloproteinase-1 expression in cultured human gingival fibroblasts: role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Experimental Oral Pathology*. Vol 10. 87-93. 2004.
- 27) G.P. Garlet. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction. *Journal of Dental Research*. Vol. 12. 1349-1363. 2010.
- 28) Dana Graves. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *J Periodontology*. Vol. 8. 1581-1591. 2008.
- 29) Vikas Deo. Role of Cytokines in Host Response. *Pathogenesis of Periodontitis*. Vol 9. 68-70 2009.
- 30) Keith L. Kirkwood, Carlos Rossa. The Potential of p38 MAPK Inhibitors to Modulate Periodontal Infections. *Curr Drug Metab*. Vol. 10. 55-67. 2009.
- 31) C. Hayashi<sup>1</sup>, C.V. Gudino, F.C. Gibson. Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. *molecular oral microbiology*. Vol. 25. 305-316. 2010.
- 32) P.-L. Wang, K. Ohura. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Signaling in Gingival Fibroblasts—CD14 and Toll-like Receptors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. Vol. 13. 132-142. 2002.
- 33) F. Sandor, M. Buc. Toll-like Receptors. Distribution and Pathways Involved in TLR Signalling. Vol. 30. 188-197. 2005.
- 34) Michelle H. W. Laird, Sang Hoon Rhee, Darren J. Perkins. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol 85. 966-977. 2009.
- 35) Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*. Vol 26. 230-242. 1991.
- 36) Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem*. Vol. 273. 637-645. 1998.
- 37) Heidenreich O, Neininger A, Schratt G, Zinck R, Cahill MA, Engel K, et al. MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. Vol. 274. 1434-1443. 1999.
- 38) Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, et al. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three

- different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol.* Vol 10. 6742-6753. 1999.
- 39) Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, et al. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J.* Vol. 18. 4969-4980. 1999.
- 40) Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Vol. 11. 4932-4937. *Infect Immun* 1992.
- 41) Laschinger CA, Bellows CG, Wasi S. Modulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors by TGF- $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and EGF in fetal rat calvaria cells at different times of culture. *Bone Miner.* Vol. 1. 23-34. 1991.
- 42) Evans DB, Bunning RA, Russell RG. The effects of recombinant human interleukin-1 beta on cellular proliferation and the production of prostaglandin E2, plasminogen activator, osteocalcin and alkaline phosphatase by osteoblast-like cells derived from human bone. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol. 166. 208-216. 1990.
- 43) Jin CH, Miyaura C, Ishimi Y, et al. Interleukin 1 regulates the expression of osteopontin mRNA by osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol.* Vol 74. 221-228. 1990.
- 44) Dinarello C. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* Vol.4. 253-265. 1997.
- 45) Oppenheim J, Kovacs E, Matsushima K, Durum S. There is more than one interleukin-1. *Immunol Today.* Vol 7. 45-56. 1986.
- 46) Dinarello C. Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* Vol. 87. 2095-2147. 1996.
- 47) Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell dependent antibody production. *Immunology.* Vol 104. 402-409. 2001.
- 48) Lepe-Zuniga J, Gery I. Production of intracellular and extracellular interleukin-1 (IL-1) by human monocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* Vol. 31. 222-230. 1984.
- 49) Wood W, Janson R, Joslin F, Jameel S. IL-1 $\alpha$  production in cultured human monocytes is regulated at multiple levels. *J Immunol.* Vol 143. 118-126. 1989.
- 50) Miller D, Calaycay J, Chapman K, Howard A, Kostura M, Molineaux S, et al. The IL-1 beta converting enzyme as a therapeutic target. *Ann N Y Acad Sci.* Vol.4. 3-12. 1993.
- 51) Singer I, Scott S, Chin J, Bayne E, Limjuco G, Weidner J, et al. The interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *J*

- Exp Med. Vol 182. 1447-1459. 1995.**
- 52) Fantuzzi G, Ku G, Harding M, Livingston D, Sipe J, Kuida K, et al. Response to local inflammation of IL-1 beta converting enzyme deficient mice. *J Immunol. Vol. 158. 1818-1824. 1997.*
  - 53) Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, Poli G, Degioia L, Introna M, et al. Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. *J Exp Med. Vol. 182. 623-628. 1995.*
  - 54) Malyak M, Smith M, Abel A, Hance K, Arend W. The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes. *Vol. 161. 2004-2010. J Immunol 1998.*
  - 55) Hazuda D, Strickler J, Kueppers F, Simon P, Young P. Processing of precursor interleukin-1 beta and inflammatory disease. *J Biol Chem. Vol 265. 6318-6322. 1990.*
  - 56) Mizutani H, Schechter N, Lazarus G, Black R, Kupper T. Rapid and specific conversion of precursor interleukin-1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med. Vol.174. 821 825 1991.*
  - 57) Vigers G, Caffes P, Evans R, Thompson R, Eisenberg S, Brandhuber B. X-ray structure of interleukin-1 receptor antagonist at 2.0-angstrom resolution. *Vol. 97. 3005-3021. J Biol Chem 1994.*
  - 58) Evans R, Bray J, Childs J, Vigers G, Brandhuber B, Skalicky J, et al. Mapping receptor-binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site directed mutagenesis identification of a single site in IL-1ra and 2 sites in IL-1-beta. *J Biol Chem. Vol. 270. 11477-11483. 1995.*
  - 59) Arend W. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol. Vol. 16. 27-55. 1993.*
  - 60) Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol. Vol. 30. 1075-1079. 1998.*
  - 61) Zhang, Y., Shaffer, A., Portanova, J., Seibert, K, Isakson, P. C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *J. Pharmacol. Vol. 283. 1069-1075. 1998.*
  - 62) Sinicrope, F. A. Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer. *Mol. Carcinog. Vol. 45. 447-454. 2006.*
  - 63) Van der Donk, W. A., Tsai, A. L. and Kulmacz, R. J. The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry. Vol. 4. 15451-15457. 2002.*
  - 64) Spencer, A. G., Thuresson, E., Otto, J. C., Song, I., Smith, T., DeWitt, D. L., Garavito, R. M. The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis. *J. Biol. Chem. Vol. 274. 32936-32942. 1999.*
  - 65) Picot, D., Loll, P. J. and Garavito, R. M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Vol. 367. 23-249. Nature 1994.*
  - 66) Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J.,

- Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. Vol. 384. 644-648. 1996.
- 67) Bustos, M., Coffman, T. M., Saadi, S. Modulation of eicosanoid metabolism in endothelial cells in a xenograft model. Role of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* Vol. 100. 1150-1158. 1997.
- 68) Caughey, G. E., Cleland, L. G., Penglis, P. S., Gamble, J. R. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J. Immunol.* Vol. 167. 2831-2838. 2001.
- 69) Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, et al. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol.93. 4816-4820. 1996.
- 70) Kim Y, Fischer S M. Transcriptional regulation of cyclooxygenase 2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J Biol Chem*. Vol. 273. 27686-27694. 1998.
- 71) Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. Vol. 68. 95-114. 2002.
- 72) FitzGerald GA. COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov*. Vol 20. 879-890. 2003.
- 73) FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*. Vol. 345. 433-442. 2001.
- 74) Tanabe. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins. Other. Lipid. Mediat*. Vol. 68. 95-114. 2002.
- 75) Kang, Y. J., Mbonye, U. R., DeLong, C. J., Wada, M. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog. Lipid. Res*. Vol. 46. 108-125. 2007.
- 76) Chen, C. Y. and Shyu, A. B. Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol. Cell. Biol*. Vol. 14. 8471-8482. 1994.
- 77) Chen, C. Y., Chen, T. M. Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich element specifies its mRNA-destabilizing function. *Mol. Cell. Biol*. Vol. 14. 416-426. 1994.
- 78) Lasa, M., Mahtani, K. R., Finch, A., Brewer, G., Saklatvala, J. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol. Cell. Biol*. Vol. 20. 4265-4274. 2004.

- 79) Lasa. M., Brook, M., Saklatvala, J. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol. Cell. Biol.* Vol.21. 771-780. 2001.
- 80) Dixon, D. A., Tolley, N. D., King, P. H., Nabors, L. B., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J. Clin. Invest.* Vol. 108. 1657-1665. 2001.
- 81) Mbonye, U. R., Wada, M., Rieke, C. J., Tang, H. Y., Dewitt, D. L. The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *J. Biol. Chem.* Vol. 281. 35770-35778. 2006.
- 82) Smith, W. L., DeWitt, D. L. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 69. 145-482. 2000.
- 83) Otto, J. C., DeWitt, D. L. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* Vol. 268. 18234-18242. 1993.
- 84) Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell. Biol.* Vol.7. 766-772. 2005.
- 85) Ravid, T., Doolman, R., Avner, R., Harats, D. The ubiquitin-proteasome pathway mediates the regulated degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* Vol. 275. 35840-35847. 2000.
- 86) Mbonye, U. R., Yuan, C., Harris, C. E., Sidhu, R. S., Song, I., Arakawa, T. Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. *J. Biol. Chem.* Vol. 283. 8611-8623. 2008.
- 87) Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* Vol. 122. 217-224. 1994.
- 88) Smith, W. L. Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *Trends. Biochem.* Vol. 33. 27-37. 2008.
- 89) Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.* Vol. 55. 7908-7916. 1999.
- 90) Goodson JM, Dewhirst FE, Brunetti A. Prostaglandin E2 levels and human periodontal disease. *Prostaglandins.* Vol. 6. 81-85. 1974.
- 91) Yucel-Lindberg T, Ahola H, Nilsson S, Carlstedt-Duke J, Modeer T. Interleukin-1 $\beta$  induces expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human gingival fibroblasts. *Inflammation.* Vol. 19. 549-560. 1995.
- 92) Yucel-Lindberg T, Nilsson S, Modeer T. Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in human gingival fibroblasts. *J Dent Res.* Vol. 78. 61-68. 1999.
- 93) Noguchi K, Yanai M, Shitashige M, Nishihara T, Morita I, Murota S,



- Ishikawa I. Prostaglandin production via induction of cyclooxygenase-2 by human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Inflammation*. Vol. 20. 555-568. 1996.
- 94) Watanabe K, Tanaka Y, Morimoto Y, Yahata K, Zeki K, Fujihara T, Yamashita U, Eto S. Interleukin-4 as a potent inhibitor of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 172. 1035-1041. 1990.
- 95) Kunii R, Nemoto E, Kanaya S, Tsubahara T, Shimauchi H. Expression of CD13/aminopeptidase N on human gingival fibroblasts and up-regulation upon stimulation with interleukin-4 and interleukin-13. *J Periodontal Res*. Vol. 40. 138-146. 2005.
- 96) Noguchi K, Shitashige M, Murota S, Ishikawa I. Interleukin-4 and interferon- $\gamma$  inhibit prostaglandin production by interleukin-1 $\beta$  stimulated human periodontal ligament fibroblasts. *Inflammation*. Vol. 23. 1-13. 1999.
- 97) Sakuma Y, Tanaka K, Suda M, Yasoda A, Natsui K, Tanaka I, Ushikubi F, Narumiya S, Segi E, Sugimoto Y, Ichikawa A, Nakao K. Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast formation by pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res*. Vol. 15. 218-227. 2000.
- 98) Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*. Vol. 17. 210-220. 2002.
- 99) Bichell DP, Rotwein P, McCarthy TL. Prostaglandin E2 rapidly stimulates insulin-like growth factor-I gene expression in primary rat osteoblast cultures: evidence for transcriptional control. *Endocrinology*. Vol 133. 1020-1028. 1993.
- 100) Attstrom R, Schroeder HE. Effect of experimental neutropenia on initial gingivitis in dogs. *Scand J Dent Res*. Vol. 87. 7-23. 1979.
- 101) Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K, et al. Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*. Vol. 85. 524-529. 2006.
- 102) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity *Cell*. Vol. 124. 783-801. 2006.
- 103) Muthukuru M, Jotwani R, Cutler CW. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. Vol. 73. 687-694. *Infect Immun* 2005.
- 104) Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- $\kappa$ B. *J Biol Chem*. Vol. 274. 14560-14567. 1999.
- 105) Tietze K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K, Nonnenmacher C. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram positive and gram-negative bacteria. *J Periodontal Res*. Vol. 41. 447-454. 2006.

- 106) Fung E, Tang SM, Canner JP, Morishige K, Arboleda-Velasquez JF, Cardoso AA, et al. Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation*. Vol. 115. 2948-2956. 2007.
- 107) Williams DL, Ozment-Skelton T, Li C. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Shock*. Vol. 25. 432-439. 2006.
- 108) Patil CS, Kirkwood KL. p38 MAPK signaling in oral-related diseases. *J Dent Res*. Vol. 85. 812-825. 2007.
- 109) Pesu M, Aittomaki S, Takaluoma K, Lagerstedt A, Silvennoinen O. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-4-induced gene expression by stimulating STAT6-mediated transcription. *J Biol Chem*. Vol. 277. 38254-38261. 2002.
- 110) Arbibe, L., Mira, J. P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P. J., Ulevitch, R. J., Knaus, U. G. Toll-like receptor 2-mediated NF- $\kappa$ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol*. Vol.1. 533-540. 2000.
- 111) Rhee, S. H., Kim, H., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/Toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem*. Vol. 281. 18560-18568. 2006.
- 112) Sung Keun J., Ki Won Lee, Sanguine Byun, Myricetin Suppresses UVB-Induced Skin Cancer by Targeting Fyn. *Cancer Research*. Vol. 68. 6021-6029. 2006
- 113) Landolfi R., Mower R. L. and Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. *Biochem. Pharmac*. Vol. 33. 1525-1530. 1984.
- 114) Tzeng S. H., Ko W. C., Ko F. N. Teng C. M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb. Res*. Vol. 64. 91-100. 1991.
- 115) Whalley C. V., Rankin S. M., Houlst J. R., Jessup W. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipo- proteins by macrophages. *Biochem. Pharmac*. Vol. 39. 1743-1750. 1990.
- 116) Hertog M. G., Feskens E. J., Holhnan P. C., Katan M. B. Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*. Vol. 342. 1007-1011. 1993.
- 117) Chaudhry P. S., Cabrera J., Juliani H. R. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmac*. Vol. 32. 1995-1998. 1995.
- 118) Ong K. C. and Khoo H. E. Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation. *Biochem. Pharmac*. Vol. 51. 423-429. 1996.
- 119) Hirschmann S. G., Theoduloz C., Franco L., Ferro E. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Ethnopharmac*. Vol. 21. 183-186. 1987.

- 120) Di Carlo G., Autore G., Izzo A. A., Maiolino P., Mascolo N., Viola P., Diurno M. V. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J. Pharm. Pharmacol.* Vol. 45. 1054-1059. 1993.
- 121) Namba, T.; Tsunozuka, M.; Bae, K. H.; Hattori, M. *Shoyakugaku Zasshi*. Dental caries prevention by traditional Chinese medicines. Part I. Potent antibacterial action of *Magnoliae cortex* extracts against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* Vol. 44. 100-106. 1981.
- 122) Namba, T.; Tsunozuka, M.; Takehana, Y.; Nunome, S.; Takeda, K. Studies on Dental Caries Prevention by Traditional Chinese Medicines (Part IV) : Screening of Crude Drugs for Anti-plaque Action and Effects of *Artemisia capillaris* Spikes on Adherence of *Streptococcus mutans* to Smooth Surfaces and Synthesis of Glucan by Glucosyltransferase. *Planta Med.* Vol. 38. 253-263. 1984.
- 123) Osawa, K.; Yasuda, H.; Maruyama, T.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *H. Chem. Pharm. Bull.* Vol. 40. 2970-2974. 1992.
- 124) Bokyoung Sung, Manoj K. Pandey, and Bharat B. Aggarwal. Fisetin, an Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 6, Down- Regulates Nuclear Factor- $\kappa$ B-Regulated Cell Proliferation. *Molecular Pharmacology.* Vol. 71. 1703-1714. 2007.
- 125) Buss GD, Constantin J, Lima LC, Teodoro GR, Comar JF, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A. The action of quercetin on the mitochondrial NADH to NAD<sup>+</sup> ratio in the isolated perfused rat liver. *Planta Med.* Vol. 71. 1118-1122. 2005.
- 126) Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Academic Press; 1974.
- 127) Acco A, Comar JF, Bracht A. Metabolic effects of propofol in the isolated perfused rat liver. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* Vol. 95. 166-174. 2004.
- 128) Constantin RP, Constantin J, Salgueiro-Pagadigorria CL, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A, Ono MKC, Yamamoto NS. The actions of fisetin on glucose metabolism in the rat liver. *Cell Biochem Funct.* Vol. 28. 147-158. 2010.
- 129) Yewseok Suh, Farrukh Afaq, Jeremy J. Johnson y Hasan Mukhtar. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF- $\kappa$ B-signaling pathways. *Carcinogenesis.* Vol. 30. 300-307. 2009.
- 130) Jae-Dong Lee, Jeong-Eun Huh, Geum Seon Jeon, Ha-Ru Yang. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and in vivo models. *Int Immunopharmacol.* Vol. 9. 268-276. 2009.

- 131) **Po-Lin KuoT. Myricetin inhibits the induction of anti-Fas IgM-, tumor necrosis factor- $\alpha$ - and interleukin-1 $\beta$ -mediated apoptosis by Fas pathway inhibition in human osteoblastic cell line MG-63. Life Sciences. Vol.77. 2964-2976. 2005.**
- 132) **Gutiérrez-Venegas G, Jiménez-Estrada M, Maldonado S. The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts. Int Immunopharmacol. Vol.7. 1199-11210. 2007**