



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de Poly : IC sobre la expresión de Ciclooxygenasa-2 en Fibroblastos
Gingivales Humanos.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Rocío Santiago Mendoza



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS.
VOCAL: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.
SECRETARIO: ENRIQUE ORTEGA SOTO.
1er. SUPLENTE: JOSÉ PREDRAZA CHAVERRI.
2° SUPLENTE: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA EN LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN, DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas _____

SUSTENTANTE (S):

Rocío Santiago Mendoza _____

A mis padres y hermanos.

Agradecimientos

A alguien...

Por la existencia de la humanidad, la materia y el espacio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Por permitir que forme parte de esta honorable casa de estudios, abriéndome tus puertas facultándome día a día para alcanzar mis sueños de niña, aquí aprendí y comprendí cosas invaluable para construir un mejor futuro, pero sobre todo, espero seguir cumpliendo parte de esos sueños... en ésta mi segunda casa.

A la Doctora Gloria Gutiérrez Venegas.

Por brindarme todas las facilidades y así poder concluir una etapa, por sus vastos conocimientos, por las enseñanzas humanas y científicas, es importante para mí hacerle saber que a su lado aprendí a valorar al ser humano como tal, gracias por todo, con mucho afecto y cariño para usted.

Al jurado asesor.

Por dedicar tiempo a la revisión, por todas sus sugerencias y su paciencia; con mucho afecto para ustedes.

A Antonia y Epifanio, mis padres.

Por su comprensión, tolerancia, amor, cariño, afecto, paciencia y apoyo incondicional para conmigo, sé que siempre estarán dispuestos a apoyarme no importando adversidades, ésta tesis es una forma de agradecimiento y una manera de retribuir todo su esfuerzo, sé que no ha sido fácil brindarme todo lo necesario para poder concluir esta etapa, mas sin embargo, lo hemos logrado; los amo.

A Silvia, Marisol, Víctor, Mayda y Arely; mis hermanos.

Recuerdo que desde niños nos enojábamos, peleábamos, reíamos, llorábamos pero siempre nos hemos apoyado, he recibido mucho de ustedes, hoy puedo decirles que gracias a todas esas experiencias a su lado somos personas maduras, además de ser individuos para bien. Los admiro.

Luciana Moreno Bernardino † y Trinidad Mendoza Arenas †.

No nos conocimos lo suficiente aunque siempre me brindaron un trato amable, sé que si estuvieran aquí compartirían estos momentos tan importantes, esto es para ustedes, los recuerdo con gran alegría.

A Bárbara Jacqueline Villafuerte Vázquez

En mi andar, te conocí en clase; por segunda ocasión volvimos a estar juntas, nunca imaginando compartir momentos que conmocionaran nuestra vida, te admiro, por no dejar que las personas que están a tú lado declinen; somos almas gemelas y espero sigas ahí compartiendo todo.

A José Alfredo Corona Jiménez y Daniel Ramírez Méndez.

Nos conocimos por casualidad o causalidad, sin esperar nada a cambio el uno del otro, hemos fomentado una de las virtudes más importantes en la vida y se llama amistad, gracias por estar a mí lado en momentos difíciles, por compartir éxitos y fracasos, sin su apoyo no hubiera logrado este paso tan importante en mi vida; espero tengamos tiempo suficiente para seguir disfrutando los misterios de la vida.

A Alejandro, Anabel, Cecilio, Cristina, Diana, Eduardo, Emmanuel, Fernanda, Giroshi, Israel, Jairo, Juan Antonio, Mónica, Óscar, y Zeltzin.

Por compartir momentos agradables, por sus conocimientos, enseñanzas y su ayuda invaluable en el laboratorio, por mostrarme siempre una sonrisa y sobre todo por su paciencia para conmigo, con mucho cariño para todos ustedes.

A los CCHeros.

Carlos, Jenny, Marisol, Fermín, Fernando, DJ Spawn, Rodrigo, Elba, Gustavo, Chino, la Plasta, Paulina, Karla, Zaira, Nushmi, Hugo, Capitán Pelusa, Gaby, Tania, Yoyo, Rachel, Abel, Pablo, Alma, Fredy, Víctor Cuéllar, Darit, Víctor Hernández, Chucho, Juan; hemos compartido a lo largo de ocho años tantas e innumerables anécdotas; siempre han creído en mi capacidad y compromiso por alcanzar las metas fijadas, por todo lo vivido, fueron grandes momentos, aprendimos que la amistad es lo más importante y nos mantendrá unidos, a ustedes les debo mucho, siempre dándome ánimo para seguir, nunca permitieron que abandonara ningún proyecto, los admiro y los quiero.

Sé que seguiremos recordando el resto de nuestra vida esta etapa tan maravillosa que me tocó vivir a su lado, gracias.

A los Químicos.

Compartimos el gusto por la química, hemos disfrutado momentos inolvidables y siempre están ahí para ayudarme cuando más lo necesito; con mucho cariño para todos ustedes: Jairo, Toño, Gina, Jonh, Patricio, Oboe, Chuy, Mario, Oldais, Viri, Jessy, Will, Rubén, Fosy, Dani, Xóchitl, Rosario, Querena, Pavel, Fermín, Raúl, Dnéfetm, Giroshi, Cristina, Daniela, Richie, Ismael y Mónica; espero sigan ahí para seguir enseñándome que existe un mundo sin malicia.

A mí querido profesor Luciano Gómez Hernández, por su paciencia en el laboratorio, por todas sus enseñanzas, gracias.

A todos los integrantes de radioterapia

Muy en especial al Dr. Ernesto González † por brindarme todas las facilidades de pertenecer a este grupo integrado por personas que no solamente se especializan en diferentes ramas de la ciencia, sino también en guiar, cuidar y procurar al ser humano; aquí aprendí a regalar una sonrisa a la persona que más lo necesita, porque no sabemos cuándo nosotros necesitaremos una sonrisa que nos aliente; agradezco haber conocido a Rosalba, Sandra, Rodrigo, Maricruz, Mayra, Luz, Pamela, Yolis, Marisol, Bárbara, Graciela Lojero, Gabriel, Elena Justiniani, Evangelina, Miguel, Alejandro, Galileo, Lucero, Liliana, Juanita, Adela, Toño, Jesús, Lizbeth, Karen, Rubén, Dra. Mota, Dr. Fernández, Dr. Herrera, Dr. Lujan, Dra. Poitevin, Dra. Flores y Dr. Enríquez; con cariño para todos ustedes.

A mis amigos del Instituto Politécnico Nacional

Thali, Iván, Diana, Lalo, Daniela, Isaac, Karen y Marisol, me han aceptado como parte de esta gran institución, gracias.

Y como dicen, “siempre comprometidos con el avance tecnológico del país”.

A todas aquellas personas que conocí a lo largo de esta corta trayectoria y que me motivaron una y otra vez para seguir adelante después de cada tropiezo.

Sin ustedes mis logros no tendrían significado alguno.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I.RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	4
II.1 Periodondo	4
II.2 Placa dentobacteriana y enfermedad periodontal	13
II.2.1 Placa gingival	13
II.2.2 Placa supragingival	15
II.2.3 Enfermedad periodontal	15
II.2.4 Clasificación	18
II.3 Bacterias periodontopatógenas	21
II.3.1 Estructura bacteriana	23
II.4 Lipopolisacárido	26
II.5 Virus en la enfermedad periodontal	27
II.6 Receptores Toll de <i>Drosophila melanogaster</i>	29
II.6.1.2 Receptor Tipo Toll 3	34
II.6.2 Vías de transducción	36
II.6.2.1 Vía Map Cinasa	38
II.6.2.2 p38	40
II.6.2.2.1 Participación de p38 en la respuesta inmune innata	44
II.6.2.2.2 Participación de p38 en la inducción de la enzima Ciclooxygenasa-2	48
III.ANTECEDENTES	51
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
V. HIPÓTESIS	53
VI. OBJETIVOS	54
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	55
VII.1 Cultivo celular de Fibroblastos Gingivales Humanos	55
VII.2 Western blot	55
VII.3 Inmunocitoquímica	57
VII.4 Viabilidad celular	57
VII.5 Reacción RT-PCR	58
VII.6 Transfección para evaluar la actividad reportera de luciferasa	59
VIII. RESULTADOS	60
VIII.1 Efecto de Poly (I:C) en la expresión de Ciclooxygenasa-2	60
VIII.1.2 Poly (I:C) induce la expresión de COX-2 de manera dependiente de la dosis	61
VIII.1.3 Efecto de Poly (I:C) en la viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos	62
VIII.1.4 Immunolocalización de Ciclooxygenasa-2 en fibroblastos gingivales humanos	63
VIII.1.5 Determinar la expresión de Ciclooxygenasa-2 en fibroblastos gingivales	64

humanos.	
VIII.1.6 Determinar la actividad relativa de luciferasa en fibroblastos gingivales humanos	68
IX. DISCUSIÓN	70
X. REFERENCIAS	72

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
APC	Células presentadoras de antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
CO₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenasa-2
cPLA2	Fosfolipasa A2 citosólica
CREB	Elemento de respuesta a AMPc
DMEM	Medio de Cultivo Eagle modificado por Dulbecco
dsARN	ARN de cadena doble
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GTP	Guanosín trifosfato
HCl	Ácido clorhídrico
HFG	Fibroblastos Gingivales Humanos
IFN-γ	Interferon Gama
IFN-β	Interferon Beta
IL-1	Interleucina uno
IL-6	Interleucina seis
IL-12	Interleucina doce
JNK	Cinasa terminal-N Jun
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
MAPK	Proteínas Cinasas Activadas por Mitógeno
MTT	Tetrazolio Azul Real
NaCl	Cloruro de sodio
NF-κB	Factor nuclear kappa B
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 cinasa
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína Cinasa C
PKR	Proteína Cinasa R
PLC	Fosfolipasa C
Poly (I:C)	Ácido poli-inosínico/policitidílico
RRL	Repeticiones ricas en leucina
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RTK	Receptores tirosina cinasa

RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
TIR	Receptor Interleucina 1
TLR3	Receptor Tipo Toll 3
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TRAF6	Factor 6 del Factor de Necrosis Tumoral

RESUMEN

La enfermedad periodontal y la caries dental son las principales enfermedades de atención odontológica en la población mexicana; causando destrucción del tejido conectivo periodontal y del hueso alveolar, además en severos casos la pérdida de la pieza dentaria. Históricamente su etiología está asociada con la presencia de microorganismos. En fechas recientes virus como Epstein-Barr, Citomegalovirus y Herpes Humano tipo siete, se han relacionado con el desarrollo de la periodontitis.

Las moléculas doble cadena de Ácido Ribonucleico que se producen como intermediarios de la replicación viral o son parte del genoma viral actúan como ligando de los receptores Tipo Toll 3. El ácido poli-inosínico/policitidílico Poly (I C) es un análogo sintético de Ácido Ribonucleico de doble cadena, que ha sido ampliamente utilizado para estimular al receptor Tipo Toll 3.

La expresión del receptor Tipo Toll 3 ha sido demostrada en fibroblastos gingivales humanos, que son las células predominantes de la encía cuya principal función es la producción de fibras de colágena, reticulina y elásticas, y que asimismo están involucradas en la reparación o destrucción de tejidos en la enfermedad periodontal. Investigaciones recientes demuestran que los fibroblastos gingivales humanos secretan mediadores solubles de inflamación como: Interferon- γ , Prostaglandina E₂, Interleucina 1, Interleucina 6 e Interleucina 8 (12, 24).

La periodontitis es caracterizada por la inflamación del tejido conectivo debido a la presencia de prostaglandinas sintetizadas a partir de ácido araquidónico por la enzima ciclooxigenasa-2. En este trabajo evaluamos el efecto de Poly (I:C) en la regulación de la enzima Ciclooxigenasa-2 mediante ensayos de western-blot. Encontramos que Poly (I:C) regula positivamente la expresión de Ciclooxigenasa-2 mediante las vías de p38, PLC e I κ B, por lo que podemos concluir que Poly(I:C) activa la expresión de mediadores de respuesta inflamatoria en células de fibroblastos gingivales humanos.

I.INTRODUCCIÓN

II.1. Periodonto

El periodonto, también llamado “Aparato de inserción” o “Tejido de sostén del diente”, está formado por los siguientes tejidos (Fig1), (21):

- Encía
- Ligamento periodontal
- Cemento radicular
- Hueso alveolar

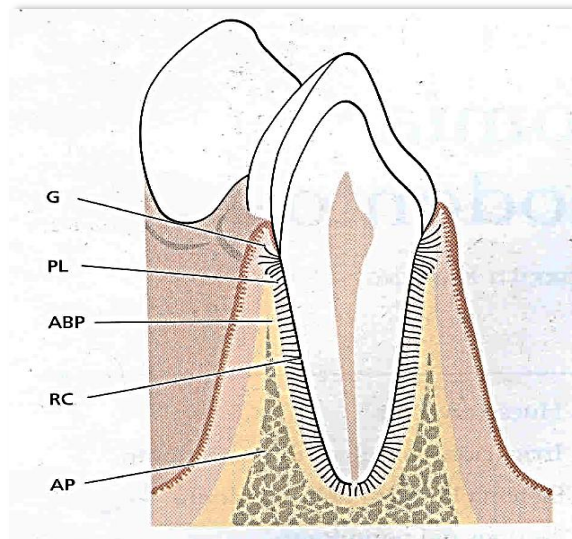


Fig. 1. Esquema de las estructuras del periodonto: encía (G), ligamento periodontal, (PL), cemento radicular (RC), el hueso alveolar propio (ABP) y apófisis alveolar (AP), (21).

La función principal del periodonto es unir el diente al tejido óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal (21).

ENCÍA

La encía es la parte de la mucosa masticatoria que cubre los procesos alveolares y rodea las porciones cervicales de los dientes. Anatómicamente está dividida en encía marginal e insertada (Fig. 2), (21).

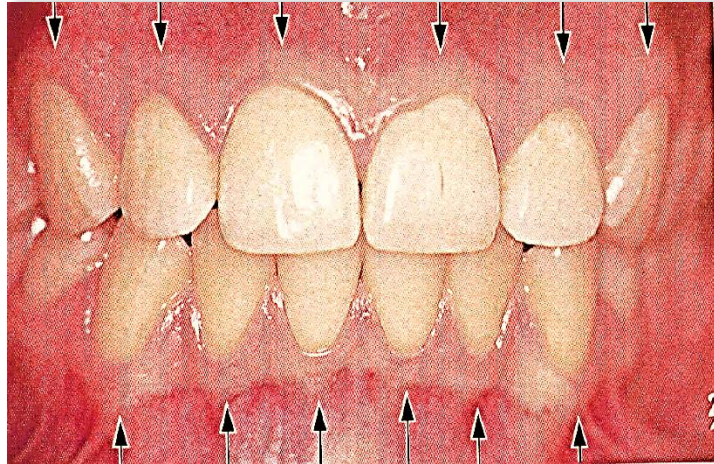


Fig. 2. Imagen de la encía clínicamente sana, (21).

Encía libre o marginal.

La encía libre es el borde de la encía que rodea los dientes a modo de collar, es de color coral, tiene una superficie opaca, consistencia firme y comprende el tejido gingival de las zonas vestibulares, lingual y palatino de los dientes, así como la encía interdental o papilas interdentarias (Fig. 2) (21).

En el lado vestibular y lingual de los dientes, la encía libre va en sentido coronal del margen gingival libre, en sentido apical hasta el surco gingival que está ubicado en un nivel que se corresponde con el nivel del límite cemento adamantino, cuya profundidad al sondeo no excede los 2 o 3 mm. La encía interdental corresponde a las papilas interdentales, su forma está dada por las relaciones de contacto entre los dientes, la anchura de las superficies dentales proximales y el curso de la unión cemento adamantina (21).

Encía adherida:

Está delimitada en sentido coronal por el surco gingival libre y se extiende en dirección apical hacia la unión mucogingival, donde se continúa con la mucosa alveolar. Tiene una textura firme, rosa coral y suele mostrar un puntillado fino que le da el aspecto de cáscara de naranja. Este tipo de mucosa está firmemente adherida al hueso alveolar y cemento subyacentes, por medio de fibras conectivas y es por tanto casi inmóvil en relación con la encía libre (21).

Descripción microscópica de la encía.

La encía está formada por tejido epitelial y tejido conjuntivo, es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes (21).

A) Tejido epitelial:

La encía libre está formada por un epitelio que se encuentra diferenciado de la siguiente forma: epitelio bucal que da hacia la cavidad bucal, epitelio sulcular bucal que va hacia el diente sin ponerse en contacto con el mismo, y un epitelio de unión que permite el contacto encía y diente (Fig. 3) (21).

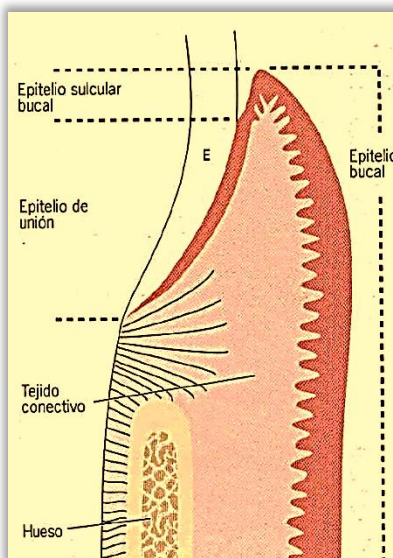


Fig. 3. Esquema de un corte histológico que describe la composición de la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte (21)

El epitelio bucal es un epitelio escamoso estratificado queratinizado, del cual se diferencia en varias capas según su grado de queratinización (21):

- 1.- Capa basal
- 2.- Capa de células espinosas
- 3.- Capa de granular
- 4.- Capa cornificada

Las células basales son células cilíndricas o cuboides que están en contacto con la membrana basal. Las células basales tienen la capacidad de dividirse por medio de divisiones mitóticas. En la capa cornificada se observan las células epiteliales aplanadas, muy cerca entre sí, que han perdido sus núcleos en el proceso de queratinización por lo cual se les llama ortoqueratinizadas (21).

El tejido epitelial está separado del tejido conectivo por medio de la membrana basal, la cual está formada por dos capas; una lámina lúcida hacia las células basales y en una lámina densa hacia el tejido conectivo y de la cual se desprenden las fibras de anclaje. Las células basales que se encuentran en contacto con la lámina lúcida presentan unas zonas gruesas conocidas como hemidesmosomas. Los tonofilamentos citoplasmáticos de la célula convergen hacia esos hemidesmosomas, así estas estructuras participan en la inserción del epitelio a la membrana basal. La unión entre las células está dada por otras estructuras conocidas como desmosomas, que pueden considerarse como hemidesmosomas encontrados (21).

B) Tejido conjuntivo:

Es el tejido predominante de la encía y del ligamento periodontal. Sus componentes principales son las fibras colágenas (60%), células (5%), vasos, nervios y matriz (aproximadamente un 35%) (21).

Células:

Entre las células que se encuentran están predominantemente: los fibroblastos (65% aproximadamente), macrófagos, mastocitos, neutrófilos, linfocitos, y plasmocitos.

El *fibroblasto* es una célula grande, plana y ramificada, fusiforme o estrellada (Fig. 4). Se ocupa de la producción de los diversos tipos de fibras que se hallan en el tejido conjuntivo, también interviene en la síntesis de la matriz del tejido conjuntivo. El fibroblasto es una célula con núcleo ovalado, tiene una delicada membrana nuclear, uno o dos nucléolos notables y una pequeña cantidad de cromatina en gránulos finos. En su citoplasma se observa un retículo endoplasmático granuloso bien desarrollado con ribosomas; su aparato de Golgi es de tamaño considerable y sus mitocondrias son grandes y numerosas. Además en su citoplasma se observan muchos tonofilamentos delgados. Adyacentes a la membrana celular, en la periferia se pueden hallar una gran cantidad de vesículas. Su principal función es la producción de los diversos tipos de fibras halladas en este tejido (fibras colágena, reticulina y elásticas) y de algunos componentes de la matriz celular (glucosaminoglucanos y glucoproteínas). Los demás componentes de la matriz celular son formados por los mastocitos. El fibroblasto también está involucrado en la reparación y destrucción de los tejidos en la enfermedad periodontal (4, 21).

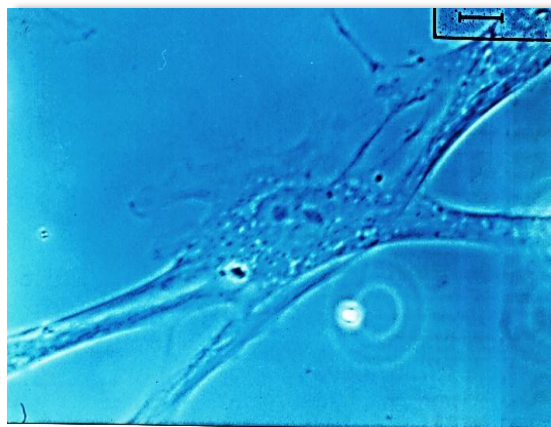


Fig. 4. Microscopia de interferencia de Nomarski de fibroblasto gingival humano. Imagen obtenida en el Laboratorio de Bioquímica de Posgrado de Odontología.

El *mastocito* es responsable de la producción de ciertos componentes de la matriz extracelular, produce sustancias vasoactivas, que pueden afectar el sistema microvascular y controlar el flujo de la sangre a través del tejido; tales sustancias son la histamina y la heparina, que se acumulan en una gran variedad de vesículas que se encuentran en el citoplasma de la célula (21).

Las demás células como los neutrófilos y linfocitos, participan principalmente en la respuesta inflamatoria.

Fibras (4, 21):

Las fibras presentes en el tejido conjuntivo de la encía se dividen en: fibras colágenas, fibras elásticas, fibras de reticulina y fibras oxitalánicas.

Las *fibras de colágena*: son las predominantes y son producidas principalmente por el fibroblasto, aunque también los cementoblastos y osteoblastos poseen esta capacidad. Algunas de ellas se distribuyen al azar y otras se organizan en fascículos con una orientación definida distinguiéndose:

- *Fibras circulares*: siguen un curso dentro de la encía libre y rodean al diente.
- *Fibras dentogingivales*: están incluidas en el cemento de la porción supra-alveolar de la raíz y siguen un trayecto en abanico hacia la encía libre.
- *Fibras dentoperiósticas*: siguen un trayecto en abanico igual que las anteriores pero van hacia el cemento de la porción infra-alveolar de la raíz.
- *Fibras transeptales*: se extienden del cemento supra-alveolar de dientes vecinos.
- *Fibras elásticas*: se encuentran asociadas con los vasos sanguíneos.
- *Fibras de reticulina* se caracterizan por teñirse con la tinción argirofílica y se encuentran principalmente adyacentes a la membrana basal, y en el tejido conjuntivo laxo que rodea a los vasos sanguíneos.
- *Fibras oxitalánicas* están presentes en la encía y en el ligamento periodontal, sin embargo su función es desconocida.

Matriz:

La matriz del tejido conjuntivo es producida principalmente por los fibroblastos y mastocitos; la matriz es el medio donde se difunden los nutrientes para que estas sobrevivan. Su componente principal son macromoléculas de polisacáridos y proteínas, se dividen en: proteoglicanos y glicoproteínas. Los proteoglicanos son moléculas ubicuas que pueden ser encontradas como parte de matriz extracelular en las superficies celulares o asociadas a la membrana celular; participan en la organización estructural de los tejidos y en la regulación de algunos factores de crecimiento, asimismo se encuentran en el líquido sinovial de las articulaciones, el humor vítreo del ojo, el hueso y el cartílago. Las glicoproteínas son proteínas conjugadas que contienen uno o más sacáridos como grupo prostéticos, los cuales carecen de unidad repetitiva seriada y están unidos covalentemente a una cadena peptídica, desempeñan un papel importante en la protección de los tejidos que recubren el sistema respiratorio y gastrointestinal (21).

LIGAMENTO PERIODONTAL:

El ligamento periodontal es el tejido conectivo blando que rodea las raíces dentales y conecta el cemento radicular con la pared del alvéolo; está formado en su mayor parte por fibras colágenas llamadas fibras principales o fibras periodontales, que se disponen en los siguientes grupos (4, 21):

- *Fibras crestodentales*: se extienden desde la cresta ósea, en dirección oblicua hacia la corona, y se insertan en la franja cementaria supra ósea.
- *Fibras oblicuas*: ocupan la mayor parte del ligamento periodontal y siguen una dirección oblicua hacia apical de hueso a cemento. Sirven para detener la intrusión del diente.
- *Fibras apicales*: ocupan las zonas apicales en forma radial. No existen en raíces incompletamente formadas.
- *Fibras de transición*: son pequeños grupos horizontales entre los haces anteriores.

Las fibras que conforman el ligamento periodontal se clasifican en (Fig. 5):

- a) Grupo de la cresta alveolar, que se extiende desde el área cervical de la raíz hasta la cresta alveolar.
- b) Grupo horizontal, estas fibras corren de manera perpendicular desde el diente hasta el hueso.
- c) Grupo oblicuo, estas fibras están orientadas de forma oblicua con inserciones en el cemento y se extienden más oclusalmente en el alveolo.
- d) Grupo apical, se diseminan desde el ápice del diente hasta el hueso.

Esta disposición de las fibras permite sustentar las fuerzas recibidas por el diente. El ligamento periodontal está compuesto principalmente de fibrillas colágenas dispuestas en haces. La colágena representa el 50% del peso seco de todo el ligamento periodontal. Aunque también están presentes fibras elásticas asociadas a los vasos sanguíneos y fibras oxitalánicas. Cerca de la parte media del ligamento, cruzan canales de tejido conectivo laxo, el cual contiene vasos sanguíneo, linfáticos y haces nerviosos (21).

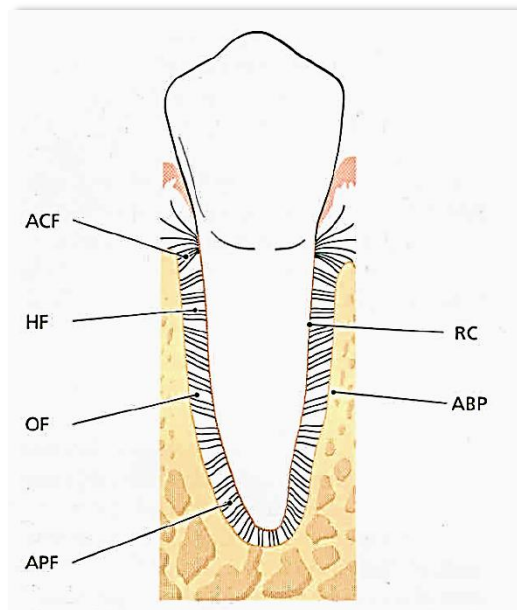


Fig. 5. Esquema de la ubicación de las fibras del ligamento periodontal con respecto al hueso (ABP) y el cemento radicular (RC). Fibras de la cresta alveolar (ACF), Fibras horizontales (HF), fibras oblicuas (OF), Fibras apicales (APF) (21).

CEMENTO RADICULAR:

El cemento es un tejido mineralizado especializado que recubre las superficies radiculares de los dientes, no posee vasos sanguíneos ni linfáticos, no posee inervación, no presenta reabsorción ni remodelado fisiológico, pero se deposita continuamente toda la vida. Consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica. Su contenido mineral lo constituye principalmente la hidroxiapatita en un porcentaje del 95% del peso. Sus funciones principales son la reparación de la superficie radicular y la de la inserción del ligamento periodontal (21).

Hay dos tipos: el cemento acelular o primario que se forma a medida que se va formando la raíz; y el cemento celular o secundario que se forma después de la erupción dentaria y en respuesta a las exigencias funcionales (21).

El cemento acelular cubre siempre la parte cervical del diente y en la porción apical la raíz está cubierta por cemento celular. Ambos cementos son producidos por el cementoblasto que al quedar contenidos dentro del cemento reciben el nombre de cementocitos. En la parte que corresponde al cemento acelular se pueden observar la inserción de fibras del ligamento periodontal que se insertan tanto en el cemento como en el hueso y se conocen como fibras de Sharpey (8, 21).

HUESO ALVEOLAR

La apófisis alveolar o el hueso alveolar es la parte de los maxilares superior e inferior que forma y sostiene los alvéolos de los dientes.

Se pueden distinguir dos tipos de hueso:

- 1.- La porción de hueso alveolar que cubre el alveolo conocida como hueso cortical o a veces llamado lámina dura.
- 2.- La porción de la apófisis alveolar denominada por su aspecto de red, hueso esponjoso.

Junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal constituyen el aparato de inserción de los dientes, cuya función principal es distribuir y reabsorber las fuerzas generadas por los contactos dentarios.

La lámina dura o hueso compacto está perforado por múltiples conductos de Volkmann, a través de los cuales pasan los vasos sanguíneos y linfáticos, así como fibras nerviosas, estos conductos van desde el hueso alveolar hasta el ligamento periodontal (21).

El sistema Haversiano está conformado por estructuras cilíndricas y orientadas longitudinalmente alrededor de los conductos vasculares.

El hueso es formado por las células llamadas osteoblastos, y es reabsorbido por los osteoclastos. Los osteoblastos primero producen el osteoide, constituido por fibras colágenas y una matriz que contiene proteoglicanos y glicoproteínas; este osteoide experimenta una mineralización por depósitos de minerales, como calcio y fosfato, que posteriormente se transforman en hidroxiapatita. Durante este proceso de mineralización los osteoblastos pueden ser incluidos en el osteoide y quedar atrapados, y reciben el nombre de osteocitos, los cuales se nutren y comunican por medio de sus prolongaciones citoplásmicas (21).

II.2 Placa dentobacteriana y enfermedad periodontal.

La placa dental es el acúmulo de depósitos bacterianos en la cavidad bucal. Se clasifica de acuerdo a su localización en supragingival y subgingival (21).

II.2.1. Placa gingival.

Se detecta a simple vista cuando alcanza cierto grosor, es amarilla o blanquecina y tiene mayor grosor a lo largo del tercio gingival del diente y áreas interproximales (21).

La formación de la película adquirida comienza con la aposición de proteínas salivares a la hidroxiapatita depositadas en pocos minutos después de haber limpiado la superficie dentaria (FASE 1). A los pocos minutos de haberse establecido la película adquirida inicia la colonización bacteriana, el primer colonizador es *Streptococcus sanguis*, posteriormente se instala *Actinomyces viscosus*, estos se asocian con las glicoproteínas de la película. La mayor parte de las bacterias provienen de la micro flora salival que baña el diente y algunas otras son transportadas por células descamadas que las llevan adheridas (FASE

2). Posteriormente se inician los fenómenos de agregación bacteriana y se incorporan nuevas bacterias, además de que continúa la multiplicación de las ya presentes (FASE 3), en esta etapa la placa es fina, fácilmente desprendible, el metabolismo bacteriano es principalmente aerobio y está formada principalmente por cocos. La colonización continúa hasta llegar a la placa madura (FASE 4) en donde se han agregado bacterias anaerobias y anaerobias facultativas por el metabolismo bacteriano y la producción de H_2O_2 , las especies predominantes son los cocos Gram-positivos anaerobios facultativos entre ellos *S. sanguis* y *mamitis* y algunas especies de *Actinomyces*. Las superficies receptoras de los cocos y bacilos Gram positivos permiten la posterior adherencia de organismos Gram negativos. La acumulación de la placa a lo largo del margen gingival origina una reacción inflamatoria de los tejidos gingivales. La placa madura se forma en un lapso de tiempo variable, pero puede alcanzarse a las 2 o 3 semanas. Al envejecer la placa las capas más profundas se ven privadas de oxígeno y de nutrientes, los productos de desecho se acumulan y hay una reducción gradual en la cantidad de microorganismos vivos, de tal forma que los estudios microscópicos revelan la presencia de espacios vacíos por autólisis de algunas bacterias. (Fig. 6) (9, 21).

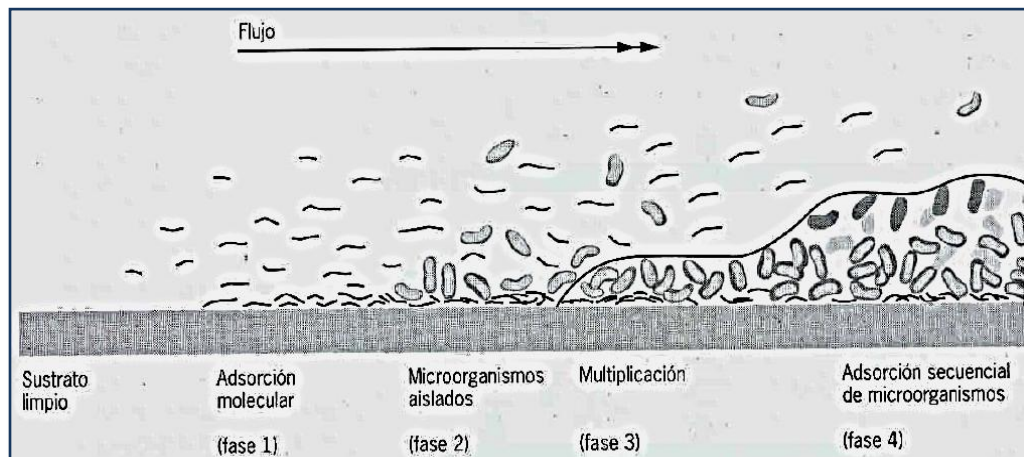


Fig. 6. Etapas en la formación de biopelícula sobre una superficie limpia, dura y no descamante. Fase 1: Adsorción molecular para favorecer la formación de la biopelícula. Fase 2: Adhesión bacteriana. Fase 3: Crecimiento de la matriz extracelular y multiplicación bacteriana. Fase 4: Adsorción secuencial de más bacterias para formar biopelícula más compleja y madura (21).

II.2.2 Placa supragingival.

Es delgada, contenida dentro del surco gingival o bolsa periodontal por lo que resulta difícil su estudio *in situ*. En las porciones más próximas al esmalte va a estar influenciada directamente por la placa supragingival, por lo que su composición es muy similar a ésta, con cocos Gram positivos anaerobios facultativos. La placa no adherida al diente puede estar adherida al epitelio o estar flotante. Las bacterias de la placa flotante comprenden: bacilos Gram negativos anaerobios facultativos como: *Aggregatibacter actinomycetem-comitans*, especies de *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia buccalis* y *Selemonas*. La placa adherida al epitelio está formada por bacterias que tienen la capacidad de adhesión por medio de fimbrias, como *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella melaninogenica*, *Capnocytophaga*, *Selemonas* y *Fusobacterium* (21, 24).

Enfermedad periodontal.

Los padecimientos más frecuentes de los tejidos periodontales son los procesos inflamatorios gingivales y del aparato de inserción dental; son infecciones microbianas relacionadas con la acumulación local de placa dental, cálculos y flora periodontal patógena subgingival (24).

El huésped responde ante el ataque de las bacterias periodonto-patógenas por medio de un proceso inflamatorio e inmune, su objetivo es evitar la extensión de los microorganismos y la invasión a otros tejidos. Sin embargo en ocasiones estas reacciones pueden ser perjudiciales para el huésped mismo, ya que la inflamación daña a las células circundantes y al tejido conectivo (24).

Una encía clínicamente sana tiene una capacidad de respuesta contra los microorganismos como se describe a continuación (21):

- Producción de anticuerpos contra los microorganismos.
- Función fagocitaria de los neutrófilos y macrófagos.
- Producción de elementos del complemento.
- Descamación celular
- Mantenimiento de una barrera epitelial.

- Un flujo líquido positivo de la hendidura gingival, que puede eliminar los microorganismos y productos nocivos.

Todos estos factores pueden actuar en conjunto para reducir la carga bacteriana y así prevenir una respuesta excesiva de los sistemas de defensa de los tejidos que podría conducir a la formación de una lesión. La relación huésped-microorganismo que constituye una encía libre de infiltrado inflamatorio es modificada en la gingivitis y periodontitis.

En 1976 Page y Schroeder dividieron la lesión progresiva en los tejidos gingivales/periodontales en cuatro fases: *inicial*, *temprana*, *establecida* y *avanzada*.

La descripción de la lesión inicial y temprana caracterizan los cambios histopatológicos de la encía clínicamente sana y los estadios tempranos de la gingivitis mientras que la lesión establecida caracteriza a la gingivitis crónica; la lesión avanzada refleja la fase en la cual la gingivitis progresa a la periodontitis y es una lesión que se asocia a la pérdida de inserción y tejido óseo (21).

Lesión gingival inicial

Una lesión gingival comienza con formación de la placa dental desarrollándose rápidamente el proceso inflamatorio. Dentro de las 24 horas ocurren cambios que evidencian en el plexo dento-gingival como un aumento del aporte sanguíneo. La dilatación de las arteriolas, los capilares y las vénulas a la red vascular se torna una característica prominente. La presión hidrostática en la microcirculación se incrementa provocando la permeabilidad micro vascular y como consecuencia la exudación de líquido y las proteínas que invaden los tejidos y se produce una penetración de células inflamatorias (linfocitos, macrófagos y neutrófilos) en el tejido conectivo subyacente al epitelio de unión (21).

Simultáneamente a las alteraciones vasculares, se produce la migración de leucocitos desde los capilares, ésta salida es reforzada por moléculas de adhesión como ICAM-1 y (molécula de adhesión intercelular -1) y la molécula-1 de adhesión leucocitaria endotelial (ELAM-1) y otras adhesinas (21).

Los leucocitos migran por quimio taxis de factores microbianos y del huésped. Entre los factores quimio tácticos que atraen los leucocitos se encuentran el péptido metionilleucilfenilalanina (FMLP) y citocinas como la IL-8, moléculas producidas por los neutrófilos como la leucotrieno B4 (21).

Lesión gingival temprana

Se caracteriza por la presencia de vasos dilatados, los linfocitos y neutrófilos constituyen un infiltrado leucocitario predominante en esta etapa y se observan pocos plasmocitos, el infiltrado constituye hasta un 15% del tejido conectivo debajo del epitelio de unión; existiendo un mayor espacio para el infiltrado inflamatorio. Se produce aumento de las células basales del epitelio de unión y sulcular, lo cual probablemente ocurre por un intento del cuerpo por reforzar la barrera innata la placa. También se presenta destrucción de colágena, la cual se debe principalmente a la inducción de proteasas del huésped (21).

Lesión gingival establecida.

En esta hay un incremento de exudado líquido y migración de leucocitos hacia los tejidos y la hendidura gingival. Su característica principal es que está dominada por plasmocitos, encargados de la defensa humoral, que se caracterizan por la producción de anticuerpos contra un agente patógeno, su función se relaciona con la capacidad de opsonizar bacterias para prevenir la colonización microbiana.

Continúa con la pérdida de colágeno y la proliferación de las células epiteliales, el epitelio de la bolsa no está adherido a la superficie dentaria y tiene una fuerte infiltración leucocitaria con predominio de neutrófilos, en comparación con el epitelio de unión original, el epitelio de la bolsa es más permeable al paso de sustancias hacia dentro y hacia fuera de los tejidos conectivos subyacentes (21).

Lesión gingival avanzada.

El infiltrado inflamatorio se extiende lateral y apicalmente, la lesión avanzada tiene las características de una lesión establecida excepto porque existe una pérdida de hueso alveolar y un importante daño de las fibras, el epitelio de unión migra apicalmente desde el límite cemento adamantino (21).

II.2.4 CLASIFICACIÓN

Se han utilizado diferentes clasificaciones de las enfermedades periodontales, en fechas recientes un comité de expertos clínicos e investigadores científicos convocados por la Academia Americana de Periodontología desarrollaron un sistema de clasificación para ordenar las diversas entidades clínicas de la enfermedad periodontal.

La clasificación actual es en base a su etiología y la capacidad de respuesta del huésped (21):

I.- Enfermedades gingivales.

A.- Enfermedad por placa dental.

1. Gingivitis asociada únicamente a placa
2. Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos.
 - a. Asociadas al sistema endócrino
 - b. Asociadas a discrasias sanguíneas
 - 1) Gingivitis en la leucemia
3. Enfermedades gingivales influenciadas por medicación
 - a. Influencia por drogas
 - 1) Agrandamientos gingivales inducidos por drogas
 - 2) Gingivitis influenciada por drogas
 - b. Influenciada por anticonceptivos
 - c. Otros.
4. Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición
 - a. Gingivitis por deficiencia de ácido ascórbico
 - b. Otros.

B.- Enfermedades gingivales no asociadas a la placa

1. Lesiones originadas por bacterias específicas
 - a. *Neisseria gonorrhoea*
 - b. *Treponema pallidum*
 - c. *Streptococcus* sp.
 - d. Otras variedades.
2. Enfermedad gingival de origen viral
 - a. Infecciones por herpes
 - b. Otras
3. Enfermedad gingival de origen fúngico
 - a. Infecciones por *Candida* sp.
 - b. Eritema gingival lineal
 - c. Histoplasmosis
 - d. Otras
4. Lesiones gingivales de origen genético
 - a. Fibromatosis gingival hereditaria
 - b. Otras
5. Manifestaciones gingivales de ciertas condiciones sistémicas
 - a. Desórdenes mucocutáneos
 - 1) Liquen plano
 - 2) Penfigoide
 - 3) Pénfigo vulgar
 - 4) Eritema multiforme
 - 5) Lupus eritematoso
 - b. Reacciones alérgicas
 - 1) Materiales dentales
 - 2) Otros.
6. Lesiones traumáticas
7. Reacciones a cuerpo extraño
8. No especificadas

II. Periodontitis.

1.- Crónica

- A. Localizada
- B. Generalizada

2.- Periodontitis agresiva

- A. Localizada
- B. Generalizada

3.- Periodontitis con manifestaciones de enfermedades sistémicas.

- A. Asociada con desórdenes hematológicos
 - 1. Neutropenia adquirida
 - 2. Leucemias
 - 3. Otras.
- B. Asociada con desórdenes genéticos
- C. No especificadas (NES)

4. Enfermedades periodontales necrotizantes.

- A. Gingivitis ulcerativa necrosantes (GUN)
- B. Periodontitis ulcerativa necrosante (PUN)

5. Abscesos en el periodonto.

- A. Absceso gingival
- B. Absceso periodontal
- C. Absceso periocoronal

6. Periodontitis asociadas con lesiones endodónticas

7. Deformidades y condiciones del desarrollo y adquiridas

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

B. Deformidades mucogingivales y condiciones alrededor del diente.

Deformidades mucogingivales y condiciones de procesos edéntulos.

D. Trauma oclusal.

La gingivitis es un proceso inflamatorio de la encía, en el cual el epitelio de unión se localiza en su nivel original, es decir, en o cerca de la unión cemento-esmalte. Esta inflamación se presenta con cambios de color, forma de la encía, posición, aspecto de la superficie y la presencia de hemorragia o exudado leve (21).

La periodontitis es una enfermedad crónica, destructiva, supurativa e inflamatoria de los tejidos de soporte del diente. Clínicamente puede observarse inflamación de la encía dependiendo de las bolsas periodontales, migración apical del epitelio de unión y exposición del cemento radicular al medio ambiente oral, además el diente presenta movilidad, debido a la pérdida del ligamento periodontal. La velocidad de la progresión de esta enfermedad varía considerablemente. Otra característica importante es que el epitelio de la bolsa está ulcerado (21, 24).

II.3 BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

La historia de la microbiología bucal es paralela a la de la microbiología y la enfermedad infecciosa en general, y comienza en 1683 con el descubrimiento de la primera bacteria encontrada en la placa dental por Leeuwenhoek.

Por otro lado en 1890 Miller obtuvo fama por su teoría ácido génica de la caries dental y también propuso que la piorrea alveolar no la causaba una bacteria específica, sino que participaban diversas bacterias; como un proceso supurativo en el cual se implican varias bacterias. Esta es una de las primeras declaraciones de lo que ahora es la hipótesis de placa no específica (21).

A principios del siglo XX, algunos investigadores como Bass, Smith, Barret consideraron que estaban implicadas en la enfermedad periodontal algunos tipos de amibas, de hecho Bass le llamó *Endoamebabuccalis*; otros autores mencionaron espiroquetas, estreptococos, *Staphylococos*, y al *Bacteroides melaninogenicum* como causantes de la enfermedad, constituyendo la hipótesis de placa específica (45).

En la mitad de los 80's, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Wolinella recta* y otros

microorganismos son asociados a la enfermedad periodontal, la lista de los patógenos posibles asociados a la enfermedad continúa creciendo, gracias a los avances de las técnicas de cultivo y de observación (45).

Se ha demostrado que las enfermedades periodontales son causadas por bacterias y virus presentes en la placa dental bacteriana, asimismo la presencia Herpes virus, Citomegalovirus y Epstein Barr virus fueron detectados en biopsias de pacientes con periodontitis implicándolos en la patogenia de la enfermedad (31, 35).

Socransky modificó estos postulados para poder determinar que bacterias debían ser consideradas como causales de la enfermedad, estos son (21):

- 1.- Los patógenos están presentes en la proximidad de las lesiones periodontales y en grandes cantidades.
- 2.- Los pacientes infectados desarrollan altas concentraciones de anticuerpos en el suero, saliva y líquido gingival.
- 3.- La eliminación de estos microorganismos disminuye la gravedad de la enfermedad.
- 4.- Los microorganismos deben poseer factores de virulencia relevantes en la iniciación y progreso de la enfermedad.
- 5.- La implantación experimental del microorganismo en el surco gingival de un animal permite el desarrollo de alguna de las características de la enfermedad.

La enfermedad periodontal está asociada con una micro flora compleja en la cual más de 350 especies pueden ser encontradas, esto entre bacterias y algunos hongos como *Candida* (35).

Una variedad de microorganismos predominantemente Gram negativos, anaerobios y móviles participan en la etiología de la enfermedad. Entre las especies más mencionadas encontramos: *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Camphylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*,

Peptostreptococcus micros, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus intermedius* y especies de *Treponema* (21, 24, 35).

II.3.1 Estructura bacteriana.

Las bacterias son células unicelulares procariotas, su información genética está contenida en una gran molécula circular de ADN bicatenario, el material genético no se encuentra delimitado en un núcleo por una membrana nuclear. El citoplasma celular contiene muchos ribosomas pero carece de otros organelos por lo cual muchas de sus funciones metabólicas las realiza en la membrana celular. En todas las bacterias, excepto en los micoplasmas, la célula está rodeada por una pared celular compleja, que ha sido considerada para la clasificación de las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Por fuera de la pared celular las bacterias pueden poseer cápsulas, flagelos y pilis que desempeñan papeles importantes en la relación huésped-parásito (21).

Pared Celular.

La pared celular difiere en las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Fig. 7), sin embargo tienen un componente común llamado péptidoglucano (mucopéptido o mureína), es un polímero mixto de azúcares hexosa (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) y aminoácidos (21).

En las bacterias Gram positivas, la pared forma una gruesa capa externa de la membrana celular y puede contener otras macromoléculas (21).

En bacterias Gram negativas, la capa de peptidoglucano es delgada y está cubierta por una membrana externa, las principales moléculas presentes en ésta membrana externa son lipopolisacáridos y lipoproteínas. El lipopolisacárido de la membrana le confiere a estas especies propiedades tóxicas y antigénicas (21).

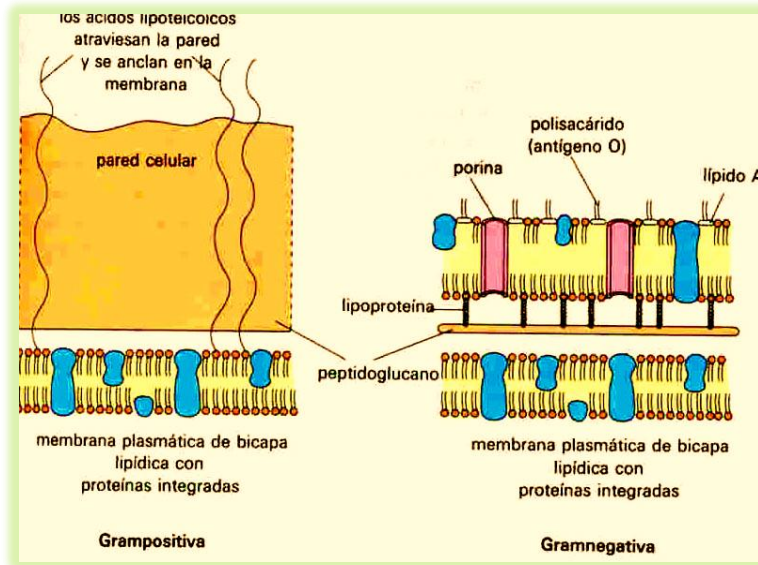


Fig. 7. Esquema de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas (21).

Cápsula.

Esta estructura rodea a la pared celular, está presente solo en algunas especies, está formada por polisacáridos de alto peso molecular. Esta superficie proporciona protección contra la fagocitosis por células del huésped (21).

Flagelos.

Son filamentos helicoidales largos que se extienden desde la superficie celular para generar fuerzas de propulsión y permitir que la bacteria se mueva en su medio, pueden estar limitados a los polos de la célula y ser únicos (polares) o formar penachos (lopotricos), o bien aparecer distribuidos sobre la superficie general de la célula (peritricos). Los flagelos están constituidos por componentes proteínicos (flagelinas) fuertemente antigénicos (21).

Pili.

Son otra forma de proyecciones superficiales bacterianas, están formados por proteínas conocidas como adhesinas. Su función consiste en promover la adherencia a otras bacterias o a las células del huésped. La existencia de muchos pilis sobre la superficie bacteriana evita la fagocitosis por parte de la defensa del huésped (21).

Los principales microorganismos asociados a distintas enfermedades periodontales se presentan en la tabla 1.

Tabla I. Microorganismos asociados a enfermedades periodontales (21).

Microorganismo	Gingivitis asociada a PDB.	Perio. crónica	Perio. Juvenil local y gral.	Perio. Enf. Sistémicas VIH.
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	-	++	+++	+
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	+++	-	+
<i>Prevotella intermedia</i>	++	++	+	++
<i>Bacteroides forsythus</i>	-	+++	+	?
<i>Fusobacterium (spp)</i>	+++	++	-	+
<i>Peptostreptococcus micros</i>	-	+++	-	++
<i>Woillenella recta</i>	+	++	+	+++
<i>Treponema denticola</i>	++	++	-	++
<i>Actinomyces (spp)</i>	+++	-	-	-
<i>Capnocytophaga (spp)</i>	-	++	+	-
<i>Eikenella corrodens</i>	-	+	+	?
<i>Streptococcus (spp)</i>	+++	-	-	-

II.4 Lipopolisacárido

Las paredes celulares de las bacterias Gram negativas están compuestas por una fina capa de péptidoglicano, situada a continuación de la membrana plasmática y rodeada por ambos lados de espacio periplásmico, estudios recientes demuestran que puede constituir aproximadamente del 20 al 40% del volumen total de la célula (21).

La membrana externa se encuentra cerca de la capa de peptidoglicano y está unida de manera covalente a la célula a través de la lipoproteína de Braun al peptidoglicano subyacente y está inmersa en la membrana externa por su extremo hidrofóbico, de igual manera, se encuentra unida a través de sitios de adhesión (21).

El lipopolisacárido es el componente más complejo de la membrana externa, consta de tres partes: lípido A, polisacárido central o *core*, y cadena lateral O. La región del lípido A contiene dos derivados de glucosamina cada uno con tres ácidos grasos y un pirofosfato o fosfato unido. Los ácidos grasos unen lípido A a la membrana externa, mientras que el resto de la molécula de LPS sobresale de la superficie. El polisacárido central o *core* está unido al lípido A. La cadena lateral O es un polisacárido que se extiende hacia fuera respecto al *core*. Contiene varios azúcares y su composición varía según la cepa bacteriana (Fig. 7) (21).

El lipopolisacárido proporciona adhesión bacteriana a superficies y a la formación de biopelículas, además participa en la protección de la bacteria frente a las defensas del huésped. Esta respuesta implica la producción de anticuerpos que se unen a la forma cepa-específica del lipopolisacárido que desencadenó la respuesta inmunitaria (21).

II.5 Virus en la enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal representa una amplia gama de condiciones patológicas, que muestran una gran variedad de presentaciones clínicas y que son ocasionadas por infecciones polimicrobianas y mecanismos patofisiológicos. Recientemente se ha demostrado que este padecimiento afecta a la mayoría de la población adulta en el mundo, pero solo un bajo porcentaje de los pacientes afectados recibe un tratamiento adecuado. La terapia periodontal convencional consiste en la estabilización de la enfermedad acompañada por la disrupción mecánica de la placa y el cálculo dental (31, 35). La comprensión de la etiopatogenia de la enfermedad periodontal es un pre-requisito para el diseño y desarrollo de estrategias terapéuticas a fin de hacer más eficiente y efectivo el tratamiento contra esta enfermedad, por lo que la identificación de los factores periodontopáticos es determinante en los estados iniciales de la enfermedad (35). La enfermedad también está relacionada a defectos inmuno-genéticos, a enfermedades sistémicas que primariamente no afectan los tejidos orales, factores medioambientales y/o demográficos; aún no se han esclarecido los factores de riesgo debido a su amplia etiología debido a que están involucradas las variaciones genéticas o inmunológicas o bien en relación con factores socioeconómicos, estilos de vida o diferencias culturales (31, 35).

Se han reportado severos casos de periodontitis que conlleva a la destrucción del periodonto en pacientes infectados por alguna enfermedad viral como: encefalitis, neumonía, cáncer cervico-uterino, linfomas, adenocarcinomas de colon y próstata. Además se han encontrado más de un millón de copias del genoma de herpes virus en un sitio afectado con periodontitis. La abundancia de herpes virus en lesiones con periodontitis agresiva sugiere que los virus tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal. La presencia de este virus promueve la liberación de citocinas pro-inflamatorias que tienen el potencial de activar a los osteoclastos y la síntesis de metaloproteinasas de matriz (31, 35).

Herpes virus y bacterias se han visto co-agregadas, de tal manera, se explica las severas características clínicas de la periodontitis y el riesgo de la progresión de la enfermedad. Diversas investigaciones revelan la presencia de herpes virus en el periodonto aún en condiciones de salud, en pocas palabras, se suman las características patogénicas de la relación herpes virus-bacteria en la infección periodontal (31).

En estudios sobre periodontitis, la variación para herpes virus oscila del 13 al 100%; virus Epstein-Barr del 3 al 83% y de citomegalovirus del 0.3 al 83% en sitios con periodontitis agresiva/progresiva en relación con los sitios afectados con periodontitis crónica (6, 35).

Por este motivo algunos investigadores sugieren que agentes infecciosos específicos ocasionan la enfermedad y otros enfatizan la importancia de diversos factores inmunes o genéticos del huésped y precisamente por esta diversidad es que la clasificación es muy amplia.

Asimismo, en sitios sanos, la placa dentobacteriana alberga predominantemente bacterias facultativas Gram-positivas, mientras que en las lesiones periodontales se encuentran una amplia variedad de especies anaeróbicas Gram-negativas. El desplazamiento en la microbiota periodontal con el desarrollo de enfermedad es el resultado una interacción multifactorial entre el ecosistema los microorganismos que conforman la placa dentobacteriana con las respuestas inmune del huésped (31).

Una importante excepción es la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que está asociada con el desarrollo de la periodontitis localizada agresiva (juvenil) (24). Como se espera de un verdadero patógeno las cuentas de este microorganismo muestran un dramático incremento en relación con la pérdida de la adherencia (21).

Con excepción de la periodontitis agresiva localizada, la periodontitis destructiva se desarrolla con un ataque no predecible al periodonto y con eventos infecciosos que progresan de una gingivitis a periodontitis. Este proceso discurre a través de revisión de la enfermedad que se ve interrumpida por episodios ocasionales de recaída clínica por lo que base biológica subyacente no ha sido determinada aún. Afecta a pocas piezas dentales con la presencia de periodontopatógenos en saliva. Se asume que la periodontitis se desarrolla en individuos infectados por agentes virulentos y desarrollan inflamación gingival persistente y diferentes respuestas inmunes (21).

II.6 Receptores Toll de *Drosophila melanogaster*.

Los genes Toll, Tube, Pelle, Easter, Cactus, Dorsal homólogo de NF- κ B de *Drosophila melanogaster* fueron descubiertos en 1984 por C. Nusslein-Volhard y E. Wieschaus, estos genes participan en la embriogénesis y el establecimiento de los ejes dorso-ventrales de la mosca de la fruta, asimismo son requeridos para la respuesta inmune (40, 43).

Los receptores Toll son proteínas transmembranales con un dominio extracelular que contiene repetidos ricos de leucina (LRR) y un dominio rico de cisteína próximo a la membrana celular. Los repetidos ricos de leucina son aproximadamente 24 residuos de aminoácidos, cada uno contiene un número abundante de residuos de leucina; el dominio intracelular cercano a la membrana es homólogo al dominio intracelular del receptor de Interleucina uno (IL-1R), este dominio es conocido como dominio TIR (40, 43).

La activación de la vía de señalización del receptor Toll en *Drosophila melanogaster* comienza con una cascada proteolítica provocando cambios conformacionales de Spatzle (Spz) para ser reconocido por el receptor. Spatzle es una proteína sintetizada y secretada como un precursor inactivo que consiste en un prodominio en la región carboxilo terminal; se han sugerido dos modelos: un dímero de Spz se une a dos receptores o dos dímeros de Spz se une al amino

terminal de una de los dos receptores Toll. Después de la unión ligando-receptor el dominio TIR une al adaptador MyD88, posteriormente las proteínas Tube y Pelle son reclutadas para formar un complejo heterotrimérico fosforilando al factor Cactus para activar a NF- κ B y permitir la transcripción de genes (Fig. 8) (40,43).

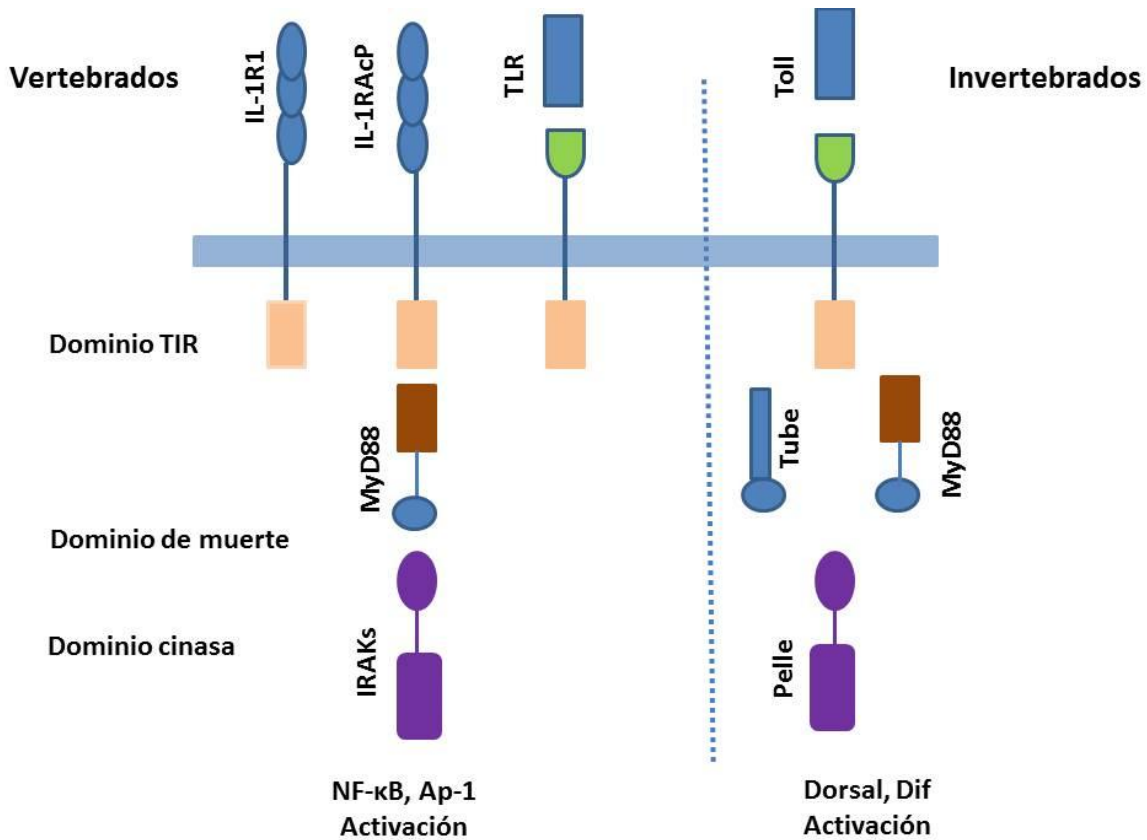


Fig. 8. Esquema de la vía de señalización de receptores Tipo Toll, Toll e IL-1R (43).

El sistema inmune de la mosca de la fruta está integrado por componentes celulares y humorales. Infecciones por hongos y bacterias Gram-positivas activan la vía de señalización intracelular Toll, que permite la producción de péptidos antimicrobianos; señalización que es paralela a la inducida por IL-1R de células de mamífero (40).

II.6.1 Receptores tipo Toll en mamíferos.

El receptor tipo Toll de mamífero fue caracterizado y clonado a partir de la proteína Toll de *Drosophila melanogaster* en 1997 por R. Medzhitov y C. Janeway, este receptor tiene la misma arquitectura que el receptor Toll de *Drosophila melanogaster* (Fig. 8) (25).

Los receptores tipo Toll (TLRs) son proteínas transmembranales que se expresan en una amplia variedad de tipos celulares y cuya función es el reconocimiento de microorganismos invasores y la activación de vías de señalización que promuevan la expresión de moléculas promotoras de respuesta inflamatoria. En mamíferos la familia de los receptores Tipo Toll incluye 10 proteínas (TLR1-10) (18, 27).

Los receptores tipo Toll consisten en una región extracelular que contiene regiones repetidas ricas en leucina y un dominio rico en cisteína, una región transmembranal y un dominio citosólico denominado TIR (Receptor a Interleucina-1/Receptor Toll-IL-1R). Diferentes receptores Tipo Toll sirven como receptores para diversos ligandos, entre los que incluyen componentes bacterianos, RNA doble-hebra de derivado de virus, o compuestos inmunomodulatorios. La activación de los receptores Tipo Toll ocurre después de la unión de un ligando afín a la porción de repeticiones ricas en leucina del receptor. En humanos TLR 1, 2, 4, 5 y 6 se encuentran en la membrana externa y responden a PAMP asociados a la superficie bacteriana. El segundo grupo TLR 3, 7, 8 y 9 se encuentra en superficies endosomales y responden a Patrones Moleculares Asociados a Patógenos basado en ácidos nucleicos derivados de virus y bacterias. El receptor tipo Toll activado regula vías de señalización entre las que se incluye la activación de NFκB (Factor nuclear-kappa B) y las MAPKs (Proteínas cinasas activadas por mitógeno). El segundo patrón de activación que involucra a TLR3 y TLR4 conduce a la activación de NF-κB y a otro factor de transcripción IRF3 (Factor regulador interferon-3) permitiendo la expresión de genes adicionales entre los que se incluyen genes anti-virales como IFN-β (Interferón-beta) (27, 40).

Actualmente se han identificado 10 receptores tipo Toll en humanos, 13 en ratón (tabla II), cada uno de ellos es receptor específico para diversos estímulos externos que lleguen a las células (18). En estudios realizados con lipopolisacárido purificado de bacterias Gram-negativas se observó que éste actuaba sobre el receptor tipo Toll 2 y 4, sin embargo actualmente se sabe que el receptor tipo Toll 2 tiene poca afinidad por el lipopolisacárido y que esto pudo ocurrir por la presencia de lipoproteínas en el lipopolisacárido aislado, concluyendo que el receptor tipo Toll 2 reconoce las lipoproteínas de las bacterias Gram positivas y el receptor tipo Toll 4 el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas. El receptor tipo Toll 3 está implicado en la respuesta a ARN viral, receptor tipo Toll 5 a flagelina, receptor tipo Toll 9 a ADN de bacterias (24, 27, 43).

Tabla II. Miembros de la familia de Receptores tipo Toll conocidos (18, 19).

TLRs	Ligando principal	Patógenos
TLR1	Cofactor de TLR2	Gram ⁺ , Gram ⁻ , mycobacterias, espiroquetas, micoplasma
TLR2	Lipoproteínas, glucopéptidos, péptidogluano.	Gram ⁺ , Gram ⁻ , mycobacterias, espiroquetas
TLR3	Hebra doble de ARN	Virus
TLR4	Lipopolisacárido	Gram-negativas
TLR5	Flagelinas	Flagelos de Gram ⁺ y Gram ⁻
TLR6	Cofactor de TLR2	Gram ⁺ , Gram ⁻ , mycobacterias, espiroquetas, micoplasma
TLR7	Imidazoquinoline	Componentes antivirales sintéticos
TLR8	Desconocido	-
TLR9	ADN modificado CpG	todas las bacterias
TLR10	Desconocido	-

Otras características de los receptores tipo Toll es que comparte dominios con los receptores de la familia de IL-1R (40), conocidos como receptores toll-interleucina 1 que han sido involucrados en la respuesta alérgica.

Receptor tipo Toll 3.

El receptor tipo Toll 3, es una proteína transmembranal compuesta de un ectodominio con repeticiones ricas en leucina (RRL), una región transmembranal y un dominio TIR conservado a nivel de citoplasma (Fig. 9). El dominio transmembranal consiste en estructuras α -hélice, el dominio TIR está compuesto de estructuras tipo β -plegada y α -hélice unidas por BB-loop interactuando directamente con el adaptador de TLR. Este BB-loop contiene un residuo de alanina que interactúa con el adaptador TRIF, involucrado en la señalización. El dominio extracelular consiste en 23 repeticiones ricas de leucina adquiriendo forma de herradura que es altamente glicosilada; el mecanismo de unión de cadena doble de ARN al receptor tipo Toll 3 se debe a la región glicosilada de la proteína. Se ha propuesto un modelo de dimerización del receptor, dos moléculas de TLR3 dimerizan por el dominio extracelular, el dominio extracelular rota 180°, por lo que provee al ligando la unión (12, 41).

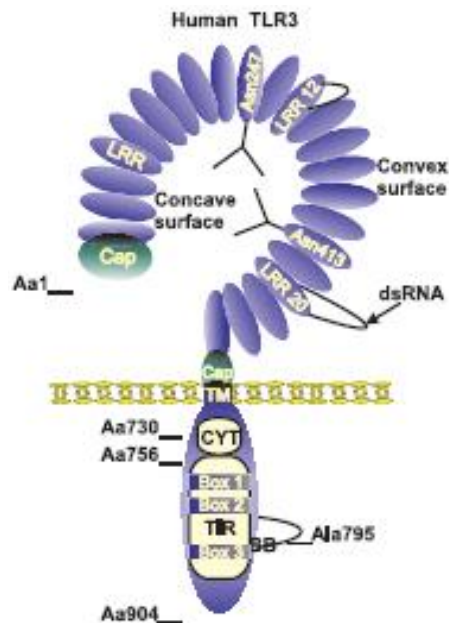


Fig. 9. Estructura del receptor tipo Toll 3 humano, proteína de 904 aa. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by Toll Like Receptor 3 (41).

Ulteriormente del reconocimiento específico de ARN de doble cadena, producido como un intermediario del ciclo de replicación o como parte del genoma viral, se desencadenan intracelularmente cascadas de señalización, estimulando el

reclutamiento de proteínas adaptadoras como TRIF, culminando en la activación de NF- κ B, MAP cinasa y el IRF 3, dando la apropiada y efectiva respuesta de la respuesta inmune en contra de patógenos (12, 41).

Localización del receptor tipo Toll 3

El receptor tipo Toll 3 ha sido encontrado en compartimentos endosomales o en la superficie celular; la localización del receptor tipo Toll 3 depende del tipo celular, lo que conlleva a la participación de específicas vías en la inducción de Interferón antiviral. Algunos tipos celulares como las células dendríticas no expresan al receptor en su superficie celular, diversas investigaciones sugieren que la doble cadena de ARN es internalizada para unirse y activar a TLR3 (41).

Función de TRIF como molécula adaptadora del receptor tipo Toll 3.

El dominio TIR del receptor es el responsable de llevar a cabo la señalización y reclutar a TRIF, que indirectamente activa a factores de transcripción incluyendo IRF 3 y NF- κ B induciendo la producción de interferón tipo uno permitiendo la eliminación de virus. IRF 3 es un miembro de la familia de factores de transcripción, regulando genes que codifican para Interferón tipo uno, está involucrado tanto en la respuesta inmune adaptativa e innata, es constitutivamente expresado y activado por fosforilación de residuos de serina-treonina y así de su translocación al núcleo después de la formación del complejo IKK y TBK1 (18, 41).

El factor de transcripción NF- κ B es requerido para la expresión de genes mediadores de inflamación; es secuestrado en el citoplasma por miembros del factor nuclear κ B, cuando es fosforilada I κ B es rápidamente ubiquitinizada y degradada por proteosoma, dirigiéndose al núcleo, uniéndose a DNA y activando factores de transcripción en respuesta inflamatoria (12, 18).

Fosforilación de tirosina en el receptor tipo Toll 3

Comienza la señalización intracelular con la fosforilación de residuos de tirosina 759 y tirosina 858 contribuyendo a la activación de IRF3 y NFκB. La fosforilación de tirosina 858 está involucrada en la activación de TBK1 induciendo la parcial fosforilación y activación de IRF3 dimerizándose y traslocándose a núcleo. La fosforilación de tirosina 759 permite el reclutamiento de PI3K, la activación de Akt, que es requerida para la fosforilación y activación de IRF3 en el núcleo. Una señal permite la fosforilación de la proteína inhibitoria IκB, permitiendo la translocación de NFκB al núcleo; la otra señal permite la fosforilación de p65 subunidad de NFκB llevando a la activación (41).

La fosforilación de residuos de tirosina también puede darse por la unión de proteínas con dominio SH2. Recientemente se ha demostrado que la proteína c-Src se une al receptor tipo Toll 3 induciendo la activación de IRF3 (41).

Señales celulares y vías de transducción.

La membrana plasmática separa a la célula del medio que la rodea. Sólo es permeable a pequeñas moléculas solubles en lípidos, como las hormonas esteroideas, que pueden difundir a través de ella para adentrarse en el citoplasma. Es impermeable a los materiales solubles en agua, incluyendo los iones, pequeñas moléculas inorgánicas, y polipéptidos o proteínas. La respuesta al material hidrofílico depende de la interacción sobre la cara extracelular de la célula con un componente proteínico de la membrana plasmática. La molécula extracelular es llamada generalmente el ligando y la proteína de la membrana plasmática que la une se le llama receptor (12).

Así podemos definir un receptor como una estructura química capaz de recibir al mensajero y de transmitir el mensaje para que se produzca la respuesta de la célula. El receptor es una proteína grande de peso molecular elevado, y sus funciones principales son reconocer al mensajero y activar la secuencia de eventos que conducen a la respuesta celular. La información para su síntesis está almacenada en el material genético de cada célula; su superficie presenta un sitio de reconocimiento al que se une el mensajero. Las superficies del mensajero y del

receptor se unen con un alto grado de selectividad entre sí, así como de afinidad. La afinidad puede definirse como una medida de la fuerza de interacción entre dos sustancias. Por su localización los receptores se pueden dividir en dos grandes familias; los que se localizan en la membrana plasmática y los intracelulares.

La transmisión de una señal implica la interacción de un ligando extracelular con una proteína transmembranal que tiene dominio a ambos lados de la membrana. La unión del ligando convierte al receptor de su forma inactiva a la activa. El principio básico de esta interacción es que la unión del ligando en la cara extracelular influye en la actividad del dominio del receptor que se encuentra en la cara citoplásmica. Este proceso recibe el nombre de transducción de la señal.

La transducción de la señal proporciona un medio de amplificación de la señal original. El principio de la transducción de señales es que la forma activa de un receptor dispara una actividad catalítica en el citoplasma. La amplitud de la señal citosólica es mucho mayor que la señal extracelular original. Una molécula producida en respuesta a la transducción de una señal extracelular se denomina segundo mensajero.

Se conocen diferentes vías de transducción en donde intervienen distintos segundos mensajeros como pueden ser la fosforilación de proteínas a través de AMPc o GMP, o la de fosfolípidos y calcio, en este caso nos interesará investigar la vía de las MAP cinasas.

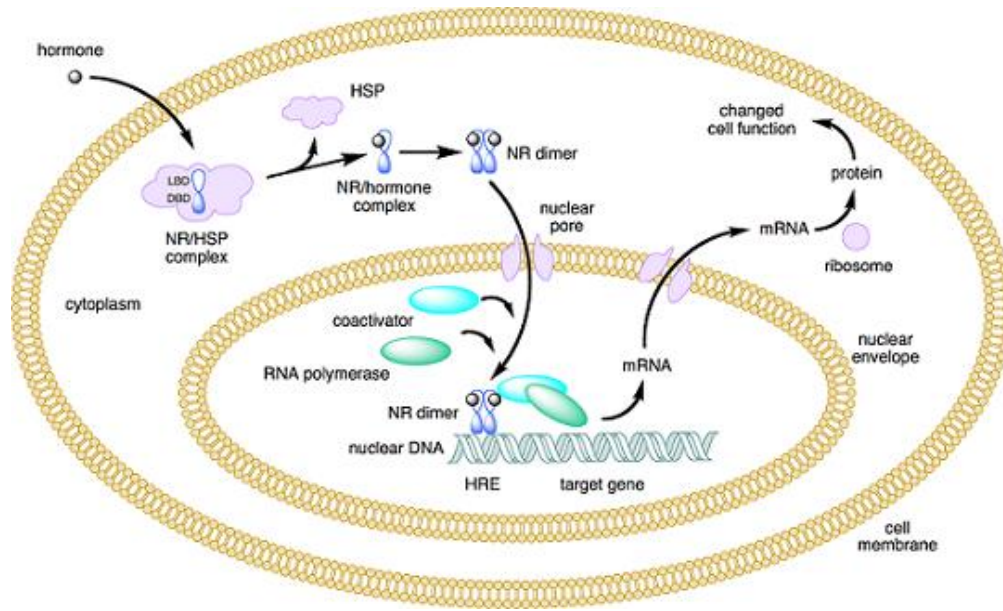


Fig. 10. Ejemplificación de las señales de transducción. La hormona esteroidea se difunde a través de la membrana plasmática y se une a un receptor nuclear, el cual estimula directamente la transcripción de sus genes blanco (44).

II.6.2.1 Vía Map Cinasa.

La vía de la MAP cinasa es una cascada de proteínas que se han conservado a lo largo de la cadena evolutiva y juegan un papel central en la transducción de señales en todas las células eucarióticas. El elemento central de la ruta es una familia de proteínas cinasas de treonina-serina llamada MAP cinasa que son activadas en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares. En levaduras, esta vía controla está involucrada en la activación de factores de crecimiento y otras respuestas celulares, como su reproducción, forma y esporulación. En los mamíferos regula el crecimiento celular y la diferenciación, motivo por el cual se les denominó proteínas cinasas activadas por mitógenos.

Existen en las células eucariotas de los mamíferos varias rutas de las MAP cinasas, cada cascada consiste de tres proteínas cinasas: una cinasa terminal y dos cinasas intermedias que regulan distintas respuestas celulares. Entre las familias de proteínas de las cuáles se desprenden estas cascada se encuentran ERK, JNK y p38, que son las que se han estudiado más ampliamente en mamíferos (12, 18, 35).

Tabla III. Familia MAP cinasa (29).

Estimulo	Factores de crecimiento	Citocinas/ estrés celular
Cinasa antecesoras	RAF	MEKKs
	MEK	MKKs
MAP cinasa	ERK	JNK/p38
Respuesta celular	Proliferación, diferenciación y supervivencia celular	Muerte celular e inflamación

ERK (cinasa regulada por señal extracelular) es activada en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares. En las levaduras ERK lleva la reproducción, forma celular y esporulación. JNK y p38, a diferencia de ERK, son activadas en respuesta a citosinas inflamatorias y estímulos físicos como la radiación ultravioleta. Mientras que las señales de ERK conllevan principalmente a la proliferación, supervivencia y diferenciación celular; las señales de JNK y p38 provocan inflamación y muerte celular. Esto lo hacen mediante su translocación al núcleo y la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión genética. ERK es una de las MAP cinasa mejor caracterizada en las células de los mamíferos, su activación se lleva a cabo mediante la unión del ligando a receptores acoplados a proteínas tirosina-cinasa o a receptores acoplados a proteínas G. La activación de ERK es mediada por dos proteínas cinasas intermedias, las cuales se acoplan con factores de crecimiento por un lado y por otro con un GTP, estas proteínas son RAS y RAF, las cuales fosforilan y activan una segunda proteína cinasa llamada MEK. MEK es una proteína con especificidad dual, esto es activa miembros de la familia ERK por fosforilación de dos residuos de: treonina y tirosina. Una vez activada ERK fosforila una variedad de blancos como pueden ser otras proteínas cinasa y factores de transcripción (12, 29).

Las tres MAPK son activadas por una cinasa intermedia MAPKK, que tiene especificidad dual, fosforila residuos treonina y tirosina en un sitio tirosina-X-treonina específico para cada MAPK (12).

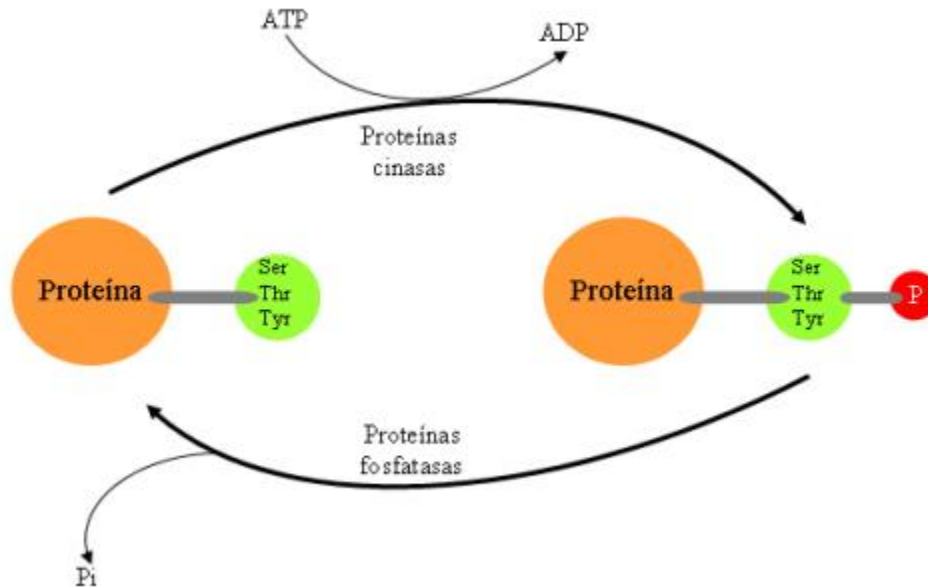


Fig. 11. Fosforilación de residuos de Tirosina por la proteína tirosina-cinasa y desfosforilación del residuo por la proteína tirosina fosfatasa (45).

Los tripéptidos de las MAP cinasas son: de ERK, Thr-Glu-Tyr, de p38 Thr-Gly-Tyr, y de JNK Thr-Pro-Tyr. La fosforilación de estos residuos tirosina-treonina es llevada a cabo por las proteínas cinasas activadoras de MAPKK (MAPKKKS) como son Rafs, MEKK1, cinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), MLKs, TAK (29).

II.6.2.2 p38

p38 es el tercer miembro de la familia MAPK, también se le conoce como SAPK2/RK o cinasa reactiva o cinasa activada por estrés. Fue originalmente identificada por la estimulación de macrófagos de ratón con LPS. Es una proteína de peso molecular de 38 kDa que se encuentra presente en el citoplasma celular de células involucradas en la respuesta inflamatoria como monocitos y macrófagos, en células involucradas en la respuesta inmune como células T, CD4

y CD8 y neutrófilos. También ha sido caracterizada en fibroblastos, en células del sistema nervioso como astrocitos y microglía, en células epiteliales, en plaquetas y en células del músculo vascular (18).

Se han descrito cuatro isoformas de p38: α , β , γ , δ , sin embargo la forma α es la que más se ha estudiado en diversas líneas celulares y la más caracterizada. Algunos autores mencionan que las cuatro isoformas son idénticas en un 57-73% de sus secuencias de aminoácidos pero difieren en sus patrones de expresión, y en su sensibilidad a inhibidores conocidos contra estas enzimas, así SB203580 y SB202190 son específicos para p38 α y p38 β (12,18).

Como se comentó anteriormente los estudios realizados sobre p38 muestran que su activación es estimulada por IL-1, TNF; así como lipopolisacárido, trombina y colágena, y estrés celular como un shock osmótico o un shock por calor, radiación UV y agentes químicos. Estos estimuladores inducen la fosforilación de p38 en su dominio constituido por el tripartido: treonina, glicina y tirosina.

Para su activación se han encontrado en el complejo de señalización moléculas como Cdc42, PAK y Rac1. Cdc42 es una proteína de unión de GTP de tipo RAS, miembro de la familia Rho, que tiene una alta afinidad por dominios de proteínas cinasas tipo serina-treonina (12).

La activación a través del complejo de señalización de los receptores al asociarse con el lipopolisacárido, fosforila las MAPKKK de p38, entre las cuales se han identificado: PKR o proteína cinasa regulada por RNA, MLK3/SPRK, ASK1 (cinasa activadora de la señal de apoptosis -1) y TAK1, estas MAPKKK activa la MAPKK de p38 que involucra dos cinasas específicas MKK3 y MKK6. Un knock out del gen de MKK3 causa un defecto en la activación de p38 y en la activación del gen para TNF α . También existen algunas evidencias de que MKK4 puede fosforilar a p38 (Fig. 12) (12).

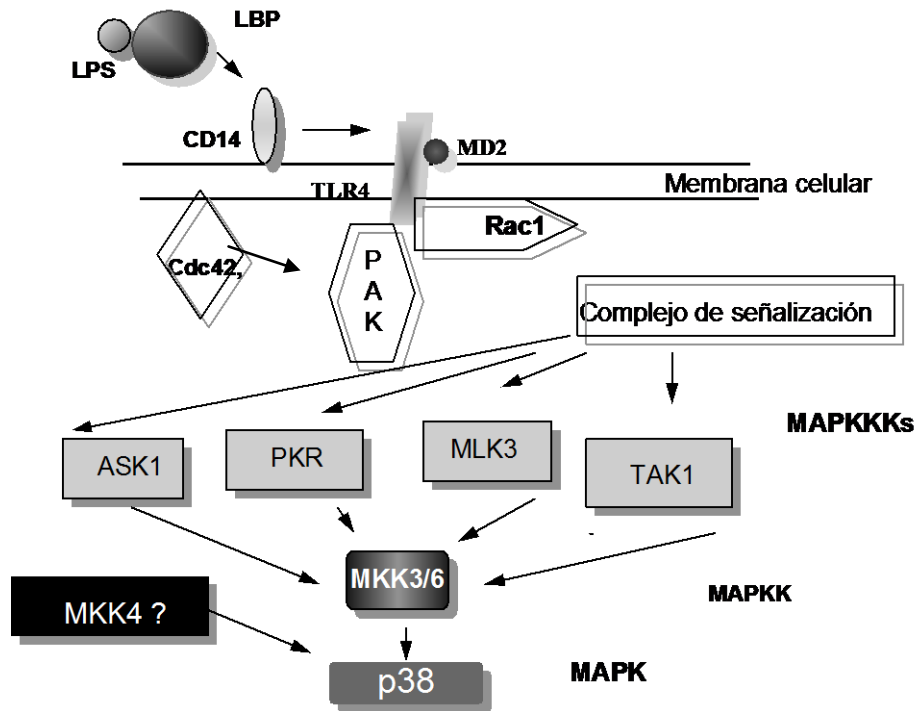


Fig. 12. Esquema de la vía de señalización de p38 por el LPS y el receptor TLR4 (12).

La importancia de p38 radica en su capacidad para regular positivamente la expresión de genes de muchas citocinas y su rol en la respuesta inmune (Fig. 14) (12).

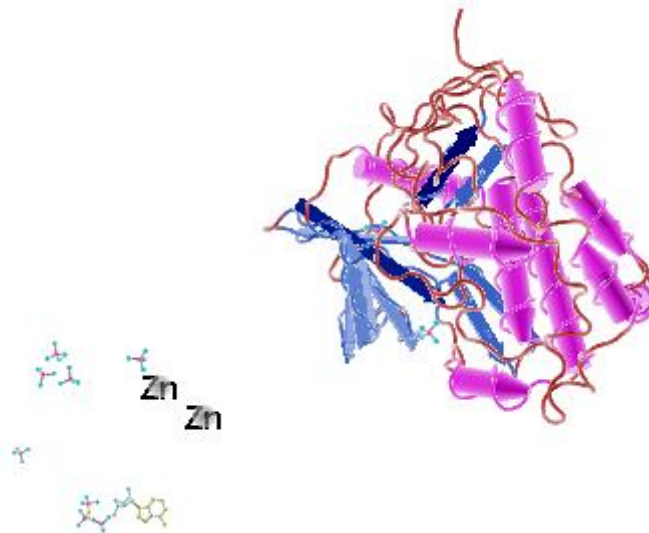


Fig. 13. Sitio de fosforilación de p38 (29).

La cinasa p38 fosforilada activa varios factores de transcripción que incluyen ATF-2, ELK1, CHOP, MEF2C, AP-1, IF4E (Factor de iniciación eucariótica) y Sap1a. Estos factores están involucrados en numerosas funciones celulares como la activación, proliferación y transformación celular; así como en la transcripción y traducción de mediadores pro inflamatorios (Fig. 15). También se ha involucrado la participación de p38 en la inducción del factor de transcripción NFκB, se cree que p38 no actúa directamente sobre el factor de transcripción o sobre las proteínas cinasas IKβ, sino que actúa en un segundo nivel de activación que involucra un complejo basal en el cual participan p65/p50 que interactúa con el coactivador CBP que se encuentra en el complejo basal. La inhibición de p38 ha demostrado que reduce la unión de la proteína TBP que une la porción de p65/p50 al complejo basal. Aún no se comprenden bien los mecanismos por los cuales esta cinasa activa estos factores de transcripción, se sabe que tiene un papel importante porque al ser inhibida puede disminuir la inducción de estos genes, algunos estudios refieren que p38 actúa en la fosforilación de otras cinasas que se encuentran debajo de ella y que a su vez activan estos factores de transcripción, por otro lado también se ha referido que las MAPK son capaces de translocarse al núcleo (12, 18,19, 29).

Entre las cinasas que se han caracterizado y que son inducidas por p38 por estar debajo de esta vía se mencionan MNK1/2, MAPKAPK2 (MK2), MSK1 y PRAK las cuales regulan la expresión de genes por la fosforilación de otros factores de transcripción como CREB y ATF-1 (Fig. 14) (29).

Otros estudios realizados con anterioridad involucran la presencia de la proteína p38 en diversos eventos fisiológicos como la producción de la enzima NOS2 de óxido nítrico, aumento de la producción de ácido araquidónico por la enzima fosfolipasa C (cPLA2), y apoptosis (29).

p38 regula la expresión del factor de transcripción de IL-1β (C/EBPβ y C/EBPδ) y TNFα en monocitos y macrófagos, estos resultados se obtuvieron en diversos estudios, en algunos de ellos se utilizó uno de los inhibidores específicos de p38, SB203580, que pertenece a un grupo del compuesto polivinilo imidazol. El efecto de este inhibidor es atribuido a la unión en el dominio cinasa para ATP. La

conclusión de la participación de p38 se obtuvo ya que al pre incubar este inhibidor previamente al tratamiento con LPS se inhibía la activación de p38 y se redujo la inducción de IL-1 y TNF α (29).

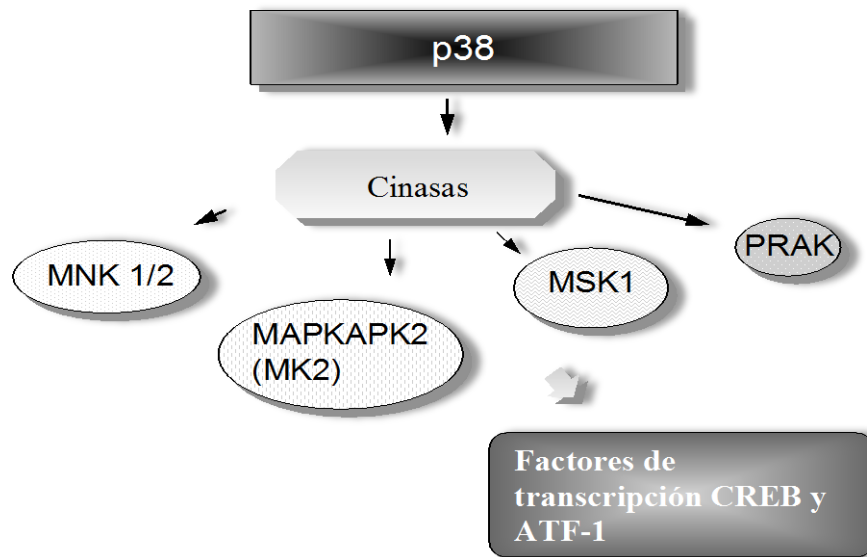


Fig. 14. Cinasas activadas por p38 y los factores de transcripción que se desprenden de ellas (18).

II.6.2.2.1 Participación de p38 en la respuesta inmune innata.

La respuesta inmune está envuelta en un gran número de tipo celulares que funcionan como iniciadores, reguladores y efectores de medios de defensa del huésped contra patógenos invasores. Éstas células interactúan entre sí y tienen una regulación cruzada, las células blanco responden usando vías de señales de transducción que regulan la expresión de genes y funciones inmunes (18).

Los mayores conocimientos que se tienen sobre la respuesta inmune innata en mamíferos ha sido gracias a los avances realizados en estudios hechos sobre la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, en la cual se identificó un grupo de 8 proteínas de la familia Toll, la cual es el centro de la defensa innata, que envuelve el reconocimiento de bacterias y hongos, y la inducción de péptidos antimicrobianos. Está bien establecido que la vía NF- κ B es un importante blanco de los receptores Toll en la respuesta inmune innata de *Drosophila melanogaster* (40). Las MAP cinasa como JNK y p38 son activadas por patógenos en las células

del insecto. p38 en la mosca parece atenuar la expresión genética de péptidos antimicrobianos seguida a la exposición del lipopolisacárido (18).

En mamíferos se ha observado que una vez inducida p38 por el lipopolisacárido media la producción de IL-1, IL-12, el factor de necrosis tumoral $TNF\alpha$ en la respuesta inmune innata (18).

Su participación en la producción de $TNF\alpha$ lo hace vía (MAPKAP) MK2 y MK3, a través de elementos ricos en AU (ARE) en la región de transcripción 3'. La supresión en el genoma de esta región en ratones provoca un $TNF\alpha$ anormal que conlleva la expresión de genes y desarrollo de dos tipos de autoinmunidad: artritis y enfermedad inflamatoria del intestino (36).

Para examinar el rol funcional de p38 en la respuesta inmune, analizaron la deficiencia de la cinasa de p38 MKK3 en ratones. La disrupción de MKK3 causó en aproximadamente un 40 a 70% la reducción total de la actividad de p38 en macrófagos tratados con LPS. La actividad residual pudo ser atribuida por MKK6 o probablemente por MKK4. El mismo resultado se observó por el uso de inhibidores específicos de p38 como SB203580, SB202190 y SB202474 (29).

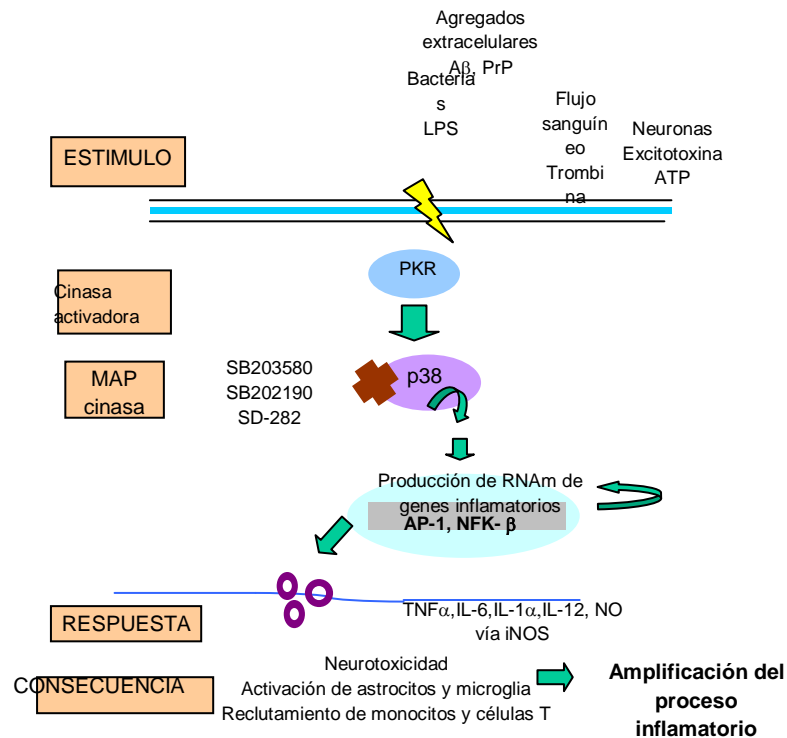


Fig.15 Participación de p38 en el proceso inflamatorio en mamíferos (18).

Por otro lado p38 también se ha visto involucrada en la activación y diferenciación de células T (Fig. 16). Las células CD4 cooperadoras juegan un papel central en la respuesta inmune. Como las células CD8 citotóxicas, las células CD4 se desarrollan en el timo, y tienen especificidad para reconocer complejos péptidos MHC presentes sobre células que presentan el antígeno llamadas (APC). Una vez reconocido este antígeno se desencadena una señal en el receptor de las células T, en donde también interviene un coestimulador llamado CD28, esto lleva a la producción de interleucina 2 por parte de la célula T y al mismo tiempo a que la célula entre en el ciclo celular, es decir la célula se divide rápidamente durante varios días y las células T se diferencien en células efectoras (36). Durante este proceso de diferenciación, se expresa un nuevo patrón de expresión de citocinas que conlleva la producción de genes responsables de las funciones

efectoras específicas de estas células, y también a su papel en la protección del huésped de una gran variedad de patógenos.

Se han identificado dos clases de células T efectoras CD4 en base a las citocinas que secretan y sus efectos inmuno-mediadores conferidos por estas citocinas. Las células efectoras Th 1 producen citocinas pro inflamatorias como interferón- γ (IFN- γ) y linfotoxina- α (Lt- α), las cuales organizan centros inflamatorios y desencadenan la respuesta celular inmune contra ciertos patógenos como *Mycobacterias*, *Salmonella* y otros agentes a través de la activación de defensas antimicrobianas. Las células efectoras Th2 producen diferentes citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 y otras) que estimulan a las células B para diferenciarse y secretar anticuerpos. También interactúan con diferentes tipos celulares para la respuesta antiparasitaria. Por lo que Th2 juega un papel importante en la protección contra ciertos patógenos bacterianos y parásitos (43).

Estudios recientes también sugieren el rol de p38 en la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-2 y IL-18 para la activación de células T. Estos resultados se han obtenido usando inhibidores del grupo imidazol que bloquean p38, lo cual a su vez bloquea la producción de IFN- γ por las células Th1.

P38 y JNK están frecuentemente coordinadas en la regulación de muchos procesos fisiológicos. En las células Th1, tanto p38 como JNK están activadas de forma selectiva, aún no se comprende bien el mecanismo de selección, sin embargo se ha encontrado que es necesaria la participación de una proteína Rac2 para la activación de estas cinasas, se cree que esta proteína juega un importante papel en la selección para p38 y JNK, mientras que para activar JNK es necesaria la expresión de GADD45 que activa JNK mediante la activación de MEKK4 por lo cual se considera que si MKK4 es una de las rutas que activa p38 puede ser también activada por esta proteína GADD45 (12, 29, 36).

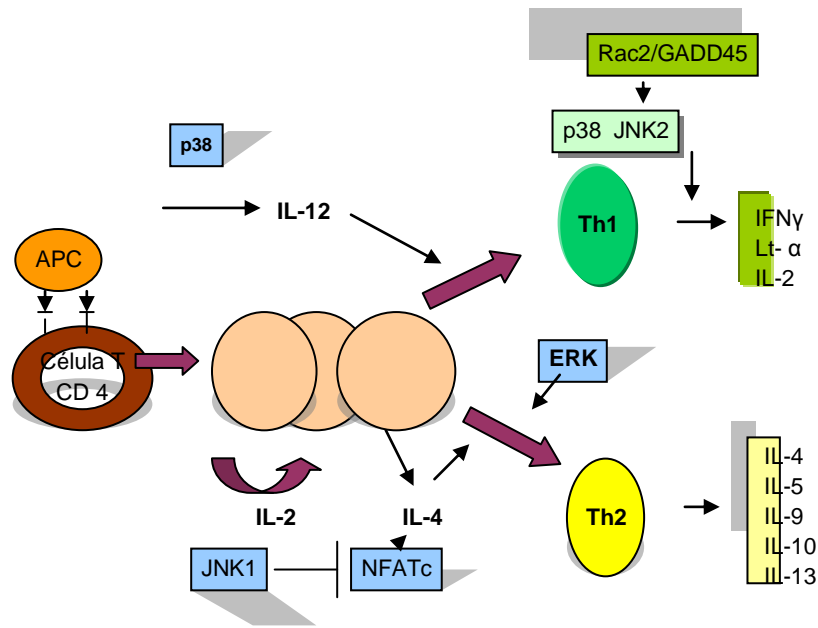


Fig. 16 Participación de p38 en la diferenciación de células T (21).

Se piensa que p38 está involucrada en el mismo mecanismo de producción de IFN- γ en células cito tóxicas CD8, sin embargo faltan más estudios para corroborar esta hipótesis. También se ha involucrado la participación p38 como reguladora de la activación de la muerte celular programada en células CD8 (36).

III.6.2.2. Participación de p38 en la inducción de la enzima Ciclooxygenasa-2.

Las prostaglandinas son reguladores críticos de la respuesta inmune, la fiebre y el dolor, también actúan como moduladores autócrinos y parácrinos de la respuesta celular que juega un papel importante en la mitogénesis y apoptosis (29, 36).

Las prostaglandinas se forman a partir del metabolismo del ácido araquidónico, por medio de dos enzimas la ciclooxigenasa-1 y la clooxigenasa-2. El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono que procede de la dieta o de la conversión del ácido linoléico. Se encuentra esterificado en los fosfolípidos de la membrana celular y su liberación se lleva a cabo por la activación de las fosfolipasas celulares, por estímulos mecánicos, químicos y físicos o por otros mediadores, como por ejemplo C5a (34, 36).

Como se menciona anteriormente las ciclooxigenasas catalizan la conversión de ácido araquidónico y O₂ a prostaglandias, especialmente PGH₂.

La ciclooxigenasa-1 (COX-1) es una enzima constitutiva cuya expresión es regulada. COX-1 cataliza la síntesis de prostaglandinas en el retículo endoplásmico, es la única ciclooxigenasa presente en las plaquetas y también se ha asociado con la producción de tromboxano A₂. En contraste la enzima COX-2 recientemente descubierta de peso molecular de 82KDa, es una enzima inducida que normalmente no se encuentra presente en las células, de hecho solo algunas líneas celulares expresan COX-2; pero su inducción es rápida y transitoria, entre los estímulos que la inducen se encuentran factores de crecimiento y citocinas. Entre los productos finales a los cuales se asocia COX-2 están PGE₂ y las prostaciclinas (29, 34).

En estudios anteriores hechos en macrófagos alveolares se demostró la inducción de la enzima COX-2 por LPS, en este proceso se encontró involucrada MAP cinasa p38 (34).

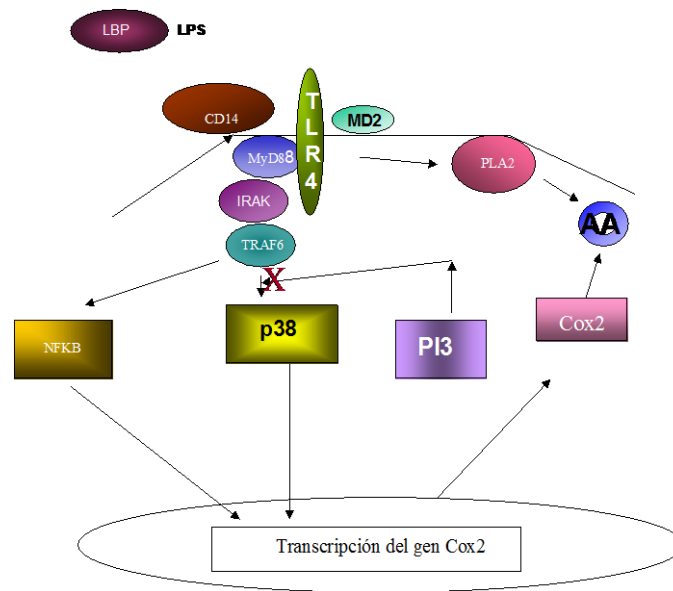


Fig. 17. Regulación de la expresión de COX-2 por p38 (34).

La activación de p38 ha sido relacionada con la expresión de diversos genes que codifican para citocinas inflamatorias y de igual forma ha sido relacionada con la estabilidad de mRNA de COX-2, por otro lado también se menciona que p38 induce directamente la expresión de mRNA de COX-2 a través de MAPKAP2, sin embargo también se menciona que la participación de p38 solo no es suficiente para inducir el gen de COX-2, es necesaria la participación negativa de la enzima PI3K que se encuentra en la membrana celular, una vez inhibida esta enzima se produce un aumento en la inducción de p38 (fig 17).

III. ANTECEDENTES

En los últimos 50 años gracias a los avances tanto en el área de la Microbiología Médica como en Biología Molecular y Celular, tenemos una mayor comprensión sobre la etiología y patogénesis de las diversas enfermedades que se presentan en el ser humano. El área Odontológica no está exenta de estos avances ya que entre las principales enfermedades a las que nos enfrentamos son las periodontales como la gingivitis y la periodontitis, las cuales han sido asociadas con la presencia de microorganismos presentes en la placa dentobacteriana.

En estudios anteriores se ha observado que el lipopolisacárido se asocia al receptor CD14 que se encuentra en fibroblastos gingivales humanos y recientemente se ha descrito que estas células expresan así mismo los receptores Tipo Toll 2, 3 y 4. Algunas evidencias señalan que la proteína TRL4 promueve una serie de respuestas celulares por medio de la activación de vías de transducción como la activación de la familia de las MAP cinasas (18, 27).

Diversas investigaciones demuestran que el Ácido poli-inosínico/policitídílico es reconocido por el receptor tipo Toll 3 en diversos tipos celulares, asimismo sugieren que el receptor tipo Toll 3 contribuye a la respuesta inmune en contra de un estímulo viral, de igual manera la activación del receptor participa en la diferenciación y muerte celular (12). Se ha demostrado que los fibroblastos gingivales humanos expresan al receptor tipo Toll 3 tanto intracelular como extracelularmente (12, 24).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Basándonos en la incidencia de infecciones bucodentales, como es el caso de gingivitis y periodontitis, enfermedades caracterizadas por la inflamación crónica o aguda del tejido conectivo que conlleva a la pérdida de piezas dentarias; además sabemos que dichas enfermedades ocupan en México uno de los principales problemas de salud, representando un gasto salúfero, que se encuentra por encima de los recursos del país. La periodontitis y la gingivitis están asociadas factores medioambientales, demográficos y al reconocimiento de microorganismos. De tal manera utilizaremos células predominantes del periodonto induciendo proteínas que participan en la inflamación del tejido conectivo.

Se emplearán metodologías propias para la identificación cualitativa y cuantitativa a nivel transcripcional y traduccional de proteínas como western blot, inmunohistoquímica, transfección y RT-PCR.

V. HIPÓTESIS

Las células de fibroblastos gingivales humanos expresan en la membrana celular receptores tipo Toll. Entonces, la estimulación de fibroblastos gingivales humanos a través del receptor tipo Toll 3, inducirá la expresión de Ciclooxygenasa-2.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el efecto de Poly (IC) en la expresión de COX-2 en células de fibroblastos gingivales humanos.

Objetivos específicos

- Caracterizar las dosis efectivas en la producción de COX-2.
- Caracterizar mecanismos de señalización intracelular que median la expresión de COX-2 inducida por Poly (IC) en fibroblastos gingivales humanos.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos. (HGF)

Los fibroblastos gingivales humanos (HGF) se obtuvieron de una muestra de tejido sano de pacientes que acuden a la clínica de exodoncia. Para la obtención de la muestra se solicitó el consentimiento informado de cada paciente (ISO/BQ-LIFO-RE-001) y el proyecto fue aprobado por el comité de investigación y de ética de la Facultad de Odontología.

Dentro de los criterios de inclusión, exclusión y eliminación. La encía donadora obtenida deberá estar libre de inflamación, sangrado y cualquier otra patología tanto local como sistémica del paciente. El tejido gingival que se obtuvo se localizaba en la parte distal del 3° molar, sin presentar inflamación, se cortó quirúrgicamente del maxilar y posterior a la remoción se lavó por 6 ocasiones con solución de Hanks (Invitrogen) suplementado con penicilina/ estreptomicina/ fungizona (Invitrogen). El tejido gingival se desmenuzó en fragmentos de 1 a 2 mm y se colocó en cajas con medio Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen) suplementado con 2mM L-glutamina (Invitrogen), penicilina / estreptomicina / fungizona (Invitrogen) 100 ug/ml, 100 µg/ml y 1 mg/ml respectivamente y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. El explante se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. El cultivo celular se alimentó cada 3 días hasta que las células alcanzaron la confluencia. Las células se utilizaron entre los pases 5 a 7.

VII.2 Western Blot.

El crecimiento de celular se llevó a cabo en caja de seis pozos, cuando se observó una confluencia del 60-80% éstas fueron ayunadas con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco al 2 %, consecuentemente las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de Poly(IC) (Sigma); para desprender las células fue necesario retirar el medio de reacción con ayuda de vacío y posteriormente se adicionó ortovanadato de sodio (Sigma) diluido en Buffer de Fosfato Salino a pH 7.2 obteniendo una concentración 1mM; con la ayuda de un

gendarme dichas células se desprendieron, la muestra se transfirió a tubos eppendorf, después de centrifugarlas a 12,000 rpm durante 15 minutos el sobrenadante fue retirado con ayuda de vacío, consecuente con este paso se adicionaron 20 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) (Sigma), la muestra fue sonicada (1sx25) en un baño de hielo; se utilizaron 50 µg de proteína que se mezcló 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromo fenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; (Sigma), la muestra se cargó en un gel al 10% SDS-PAGE y se corrió a 50 V durante 2 horas. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (Amersham) durante una hora a 0.3 amperes y 5 Volts. Para cotejar que se cargó igual concentración de proteína en todas las muestras, las membranas se desnudaron con una solución de ácido acético al 10% para tratar con γ -tubulina. Ulteriormente la membrana se bloqueó con buffer de fosfato salino (NaCl 150 mM, 100mM Tris- HCl pH 7.8 y 5% de suero albúmina de bovino durante 1 hora, se lavó con buffer de lavado para anti-fosfoproteínas (Trisma base 0.02M, NaCl 0.1 M) durante 30 minutos, transcurrido este tiempo se incubó con el anticuerpo primario COX-2 anti-goat policlonal (3:10000) (Santa Cruz Biotechnology) y para el control se utilizó γ - tubulina anti-goat policlonal (3:10000) (Santa Cruz Biotechnology); las membranas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron durante 30 minutos y se incubaron durante 2 horas con anticuerpo secundario, anti-goat policlonal (3:10000) (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas características de la proteína de interés fueron expuestas y reveladas con el sustrato de quimio-luminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) la correspondiente radiografía se obtuvo después de 15 minutos de exposición. El trabajo experimental se realizó en tres ocasiones por separado; los resultados se capturaron con el sistema Digi Docit y se analizaron con el sistema digital Labs-Works.

VII.3 Inmunohistoquímica.

El crecimiento y mantenimiento de células de fibroblastos gingivales humanos se llevó a cabo después de tripsinizar en donde son transferidas a cajas de 24 pozos conteniendo cubreobjetos de un centímetro de diámetro, cuando se observó una confluencia del 60-80%, las células fueron ayunadas con medio Eagle modificado por Dulbecco al 2%, subsecuentemente las células fueron estimuladas con Poly (IC) (25 µg/mL), ácido lipoteicoico (1µg/ml) y Lipopolisacárido (1mg/ml) incubando durante cuatro horas, posteriormente el medio fue retirado con ayuda de vacío las células fueron fijadas por 15 minutos con 2% de para formaldehído (Sigma), permeabilizadas con tritón X-100 por diez minutos posteriormente son lavadas con buffer de fosfato salino durante tres ocasiones e incubadas por una hora con un anticuerpo primario COX-2 anti-goat policlonal (1:200) transcurrido este tiempo las células fueron lavadas en tres ocasiones con buffer de fosfato salino, posteriormente se incubó por una con el anticuerpo secundario isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz Biotechnology) anti-goat (1:200), se realizaron lavados por tres ocasiones y los cubreobjetos fueron colocados en resina y así poder obtener imágenes por microscopia confocal. El trabajo experimental se repitió en tres ocasiones por separado.

VII.4 Viabilidad Celular.

El crecimiento y tratamiento celular de fibroblastos gingivales humanos se llevó a cabo después de tripsinizar en donde son transferidas a cajas de noventa y seis pozos; observada una confluencia celular del sesenta al ochenta por ciento, se ayuno al cultivo celular con medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco al 2%, posteriormente fueron estimuladas con 10, 15, 20 y 25 µg/mL del agonista del receptor tipo Toll 3 a 24, 48 y 72 horas, una vez concluidos los tiempos de incubación el medio fue retirado completamente con ayuda de vacío, posterior a esto el cultivo celular es tratado e incubado por dos horas con MTT (tetraxolio azul real) 1 mM (Sigma) en un medio acidificado con etanol absoluto (Sigma) y dimetilsulfóxido (Sigma) para permeabilizar la membrana celular; transcurrido este

tiempo la micro placa de 96 pozos es introducida al espectrofotómetro para medir indirectamente la actividad celular con una reacción colorimétrica a través de la reducción del tetrazolio azul real por deshidrogenasas y reductasas mitocondriales. La actividad enzimática es cuantificada por el producto reducido a 500 nanómetros y fue analizada con el sistema digital Labs-Works. El trabajo experimental se repitió en tres ocasiones por separado.

VII.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR). Las células de fibroblastos gingivales humanos fueron crecidas y mantenidos en cajas de cuatro pozos después de haberlos tripsinizado, cuando se observó una confluencia del 60-80 % de crecimiento, las células fueron ayunadas con medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco al 2%, posteriormente fueron estimuladas con Poly (IC) (25µg /mL) e incubadas durante cuatro horas, transcurrido este tiempo se aisló RNA total, posteriormente se transcribió por Transcriptasa Reversa (Invitrogen) y posteriormente se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando los oligonucleótidos para COX-2 sense, secuencia (5´a 3´): TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT y anti-sense, secuencia (5´a 3´): AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT; para GADPH como control sense secuencia (5´a 3´): GCCAAAAGGGTCATCATCATCTC, anti-sense, secuencia (5´a 3´): GTAGAGGCAGGGATGATGTT. La amplificación se llevó a cabo con la desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min; la Reacción en Cadena de la Polimerasa se generó por 36 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda característica de acuerdo al peso molecular en pares de bases, observado en un gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El trabajo experimental se repitió en tres ocasiones por separado.

VII.6 Transfección para evaluar la actividad reportera de luciferasa.

El ensayo para la determinación de la expresión del reportero a luciferasa, las células (5×10^4) se sembraron un día antes de la transfección en placas de 24 pozos (Corning, USA). Al día siguiente 50 ng del vector reportero de luciferasa.

Transfección transitoria del plásmido pNIFTY. Las células se prepararon para la transfección 24 horas antes en placas de 12 pozos (Corning), en cantidades correspondientes a 1×10^5 células por pocillo. La transfección de cada muestra se realizó por triplicado usando el Turbofect (Thermo Scientific, USA.). Brevemente, se usaron por muestra 1,5 μg /pocillo de ADN y liposomas a 9,2 μM /pocillo, considerando un volumen final de 1.050 μl /muestra; la mezcla de transfección (25 μl /muestra) se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min y, a continuación, se añadió tampón HBS 2x (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) en cantidades de 25 μl /muestra, y se añadieron a las células 50 μl /muestra de la solución obtenida de este modo durante 5 horas. Después de realizar tres lavados con PBS (tampón fosfato a pH 7,4) sin calcio ni magnesio, las células se cultivaron en medio de cultivo que contenía ALC a las concentraciones indicadas en los tratamientos hasta el momento de la lisis celular para el ensayo de la actividad luciferasa. Como control, se añadió ADN desnudo en una solución HBS 1x.

Ensayo de luciferasa en muestras transfectadas in vitro Las células se lavaron con PBS (tampón fosfato a pH 7,4) sin calcio ni magnesio y se sometieron a lisis mediante la adición de 200 μl del tampón de lisis contenido en el kit de marca PROMEGA utilizado para el ensayo de luciferasa. Después de 20 min, se recogieron las proteínas totales y se ensayó la actividad luciferasa en 10 μl de cada muestra, siguiendo los procedimientos indicados en el kit; utilizando el luminómetro GloMax 20/20, se normalizaron por mg de proteínas totales calculados utilizando el procedimiento de Bradford.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Efecto de Poly (I:C) en la expresión de ciclooxygenasa-2

Para evaluar la expresión de ciclooxygenasa-2, las células se incubaron con Poly (I:C) (25 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes intervalos de tiempo. Los lisados celulares se cuantificaron por la técnica de Bradford y 50 μg de proteína, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferidos a membranas de PVDF e incubados con anticuerpos anti-COX2. Posteriormente la membrana se desnudó y se incubó con anti- γ tubulina para determinar la misma carga en cada condición experimental. Se realizaron tres experimentos por separado.

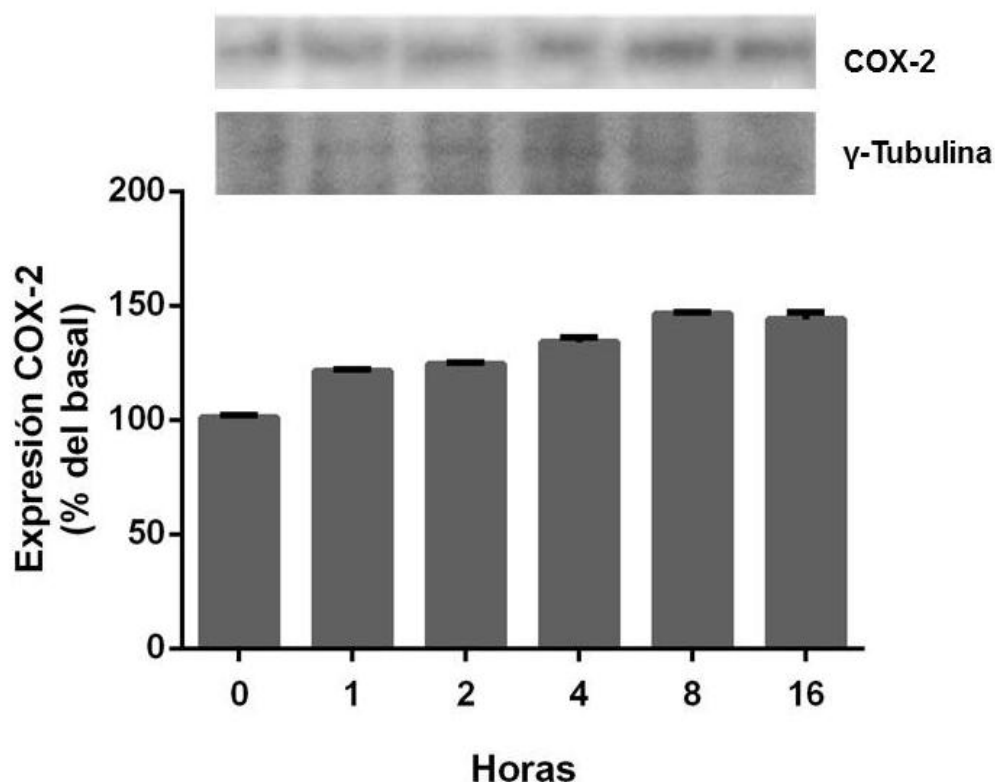


Figura 18. Curso Temporal del Efecto de Poly (I:C) en la expresión de Ciclooxygenasa-2.

Las células fueron incubadas con Poly (I:C) (25 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes intervalos de tiempo. Los lisados celulares se cuantificaron por la técnica de Bradford y 50 μg de proteína, fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de PVDF, se incubaron con anticuerpos anti-COX2. Los resultados son la imagen representativa de tres experimentos realizados por separado. Posteriormente las membranas se desnudaron y se incubaron con anti- γ tubulina para determinar la misma carga en cada condición experimental. Las barras representan la media \pm S.E.M., los resultados se obtuvieron por densitometría.

VIII.1.2 Poly (I:C) induce la expresión de COX-2 de manera dependiente de la dosis.

Las células se estimularon con diferentes concentraciones de Poly (IC), se incubaron durante cuatro horas. Los lisados celulares se cuantificaron por la técnica de Bradford y 50 μg de proteína, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferidos a membranas de PVDF e incubados con anticuerpos anti-COX2. Posteriormente la membrana se desnudó y se incubó con anti- γ tubulina para determinar la misma carga en cada condición experimental. Se realizaron tres experimentos por separado.

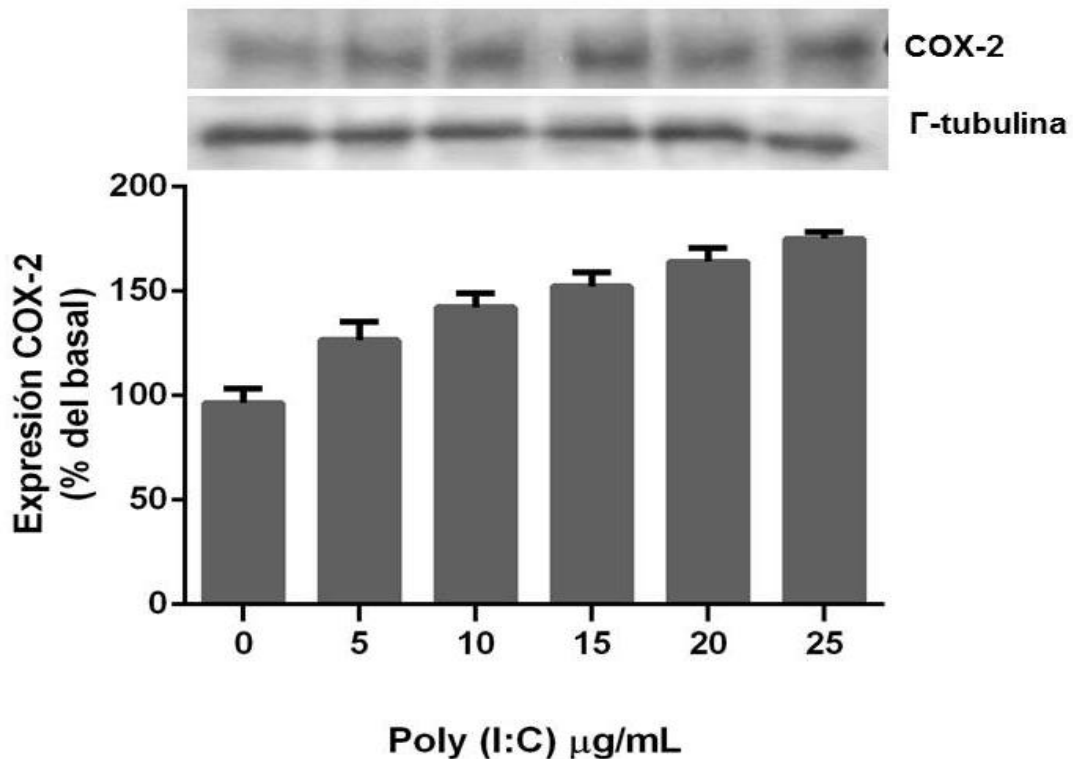


Figura 19. Dosis Respuesta del Efecto de Poly IC en la expresión de Cicooxigenasa-2.

Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de Poly (IC) durante cuatro horas. Los lisados celulares se cuantificaron por la técnica de Bradford y 50 μg de proteína, fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de PVDF, se incubaron con anticuerpos anti-COX2. Los resultados son la imagen representativa de tres experimentos realizados por separado. Posteriormente la membrana se desnudó y se incubó con anti- γ tubulina para determinar la misma carga en cada condición experimental. Las barras representan la media \pm S.E.M., los resultados se obtuvieron por densitometría.

VIII.1.3 Efecto de Poly (IC) en la viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos.

Para evaluar viabilidad en fibroblastos gingivales humanos se estimularon con diferentes concentraciones de Poly IC durante 24, 48 y 72 horas respectivamente, al término las células se incubaron con tetrazolio azul real durante dos horas para determinar la proliferación celular a través de la reducción del tetrazolio por deshidrogenasas y reductasas mitocondriales, dicha actividad fue medida a través del formazan a 550 nanómetros en un lector de placas. Se realizaron tres experimentos por separado.

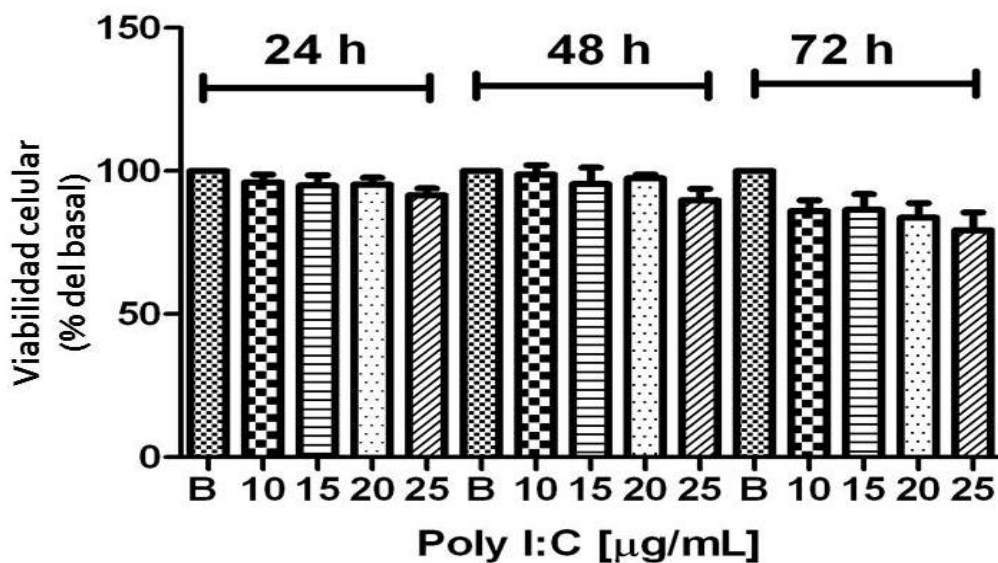


Figura 20. Efecto de Poly (I:C) en la viabilidad de fibroblastos gingivales humanos.

Las células (2×10^4) se crecieron en placas de 96 pozos durante toda la noche. Posteriormente se trataron con Poly (I:C) a diferentes dosis y tiempos. Al término se retiró el medio de cultivo y se colocó medio adicionado con MTT (5 mg/mL) durante 2 horas, se cuantificó a 550 nanómetros.

VIII.1.4 Inmunolocalización de Ciclooxigenasa-2 en fibroblastos gingivales humanos.

Las células de fibroblastos gingivales humanos se estimularon con Poly IC, lipopolisacárido y ácido lipoteicoico, se incubaron durante cuatro horas, las células se fijaron a los cubreobjetos con formaldehído, se permeabilizaron con tritón X-100, se incubaron durante una hora con anti-Cox-2, posteriormente se incubó con anticuerpo secundario isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante una hora, las imágenes se observaron por microscopia confocal. Se realizaron tres experimentos por separado.

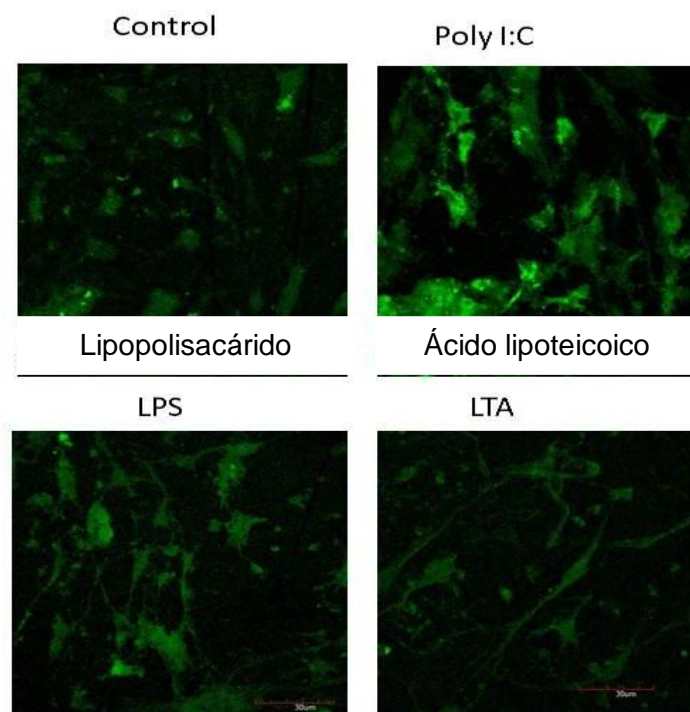


Figura 21. Producción de COX-2 inducido por el agonista de TLR3 en HGF, estimulados con poly(I:C), lipopolisacárido y ácido lipoteicoico, cada condición fue tratada con anticuerpo primario COX-2 y como anticuerpo secundario FITC, la expresión fue observada a través de microscopia.

VIII.1.5 Determinar la expresión de Ciclooxygenasa-2 en fibroblastos gingivales humanos.

Las células se estimularon con inhibidores para MEK, p38, JNK y PKC, se incubaron durante treinta minutos, se estimularon con Poly (I:C) (25 $\mu\text{g/ml}$), se incubaron durante cuatro horas. Los lisados celulares se cuantificaron por la técnica de Bradford y 50 μg de proteína, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de PVDF, se incubaron con anticuerpos anti-COX2. Posteriormente la membrana se desnudó y se incubó con anti- γ tubulina para determinar la misma carga en cada condición experimental. Los resultados son la imagen representativa de tres experimentos realizados por separado.

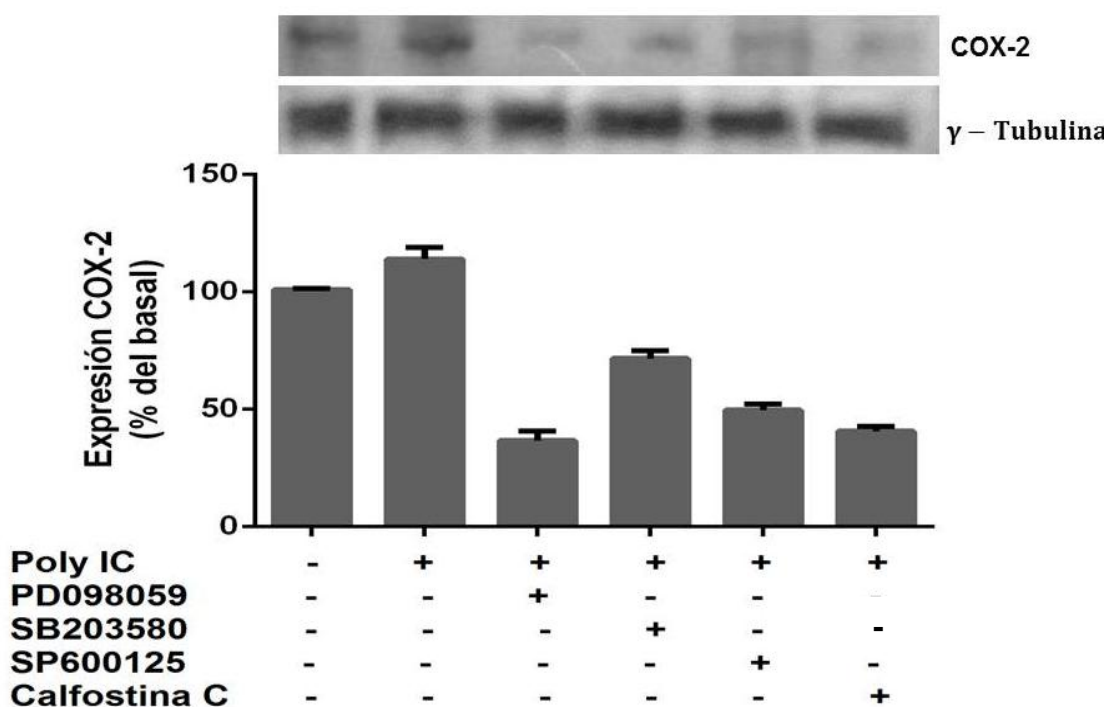


Figura 22. Expresión de COX-2. Las células fueron incubadas con inhibidores para MEK, p38, JNK y PKC, se estimuló con Poly (I:C) (25 $\mu\text{g/ml}$), se incubaron durante cuatro horas. Los lisados celulares se cuantificaron por la técnica de Bradford y 50 μg de proteína, fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferidos a membranas de PVDF e incubados con anticuerpos anti-COX2. Los resultados son la imagen representativa de tres experimentos realizados por separado. Posteriormente las membranas se desnudaron y se incubaron con anti- γ tubulina para determinar la misma carga en cada condición experimental. Las barras representan la media \pm S.E.M., los resultados se obtuvieron por densitometría.

VIII.1.5 Determinar la expresión de Ciclooxygenasa-2 en fibroblastos gingivales humanos.

Las células se estimularon con inhibidores para PLC, PI3K, PKA e IκB , se incubaron durante treinta minutos, se estimularon con Poly (I:C) (25 μg/ml), se incubaron durante cuatro horas. Los lisados celulares se cuantificaron por la técnica de Bradford y 50 μg de proteína, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferidos a membranas de PVDF e incubados con anticuerpos anti-COX2.. Posteriormente la membrana se desnudó e incubó con anti- γ tubulina para determinar la misma carga en cada condición experimental. Los resultados son la imagen representativa de tres experimentos realizados por separado.

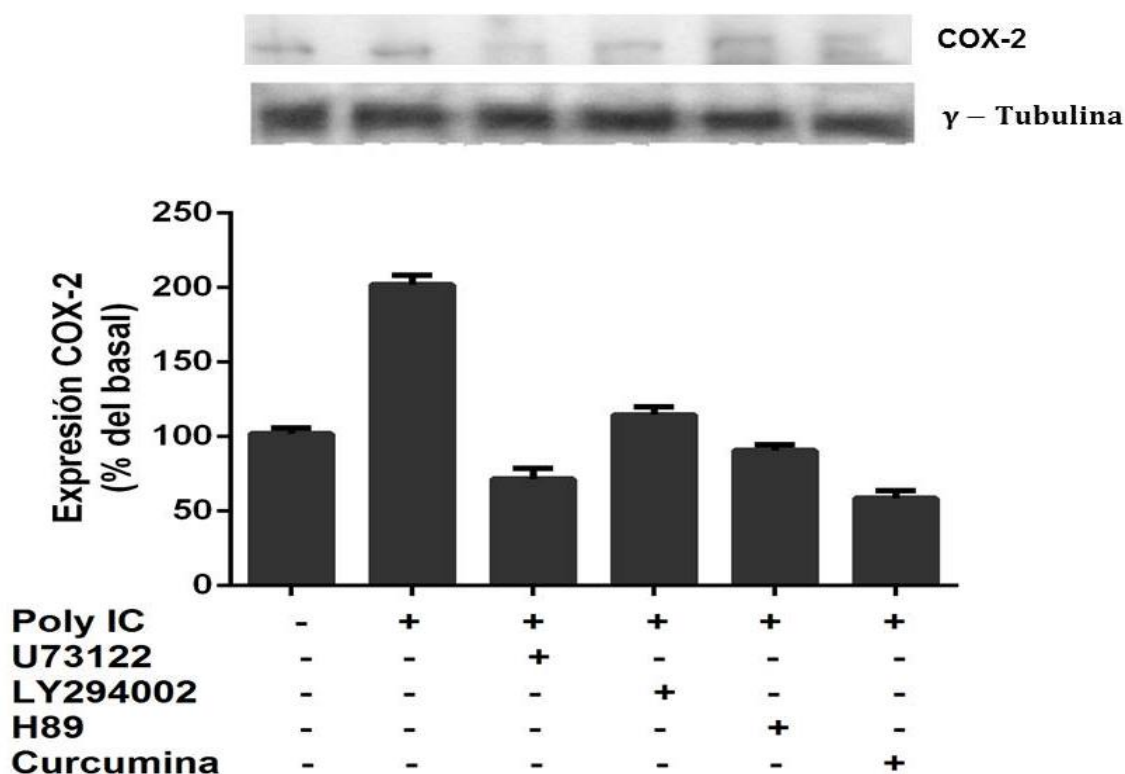


Figura 23. Expresión de COX-2. Las células fueron incubadas con Poly (I:C) (25 μg/ml) y estimuladas con inhibidores para PLC, PI3K, PKA e IκB, Los lisados celulares se cuantificaron por la técnica de Bradford y 50 μg de proteína, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y transferidos a membranas de PVDF e incubados con anticuerpos anti-COX2. Los resultados son la imagen representativa de tres experimentos realizados por separado. Posteriormente la membranas se desnudaron e incubaron con anti- γ tubulina para determinar la misma carga en cada condición experimental. Las barras representan la media ± S.E.M., los resultados se obtuvieron por densitometría.

VIII.1.5 Determinar la expresión de Ciclooxygenasa-2 en fibroblastos gingivales humanos.

Las células se estimularon con inhibidores para MEK, p38, JNK y PKC, se incubaron durante treinta minutos, se estimularon con Poly (I:C) (25 μ g/ml), se incubaron durante cuatro horas, se aisló ARN total, se transcribió por Transcriptasa Reversa y posteriormente se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando los oligonucleótidos para COX-2 sense y COX-2 anti-sense. Para confirmar que se utilizó la misma cantidad de RNA, se trató 1 μ g de RNA para la expresión de GADPH como control. Los resultados son la imagen representativa de tres experimentos realizados por separado.

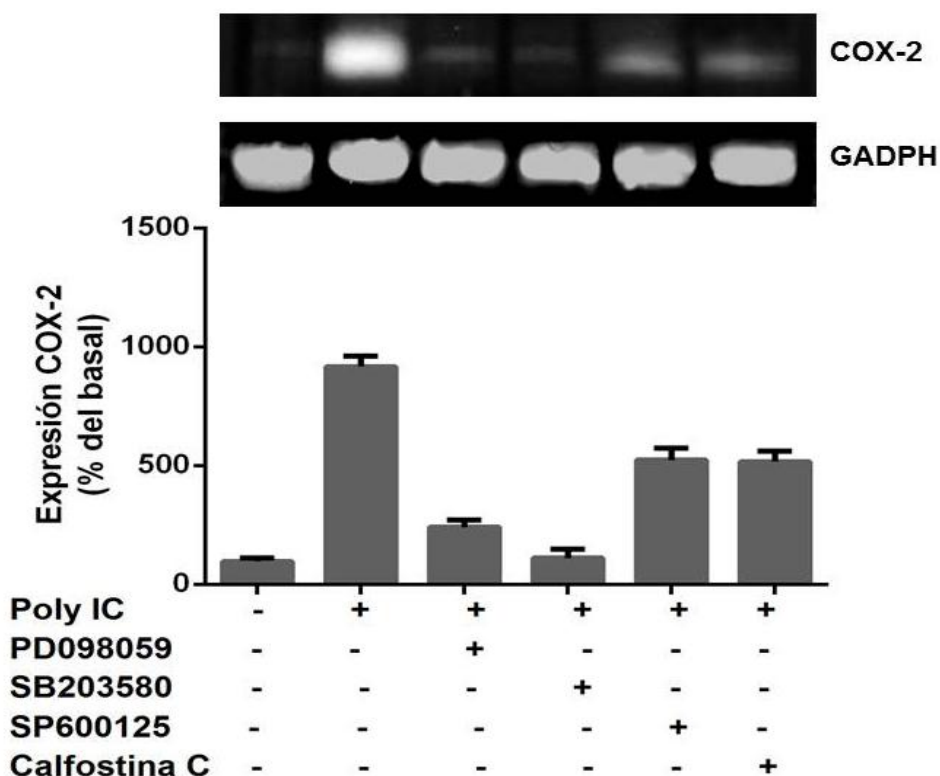


Figura 24. Expresión de COX-2. Las células se estimularon con inhibidores para MEK, p38, JNK y PKC, se incubaron durante treinta minutos, se estimularon con Poly (I:C) (25 μ g/ml), se incubaron durante cuatro horas, se aisló RNA total, se transcribió por Transcriptasa Reversa, se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando los oligonucleótidos para COX-2 sense, secuencia (5' a 3'): TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT y anti-sense, secuencia (5' a 3'): AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT; para GAPDH como control sense secuencia (5' a 3'): GCCAAAAGGGTCATCATCATCTC, anti-sense, secuencia (5' a 3'): GTAGAGGCAGGGATGATGTT.

VIII.1.5 Determinar la expresión de Ciclooxygenasa-2 en fibroblastos gingivales humanos.

Las células se estimularon con inhibidores para PLC, PI3K, PKA e I κ B, se incubaron durante treinta minutos, se estimularon con Poly (I:C) (25 μ g/ml), se incubaron durante cuatro, se aisló ARN total, se transcribió por Transcriptasa Reversa y posteriormente se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando los oligonucleótidos para COX-2 sense y COX-2 anti-sense. Para confirmar que se utilizó la misma cantidad de RNA, se trató 1 μ g de RNA para la expresión de GADPH como control. Los resultados son la imagen representativa de tres experimentos realizados por separado.

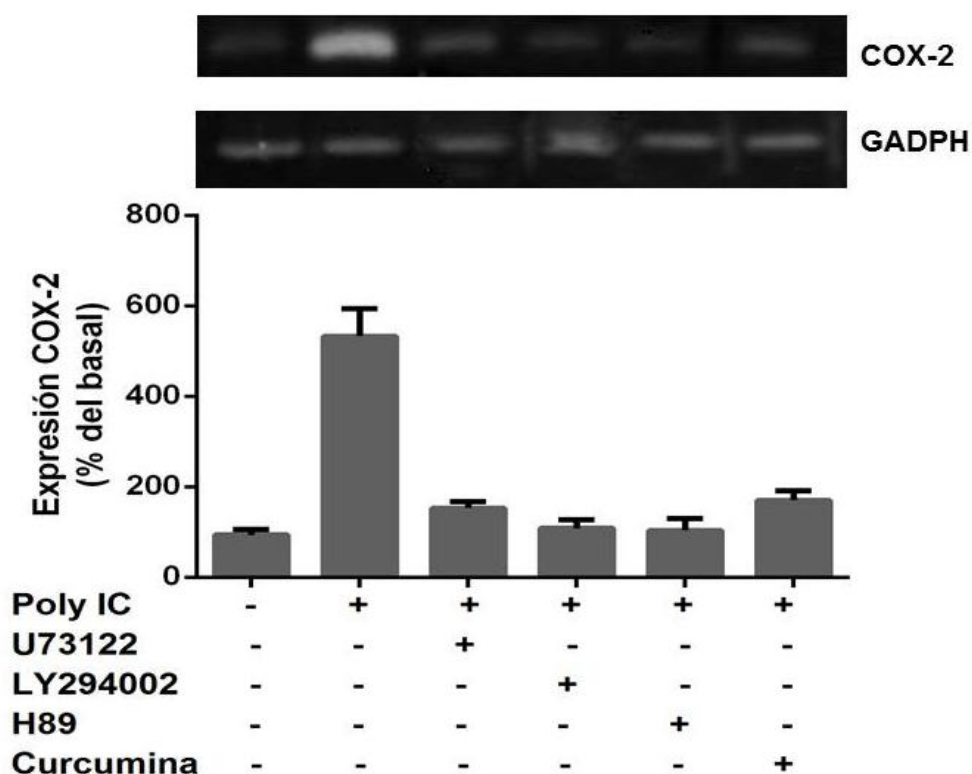


Figura 25. Expresión de COX-2. Las células se estimularon con inhibidores para PLC, PI3K, PKA e I κ B, se incubaron durante treinta minutos, se estimularon con Poly (I:C) (25 μ g/ml), se aisló ARN total, se transcribió por Transcriptasa Reversa, se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa, utilizando los oligonucleótidos para COX-2 sense, secuencia (5' a 3'): TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT y anti-sense, secuencia (5' a 3'): AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT; para GADPH como control sense secuencia (5' a 3'): GCCAAAAGGGTCATCATCATCTC, anti-sense, secuencia (5' a 3'): GTAGAGGCAGGGATGATGTT.

VIII.1.6 Determinar la actividad relativa de luciferasa en fibroblastos gingivales humanos.

Para la actividad promotora de luciferasa las células se transfectaron transitoriamente con el plásmido pNIFTY-Luc. La transfección de cada muestra se realizó por triplicado, se usaron por muestra 1,5 µg/pocillo de ADN y liposomas a 9,2 µM/pocillo, considerando un volumen final de 1.050 µl/muestra; la mezcla de transfección (25 µl/muestra) se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min y, a continuación, se añadió tampón HBS 2x (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) en cantidades de 25 µl/muestra, se añadieron a las células 50 µl/muestra de la solución obtenida de este modo durante 5 horas. Después de realizar tres lavados con PBS (tampón fosfato a pH 7,4) sin calcio ni magnesio, las células se cultivaron en medio de cultivo que contenía ALC a la concentraciones indicadas en los tratamientos hasta el momento de la lisis celular para el ensayo de la actividad luciferasa. Las células se lavaron con PBS (tampón fosfato a pH 7,4) sin calcio ni magnesio y se sometieron a lisis mediante la adición de 200 µl del tampón de lisis contenido en el kit utilizado para el ensayo de luciferasa. Después de 20 min, se recogieron las proteínas totales y se ensayó la actividad luciferasa en 10 µl de cada muestra, siguiendo los procedimientos indicados en el kit; se normalizaron por mg de proteínas totales calculados utilizando el procedimiento de Bradford.

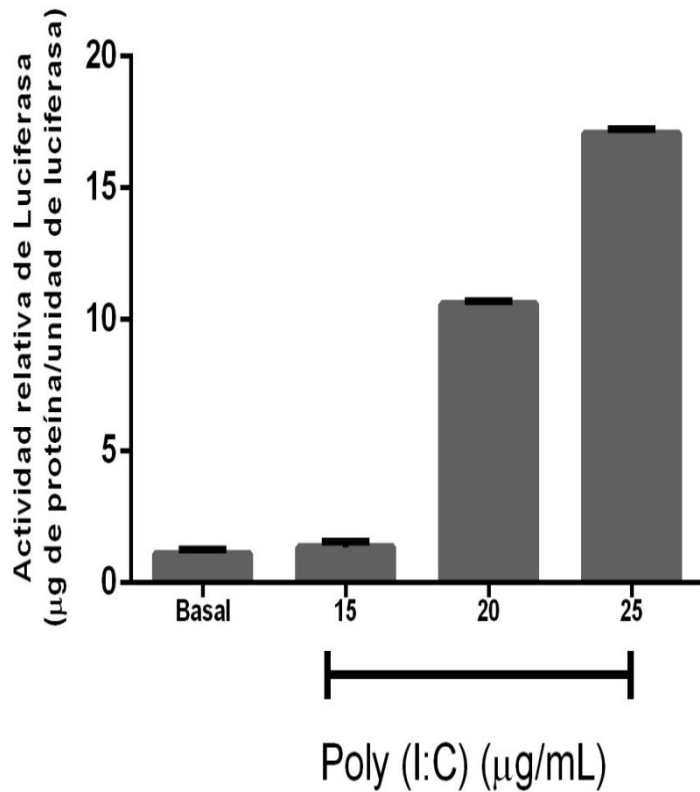


Figura 26. Actividad relativa de luciferasa en fibroblastos gingivales humanos. Las células (1×10^5) en cajas de 24 pozos. Posteriormente se trataron con 50 ng del vector reportero de luciferasa, así como 1,5 µg/pocillo de ADN y liposomas a 9,2 µM/pocillo, considerando un volumen final de 1.050 µl/muestra; la mezcla de transfección (25 µl/muestra) se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. Ensayo de luciferasa en muestras transfectadas in vitro. Las células se lavaron con PBS Después de 20 min, se recogieron las proteínas totales y se ensayó la actividad luciferasa en 10 µl de cada muestra, siguiendo los procedimientos indicados en el kit; utilizando el luminómetro GloMax 20/20, se normalizaron por mg de proteínas totales calculados utilizando el procedimiento de Bradford.

IX. DISCUSIÓN

En el primer ensayo se evaluó la expresión de Ciclooxygenasa-2 con un curso temporal, se estimuló al receptor tipo Toll 3 con Poly IC en células de fibroblastos gingivales humanos; nuestros resultados confirman la expresión del receptor en este tipo celular (12, 14), asimismo el estímulo del receptor induce la expresión de Ciclooxygenasa-2 (Fig. 18).

En el segundo ensayo se evaluó la expresión de Ciclooxygenasa-2, se estimuló al receptor tipo Toll 3 con diferentes concentraciones de Poly IC; nuestros resultados indican que el incremento de la expresión de Ciclooxygenasa-2 en una dosis manera dependiente (fig. 19).

En el tercer ensayo se evaluó la viabilidad celular, se estimuló al receptor tipo Toll 3 con diferentes concentraciones de Poly IC; nuestros resultados confirman que no existe efecto tóxico después de incubar durante 24 horas, se ha reportado que Poly IC puede causar efectos tóxicos *in vivo*, incluyendo fallo renal, coagulopatías y reacciones de hipersensibilidad (fig.20) (12,14).

El cuarto ensayo se enfocó a visualizar la expresión de Ciclooxygenasa-2 en células de fibroblastos gingivales humanos, se estimularon con Poly IC, lipopolisacárido y ácido lipoteicoico, a través del ensayo de inmunohistoquímica nuestros resultados confirman la expresión de Ciclooxygenasa-2 estimulando a las células con el agonista para el receptor (fig. 21).

El quinto y sexto ensayo se dirigió a determinar la expresión de Ciclooxygenasa-2, utilizando inhibidores para MEK, p38, JNK, PKC, PLC, PI3K, PKA e IκB, posteriormente se estimuló al receptor tipo Toll 3 con Poly IC; nuestros resultados muestran una disminución de expresión de la enzima utilizando inhibidores para MEK, p38, JNK, PKC, PI3K e IκB a través del ensayo de western blot (fig. 22 y 23).

El séptimo y octavo ensayo se dirigió a determinar la expresión de Ciclooxygenasa-2, utilizando inhibidores para MEK, p38, JNK, PKC, PLC, PI3K, PKA e IκB, posteriormente se estimuló al receptor tipo Toll 3 con Poly IC; nuestros resultados muestran una disminución de la expresión de la enzima utilizando inhibidores para JNK a través del ensayo de RT-PCR (fig. 24 y 25). Podemos sugerir que la

expresión de Ciclooxygenasa-2 es sensible al uso de inhibidores en células de fibroblastos gingivales humanos, mostrando que en la regulación de la enzima están involucradas proteínas intracelulares pertenecientes a la cascada de señalización de las MAP cinasas (10, 36).

El noveno ensayo se dirigió a determinar la actividad del gen reportero de Luciferasa unido al promotor NFκB en células de fibroblastos gingivales humanos, se estimuló al receptor tipo Toll 3 con diferentes concentraciones de Poly IC; nuestros resultados muestran un incremento de la actividad del gen reportero de luciferasa en una dosis manera dependiente, estos resultados sugieren una activación del factor de transcripción NFκB, regulando la actividad transcripcional de genes que codifican para citocinas proinflamatorias.

Además se sabe que la activación de los receptores tipo Toll puede tener efecto negativo suprimiendo al sistema inmune causada por la inflamación crónica (19). Los resultados obtenidos sugieren que el receptor tipo Toll 3 expresado en células de fibroblastos gingivales humanos contribuyen a la síntesis contribuye a la síntesis de prostaglandinas, coadyuvando a la inflamación del tejido lo que conlleva en algunos casos a la pérdida del funcionamiento celular.

X. REFERENCIAS

1. **Becker W, Becker BE.** *Periodontal regeneration updated.* J Am Dent Assoc. 1993 Jul; **124**(7): 37-43.
2. **Berkovitz BK.** *The structure of the periodontal ligament: an update.* Eur J Orthod. 1990 Feb; **12**(1): 51-76.
3. **Bernstein S, Cooke J, Fotek P, Wang HL.** *Vertical bone augmentation: where are we now?.* Implant Dent 2006 Sep; **15**(3): 219-28
4. **Bosshardt DD.** *Structure of periodontal tissues in health and disease.* Periodontol2000 2006; **40**: 11-28.
5. **Bunting RA, Duffy KE, Lamb RJ, San Mateo LR, Smalley K, Raymond H, Liu X, Petley T, Fisher J, Beck H, Flavell RA, Alexopouloud L, Ward CK.** *Novel antagonist antibody to TLR3 blocks poly (I:C)-induced inflammation in vivo and in vitro.* Cell Immunol 2011; **267**(1): 9-16.
6. **Chalabi M, Moghim S, Mogharehabet A, Najaf F, Rezaie F.** *EBV and CMV in chronic periodontitis: a prevalence study.* Arch Virol 2008; **153**(10): 1917-1919.
7. **Cho MI, Garant PR.** *Development and general structure of the periodontium.* Periodontol 2000 2000 Oct; **24**: 9-27.
8. **Emslie RD.** *Some considerations on the role of cementum in periodontal disease.* J Clin Periodontol 1978 Feb; **5**(1): 1-12.
9. **Ericsson I.** *The combined effects of plaque and physical stress on periodontal tissues.* J Clin Periodontol 1986 Nov; **13**(10): 918-22.

10. **García MA, Meurs EF, Esteban M.** *The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control.* *Biochimie* 2007 jul; **89**(6-7): 799-811.
11. **García-Sainz JA, De la Garza MC, Contreras-Rodríguez JL, Nájera A.** *Effects of histamine on the Metabolism of Isolated Rat Hepatocytes: Roles of H₁ and H₂ Histamine Receptors.* *Mol Pharmacology* 1986; **31**: 253-258.
12. **Gauzzi MC, Del Corno M, Gessani S.** *Dissecting TLR3 signaling in dendritic cell.* *Immunobiology* 2010; **215**: 713-723.
13. **Goodsell DS.** *The molecular perspective: Cyclooxygenase-2.* *Stem Cells* 2000; **18**(3): 227-229.
14. **Gutiérrez-Venegas G, Rodríguez-Pérez CE.** *Toll-like receptor 3 activation promotes desensitization of histamine response in human gingival fibroblasts: Poly (I:C) induces histamine receptor desensitization in human gingival fibroblast.* *Cell Immunol* 2012; **273**(2): 150-157.
15. **Janssens S, Beyaert R.** *Role of Toll-like Receptors in Pathogen Recognition.* *Clin Microbial Rev* 2003 Oct; **16**(4): 637-646.
16. **Jeong SW, Jang JY, Lee SH, Kim SG, Cheon YK, Kim YS, Cho DJ, Kim HS, Lee JS, Jin SY, Shim CS, Kim BS.** *Increased expression of Cyclooxygenase-2 is associated with the progression to cirrhosis.* *Korean J Intem Med* 2010 Dic; **25**(4): 364-371.
17. **Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO.** *The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell.* *J Periodontal Res.* 2011 Abr; **46**(2): 153-7.
18. **Kawai T, Akira S.** *TLR signaling.* *Immunology* 2007; **19**: 24-32.

- 19. Kutikhin AG.** *Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk.* Human Immunology 2011; **72**: 1095-1116.
- 20. Limeback H.** *Molecular mechanisms in dental hard tissue mineralization.* Curr Opin Dent. 1991 Dic; **1**(6): 826-835.
- 21. Lindhe J, Lang NP, Karting T.** *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica.* Ed. Panamericana, México 2009; 3-9, 18-22, 27-37, 187-188, 287-294.
- 22. Listgarten MA.** *The structure of dental plaque.* Periodontol 2000 1994 Jun; **5**: 52-65.
- 23. Machuca P, Daille L, Vine´s E, Berrocal L, Bittner M.** *Isolation of a Novel Bacteriophage Specific for the Periodontal Pathogen Fusobacterium nucleatum.* Appl Environ Microbiol 2010 Nov; **76**(21): 7243-7250.
- 24. Mahanonda R, Sa-Ard-lam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, Pichyangkul S.** *IL-8 and IDO Expression by Human Gingival Fibroblast via TLRs.* J Immunol 2007; **178**: 1151-1157.
- 25. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA.** *A human homologue of the Drosophila Toll Protein signals activation of adaptive immunity.* Nature 1997; **388**: 394-397.
- 26. Murakami M, Ohta T, Ito S.** *Lipopolysaccharides Enhance the Action of Bradykinin in Enteric Neurons Via Secretion of Interleukin-1 β From Enteric Glial Cel.* J Neuroscience Research 2009; **87**: 2095-2104.
- 27. Moreno C, Sánchez-Ibarrola A.** *Receptores tipo Toll: Bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario.* Rev. Med. Univ. Navarra 2003; **47**(3): 29-33.

- 28. Norkin LC**, *Virology Molecular Biology and Pathogenesis*. ASM Press 2010; 40-47, 50-52, 80-85.
- 29. Pinado J, Balsinde J, Balboa MA**. *TLR3-Dependent Induction of Nitric Oxide Synthase in RAW 264.7 Macrophage-Like Cell via a Cytosolic Phospholipase A₂/Cyclooxygenase-2 Pathway*. *J Immunol* 2007; **179**: 4821-4828.
- 30. Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ**. *Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease*. *Periodontol* 2000 2003; **31**:12-31.
- 31. Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli E, Gentili V, Lazzarotto Trombelli L**. *Human herpesvirus 7, EpsteinBarr virus and human bcytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects*. *J Clin Periodontology* 2008; **35**: 831-837.
- 32. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE**. *New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle*. *J Dent Res* 2012 Dic; **91**(12): 1110-8.
- 33. Shea JE, Miller SC**. *Skeletal function and structure: implications for tissue-targeted therapeutics*. *Adv Drug Deliv Rev* 2005 May; **25;57**(7): 945-57.
- 34. Shiraishi Z, Asano K, Niimi K, Fukunaga K, Wakaki M, Takihara T, Ueda S, Nakijama T, Oguma T, Suzuki Z, Shiomi T, Sayama K, Kagawa S, Ikeda E, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Miyaso T, Ishizaka A**. *Cyclooxygenase-2/Prostaglandin D₂/CRTH2 Pathway Mediates Double Stranded RNA-Induced Enhancement of Allergic Airway Inflammation*. *J immunol* 2008; **180**: 541-549.

- 35. Slots J.** *Human viruses in periodontitis.* Periodontology 2000 2010; **53**: 89-110.
- 36. Steer SA, Moran JM, Christmann BS, Maggi LB, Corbett JA.** *Role of MAPK in the Regulation of Double-Stranded RNA and Encephalomyocarditis Virus-Induced Cyclooxygenase-2 Expression by Macrophages.* J Immunol 2006; **177**: 3413-3420.
- 37. Takata T.** *Oral wound healing concepts in periodontology.* Curr Opin Periodontol **1994**: 119-27.
- 38. Ten Cate AR.** *The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support.* Oral Dis 1996 Mar; **2**(1):55-62.
- 39. Uitto VJ, Larjava H.** *Extracellular Matrix Molecules and Their Receptors: an overview with special emphasis on periodontal tissues.* Crit Rev Oral Biol Med. 1991; **2**(3):323-54.
- 40. Valanne S, Wang JH, Ramet M.** *The Drosophilla Toll Signaling Pathway.* J Immunol 2011; **186**: 649-656;
- 41. Vercammen E, Staal J, Beyaert R.** *Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3.* ASM. 2008; **21**(1): 13-25.
- 42. Villar CC., Cochran DL.** *Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration.* Dent Clin North Am 2010 Ene; **54**(1): 73-92.
- 43. Waksman G, Remaut H.** *Structural Biology of Bacterial Pathogenesis.* Ed. ASM Press 2005; 241-261.
- 44. www.imim.es/imimat/2009/05/el-viaje-de-las-hormonas-esteroides/es/**
- 45. www.solociencia.com/quimica/proteinas-fosfatasas-origen-vegetal-**

proteinas-fosfatasas.htm

- 46. Zijge V, Ammann T, Thurnheer T, Gmür R. *Subgingival biofilm structure.* Front Oral Biol 2012; **15**: 1-16.**