



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA BRADICININA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR SEMEJANTE
A TOLL-3 EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CRISTINA HERNÁNDEZ BERMÚDEZ

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: **Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas**

VOCAL: **Profesor: Gloria Gutiérrez Venegas**

SECRETARIO: **Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

2° SUPLENTE: **Profesor: José Pedraza Chaverri**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas _____

SUSTENTANTE:

Cristina Hernández Bermúdez _____



Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por acogerme en su seno, y darme la oportunidad en su Facultad de Química, de realizar mis estudios; que para mí constituyo una experiencia invaluable e inolvidable. Siempre estaré orgullosa de ser miembro de la gran comunidad universitaria.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Sé que estas líneas no serán suficientes para agradecerle todo lo que hace por mí. Quiero agradecerle en principio haberme abierto las puertas de su laboratorio y más importante por abrirme las puertas de su vida, por ser una gran tutora y amiga. Gracias por todo su apoyo, paciencia y todas las enseñanzas que van desde literatura, música, cine y muchas más hasta el amor que compartimos por la ciencia. Gracias por hacerme crecer como persona, por todos esos consejos de vida que me han alentado a seguir adelante. Gracias a la vida que la puso en mi camino porque se ha convertido en un pilar en mi vida, gracias por su inmenso cariño. La quiero y admiro mucho.

A mis sinodales

Dr. Eleazar Martínez Barajas y la Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez, por su apreciable tiempo para la revisión y observaciones de la tesis.



Muchas gracias a:

A mis papás

Alicia y Miguel por ser una bendición y lo más maravilloso del mundo, por enseñarme a gatear, caminar, correr, y a levantarme en cada caída. Gracias por todo su amor, amistad y apoyo que me han dado durante toda mi vida. Gracias por la comprensión, tolerancia y por preocuparse que nunca me faltara nada, por todo el esfuerzo que han hecho y por llevarme de la mano para que yo pudiese terminar una etapa importante de mi vida. Gracias por todos y cada uno de los valores y consejos que me han enseñado y que han hecho de mí la persona que ahora soy. Siempre voy a estar agradecida con la vida por la gran familia que me dio y la vida no me va alcanzar para pagarles todo lo hacen por mí.

Gracias papitos por haberme brindado la oportunidad de estudiar y de terminar una carrera

Los amo ayer, hoy y mañana

A José Alberto

Gracias hermanito por ser mi compañero de juegos de tristezas de alegrías, por escucharme y por estar siempre conmigo. Gracias por todo el apoyo que me diste en mis noches de desvelo aunque también eras una distracción. Gracias Betox porque eres una persona muy inteligente la cual me ha llenado de consejos para enfrenar la vida ya que esta no es color de rosa. Gracias por todos los abrazos que me das cuando me siento triste, pero también gracias por todas las cosas graciosas que dices que hacen mi risa estallar. Te amo Betox y siempre tendrás aquí a tu hermana y amiga para apoyarte en todo lo que desees realizar.

A Laura[†]

Que dejo ser mi tía para convertirse en mi hermanita, la cual la vida quiso que nos distanciáramos por un tiempo, pero vivo en la esperanza de volver a verte. Gracias porque la primera vez que estuve oficialmente como alumna de la Facultad tú me acompañaste y estuviste conmigo en todo momento, esperando siempre que llegaré al final de esta meta y hoy es un hecho. Gracias porque sé que desde donde estas me guías y me cuidas. Te extraño mucho.

A mis tía y tíos (Lydia, Isaías, Hilario y Lorenzo) **a mis primos** (Ana, Daniel, Gerardo y Guadalupe)

Gracias por estar siempre a mi lado apoyándome en todo. Porque la familia constituye un gran apoyo para todos los logros y les agradezco de todo corazón que siempre me alentaron para terminar mi carrera. A mi prima Ana que siempre ha estado al pendiente de mí, gracias por defenderme, porque yo no más no digo nada. Y así como tú compartiste conmigo un momento importante en tu vida ahora yo comparto este momento contigo. Gracias a todos los quiero mucho

A Paola

Gracias a la vida que me permitió conocerte y sobretodo plantar esta semilla que juntas hemos ido regando para forjar una grandiosa amistad. Gracias amiga por todos los días que pasamos en la



facultad, a veces estudiando otros cotorreando y siempre con una actitud positiva. Gracias por esos viernes en donde me enseñabas a bailar, lamento ser una mala alumna pues hasta la fecha no aprendo. Y Pao gracias pero muchas gracias por estar en esos momentos malos de la vida siempre apoyándome y alentándome a seguir.

A Flor y Alicia

Mis amigas inseparables desde la preparatoria. Las cuales a pesar de que tomamos diferentes caminos, siempre hemos estado juntas, compartiendo muchas locuras. Gracias por toda la buena vibra que siempre me dan. Gracias porque no cambio por nada todos los momentos agradables que hemos pasado desde que quería ser un árbol hasta el agua verde que alguien invento. Gracias por formar parte de mi vida.

A Miriam, Richard, Vero y Sharon

Que fueron y son mis amigos desde primer semestre en la facultad, los cuales sé que sufrían con el frío del crudo invierno y más porque los despertaba abriendo la ventana. Gracias por todo lo que he aprendido con ustedes, por compartir conocimientos y por su amistad que me brindaron desde que los conocí, espero que por mucho tiempo sigamos siendo amigos.

A Moisés

Amigo mío no tengo palabras para escribirte cuanto significas para mí y cuanto valoro tu amistad, pues en ti encontré a un grandioso ser humano, con el cual estoy muy feliz de haber compartido la carrera. Gracias Moy por todos los conocimientos y risas que compartimos en cada clase y en cada momento. En especial recuerdo mucho un detalle tuyo que me dio fortaleza en ese momento tan difícil. Gracias por demostrarme tu amistad, por escucharme cuando estoy desesperada porque sé que si en alguien puedo confiar es en ti. Gracias por tu compañía.

A Sandy

Amiga gracias por brindarme tu amistad, porque eres una gran persona la cual siempre me alienta a seguir adelante a buscar mis sueños. Gracias Sandy por compartir conmigo a tu familia a la cual aprecio muchísimo.

A Lalo e Israel

Gracias por brindarme su amistad en el laboratorio por todos los momentos buenos y malos que compartimos. Gracias por los conocimientos que me enseñaron de su área. Fue un placer convivir con ustedes, los cuales también me enseñaron a jugar fútbol y que las apuestas no son buenas ya sabrán porque. Los aprecio mucho.

A Zeltzin, Fer, Emmanuel, Cecilio y Juan

Mis súper amigos de laboratorio a los cuales les agradezco que durante el tiempo que tengo de conocerlos me hayan apoyado y me han alentado a terminar mi trabajo de tesis. Gracias por darme fortaleza en cada momento, por todos los chistes que se nos chispotean, por vivir con ustedes una película y por todas las conebencias que tuvimos, esos recuerdos quedarán por siempre en mi memoria.



Zelt es un placer haberte conocido gracias por todos los buenos chistes que me decías, los cuales me daban alegría, gracias por ser tan buena persona y por alentarme a terminar.

Fer se que en la vida existen muchas cosas inexplicables una de ellas nuestra amistad, porque cuando yo digo negro tú dices blanco, sin embargo hemos encontrado un equilibrio en donde nuestra amistad ha perdurado y sé que seguirá así por mucho tiempo. Gracias por todas las cosas locas que he hecho desde que te conozco, la cuales no cambio por nada. Te agradezco mucho todas las veces que me has escuchado y por esos consejos que me han ayudado a seguir adelante y a terminar una etapa importante. Y Fer muchas gracias por aguantar mi mal humor.

A Mónica y Diana.

Gracias y muchas gracias por la labor que realizan, porque gracias a ella parte de esta tesis está hecha.

Mony sé que te conozco de hace mucho tiempo y quiero agradecerte de todo corazón todas y cada una de tus palabras de aliento y apoyo para terminar la carrera. Porque las palabras siempre ayudan y sé que estas orgullosa de lo que he terminado y gracias por estar en este momento, con toda la buena vibra para lo que sigue. Muchas gracias

Diana también quiero agradécete lo bueno y lo malo que hemos compartido porque a final de cuentas de todo se aprende. Gracias por una frase que me dijiste que me hace sentir orgullosa de mi trabajo.

A Mónica, Emilio y Sammy[†]

Mis amiguines de la prepa, gracias por todo el apoyo que me han dado, porque a pesar que nos separamos siempre han estado ahí cuando los necesito. Gracias por escucharme, por todos los buenos momentos que hemos compartido juntos, por aquellos momentos en que Sammy estaba con nosotros, pero sé que su esencia sigue en nuestro lazo de amistad.



DEDICATORIA

A mis papitos Miguel y Alicia por todo su apoyo y amor.

A mis hermanos José y Laura[†]



ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
3. PERIODONTO	2
3.1. Encia.....	2
3.1.1. Anatomía macroscópica.....	2
3.1.2. Anatomía microscópica.....	4
3.1.3. Fibras.....	6
3.1.4. Matriz.....	7
3.2. Ligamento Periodontal.....	7
3.3. Cemento.....	8
3.3.1. Componentes estructurales.....	8
3.4. Hueso Alveolar.....	9
4. PLACADEN TOBACTERIANA	10
4.1. Placa Supragingival.....	10
4.2. Placa Subgingival.....	11
5. ENFERMEDAD PERIODONTAL	12
5.1. Clasificación de la enfermedad periodontal.....	12
5.2. Etiología.....	15
6. RECEPTORES TIPO TOLL	16
6.1. Receptores Toll en humanos.....	18
6.2. Estructura de los receptores Toll.....	19
6.3. Unión con el ligando.....	22
6.4. Transducción de señales.....	22
7. RECEPTOR TLR-3	26
7.1. Estructura del TLR-3.....	27
7.2. Localización del TLR-3.....	29
7.3. Ligando del TLR-3.....	30
7.4. Vía de Señalización.....	32
7.4.1. Activación de IRF3.....	32
7.4.2. Activación de NF-κB.....	33
7.5. Mutaciones en el TLR-3.....	33
7.6. Relevancia Clínica.....	35



8. BRADICININA	37
8.1. Historia del descubrimiento y caracterización de Bradicinina.....	39
8.1.1. Clonación y caracterización genética de los receptores (Evidencia de interacción con proteína G).....	40
8.1.2. Clonación de genes del receptor BKB2R y BKB1R.....	41
8.2. Sistema Calicreína-cinina.....	43
8.3. Mecanismos de Señalización intracelular.....	45
8.3.1. Vía de transducción de señales del recetor BKB2R.....	46
8.3.2. Vía de transducción de señales del receptor BKB1R.....	48
8.4. Regulación de la expresión génica de los receptores a bradicinina a nivel transcripcional y postraducciona.....	50
8.5. Similitudes y diferencias entre BKB2R y BKB1R.....	52
8.6. Antagonistas y perspectivas terapéuticas.....	53
9. OBJETIVO GENERAL	57
9.1. Objetivos Específicos.....	57
10. HIPÓTESIS	57
11. MATERIALES Y MÉTODOS	58
11.1. Población de estudio.....	58
11.2. Tamaño de la muestra.....	58
11.3. Criterios de inclusión.....	58
11.4. Criterios de exclusión.....	58
11.5. Selección de variables.....	58
11.6. Método de procesamiento de datos.....	58
11.7. Materiales.....	59
11.7.1. Reactivos.....	59
11.8. Métodos.....	59
11.8.1. Cultivo Celular.....	59
11.8.2. Ensayo de RT-PCR.....	60
11.8.3. Ensa de Western Blot.....	61
11.8.4. Inmunocitoquímica.....	62
11.9. Secuencia experimental.....	62
11.10. Análisis Estadístico.....	62
12. RESULTADOS	63
13. DISCUSIÓN	71



14. CONCLUSIÓN.....	74
15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	75



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	
Clasificación de la enfermedad periodontal.....	13
Tabla II	
Enfermedades gingivales.....	13
Tabla III	
Clasificación de periodontitis.....	14
Tabla IV	
Familia de receptores TLR.....	20



INDIE DE FIGURAS

Fig.1- Esquema del periodonto y sus estructuras de soporte.....	2
Fig.2- Encía clínicamente sana.....	3
Fig.3- Fibroblasto gingival humano.....	5
Fig.4- Activación del receptor.....	18
Fig.5- Estructura de TLR.....	19
Fig.6- Organización esquemática de los TLRs.....	22
Fig.7- Recetor TLR-3 humano.....	27
Fig.8- Estructura del TLR3.....	28
Fig.9- Interacción TLR-3 – dsRNA.....	30
Fig.10- Estructura de la TLR3-dsRNA complejo de señalización.....	31
Fig.11- Residuos implicados en la unión.....	35
Fig.12- Estructura desarrollada de bradicinina.....	38
Fig.13- Efectos de la bradicinina en diferentes estados fisiopatológicos.....	39
Fig.14- Organización genómica del gen de los receptores BKB2R y BKB1R en el cromosoma 14q32.....	42
Fig.15- Esquema de la producción y catabolismo de las cininas a partir de los cininógenos de alto peso molecular (HMWK) y de bajo peso molecular (LMWK).....	45
Fig.16- Estructura de los receptores acoplados a proteínas G.....	46
Fig.17- Vías de transducción de señales de los receptores BKB2R y BKB1R.	49
Fig.18- Representación del promotor BKB1R del gen humano con sus supuestos sitios de unión a factores nucleares.....	51

FIGURAS DE RESULTADOS

Fig.19- Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente del tiempo.....	63
Fig.20- Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente del tiempo en fibroblastos gingivales humanos	64
Fig.21- Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3, de a nivel transcripcional de manera dependiente de la dosis.....	65
Fig.22- Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3, de manera dependiente de la dosis.....	66
Fig.23- Efecto de los inhibidores sobre la expresión del receptor TLR-3 en fibroblastos gingivales humanos tratados con bradicinina (1µM).....	67
Fig.24- Efecto de los inhibidores sobre la expresión del receptor TLR-3 en fibroblastos gingivales humanos tratados con bradicinina (1µM).....	68
Fig.25- Efecto de la bradicinina (1µM) sobre la localización intracelular del receptor TLR-3 en fibroblastos gingivales humanos.....	70



ABREVIATURAS

AAP	Academia Americana de Periodoncia
AP-1	Proteína Activadora-1
BK	Bradicininina
BKB1R	Receptor 1 a bradicininina
BKB2R	Receptor 2 a bradicininina
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DAG	Diacil glicerol
DC	Célula Dentritica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	Hebra doble de RNA
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ERK	Cinasa extracelular
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GTP	Guanosin trifosfato
HGF	Fibroblasto gingival humano
HK	Cinínógeno de alto peso molecular
IL-1	Interleucina-1
IL-12	Interleucina-12
IL-1R	Receptor a Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNos	Enzima óxido nítrico inducible
IP3	Inositol-1,5-trifosfato
LK	CINInógeno de bajo peso molecular
LLR	Repeticiones de leucina
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
MAPK	Proteína cinasa activada por mitogno
MYD88	Factor de diferenciación mieloide 88
NEP	Endopeptidasa neutral
NFk-B	Factor nulear kapa
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PGE2	Prostaglandina
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína cinasa C (PKC)



PLA2	Fosfolipasa A ₂ (PLA ₂)
PLC	Fosfolipasa C
Poly (I:C)	Ácido policitidílico poliinosínico
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PTX	Toxina pertussis
RLC	Receptores de Lectina tipo C
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SR	Receptores Scavenger
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
Ub	Ubiquitina



1. RESUMEN

La enfermedad periodontal es uno de los principales problemas de salud buco-dental en la población adulta mexicana. Su prevención constituye uno de los mayores retos que enfrenta la Odontología moderna en México. La enfermedad periodontal es un padecimiento caracterizado por un grupo de reacciones inflamatorias e inmunes que afectan a los tejidos de soporte del diente. Se produce como respuesta del hospedero ante la presencia de microorganismos periodontopatógenos y de algunos virus que provocan la pérdida del órgano dentario. Entre los factores involucrados en la respuesta inflamatoria se encuentran los patrones moleculares asociados a patógenos que se unen a los receptores semejantes a Toll y desencadenan la activación de vías de señalización y expresión de citocinas promotoras de respuestas inflamatorias. De igual manera, en el sitio de la inflamación se libera histamina, bradicinina y prostaglandina que activan a los fibroblastos gingivales humanos (HGF), que son las células mayoritarias de la encía y que son en última instancia las células responsables de desencadenar la inflamación del periodonto. Sin embargo, el papel de la bradicinina en modular la respuesta inflamatoria no ha sido evaluado hasta este momento. Por este motivo en esta investigación nos proponemos caracterizar el papel de bradicinina en la regulación de la expresión del receptor TLR-3. Las células HGF se incubaron con bradicinina a diferentes tiempos y dosis a fin de evaluar su efecto en la expresión de TLR3 mediante ensayos de RT-PCR, inmunohistoquímica y western-blot. De igual manera, se evaluaron las cinasas involucradas en la expresión del TLR3 mediada por bradicinina. Nuestros resultados muestran que bradicinina amplifica la expresión de TLR3 en HGF de manera dosis dependiente y curso temporal, tanto a nivel transcripcional como traduccional. En otra serie de resultados, encontramos que las cinasas fosfatidil inositol 3 cinas (PI3K), proteína cinasa C (PKC) y proteína cinasa A, están involucradas en la inducción de la expresión del receptor TLR3 en HGF tratados con bradicinina, en un evento en el que participa el factor nuclear kappa B (NFkB). En conclusión nuestros resultados sugieren que bradicinina participa en la regulación de la expresión del receptor TLR3 en la respuesta inflamatoria.

2. ANTECEDENTES

3. PERIODONTO

El término periodonto proviene de las raíces griegas *περί* *peri* "alrededor" y *ὀδούς* *odonto* "diente". Se denomina así al conjunto de tejidos que conforman el órgano sostén y protección del órgano dentario. Se clasifica según su función en periodoncio de protección conformado por la encía y la unión dentogingival y periodoncio de inserción conformado por el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar¹ (Fig.1).

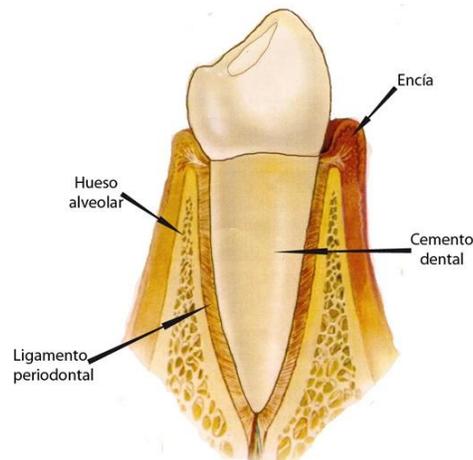


Fig. 1. Esquema del periodonto y sus estructuras de soporte. Se señala la ubicación de la encía, cemento dental, hueso alveolar y ligamento periodontal.

<http://www.clinicadentaltrigemino.es/problemas-encias/que-es-la-enfermedad-periodontal>

3.1. Encía

La encía es esa parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. La encía adquiere su forma y textura finales con la erupción de los dientes¹.

3.1.1. Anatomía macroscópica (Fig. 2)

Se pueden distinguir tres partes de la encía:

1. La encía libre o marginal
2. La encía interdientaria
3. La encía insertada

1.- Encía libre o marginal

La encía libre es de color coral, tiene una superficie opaca y consistencia firme y comprende el tejido gingival y las zonas vestibular y lingual/palatino de los dientes. La encía marginal se extiende desde la cresta del margen gingival hasta el surco marginal que está ubicado en un nivel que corresponde a la unión o límite cementoadamantina mientras que por la parte interna va hasta el epitelio del surco y el epitelio de unión¹.

2.- Encía Interdentaria

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

3.- Encía Insertada

La encía insertada en sentido coronario, está señalada por el surco gingival libre y se extiende en dirección apical hacia la unión mucogingival, donde se continua con la mucosa alveolar. Posee una textura firme, rosa coral, y suele mostrar un punteado delicado que le da aspecto de cáscara de naranja. Está firmemente adherida al hueso alveolar y cemento subyacente, por medio de fibras conectivas y es, por tanto, relativamente inmóvil en relación con el tejido subyacente¹.



Fig. 2. Encía. En esta fotografía se observa la clasificación macroscópica de la encía. Se destacan las características propias de la encía insertada como el punteado en cáscara de naranja y la textura firme propias de ella. <http://www.clinicaperiodoncia.cl/?m=201104>



3.1.2. Anatomía microscópica

La encía está formada por dos tejidos el tejido epitelial y tejido conectivo.

- Tejido epitelial bucal:

La encía marginal comprende todas las estructuras tisulares ubicadas de forma coronal a la línea horizontal ubicada en el nivel del límite cementoadamantino. El epitelio que recubre la encía marginal puede diferenciarse así: epitelio bucal, que mira hacia la cavidad bucal; epitelio sulcular bucal, que mira hacia el diente sin ponerse en contacto con él; epitelio de unión, que permite la adherencia entre encía y diente¹.

El epitelio bucal es un epitelio queratinizado, estratificado, escamoso que, según el grado de diferenciación de las células productoras de queratina, puede ser dividido en las siguientes capas celulares²:

1. Capa basal
2. Capa espinocelular
3. Capa celular granulosa
4. Capa celular queratinizada

Además de las células productoras de queratina, que comprenden alrededor del 90% del total de la población celular, el epitelio bucal contiene estos otros tres tipos de células:

1.- Melanocitos. Son células sintetizadoras de pigmento, son responsables de la producción del pigmento conocido como melanina, están presentes en las personas con pigmentación acentuada de la mucosa bucal, así como en personas en las que no se aprecian clínicamente signos de pigmentación³.

2.- Células de Langerhans. Derivan de la médula ósea y tienen la función de presentación antigénica además están involucradas en una gran variedad de respuestas inmunes por medio de la activación de las células T . La célula de Langerhans es el principal efector de las reacciones inmunes epidérmicas.

3.-Células inespecíficas (que no muestran las mismas características estructurales de los otros dos tipos de células). Las células de los tres tipos son estrelladas y tienen prolongaciones citoplásmicas de distintos tamaños y aspectos. A estas células también se les llama claras.

- Tejido Conectivo

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

Los diferentes tipos de células presentes en el tejido conectivo son:

Fibroblastos. Célula del tejido conectivo que más predomina (65%). Es una célula fusiforme o estrellada con núcleo de forma ovalada; su citoplasma contiene un retículo endoplásmico granuloso bien desarrollado con ribosomas. Su función es la producción de diversos tipos de fibras halladas en el tejido conectivo, pero además interviene en la síntesis de la matriz de este tejido¹. (Fig. 3)

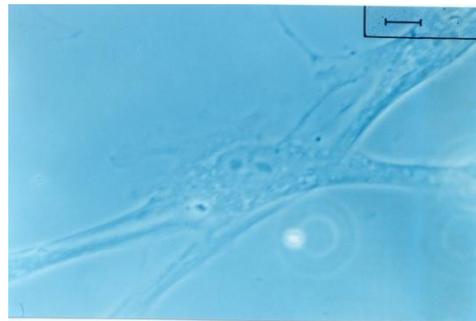


Fig.3. Fibroblasto gingival humano. El fibroblasto contiene varios complementos de Golgi y muchos perfiles de retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y vesículas secretorias. Microscopía de interferencia de Nomarski. Aumento 100x. Imagen obtenida en el Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado. U.N.A.M.

Mastocito. Es responsable de la producción de ciertos componentes de la matriz. Esta célula produce asimismo sustancias vasoactivas, que pueden afectar la función del sistema microvascular y controlar el flujo de sangre a través del tejido. El citoplasma se caracteriza por tener gran cantidad de vesículas de tamaños variables que contienen enzimas proteolíticas, histamina y heparina^{4,5}.

Macrófagos. Sus funciones son fagocíticas y sintéticas dentro del tejido. Residen en el tejidos conjuntivo subepitelial, el intersticio de los órganos parenquimatosos,



el revestimiento de los sinusoides vasculares del hígado, bazo y los senos linfáticos de los ganglios linfáticos, así como también abundan en el tejido inflamado^{4,5}.

Leucocitos Polimorfonucleares. Son la población más abundante de leucocitos circulantes intervienen en las primeras fases de las respuestas inflamatorias. El núcleo es lobulado y en el citoplasma contiene gránulos, los cuales están llenos de enzimas como lisozimas, colagenasa y elastasa.^{4,5}.

3.1.3. Fibras.

Las fibras del tejido conectivo son producidas por los fibroblastos y se las puede dividir en fibras colágenas, fibras elásticas, fibras de reticulina y fibras oxitalánicas.

1.-Fibras colágenas. Las fibras colágenas predominan en el tejido conectivo y constituyen los componentes más esenciales del periodonto. La unidad menor, la molécula de colágeno, suele ser conocida como tropocolágena que se compone de tres cadenas de polipéptidos entrelazadas para formar una hélice. Cada cadena contiene unos 1000 aminoácidos. Un tercio de ellos son glicina y alrededor del 20% prolina e hidroxiprolina. La síntesis del tropocolágeno se realiza dentro del fibroblasto, desde el cual la molécula será secretada hacia el espacio extracelular. Primero las moléculas de tropocolágeno se agregan longitudinalmente para formar protofibrillas, que posteriormente se agregan lateralmente paralelas en fibrillas colágenas^{1,4}.

Muchas de las fibras colágenas en la encía y el ligamento periodontal están distribuidas irregularmente o aleatoriamente, la mayoría tienden a estar dispuestas en grupos de haces con una clara orientación. De acuerdo con su inserción y curso dentro de los tejidos los haces orientados en la encía pueden dividirse en los siguientes grupos:

- 1) Fibras circulares. Son haces de fibras que siguen un curso dentro de la encía libre y rodean al diente como un manguito o anillo.
- 2) Fibras dentogingivales. Están incluidas en el cemento en la porción supraalveolar de la raíz y se proyectan desde el cemento con una



configuración de abanico hacia el tejido gingival libre de las superficies, facial, lingual e interproximales.

- 3) Fibras dentoperiósticas. Están incluidas en la misma porción del cemento que las fibras dentogingivales, pero siguen un curso apical sobre la cresta ósea vestibular y lingual y terminan en el tejido de la encía adherida
- 4) Fibras transeptales. Las fibras transeptales corren a través del tabique interdentario y están incluidas en el cemento de dientes adyacentes^{1,4}.

2.-Fibras de reticulina. Son numerosas en el tejido adyacente a la membrana basal. Sin embargo también aparecen fibras de reticulina en grandes cantidades en el tejido conectivo laxo que rodea a los vasos sanguíneos. De tal modo, las fibras de reticulina están presentes en las interfases de los tejidos epitelio-conectivo y endotelio-conectivo^{1,4}.

3.- Fibras oxitalánicas. Están presentes en la encía y en el ligamento periodontal y parecen estar compuestas por fibrillas finas y largas^{1,4}.

3.1.4. Matriz

La matriz del tejido conectivo es producida primero por los fibroblastos, aunque algunos componentes son generados por los mastocitos y otros provienen de la sangre. La matriz es el medio en el cual están incluidas las células del tejido conectivo y es esencial para el mantenimiento de la función normal del tejido conectivo. De tal modo, el transporte de agua, electrolitos, de nutrientes, de metabolitos, etc. desde y hacia las células conectivas individuales se produce dentro de la matriz^{4,6}.

3.2. Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo que rodea la raíz del diente (Fig.1) relacionándolo de forma directa con el hueso, éste se continúa con el tejido conectivo de la encía y se comunica con el hueso mediante los canales vasculares que se encuentran ubicados en los espacios medulares del mismo.

Fibras Periodontales se dividen en 5 clases:



1. Fibras Cresto-alveolares. Se originan del cemento que se encuentra justo debajo del epitelio a la cresta alveolar. Estas fibras también corren del cemento a través de la cresta alveolar hasta el estrato fibroso del periostio cubriendo el hueso alveolar. Sus funciones son prevenir la extrusión del diente y resistir los movimientos laterales^{1,2,6}.
2. Fibras Horizontales. Insertándose en el cemento corren por todo el eje longitudinal del diente hasta fijarse al hueso alveolar.
3. Fibras Oblicuas. Es el grupo más grande de fibras periodontales. Se insertan en el cemento y se dirigen en dirección coronal oblicua al hueso. Su función es resistir las fuerzas verticales de la masticación y transformarlas en tensión que absorberá el hueso alveolar.
4. Fibras apicales. Surgen del cemento de la zona del foramen apical y se insertan en el hueso. No están presentes en dientes con raíz incompleta.
5. Fibras Interradiculares. Se despliegan en abanico desde el cemento a la zona de la furca de dientes multirradiculares.

3.3. Cemento

El cemento es un tejido avascular, calcificado y mesenquimático que constituye la porción externa de la raíz anatómica (Fig. 1). El cemento cubre y protege la totalidad de la superficie radicular del diente desde el cuello anatómico hasta el ápice, aunque en ocasiones puede extenderse sobre el esmalte en la región cervical. Este tejido no está vascularizado y carece de inervación propia^{1,2,6}.

El cemento proporciona un medio de retención por anclaje de las fibras colágenas del ligamento periodontal que fijan el diente al hueso alveolar, controla el ancho del espacio periodontal, permite la reorientación de fibras periodontales y conserva la inserción de dichas fibras durante el movimiento dentario, transmite las fuerzas oclusales a la membrana periodontal, repara la superficie radicular cuando se presentan fracturas o resorciones y compensa el desgaste del diente por atrición.

3.3.1. Componentes estructurales

El cemento está formado por células y por una matriz extracelular calcificada. Las



principales células son los cementoblastos y los cementocitos.

Los cementoblastos se encargan de sintetizar tropocolágeno que formará las fibras colágenas intrínsecas y los proteoglicanos o glucosaminoglicanos que formarán la matriz extracelular.

Los cementocitos son aquellos cementoblastos que quedan incluidos en lagunas en el cemento mineralizado. Estas células presentan entre 10 y 20 prolongaciones citoplasmáticas que emergen del cuerpo celular y se extienden hacia la superficie externa en dirección al periodonto, que representa su fuente de nutrición.

La matriz extracelular del cemento contiene aproximadamente de 46 a 50% de material inorgánico, 22% de material orgánico y 32% de agua. El principal componente inorgánico está representado por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita, los cuales se alojan entre las fibras colágenas y dentro de ellas. Además del fosfato de calcio, también se presenta carbonato de calcio y oligoelementos entre los que se pueden mencionar sodio, potasio, hierro, magnesio, azufre y fluoruro.

La matriz orgánica del cemento está formada por fibras de colágeno principalmente tipo I, que constituye el 90% de la fracción proteica de este tejido^{1,2,6}.

3.4. Hueso Alveolar

El proceso alveolar es la porción del maxilar y mandíbula que forma y soporta los alvéolos dentales (Fig. 1). El proceso alveolar se forma cuando los dientes erupcionan y se reabsorbe gradualmente cuando los dientes se pierden. El hueso alveolar está formado en partes por células del folículo dentario (hueso alveolar propio) y por células que son independientes del desarrollo dentario. Junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal, el hueso alveolar constituye el aparato de inserción de los dientes, cuya función principal es distribuir y reabsorber las fuerzas generadas, por ejemplo, por la masticación y por otros contactos dentarios^{1,2,6}.

Las paredes de los alvéolos están tapizadas por hueso compacto y el área entre los alvéolos, incluida la pared ósea compacta, está ocupada por hueso esponjoso. El hueso esponjoso contiene trabéculas óseas, cuya arquitectura y tamaño están



en parte determinados genéticamente y en parte son el resultado de las fuerzas a las cuales están expuestos los dientes durante la función.

Los osteoblastos formadores de hueso o en reposo, incluidos los odontoclastos, que son células multinucleadas que participan en la reabsorción ósea, producen osteoide, constituido por fibras colágenas y una matriz que contiene principalmente proteoglicanos y glucoproteínas. Esta matriz ósea u osteoide experimenta una mineralización por depósito de minerales, como calcio y fosfato, que posteriormente se transforman en hidroxiapatita. Durante el proceso de maduración y mineralización del osteoide, parte de los osteoblastos quedan atrapados en el osteoide. Las células presentes en el osteoide y, después, en el tejido óseo mineralizado, se denominan osteocitos.

La reabsorción del hueso está vinculada siempre a los osteoclastos. Estas son células gigantes especializadas en la degradación de la matriz mineralizada (hueso, dentina, cemento) y, probablemente, se generan a partir de los monocitos vasculares. La osteólisis (es decir, la degradación del hueso) es un proceso celular activo ejercido por los osteoclastos. Los osteoclastos activos en la reabsorción se adhieren a la superficie del hueso y crean concavidades lacunares denominadas lagunas de Howship. Tanto el hueso cortical como el esponjoso experimentan continuamente un remodelado (es decir, reabsorción seguida de neoformación), en respuesta al desplazamiento de los dientes y a los cambios en las fuerzas funcionales que actúan sobre los dientes^{1,2,6}.

4. PLACA DENTOBACTERIANA

Se ha definido a la placa dentobacteriana (o microbiana o dental) como agregados microbianos a los dientes u otras estructuras bucales sólidas. Se clasifica de acuerdo a su localización en supragingival y subgingival^{7,8}.

4.1. Placa Supragingival

Las superficies dentarias, tanto el esmalte como el cemento, están normalmente cubiertas por una delgada película adquirida de glucoproteínas. Si se retira, por ejemplo, mediante instrumentación mecánica, se vuelve a formar en pocos



minutos. Se cree que la película desempeña un papel activo en la adhesión selectiva de las bacterias a la superficie dentaria.

En la zona supragingival, las bacterias vinculadas con la salud periodontal llegan a acumular hasta aproximadamente 12 células de espesor en la superficie dental, y son principalmente cocos y bacilos Gram-positivos.

La colonización de la superficie dental por las bacterias de la placa supragingival parece ser bastante específica y depende de la interacción de la superficie bacteriana con la glucoproteína salival de la película. Se comprobó que es *Streptococcus sanguinis* y los bacillos Gram-positivos son los grupos principales de bacterias que inician la placa supragingival. Una vez iniciado el crecimiento de la placa supragingival, se produce el crecimiento secundario y maduración. Durante esta fase hay un desplazamiento de la población bacteriana. La proporción de microorganismos filamentosos y bacterias Gram-negativas aumenta. En general, esta placa aparece más compacta. También son más evidentes las interacciones bacterianas adherentes. Los microorganismos encontrados comúnmente en dichos sitios en adultos incluyen *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii* y a veces especies de *Neisseria* y *Veillonella*^{7,8}.

4.2. Placa Subgingival

Los mecanismos involucrados en la formación de la placa subgingival, han sido parcialmente dilucidados. Una razón es la dificultad para obtener muestras con la placa subgingival conservada en su posición original entre los tejidos blandos de la encía y los tejidos del diente. La estructura de la placa subgingival tiene cierta similitud con la variedad supragingival, en particular cuando concierne a placa asociada a gingivitis sin formación de bolsas profundas. Se observa un cúmulo de microorganismos densamente apretados adyacentes al material cuticular que recubre la superficie dentaria. Los microorganismos comprenden cocos y bacilos Gram-positivos y negativos y organismos filamentosos. También se pueden encontrar espiroquetas y diversas bacterias flageladas, en especial en la extensión apical de la placa. La capa superficial suele estar menos densamente apretada y



hay leucocitos interpuestos regularmente entre la placa y el recubrimiento epitelial del surco gingival.

La acumulación de placa en la porción del diente antes cubierta por los tejidos periodontales no difiere marcadamente de la observada en la gingivitis. En esta capa, predominan los microorganismos filamentosos, pero también existen cocos y bacilos. Sin embargo, en el fondo de la bolsa, se reduce el número de los organismos filamentosos y en la porción más apical están virtualmente ausentes^{7,8}.

5. ENFERMEDAD PERIODONTAL

El término enfermedad periodontal, se refiere a un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan los tejidos de soporte del diente, encía, hueso y ligamento periodontal. Se considera el resultado del desequilibrio entre la interacción inmunológica del huésped y la flora de la placa dental marginal que coloniza el surco gingival⁹.

5.1. Clasificación de la Enfermedad Periodontal.

Cada día la enfermedad periodontal tiene mayor importancia, no solamente para la salud oral, sino que se ha constituido como un factor de riesgo importante para la salud sistémica de la población.

Los sistemas de clasificación son necesarios, ya que constituyen una forma de proveer un marco de referencia el cual, científicamente estudia la etiología, patogénesis y el tratamiento en una forma ordenada, además de proveer al clínico una vía organizada de las necesidades de cuidado para sus pacientes.

La Academia Americana de Periodoncia (AAP), a finales de 1999 en la ciudad de Oak Brook, Illinois, realizó el taller sobre la clasificación de enfermedad periodontal, que fue publicado en los anales de periodoncia de diciembre de 1999, dándonos nuevos parámetros para unificar universalmente las diferentes entidades que se presentan en la enfermedad periodontal. Es importante que esta clasificación se adopte ya que podemos globalizar el conocimiento (Tabla 1,2 y 3).



Tabla 1
CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Enfermedades gingivales	Enfermedades gingivales inducidas por placa
	Lesiones gingivales no inducidas por placa.
Periodontitis crónica	Localizada
	Generalizada
Periodontitis agresiva	Localizada
	Generalizada
Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas	
Enfermedades periodontales necrosantes	Gingivitis ulcerativa necrosante (NUG)
	Periodontitis ulcerativa necrosante (NUP)

Tabla 2
ENFERMEDADES GINGIVALES

Enfermedades gingivales inducidas por placa	
Gingivitis relacionada solo con la placa dental	Sin factores locales contribuyentes
	Con factores locales contribuyentes
Enfermedades gingivales modificados por factores sistémicos	Relacionados con el sistema endocrino
	Gingivitis relacionada con la pubertad
	Gingivitis relacionada con el ciclo menstrual
	Gingivitis relacionada con el embarazo
	Gingivitis relacionada con la diabetes mellitus
	Relacionada con las discrasias sanguíneas
	Gingivitis relacionada con leucemia
	Otras
Enfermedades gingivales modificadas por Medicamentos	Enfermedades gingivales inducidas por fármacos
	Agrandamientos gingivales
	Gingivitis influida por fármacos (anticonceptivos)
Enfermedades gingivales Modificadas por malnutrición	Gingivitis por deficiencia de ácido ascórbico
	Otras
Lesiones gingivales no inducidas por placa	
Enfermedades gingivales De origen bacteriano específico	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	<i>Treponema pallidum</i>
	Especies de <i>Streptococcus</i>
	Otras
Enfermedades gingivales de Origen viral	Gingivostomatitis herpética primaria
	Herpes bucal frecuente
	Varicela zoster



Tabla 3
CLASIFICACIÓN DE PERIODONTITIS

La periodontitis se subdivide en tres tipos con base en las características clínicas, radiológicas, históricas y de laboratorio	
Periodontitis crónica	
La periodontitis crónica se divide en localizada y generalizada y describirse como leve, moderada o grave con base a las características comunes ya descritas y las siguientes específicas	Prevalencia en adultos
	Cantidad de destrucción consistente con los factores locales
	Relación con un patrón microbiano variable
	Cálculos gingivales
	Modificada por los siguientes factores o relacionados con ellos
	Diabetes mellitus
	Virus de inmunodeficiencia humana
	Factores locales que predisponen a la periodontitis
	Tabaquismo y estrés
	Forma localizada < 30% de los sitios implicados
	Forma generalizada > 30% de los sitios implicados
	Leve: 1 a 2 mm de pérdida de inserción clínica
	Moderada: 3 a 4 de pérdida de inserción clínica
	Grave: ≥ 5 mm de pérdida de inserción clínica
Periodontitis agresiva	
La siguientes características son comunes en pacientes con periodontitis crónica	Pacientes clínicamente sano en otros factores
	Perdida de inserción y destrucción ósea rápida
	Cantidad de depósitos microbianos inconsistentes con la gravedad de la enfermedad
	Prevalencia en la familia
Las siguientes características son comunes pero no universales	Sitios infectados con <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
	Anormalidades en la función fagocítica
	Macrófagos con hiperreacción, producen una mayor de prostaglandina E2 (PGE2) e IL-1β
La periodontitis agresiva se clasifica en localizada y generalizada con base a las características comunes aquí descritas y las siguientes características específicas	
Localizada	Inicio circumpuberal de la enfermedad
	Localizada en el primer molar o incisivo con pérdida de la inserción en dos dientes permanentes.
Generalizada	Se presenta en pacientes menores a 30 años
	Perdida de la inserción proximal generalizada que afecta a tres dientes.
	Naturaleza episódica pronunciada de la destrucción periodontal
Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas	
Trastornos hematológicos	Neutropenia adquirida
	Leucemia
	Otros



Trastornos genéticos	Neutropenia Cíclica Familiar
	Síndrome de Down
	Síndromes de Deficiencia de Adhesión Leucocitaria.
	Síndrome Papillon-Lefèvre
	Síndrome de Chediak-Higashi
	Histiocitosis.
	Enfermedad de Almacenamiento de Glucógeno
	Agranulocitosis Genética Infantil
	Síndrome de Cohen.
	Síndrome de Ehlers-Danlos.
Hipofosfatasia	

5.2. Etiología

La periodontitis, es un proceso inflamatorio que afecta a las estructuras de soporte de los dientes lo que conlleva a la destrucción de la encía, del hueso alveolar y a la pérdida de los dientes y aunque su etiología es diversa por lo general está asociada a los microorganismos presentes en la placa dentobacteriana⁸. Al menos cuatrocientas especies de bacterias habitan los sitios subgingivales, aunque solo 20 microorganismos Gram-negativos, se consideran como periodontopatógenos. Sin embargo, aún existen discrepancias entre la relación de los eventos clínicos con la etiología de la enfermedad periodontal. Algunas investigaciones señalan que existen una gran variedad de factores que participan en el desarrollo de la periodontitis, entre los que se encuentran factores genéticos e inmunes. Se ha observado que en individuos genéticamente predispuestos, los agentes virulentos provocan la inflamación de la encía y desarrollan la enfermedad cuando son infectados por partículas virales tales como, Epstein-Bar virus, Herpesvirus o citomegalovirus de los cuales se han encontrado cuentas de más un millón en los sitios afectados con periodontitis. Algunas investigaciones señalan que existe una clara relación de la interacción virus-bacteria para explicar la periodontitis. Se ha propuesto que la periodontitis inicia por infección viral lo que desencadena una respuesta inmune y la consecuente liberación de citocinas pro-inflamatorias que activan osteoclastos y matriz metaloproteinasas y que perjudica a los mecanismos inmunes antibacterianos lo que ocasiona la proliferación de periodontopatógenos¹⁰



Los fibroblastos gingivales humanos (HGF), son las células más abundantes en la encía y participan en los mecanismos de defensa respondiendo a histamina o bradicicina, que son un importante mediador de reacciones alérgicas y de una amplia variedad de respuestas inmunes, entre las que se encuentran citocinas inflamatorias y modulación de células T-cooperadoras. Los HGF, expresan receptores inmunológicos, tales como, TNFR, CD14 y TLR. La estimulación de HGF con Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) induce la producción de citocinas como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), lo que sugiere que los fibroblastos gingivales tienen un rol de gran importancia en procesos inflamatorios. En fechas recientes se ha demostrado que la estimulación con poly(I:C) en HGF, induce la expresión de moléculas pro-inflamatorias entre las que se encuentran IL6, IL8 y CXCL10. Sin embargo, la estimulación crónica promueve la síntesis permanente de estos mediadores lo que conduce al desarrollo de enfermedad periodontal. Por otra parte, algunos estudios señalan que la periodontitis se puede desarrollar en individuos genéticamente predispuestos que son infectados con agentes virulentos. En fibroblastos gingivales humanos, las infecciones virales promueven la expresión de matriz metaloproteinasas lo que conlleva a la destrucción de la encía. Fibroblastos y células epiteliales expresan los receptores TLR3 tanto intracelularmente como en la superficie celular. TLR-3 activa cascadas de señalización a través la molécula adaptadora TRIF que activa a factores de transcripción como NFκ-B y la consecuente transcripción de interferon-β y de interleucina-12 (IL-12). Por otra parte poly(I:C) regula la activación del factor de transcripción AP-1 mediante la activación de las proteínas activadas por mitógeno (MAPK) y la transcripción de IL-6 y del Factor de Necrosis Tumoral (TNF).

Como mencionamos en líneas anteriores la periodontitis es el resultado de una predisposición genética y de diferentes respuestas inmunes. Por este motivo nos interesa evaluar los efectos de la bradicicina en la regulación de la respuesta inmune innata particularmente en la expresión del receptor TLR-3.



6. RECEPTORES TIPO TOLL

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra las infecciones, censa, responde y modula la respuesta a microorganismos y a productos microbianos, por medio de componentes tales como las barreras epiteliales, leucocitos (neutrófilos, macrófagos y linfocitos NK), proteínas efectoras circulantes (complemento, colectinas, pentraxinas), citocinas como TNF, IL-1, quimiocinas, IL-12, INF de tipo1 y receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que están codificados en la línea germinal, entre ellos los receptores tipo Toll (TLR) y tipo NOD (NLR), receptores de Lectina tipo C (RLC), receptores Scavenger (SR) y receptores para péptidos formilados.

En 1988, Nusslei-Volhard, en sus estudios realizados en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, encontraron una línea de embriones procedentes de hembras heterocigotas que presentaban una mutación en un gen que impedía el desarrollo del mesodermo y del sistema nervioso central, identificaron el gen mutado y comprobaron que daba lugar a un receptor transmembranal que denominaron Toll, término que proviene del alemán y significa “extraordinario”¹¹. La activación de este receptor a través del ligando *spätzle*, inicia una cascada de señalización de las cinasas plasmáticas (*tube*, *pelle*) que finalmente conduce a la degradación de la proteína (*cactus*) y a la liberación del factor de transcripción *dorsal*, el cual, se puede traslocar al núcleo y activar o reprimir la expresión de genes (Fig.4) que intervienen en el desarrollo embrionario de *Drosophila*^{12,13}.

En estudios posteriores, descubrieron que la proteína Toll tiene un papel central en la respuesta inmune de la *Drosophila* adulta, debido a que la vía de señalización de Toll es necesaria para inducir la transcripción de un gen que da lugar a un péptido antifúngico denominado drosomicina en respuesta a una infección por hongos. En moscas adultas con mutaciones en el gen Toll observaron que eran incapaces de inducir la expresión del péptido drosomicina cuando eran infectadas con *Aspergillus fumigatus*, sin embargo, observaron que estos mutantes no eran susceptibles a infecciones bacterianas, lo que les sugirió que la respuesta antibacteriana y la respuesta antifúngica seguían distintas vías de señalización¹⁴.

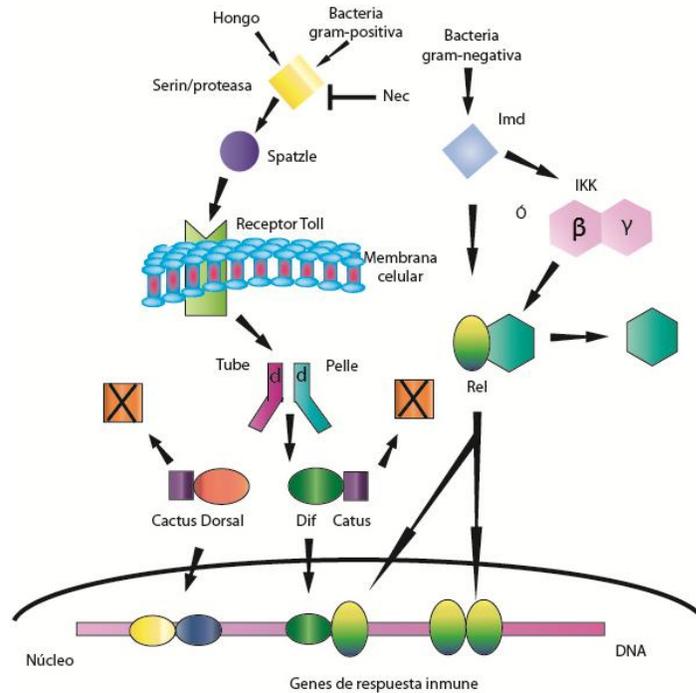


Figura 4. Activación del receptor. La activación de este receptor a través del ligando *spätzle*, inicia una cascada de señalización de las cinasas plasmáticas (*tube*, *pelle*) que finalmente conlleva a la degradación de la proteína (*cactus*) y a la liberación del factor de transcripción *dorsal*, el cual, se puede traslocar al núcleo y activar o reprimir la expresión de genes. En humanos la señalización a través de este receptor está asociada a la cinasa (IRAK), un homólogo de la proteína cinasa (*Pelle*) en el desarrollo dorsoventral de *Drosophila*. (IRAK) activa la traslocación de NF- κ B, de la misma manera que Toll activa un miembro de la familia REL. (Deborah A. Kimbrell et, al. Nature/reviews/genetics 2:265-267 (2001))

6.1. Receptores Toll en humanos

A finales de 1990, el interés en la función inmune de Toll en *Drosophila*, inspiró una búsqueda de otros genes relacionados con Toll en mamíferos. Esta búsqueda se vio facilitada por la utilización de la base de datos (EST), la cual permitió la rápida identificación y clonación de los genes homólogos. En 1997 se identificó la primera proteína de mamíferos que mostraba tener homología con Toll. Esta proteína fue el receptor a Interleucina-1 (IL-1R) o TIR¹⁵.

La señalización a través de este receptor está asociada a la cinasa (IRAK), un homólogo de la proteína cinasa (*Pelle*) en el desarrollo dorsoventral de *Drosophila*. (IRAK) activa la traslocación de NF- κ B, de la misma manera que Toll activa un miembro de la familia REL (Fig.4).

Para 1998, cinco receptores tipo Toll ya habían sido clonados a partir de cDNA de mamíferos, en la base de datos observaron la homología entre EST y el receptor Toll de *Drosophila*. Sin embargo, la función de los TLRs no era clara, pues más de 500 millones de años de divergencia entre *Drosophila* y mamíferos han alterado drásticamente la función de muchas proteínas y la eliminación de algunas de estas en otras especies¹⁶.

6.2. Estructura de los receptores Toll

Los receptores Toll son proteínas de membrana de tipo I. Son glicoproteínas integrales de membrana que se caracterizan por tener una arquitectura conservada que consiste en dos dominios, un dominio extracelular rico en repeticiones ricas de leucina (LRR) y un dominio intracelular o citoplasmático homólogo al receptor para IL-1 (Fig.5). Estos dominios conservados han permitido identificar y clasificar distintos TLRs, identificándose a 13 receptores en mamíferos, 10 de los cuales se han encontrado en humanos (Tabla 4).

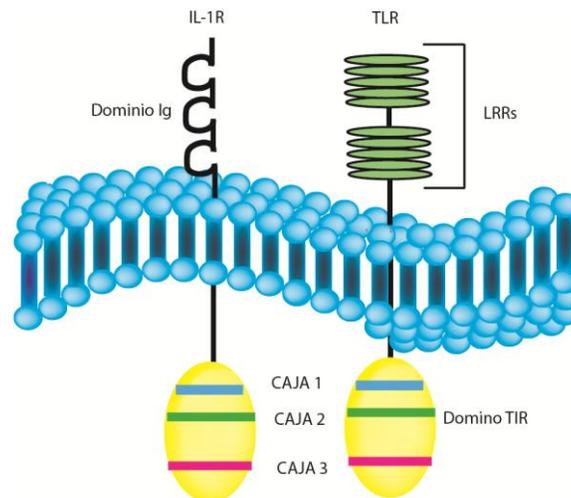


Figura 5 Estructura de TLR. Los receptores tipo Toll (TLRs) y receptores de interleucina-1 (IL-1RS) tienen un dominio citoplásmico conservado, que se conoce como dominio Toll/IL-1R (TIR). El dominio TIR se caracteriza por la presencia de tres regiones altamente homólogas (conocidas como cajas 1, 2 y 3). A pesar de la similitud de los dominios citoplásmicos de estas moléculas, sus regiones extracelulares difieren notablemente: TLRs tienen repeticiones en tándem de regiones ricas en leucina (conocido como repeticiones ricas en leucina LRR), mientras que la IL-1RS tienen tres inmunoglobulina (Ig) igual que los dominios. (Shizuo Akira et, al. Nature Reviews Immunology 4: 499-511 (2004))



Tabla 4
FAMILIA DE RECEPTORES TLR

Receptor	Localización cromosomal	Ligando	Origen del ligando	Activación
TLR-1	4p14	Triacil-lipopéptidos	Bacteria y mycobacteria	NF-κB
		Factores solubles	<i>Neisseria meningitidis</i>	
TLR-2	4q32(4q.3-32[8])	Lipoproteínas/lipopéptidos	Varios patógenos	NF-κB
		Peptidoclicano	Bacterias Gram (+)	
		Ácido lipoteicoico	Bacterias Gram (+)	
		Lipoarabinomanano	Mycobacteria	
		Glicoinositolfosfolipidos	<i>Trypanosoma cruzi</i>	
		Glicolipidos	<i>Treponema maltophilum</i>	
		Porinas	<i>Neisseria</i>	
		Lipopolisacárido atípico	<i>Leptospira interrogans</i>	
		Lipopolisacárido atípico	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
		Zyosan	Hongos	
TLR-3	4q35	Hebra doble de RNA	Virus	NF-κB y cinasa NH ₂ terminal de jun
TLR-4	9q32-33	Lipopolisacárido	Bacterias Gram (-)	NF-κB
		Taxol	Plantas	
		Proteína Heat shock 60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	
		Oligosacárido de ácido hialurónico	Huésped	
		Fibrinógeno	Huésped	
TLR-5	1q33.3[9](1q41-42[8])	Flagelina	Bacterias	NF-κB y cinasa NH ₂ terminal de jun
TLR-6	4p	Diacil-lipopéptidos	Mycoplasma	N.D.*
		Ácido lipoteicoico	Bacterias Gram (+)	
		Zyosan	Hongos	
TLR-7		Imidazoquinolina	Compuesto sintético	N.D.*
		Loxoribina	Compuesto sintético	
		Bromopirimina	Compuesto sintético	
		Hebra sencilla de RNA	Virus	
TLR-8		Imidazoquinolina	Compuestos sintéticos	N.D.*
		Hebra sencilla de RNA	Virus	
TLR-9		DNA que contiene CpG	Bacterias y virus	N.D.*
TLR-10		N.D.*		N.D.*
TLR-11		N.D.*		N.D.*

* N.D. No determinado



- **Dominio extracelular**

El dominio extracelular está compuesto de entre 19 y 25 repeticiones de una secuencia de 24 residuos de LRR, que se caracterizan por tener una porción de residuos hidrofóbicos en las regiones extracelular membranal y citoplásmica.

Muchos miembros de la familia de LRR están involucrados en el proceso de embriogénesis y desarrollo, han sido implicados en el desarrollo y mantenimiento de la región neural en humanos. Sin embargo han observado que alteraciones en el patrón de la expresión de LLR conduce al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

- **Dominio intracelular o citoplasmático**

Se ha demostrado que existe una gran homología entre el dominio intracelular de los receptores Toll de *Drosophila* y el receptor de interleucina-1(IL-1R) de mamíferos debido a que se ha observado que las moléculas que participan en las vías de transducción de los receptores Toll son similares a las que utilizan cuando se activa al IL1-R. Estas similitudes se extienden a los sistemas de defensa de aves, mamíferos y plantas cuando se exponen a diferentes patógenos.

El dominio intracelular en la cola citoplasmática tiene una región conservada de aproximadamente 200 aminoácidos, comprende una estructura general de α -hélices y láminas β . Contiene 5 hendiduras paralelas de láminas β , rodeadas por 5 α -hélices conectadas entre sí por loops flexibles. Así como también tiene una región corta de (2-10 residuos), seguida por una α -hélice que une al dominio LRR extracelular al dominio TIR intracelular.

Dentro del dominio TIR, las regiones de homología comprenden tres cajas conservadas que son cruciales para la señalización (Fig.7). En estudios realizados de las estructuras cristalinas de los dominios TIR de TLR1 y TLR2, se ha establecido la dimerización dominio TIR, la cual se produce mediante la interacción entre las regiones del loop BB, una lámina β y una α -hélice, lo cual permite la dimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas adaptadoras¹⁷ (Fig.6).

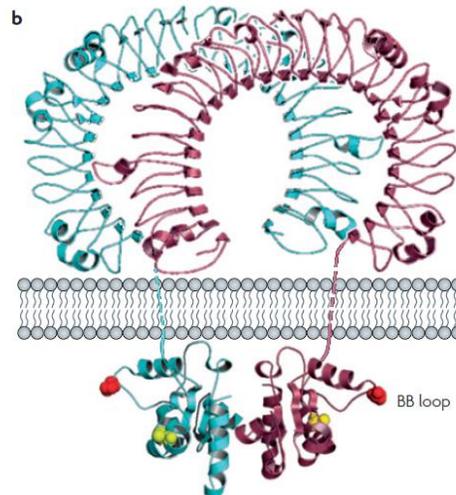


Figura 6. Organización esquemática de los TLRs. Basada en la estructura del receptor TLR-3 y TLR-2 de humanos. El loop BB del dominio TIR, es esencial para las interacciones homotípicas TIR-TIR entre los TLRs y de más moléculas adaptadoras de la señalización intracelular (François Leulier et, al. Nature Reviews Genetics 9:165-178 (2008))

6.3. Unión con el ligando

El papel de TLRs es consistente con el de otras proteínas que contienen LRRs que parecen actuar como andamios moleculares en el reconocimiento de los varios ligandos. La unión del ligando se logra mediante la interacción de los residuos variables en la superficie cóncava del dominio. Sin embargo aún no son claros los detalles moleculares de cómo estos ligandos, que muchos de los cuales son moléculas pequeñas orgánicas que interactúan con el receptor¹⁷.

6.4. Transducción de señales

Como es bien sabido, la IL-1 β es un regulador de las respuestas inflamatoria e inmunológica y tiene efectos en casi todas las células del cuerpo. Se ha descubierto que más de 90 genes están regulados por IL-1 β , incluyendo a genes para citoquinas, receptores de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, componentes de la matriz celular y moléculas reactivas de la fase aguda de infección. Un gran número de investigaciones se han enfocado en la caracterización de la vía de transducción involucrada desde la activación del receptor a IL-1 β hasta la translocación del factor de la transcripción NF- κ B, el cual es muy importante en las respuestas inmunológica e inflamatoria. Se ha



caracterizado el sistema prototípico de IL-1 β R/NF- κ B que consta de múltiples intermediarios que culminan en la translocación de NF- κ B al núcleo y la subsecuente activación transcripcional de genes efectores.

Después de la unión del ligando con el receptor TLRs/IL-1Rs, se dimeriza y sufre un cambio conformacional, el cual es necesario para el reclutamiento de moléculas cascada abajo, en las que se incluyen la molécula adaptadora de diferenciación mieloide MyD88, la cual recluta a IRAK e IRAK-2 que son dos cinasas de residuos de serina y treonina, estas cinasas posteriormente se asocian y activan a la proteína adaptadora TRAF6, que a su vez se asocia con la proteína cinasa NIK. NIK activa el complejo cinasa de I- κ B (IKK- α y β), permitiendo la fosforilación y la degradación de I κ B y la liberación y translocación de NF- κ B¹⁸.

Factor 88 de diferenciación mieloide, (MYD88): se aisló originalmente como un gen que es inducido rápidamente durante la estimulación con IL-6, y su diferenciación de M1 células mieloleucémicas en macrófagos. Posteriormente MyD88 se clonó como una molécula adaptadora. La proteína tiene dos dominios, un dominio con un grupo amino (N)-terminal letal (DD) y otro dominio carboxi-(C)-terminal TIR. Su función es reclutar a IRAK al complejo IL-1R después de la estimulación con IL-1. La asociación entre MyD88 e IRAK está mediada a través de la interacción DD-DD. MyD88 forma homodímeros a través de las interacciones de DD-DD y dominio TIR-dominio TIR¹⁹.

IRAK: La familia de IRAK consta de cuatro miembros: IRAK1, IRAK2, IRAK4 e IRAK-M que muestran distintos patrones de expresión de genes y han sido identificados en mamíferos. La familia de IRAKs contienen un dominio N-terminal y un dominio central con actividad de serina / treonina cinasa. IRAK1 e IRAK4 tienen actividad de cinasa, mientras que IRAK2 e IRAK-M no tienen actividad cinasa. Después de la estimulación de TLR/IL-1R aumenta la actividad de la cinasa IRAK1 su dominio cinasa es esencial para la señalización a través del factor nuclear- κ B (NF- κ B). Sin embargo, la actividad quinasa en sí, no es esencial para la señalización, ya que en las células deficientes de IRAK1, la sobreexpresión de cinasas mutantes en células deficientes de IRAK1 puede inducir la activación de NF- κ B.



Se ha demostrado que IRAK1 es un sustrato directo de IRAK4, pero no viceversa. En estudios realizados en ratones deficientes de la expresión de IRAK1, la producción de citocinas en respuesta a la estimulación con IL-1 y lipolisacárido (LPS) se observó disminuida, mientras que ratones deficientes de IRAK4 no mostraron respuesta a la IL-1, LPS y otros componentes bacterianos, demostrando así que IRAK4 tiene un papel importante en la señalización de IL-1R/TLR. IRAK se autofosforila para la formación del complejo y de esta manera se asocia con TRAF6²⁰.

Factor 6 asociado al receptor para TNF (TRAF6): Los miembros de TRAF constituyen una familia de proteínas adaptadoras evolutivamente conservadas. Hasta el momento, seis miembros de la familia TRAF, se han identificado en mamíferos, y se caracterizan por la presencia de un dominio N-terminal enrollado (conocido como TRAF-N) y un dominio C-terminal (conocido como TRAF C)²¹. La porción N-terminal de la mayoría de proteínas TRAF contienen un anillo y una región de dedos de zinc que es esencial para los eventos de señalización cascada abajo, mientras que la porción TRAF-C media la interacción con los receptores cascada arriba y proteínas de señalización. TRAF6 funciona como un mediador de señalización tanto para la superfamilia del receptor-TNF y la superfamilia TLR/IL-1R, interactúa directamente con los miembros de la superfamilia del receptor-TNF y está acoplado indirectamente a miembros de TLR/IL-1R a través de su asociación con IRAKs. La secuencia consenso para el dominio de unión a TRAF6 fue identificado como PXEXX-(D/E/F/W/Y). Este motivo se encuentra en CD40 y los IRAKs; tres de estos motivos de unión TRAF6, se encuentran en IRAK1, dos en IRAK2 y uno en IRAK-M^{22,23}.

La activación del factor de transcripción NF- κ B y la proteína activadora (AP1), involucra a TAK1 y dos proteínas adaptadoras TAB1 y TAB2. TAK1 es un miembro de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), que se ha demostrado que son esenciales para la activación de NF- κ B. Se han identificado dos proteínas de unión a TAK1, TAB1 y TAB2. Cuando se co-expresa TAB1 aumenta la actividad cinasa de TAK1, lo que sugirió que TAB1 funciona como un



activador de la TAK1. TAB2 funciona como un adaptador que une a TAK1 y TRAF6, facilitando así la activación de TAK1²⁴.

Factor de transcripción kappa B (NF- κ B): La familia de los factores de transcripción NF- κ B, está integrada por cinco miembros p65 (REL-A), Rel-B, c-Rel p50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2), que se encuentran en las células formando homodímeros ó heterodímeros. Todas las proteínas de la familia de los miembros de NF- κ B se caracterizan por la presencia de una región de 300 aminoácidos, comparten un dominio de homología Rel en su extremo N-terminal. Una subfamilia de proteínas NF- κ B, incluidas RelA, RelB y c-Rel, tienen un dominio de transactivación en su extremo C-terminal. En contraste, las proteínas NF- κ B1 y NF- κ B2 son sintetizadas como precursores, p105 y p100, que tras madurar dan lugar a las subunidades de NF- κ B, p50 y p52 respectivamente. La maduración de p105 y p100 está mediada por la vía ubiquitina/proteosoma e implica la degradación selectiva del C-terminal de la región que contiene repeticiones de anquirina. Mientras que la formación de p52 a partir de p100 es un proceso altamente regulado, la proteína p50 se forma a través de un proceso constitutivo de la p105.

Los dímeros de NF- κ B generalmente son secuestrados en el citoplasma en una forma inactiva por moléculas del inhibidor de la familia de NF- κ B (I κ B). Los cuales son proteínas que contienen un dominio N-terminal regulador, seguido por seis o más repeticiones de anquirina y un dominio PEST cerca de su C-terminal. Las proteínas I κ B enmascaran la secuencia de localización nuclear (NLS) de las proteínas NF- κ B y las mantienen secuestradas en un estado de inactivación en el citoplasma^{25,26}.

La familia de las proteínas I κ B consiste en I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , y Bcl-3, la principal y más estudiada I κ B es la I κ B α . Debido a la presencia de repeticiones de anquirina en las mitades C-terminales, p105 y p100 también funcionan como proteínas I κ B. La mitad C-terminal de p100, que a menudo es conocida como I κ B δ , también funciona como inhibidor. La degradación de I κ B δ en respuesta a estímulos de desarrollo, tales como aquellos transducidos a través de LT β R, potencia la activación del dímero NF- κ B a través de una vía NIK dependiente no canónica.



La activación de NF- κ B implica la fosforilación y proteólisis de la proteína I κ B. Este proceso de activación está mediado por (IKK), la cual comprende dos subunidades catalíticas IKK- α e IKK- β (también conocidas como IKK1e IKK2) y una subunidad reguladora, IKK- γ (también conocida como modulador esencial NF- κ B, NEMO)

Después de la activación cascada arriba, IKK fosforila a los I κ Bs, conduciendo a su poliubiquitinación y a la degradación mediada por el proteosoma. Con la degradación de I κ B, el complejo NF- κ B es libre para entrar al núcleo dónde puede activar la expresión de los genes específicos que tienen cerca sitios de unión de ADN para NF κ B. La activación de estos genes por NF- κ B entonces induce una respuesta fisiológica, como por ejemplo, una respuesta inflamatoria o inmune, una respuesta de supervivencia celular, o una proliferación celular

Una vía alterna para la activación de NF- κ B sugiere que la cinasa (NIK) activa a IKK- α que después fosforila a NF- κ B2 precursor de la proteína p100. Después de la fosforilación, p100 es reconocida por una SCF (S-phase kinase-associated protein 1–Cullin1–F box) de la familia de la ligasa de ubiquitina E3. β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein), que cataliza la poliubiquitinación de p100 y por lo tanto provoca su procesamiento por el proteasoma a la forma transcripcionalmente activa p52. Este evento proteolítico está estrechamente regulado por secuencias situadas en la región C-terminal de p100^{25,26}.

7. RECEPTOR TLR-3

La inmunidad innata antiviral depende de varios sistemas sensores que reconocen PAMPs de virus y por lo tanto la activación de vías de señalización específicas, como las que conducen a la activación de factores de transcripción como NF- κ B y el factor regulador de interferón 3 (IRF3). Como anteriormente he mencionado, NF- κ B media la producción de citocinas proinflamatorias y de proteínas antiapoptóticas, mientras que IRF3 regula la expresión del interferon beta (IFN- β), el cual activa varios genes incluyendo 2' - 5' oligoadenilato sintetasa, proteína cinasa R, Mx GTPasa y P56, que contribuyen a un efecto antiviral a través de la inhibición de la síntesis de proteínas y la replicación viral²⁷.

7.1. Estructura del TLR-3

El TLR-3 también conocido como CD283, es un receptor transmembranal de tipo I de 904 aminoácidos. El receptor TLR-3 constituye una forma de herradura, compuesto de un dominio extracelular que contiene 23 repeticiones ricas en Leucina (LRRs), y una cola citoplásmica que contiene el dominio conservado TIR. Tiene un diámetro interior de aproximadamente 42 Å, un diámetro exterior de 90 Å, y un grosor de 35 Å,

Al igual que todas las estructuras de LRR, las cadenas laterales consenso de leucina en la estructura del TLR-3 se encuentran orientadas hacia el interior de la molécula formando un núcleo hidrófobo, por otra parte los ocho primeros residuos de cada motivo LRR contribuyen a que se extienda una hebra β , paralela a una lámina β , las cuales forman la superficie cóncava al interior de la molécula (Fig.7).

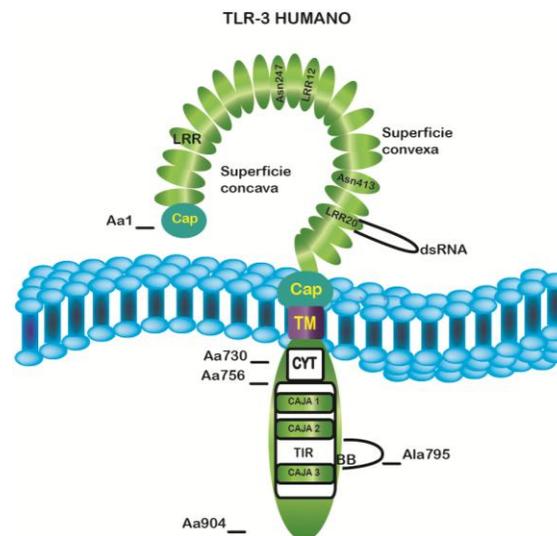


Figura 7. Recetor TLR-3 humano. El dominio extracelular TLR3 es un solenoide en forma de herradura. Las LRR están en el extremo N-terminal y las regiones C-terminales, flanqueado por un dominio rico en cisteína Cap. La superficie cóncava es rica en N-glicosilaciones. Aquí se representan dos estructuras de N-glucano sobre Asn247 y Asn413, dos residuos que están implicados en la glicosilación. LRR12 y LRR20 son motivos atípicos LRR que contienen grandes inserciones que sobresalen del solenoide. De acuerdo con el modelo de montaje simétrico, la unión del ligando se produce en la superficie libre de glicano que implica LRR20. El dominio de transmembrana (TM) se compone de una sola α -Hélice. El dominio citoplásmico comprende el elazador región citoplásmica (CYT) (ácido amino [AA] 730 a Aa756) y el dominio TIR, de la que el adaptador de unión sobresale de bucle BB. Ala795 es un residuo conservado que reside en la parte superior del bucle de BB y está implicado en la unión de TRIF. Las tres cajas conservadas que definen el dominio TIR. (Elisabeth Vercammen et, al. *Clinical Microbiology Reviews* 21:13–25 (2008))

El motivo LRR-NT del TLR-3 contiene un asa en forma de horquilla, el cual es estabilizado por un puente disulfuro. El motivo LRR-CT, es más grande que el motivo LRR-NT, es globular en su estructura contiene una α -hélice interna y dos puentes disulfuro, que se ha demostrado que son necesarios para la función del TLR-3. La mayoría de las estructuras LRR no son planas debido a la torsión de las láminas β que forman las superficies cóncavas, sin embargo la forma de herradura del TLR-3 es presumiblemente plana debido a irregularidades en los asas que conectan a las láminas- β , los LRR 8, 12, 14, 18 y 20 compensan la torsión de las láminas- β , estas irregularidades también son producidas por α -hélices cortas en el lado convexo de la herradura y dos asas largos que sobresalen de las caras laterales y convexas de los LRR 12 y 20 (Fig.8). Esta estructura plana del TLR-3 facilita la unión con el ligando y la señalización.

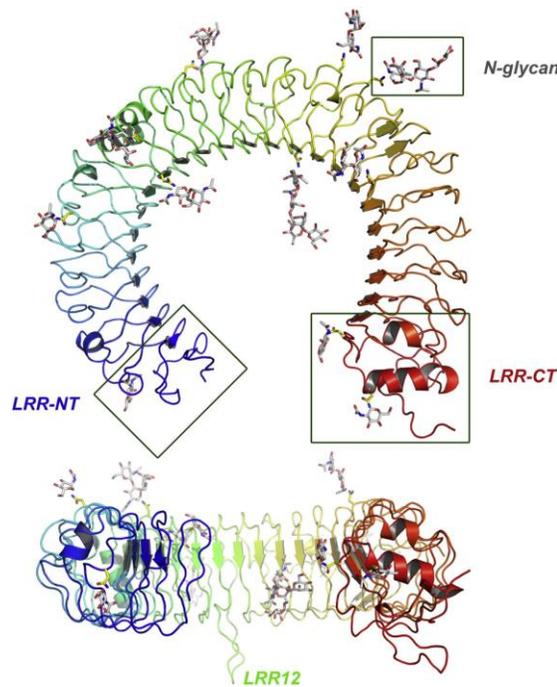


Figura 8. Estructura del TLR3. Consiste en 23 repeticiones ricas en leucina. (Istvan Botos et, al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1789 667–674 (2009))

Por otra parte, la estructura del TLR3 está altamente glicosilada, se han previsto 15 sitios de N-glicosilación, de los cuales 11 son visibles en la estructura cristalina. En células de insecto el receptor TLR3 tiene un peso de 95 kDa, el glicano contribuye con 15 kDa del peso total. En células de mamíferos el peso es aún



mayor debido a que existen N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), grupos amino N-enlazados a las fracciones de los glicanos. Los carbohidratos están distribuidos en la parte cóncava, convexa, y en una superficie lateral (del lado N-terminal de la lámina β) del TLR-3. La superficie contraria lateral carece completamente de glicosilaciones, lo que permite que exista una gran área superficial para la interacción con otras moléculas ya que la presencia de glicano en la superficie cóncava de TLR3 bloquea la interacción de ligando con esta superficie²⁸.

En el extremo citoplásmico el dominio TIR, se compone de una cadena de cinco láminas- β y rodeada por cinco α -hélices. Estos elementos de la estructura secundaria están conectados por (asas), de los cuales el asa BB (conecta la lámina β B con la α -hélice B), lo que permite la interacción con las moléculas adaptadoras. Este asa, se encuentra en todos los TLRs, cuenta con un residuo conservado de prolina, a excepción del receptor TLR-3, en donde la prolina se sustituye con una alanina, la cual se ha demostrado que es importante para la interacción con la proteína adaptadora TRIF. El TLR-3, es el único TLR que interactúa directamente con TRIF, mientras que los otros TLRs interactúan con la proteína adaptadora MyD88²⁷.

7.2. Localización del TLR-3

El TLR3 en humanos se ha encontrado en la placenta, páncreas, pulmón, hígado, corazón y cerebro. También se expresa en células dentríticas y células epiteliales intestinales, pero no ha encontrado en monocitos, leucocitos polimorfonucleares, células T, B y NK, lo que sugiere un papel fisiológico en la inmunidad innata

Se ha localizado en la superficie celular o en compartimentos endosomales y su localización depende del tipo celular. En fibroblastos humanos (por ejemplo, en la línea celular MRC-5) se ha demostrado con anticuerpos anti-TLR-3 que se inhibe la interacción del TLR-3 con la hebra doble de RNA (dsRNA), que en fibroblastos induce la expresión INF- β , sugiriendo que el TLR-3 se expresa en la superficie celular para detectar la infección viral. En otros tipos celulares como células

dentríticas, macrófagos y células HEK293 transfectadas con TLR-3 la infección viral se detecta predominantemente en los compartimentos intracelulares²⁹.

En la región citoplásmatica del TLR-3 se han identificado dos residuos Arg740 y Val741 que son cruciales para la expresión intracelular del receptor. Se ha descrito que después de eliminar estos residuos de unión se interfiere con la orientación normal intracelular y provoca la expresión del TLR-3 en la superficie celular.

7.3. Ligando del TLR-3

La hebra doble de RNA (dsRNA), es un PAMP que es reconocido por el Receptor Toll-3 (TLR-3) y varios sensores citosólicos, tales como la proteína cinasa R, 2' - 5' oligoadenilato sintetasa y recientemente la RNA helicasa RIG-I (inducible por el gen I del ácido retinoico) y MDA5 (diferenciación de melanoma asociado al gen 5) (Fig.9)

Durante la replicación viral se produce una hebra doble de RNA (dsRNA), ya sea como un producto intermedio del ciclo de replicación o como parte del genoma viral. El ácido policitídílico poliinosínico Poly (I:C) es un análogo sintético estable de dsRNA, comúnmente utilizado como ligando de TLR-3 para imitar la infección viral. Así mismo poly (I:C) puede producir efectos tóxicos como choque, falla renal, coagulopatías y reacciones de hipersensibilidad.

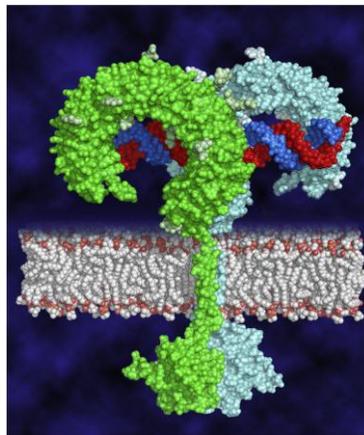


Figura 9. Interacción TLR-3 – dsRNA. Estudios realizados en TLR-3 purificado y oligonucleótidos de dsRNA han permitido comprender detalladamente la interacción del TLR-3 con su ligando. Las interacciones entre el TLR-3 y la dsRNA son hidrofílicas que implican puentes de hidrógeno. La unión del TLR-3 a dsRNA, se ha demostrado que es saturable, reversible y se produce por debajo de un pH 6.5, debido a que las cadenas laterales de imidazol de residuos de histidina se pueden protonar y por lo tanto formar interacciones iónicas con los grupos fosfato del RNA. (Istvan Botos et, al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1789 667–674 (2009))

La estructura cristalográfica del TLR-3, muestra que la dsRNA interactúa con los glicanos libres de dos TLR-3 formando un complejo simétrico (Fig.10a), visto de manera lateral los dos TLR-3 semejan a la letra “m” y la dsRNA cruza todo el nacho de la “m” (Fig.10b). En los extremos los C-terminales de los dos TLR-3 interactúan con otras moléculas homotípicas para formar el dímero (Fig.10c.)

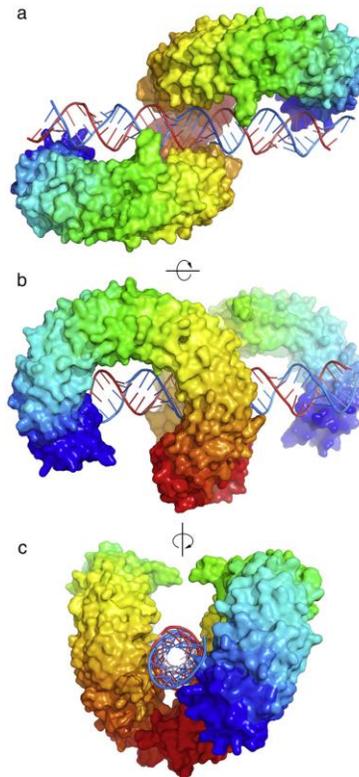


Figura. 10. Estructura de la TLR3-dsRNA complejo de señalización. (a-c) 3 puntos de vista del dímero. (a-b) Unión TLR3-dsRNA. La cara glicano libre de cada TLR3 interactúa con el dsRNA. Hay dos sitios de unión para cada molécula de TLR3: C-terminales y N-terminal. (c) mirando hacia el eje de la dsRNA muestra que dsRNA es línea. La región N-terminal es de color púrpura, y el C-terminal, rojo. (Istvan Botos et, al. Biochimica et Biophysica Acta 1789 667–674 (2009))

En el complejo ambos TLR-3 interactúan con la dsRNA en dos sitios separados por aproximadamente 55 Å, cada uno en la superficie lateral del glicano libre. Estos sitios interactúan con la ribosa-fosfato de la dsRNA

El primer sitio de unión está situado en el extremo del C-terminal del TLR-3 e incluye los residuos LRR19 y LRR20. El segundo sitio de unión se encuentra en el N-terminal e incluye los residuos LRR-NT, LRR1, LRR2 y LRR3 y también los glicanos libres en la superficie.



Los estudios cristalográficos también han sugerido la incapacidad del TLR-3 para interactuar con una dsDNA. En primer lugar han sugerido que la dsDNA y dsRNA asumen diferentes estructuras helicoidales (formas B y A, respectivamente) y que es poco probable que la hélice de DNA B, sea compatible con el N y C-terminales de sitios de unión en la herradura TLR-3, y en segundo lugar, hay un número significativo de enlaces de hidrógeno que pueden unirse al TLR3 en 2'-hidroxilo de dsRNA, que están ausentes en el DNA.

7.4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN

TRIF es una proteína adaptadora crucial para activar la vía de señalización del TLR-3 mediada por la dsRNA. El dominio TIR del TLR-3 se une con la proteína adaptadora TRIF, lo que indirectamente activa varios factores de transcripción incluyendo NF- κ B, IRF3, y la proteína activadora 1 (AP-1), que conducen a la producción de INF- β , de citosinas/quimosinas y a la producción y maduración de DC³⁰.

7.4.1. Activación de IRF3

La fosforilación de dos residuos de tirosina (Tyr759 y Tyr858) en el dominio TIR de TLR3, son esenciales para inducir la señalización por dsRNA. El fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) es reclutado por estos residuos y es necesario para fosforilar y activar a IRF3, así como también se asocia la tirosincinasa c-Src en el endosoma en respuesta a la dsRNA. Estudios realizados en células deficientes de la cinasa Scr han permitido determinar su papel crucial en la activación de la vía de señalización del TLR-3, ya en estas células deficientes de Src la activación de IRF3 se ha observado disminuida²⁹.

TRIF induce la activación de IRF3, a través de dos cinasas, I κ B cinasa ϵ (IKK ϵ) (también conocido como Ikki, donde "i" significa "inducible") y TANK-binding cinasa 1 (TBK1) (también conocida como T2K o cinasa de activación de NF- κ B [NAK]), que fosforilan a IRF3, el cual forma un dímero que se trasloca al núcleo para inducir la expresión de INF- β . Sin embargo, ahora se cree que el TRIF también está asociado con la proteína adaptadora NAK proteína 1 fosfatidilinositol-



3-cinasa Estudios realizados con RNA de interferencia demostraron que NAP1 es una subunidad del complejo TBK1/IKK ϵ que participa en la activación de IRF3 por TRIF, ya que cuando NAP1 no se expresa, no hay activación de IRF3, ni producción de INF- β en respuesta a Poly (I:C). Así como también está asociada a esta activación la proteína TRAF3.

7.4.2. Activación de NF- κ B

Poly (I:C) induce la activación de NF- κ B, pero no la de IRF3. La activación de NF- κ B se lleva a cabo por dos vías distintas una mediada por el receptor de interacción con la proteína 1 (RIP1) y la otra mediada por TRAF6.

RIP1 es un mediador esencial de la vía de TRIF para la activación de NF- κ B, la interacción de RIP1 con TRIF esta mediada a través de la interacción del motivo homotípico (RHIM), presente en ambas proteínas. En TRIF se encuentra en el C-terminal, mientras que en RIP1 se encuentra en el dominio intermedio.

TRAF6 es reclutado por el dominio N-terminal de TRIF junto con RIP1, seguido por una poliubiquitinación (Ub) de RIP1. De manera similar a lo que ocurre en la vía del receptor TNF, RIP1-Ub recluta al factor de crecimiento transformante cinasa β (TAK), a la proteína de unión-2 (TAB2) y a TAK1. TAK1 fosforila a IKK α e IKK β , que a su vez fosforilan al inhibidor de NF- κ B, I κ B, que conduce a su degradación y la translocación de NF- κ B al núcleo

TAK1 también activa a las proteínas cinasas activadas por mtógenos c-Jun, p38 y ERK, lo que lleva a la fosforilación y activación de otros factores de transcripción como AP-11²⁷.

7.5. Mutaciones en el TLR-3

Estudios de mutación han permitido identificar la interacción del TLR-3 con la dsRNA, encontrando tres residuos de aminoácidos en el TLR-3 en regiones del sitio de unión que son esenciales para su función. Antes de la estructura cristalina el complejo TLR3-dsRNA se estudió con dos mutaciones de pérdida de función, H539E y N541A, que se encuentran una región de unión a LRR20 en la superficie libre de glicano del TLR3. Ahora se sabe que estos aminoácidos se encuentran en



el C-terminal en el sitio unión al ligando de TLR3, y que la cadena lateral amida de Asn-541 probablemente interactúa con un 2' hidroxilo de la dsRNA. La eliminación del grupo amida por mutación a alanina bloquea interacción TLR3-dsRNA, lo que indica que esta interacción es necesaria para la formación y activación del complejo TLR3-dsRNA. La cadena lateral imidazol de His-539 interactúa con un grupo fosfato de la dsRNA, pero esta interacción no es necesaria para la formación del complejo ya que la mutación a alanina no afecta significativamente la actividad del complejo TLR3-dsRNA. Sin embargo, la pérdida de actividad en la mutación H539E indica que las fuerzas repulsivas de la carga negativa del ácido glutámico desestabiliza el complejo y confirma que la cadena en la que se encuentra la His-539 está en estrecha proximidad a un grupo fosfato. La mutación de otros residuos que hacen contacto la dsRNA en esta región, incluyendo Arg-544, Asn-515 y Asn -517, tienen menos efectos pronunciados sobre la actividad, lo que sugiere que contribuyen menos a la energía estabilizadora del complejo como lo hace Asn-541 (Fig.11).

En el sitio de unión N-terminal, tres fosfatos consecutivos de la dsRNA, forman puentes con los grupos imidazol de His-39, His-60 e His-108, que solo son residuos de aminoácidos conservados en este sitio. La sustitución de His-39 e His-60 por Ala (o Glu), elimina la actividad del TLR3, lo que indica que los grupos imidazol de estos residuos son esenciales para la función. Así como también es probable que estos residuos sean responsables de la dependencia de pH. La His-108 y otros dos residuos que interactúan con la dsRNA, Gln-62 y Arg-64, no retienen la actividad cuando se mutan por Ala, y por lo tanto no son esenciales para la unión. se requiere para la unión.

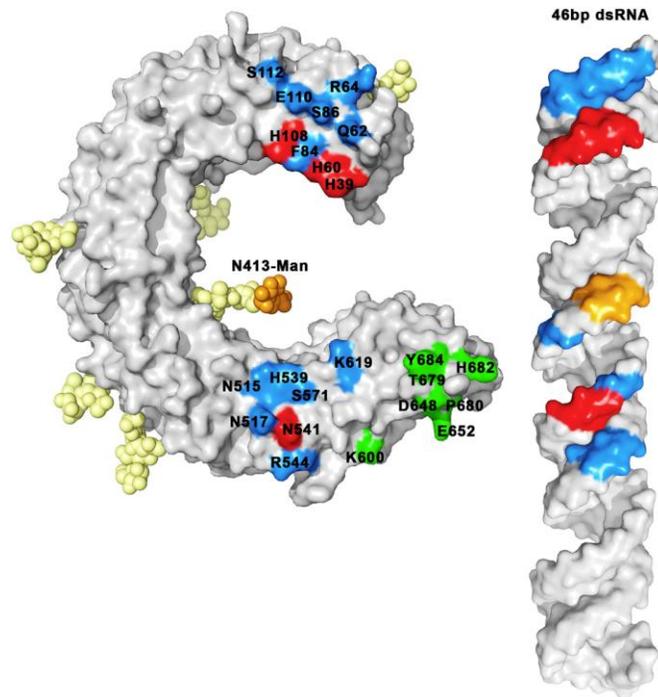


Figura 11. Residuos implicados en la unión. Los residuos de alanina (rojo), conducen a la pérdida de función cuando están mutados. Los residuos no esenciales (azul) que interactúan con la dsRNA en la estructura cristalina. El ligando de los carbohidratos destaca en (naranja). En verde algunos residuos en el rango de 600 a 684, los cuales están involucrados en las interacciones homotípicas proteína-proteína en los TLR3. El sitio del ligando N-terminal está formado por residuos de 39-112 y el sitio C-terminal va de los residuos 515-619. (Istvan Botos et, al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1789 667–674 (2009))

7.6. Relevancia clínica

A medida que la comprensión de la inmunidad innata y la biología de los receptores TLR, se ha desarrollado, se tiene un gran interés en aplicar este conocimiento a los problemas clínicos. Entre las aplicaciones más ampliamente exploradas está el desarrollo de adyuvantes para vacunas³¹ contra virus como el virus de la hepatitis y el virus del papiloma

Así mismo, el ligando de TLR3 poly (I:C) se ha demostrado que es beneficioso como adyuvante de la mucosa en la vacuna contra el virus de la influenza en un modelo murino³². En esos estudios, la administración conjunta de antígeno y poly (I:C) se demostró que aumentaba la expresión de TLR3 e IFN α/β . Otros estudios preclínicos sugieren que los agonistas de los TLRs también tienen el potencial para desarrollar terapias contra el cáncer³³.



Agonistas para TLR3 (así como para TLR7, TLR8 y TLR9) han demostrado ser tratamientos prometedores contra infecciones virales. El compuesto homólogo de poly (I:C), el poly (I:C12U) es una hélice de dsRNA, en el cual se sustituye la citosina por uridina, tiene una vida media rápida en comparación con poly (I:C), lo que permitió su desarrollo como fármaco clínicamente útil (Ampligen). A diferencia de poly (I:C), poly (I:C12U) es reconocido específicamente por TLR3 pero no MDA5, lo que podría explicar su menor toxicidad y el uso seguro en ensayos clínicos en los que se ha demostrado efecto anti-viral, el virus de la inmunodeficiencia humana. Poly (I:C12U) se ha demostrado que tienen también diversos grados de actividad antiviral contra el virus de la hepatitis B.

La activación sostenida de TLR3 está asociada con la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias y puede resultar en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Además, la expresión excesiva de TLR3 está asociada con varias enfermedades inflamatorias, tales como la inflamación asociada a miopatías, nefritis lúpica, virus del Nilo Occidental el cual produce la inflamación del SNC, y enfermedad hepática autoinmune.

El desarrollo de antagonistas para TLR3 también podría ser muy prometedor para una serie de enfermedades infecciosas e inflamatorias.

El desarrollo de antagonistas para TLR3 implica la localización de las enzimas que modulan la activación de IRF3 o NF- κ B. Por otra parte, los conocimientos obtenidos de proteínas y de la interacción proteína-proteína implicadas en la señalización, podría permitir el desarrollo de agentes específicos para interrumpir estas interacciones y de este modo limitar su capacidad de señalización³⁴ y por tanto evitar la síntesis de citocinas inflamatorias involucradas en la enfermedad periodontal, la cual conlleva a la pérdida de la pieza dental.

Es posible que en tejidos periodontales inflamados se liberen histamina, bradicinina, citocinas y componentes bacteriales y que en conjunto regulen respuestas inmunes y procesos inflamatorios. En algunos estudios se ha demostrado que bradicinina puede activar diferentes proteínas citoplasmáticas que están relacionadas con la síntesis de factores proinflamatorios como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la producción de PGE₂ y



TNF- α ³⁵. En otros estudios se ha determinado la relación que tiene la bradicinina con el inicio de la inmunidad innata, ya que experimentalmente en células dendríticas se bloqueo la producción del receptor TLR-2, observando la presencia de infección, sin embargo cuando estas células se estimularon con Bradicinina el reconocimiento de patógenos aumento al mismo tiempo que la expresión del TLR-2³⁶

8. BRADICININA

Diversos factores como lesiones tisulares, reacciones alérgicas, infecciones por virus y otros trastornos inflamatorios activan una serie de reacciones proteolíticas que generan dos péptidos vasoactivos de la clase de las *cininas* a las que se les ha denominado bradicinina (BK) y calidina en los tejidos. Dichos péptidos son autacoides que actúan localmente y producen dolor, vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular y síntesis de prostaglandinas³⁷. De este modo integran un subgrupo de un gran número de mediadores que contribuyen a la respuesta inflamatoria.

La bradicinina es un nonapéptido de bajo peso molecular (1060.21 Da y de fórmula general = C₅₀H₇₃N₁₅O₁₁) (Fig.12). Su concentración en circulación es relativamente baja se encuentra en el rango de 0.27 a 7.1 pM y su vida media es de aproximadamente 15s. Es metabolizada rápidamente por metaloproteasas entre las que se encuentran, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), endopeptidasa neutral (NEP), carboxipeptidasa y aminopeptidasa³⁸.

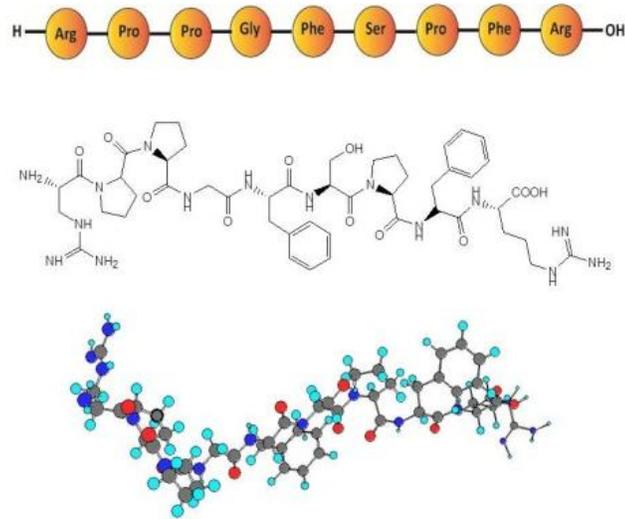


Fig. 12 Estructura desarrollada de bradicinina. Formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos que forman a la bradicinina. Los círculos en color gris representan átomos de carbono, los azul turquesa átomos de hidrógeno, el azul rey átomos de nitrógeno y los rojos átomos de oxígeno. (ChemDraw 7.0)

Ejerce sus efectos biológicos a través de la activación de dos receptores a los que se les ha denominado receptor B1 a bradicinina (BK) BKB1R y receptor B2 a bracinina (BK) BKB2R que están acoplados a proteína G.

Los receptores BKB2R se encuentran expresados de manera constitutiva en diferentes tejidos y reconocen como tal al péptido bradicinina. Tras la unión de bradicinina con el receptor se activan dos efectores, la fosfolipasa C y la fosfolipasa A2³⁹.

Los receptores BKB1R, están ausentes en la mayoría de los tejidos, pero son inducidos en pocas horas en condiciones de respuesta inflamatoria o lesión tisular; las citocinas como la interleucina-1 (IL-1) son las principales responsables de esta inducción. El receptor BKB1R es activado por el metabolito de la bradicinina o la calidina des-Arg¹⁰- calidina o des-Arg⁹ – BK.

Dependiendo del estado fisiológico o fisiopatológico en el que se encuentre, la bradicinina ejercerá diversos efectos biológicos (Fig.13)

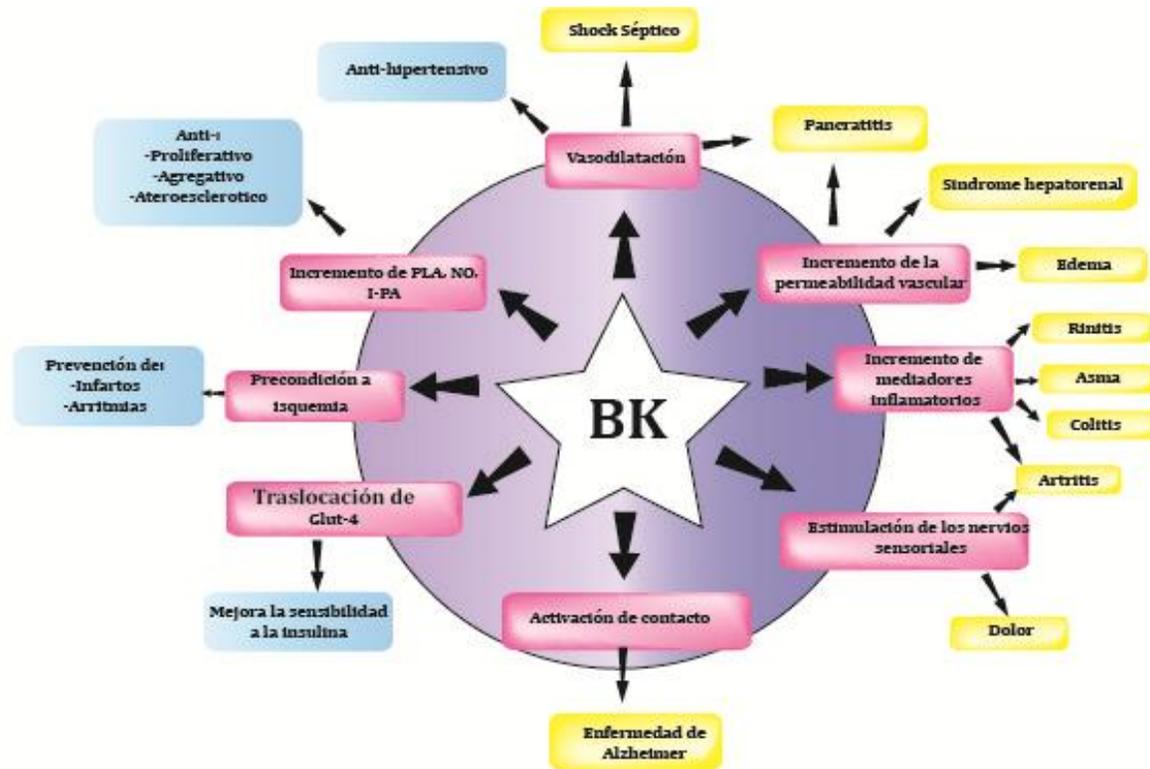


Figura 13. Efectos de la bradicinina en diferentes estados fisiopatológicos. Los recuadros amarillos representan los efectos negativos de bradicinina, mientras que los recuadros azules representan efectos positivos de bradicinina. (Maurer et, al. European journal of allergy and clinical immunology 66: 1397-1406 (2011)).

8.1. Historia del descubrimiento y caracterización de Bradicinina

En el año de 1909 los investigadores Abelous y Bardier, observaron que la orina inyectada por vía intravenosa, inducía la disminución de la presión arterial, lo que condujo a que caracterizaran al compuesto responsable del efecto, identificando de esta forma a las *cininas*. Sin embargo, tuvieron que transcurrir algunos años para que Frey y Kraut en el año de 1926, en ensayos en los que inyectaban orina humana a perros, lograron identificar a la sustancia que causaba la hipotensión, atribuyendo que se trataba de una agente bioactivo, termolábil y no dializable que estaba presente en la orina. Frey y su grupo de investigadores, consideraron que se trataba de una hormona que se encontraba en circulación y la llamaron *kreislaufhoron* que significa “hormona circulante”. Así mismo, el grupo de Frey en el año 1930 encontraron altas concentraciones de este agente hipotensivo en



páncreas y lo llamaron *calicreina*, con base a la raíz griega de dicho órgano *Kallicréas (páncreas)*.

En 1937, los investigadores Werle, Götza y Keppler identificaron que las *calicreínas* generan una sustancia farmacológicamente activa, a partir de algún precursor inactivo presente en el plasma. Y diez años después en 1948, Werle y Berek llamaron a la sustancia activa *calidina* y demostraron que era un péptido separado de una globulina plasmática que llamaron calidinógeno⁴⁰. Rocha e Silva y colaboradores en 1949, señalaron que la tripsina y algunos venenos de serpiente actuaban en la globulina plasmática para producir una sustancia que disminuía la presión arterial y que ocasionaba contracción de aparición lenta en el intestino. Ante esta respuesta lenta, llamaron a tal sustancia *bradicinina*, término proveniente de las raíces griegas *bradys* que significa “lento” y *kinein*, “movimiento”⁴¹. Andrade y Rocha e Silva en 1956, purificaron a la bradicinina pero no fue sino hasta 1960, que Boussonas sintetizó el nonapéptido de bradicinina y determinó la secuencia de aminoácidos⁴¹.

En 1980, Regoli y Berabé describieron la respuesta fisiológica a bradicinina. Ellos propusieron que la respuesta estaba mediada por dos distintos receptores de membrana y los llamaron receptor B₂ a bradicinina (B2R) y receptor B₁ a bradicinina (B1R)⁴².

8.1.1. Clonación y caracterización genética de los receptores a bradicinina (Evidencia de interacción con Proteína G)

Estudios realizados en diversos tipos celulares evidenciaron que los receptores a bradicinina, están acoplados a proteínas G. En año de 1989 Voyno-Yasenetsskaya, con su trabajo en células endoteliales de arteria pulmonar bovina, mostró que la toxina pertussis (PTX) inactivaba a la proteína G, la cual media la activación de la fosfolipasa C por bradicinina. El receptor B2R junto con la PTX mostraron una respuesta de la proteína G debido a que observó un aumento de ácido araquidónico y por lo tanto un aumento en la producción de prostaglandina E₂. El aumento de ácido araquidónico en respuesta a bradicinina se atribuyó a un



incremento en la actividad de la fosfolipasa A₂. Así como también se observó que la PTX no afectaba la movilización de calcio intracelular (Ca²⁺) inducida por bradicinina. Sin embargo, estos autores, observaron que la PTX inhibía el incremento de ácido araquidónico estimulado por bradicinina. Estos resultados indicaron que la transducción de señales activadas por bradicinina para la regulación de PLA₂ y movilidad de Ca²⁺ era probablemente por subunidades diferentes de G α , así pensó que una subunidad era sensible a la PTX y una insensible a esta toxina⁴³

8.1.2. Clonación de genes del receptor BKB2R y BKB1R

Con el conocimiento acerca de que el receptor BKB2R esta acoplado a proteína G, el investigador Mc eachern y su grupo de investigadores, en el año de 1991, clonaron el receptor usando el cDNA de células de útero de rata y en ovocitos de *Xenopus*. Consecuentemente el cDNA y el DNA genómico humano del receptor B2R fueron clonados, cuyos resultados mostraron que el gen para este recetor se encuentra localizado en el cromosoma 14q32⁴⁴.

El receptor BKB1R fue aislado y clonado por primera vez por Menke y su grupo de investigación en el año 1994, en estudios realizados en la línea celular IMR90 proveniente de fibroblastos de pulmón de embrión humano que fueron pretratados con IL-1. La organización genómica y la localización cromosomal con estos estudios localizó al receptor BKB1R en el cromosoma 14q32 entre los marcadores D14S265 Y D14S267⁴⁵.

En ese mismo año el grupo de Ma⁴⁶ mapeó el gen del receptor BKB2R mediante ensayos de hibridación fluorescente *in-situ*. Mediante el ensayo southern blot se mostró que el receptor BKB2R estaba codificado por un gen de copia única y se expresaba en diversos tejidos humanos.

Posteriormente Chai en 1996⁴⁷, mapeó el gen del receptor BKB1R, encontrando una estrecha proximidad entre ambos receptores. Los resultados de las secuencias de estos genes les permitieron confirmar su localización.

Con los resultados de ambos grupos de investigación determinaron para el receptor BKB2R una estructura de tres exones con la región codificante entre los exones dos y tres. Para el receptor BKB1R también determinaron una estructura de tres exones, con la región codificante en el tercer exón, mientras que los exones uno y dos no son codificantes (Fig.14).

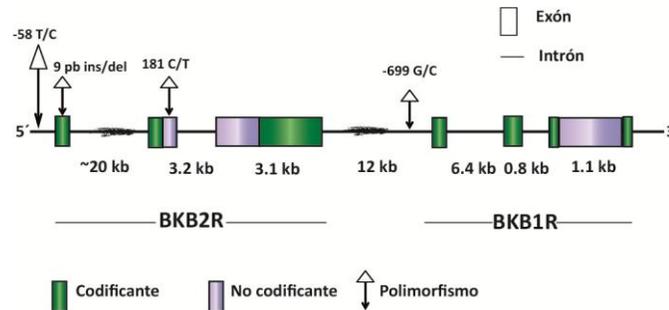


Fig. 14. Organización genómica del gen de los receptores BKB2R y BKB1R en el cromosoma 14q32. Se encuentra ilustrada la ubicación de exones, intrones y polimorfismo. Del lado izquierdo se muestra la estructura del receptor BKB2R, en donde el exón 1 y una porción del exón 2 (cajas verdes) representan la región 5' no codificante. En contraste la mayor parte traducida del receptor BKB1R es localizada en el exón 3 (caja gris), mientras que el exón 1 y 2 (caja verde) contiene la región 5' no codificante. Se indica la longitud de los intrones entre los receptores. (Prado et, al. Journal of cellular physiology 193:275–286 (2002))

Los estudios de clonación de genética para los receptores BKB2R y BKB1R, permitieron definir que existe una homología en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 80 % en diferentes especies y también determinar que el receptor BKB1R presenta una alta afinidad por el metabolito des-ARG¹⁰calidina o des-Arg⁹BK. Así como ha permitido que se lleven a cabo investigaciones acerca de polimorfismos dentro de estos genes e ir determinando la implicación fisiológica que estos tienen. Los polimorfismos dentro del gen del receptor BKB2R, han proporcionado una visión de la asociación genética del gen con la hipertensión. Mukae y su grupo de investigación⁴⁸ en el año de 1999 mediante un estudio llevado a cabo en la población japonesa les permitió identificar un polimorfismo en -58 T/C en el núcleo del promotor, 58 pares de bases cascada arriba del sitio de inicio de la transcripción y el cual está implicado en el desarrollo de hipertensión



en la poblaci3n japonesa. As3 mismo, Wang y colaboradores el a3o 2000⁴⁹, examinaron esta variante gen3tica en la poblaci3n china determinando que tambi3n era un factor para el desarrollo de la hipertensi3n en esta poblaci3n. Lo que permiti3 determinar que el alelo -58C es un factor de riesgo independiente para la hipertensi3n en varios grupos 3tnicos incluyendo los japoneses, chinos y afroamericanos.

En 1995 Brown y su grupo de investigaci3n determinaron que el ex3n 1 del gen del receptor BKB2R tiene tres alelos 2G, 3G y 3T, los alelos 2G y 3G consisten en dos o tres repeticiones de las unidades (GGTGGGGAC) respectivamente. El alelo 3T consiste en tres repeticiones de transversi3n de G a T (GGTGGTGAC), que ocurre en la segunda unidad de repetic3n. Con estos datos sugirieron que existen diferencias en las frecuencias al3licas del alelo 2G en diferentes grupos 3tnicos, cauc3sicos y afroamericanos. El alelo 2G parece tener un mayor nivel de expresi3n y siempre est3 presente en la mayor3a de los casos sintom3ticos deficientes del inhibidor C1, el cual es un inhibidor end3geno de la calicre3na plasm3tica.

En 1998 Bachvarov y su grupo de investigaci3n determinaron un polimorfismo de un solo nucle3tido G-C en la regi3n promotora 699 pb r3o arriba del sitio de inicio de la transcripci3n del gen del receptor BKB1R. Sus estudios mostraron que cuando exist3a una baja frecuencia del alelo C, se produc3a un efecto protector en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal e insuficiencia renal terminal⁵⁰.

En 1999 Zychma y su grupo de investigaci3n encontraron un polimorfismo de un solo nucle3tido C-T en el ex3n 2 del gen del receptor BKB2R, el cual determina la sustituci3n de Arg-Cys en el dominio extracelular del N-terminal. Con estos estudios determinaron que cuando el alelo T est3 presente la potencia de (BK) aumenta jugando un papel muy importante como protector en la etapa terminal de la insuficiencia renal⁵¹.

8.2. Sistema Calicre3na-cinina

La estructura y formaci3n de bradicinina y calidina son originadas por enzimas sobre sustratos de las calicre3nas denominados cinin3genos, que son prote3nas



multidominio. Los cininógenos se encuentran en circulación y son sintetizados principalmente en el hígado. El cininógeno de alto peso molecular (HK;88-120 kDa) y el cininógeno de bajo peso molecular (LK;50-60 kDa), se forman por splicing alternativo de un solo gen que se localiza en el cromosoma 3 la diferencia de tamaño entre ambos cininógenos es de aproximadamente 3.5 contra 1.7 kb.

El cininogeno de alto peso molecular (HK;88-120 kDa) contiene 626 residuos de aminoácidos; y está formado por 6 dominios. El domino 5 forma la cadena ligera, mientras que el domino 3 sirve para enlazar las proteína gC1qR a la membrana endotelial y citoqueratina 1. La secuencia bradicínica interna de nueve residuos de aminoácidos se une con la secuencia de la “cadena pesada” de la terminación amino (362 aminoácidos), y la secuencia de “cadena ligera” de la terminación carboxil (255 aminoácidos).

El cininógeno de bajo peso molecular (LK;50-60 kDa) es idéntico a la forma de mayor tamaño de la proteína, desde la terminación amino hasta la secuencia bradicínica⁵².

Las calicreínas son un grupo de serina-proteasas, existen dos tipos de calicreínas la calicreína plasmática (88 kDa) que se encuentra en circulación de forma inactiva, y la calicrína tisular (29 kDa), que parece localizarse en particular en las membranas apicales de las células y participa en el transporte transcelular de electrolitos. La calicreína tisular se encuentra en diversos tejidos como glándulas sudoríparas y salivales, páncreas, próstata, intestino y riñones. La calicreína tisular actúa sobre el cininógeno de alto peso molecular para formar bradicininina y sobre el cininógeno de bajo peso molecular para formar lisil-bradicininina.

La calicreína plasmática que se encuentra en circulación de forma inactiva se denomina (*precalicrína*) se convierte en su forma activa al ser desdoblada y activada por el Factor XII (Factor Hageman) que inicia la cascada intrínseca de la coagulación. El propio factor XII es activado por el contacto con superficies con carga negativa como las de la colágena, las membranas basales, los lipopolisacáridos de las bacterias Gram (-). El contacto con las superficies cargadas negativamente favorece la interacción de la precalicreína y el Factor Hageman, lo que conduce a la generación de cinina, separándose la bradicininina

de las moléculas de cininógeno de alto peso molecular por acción de la enzima, que actúa en 2 puntos para liberar el nonapéptido. La calicreína también puede activar al sistema del complemento y convertir el plasminógeno en plasmina⁵³. (Fig.15)

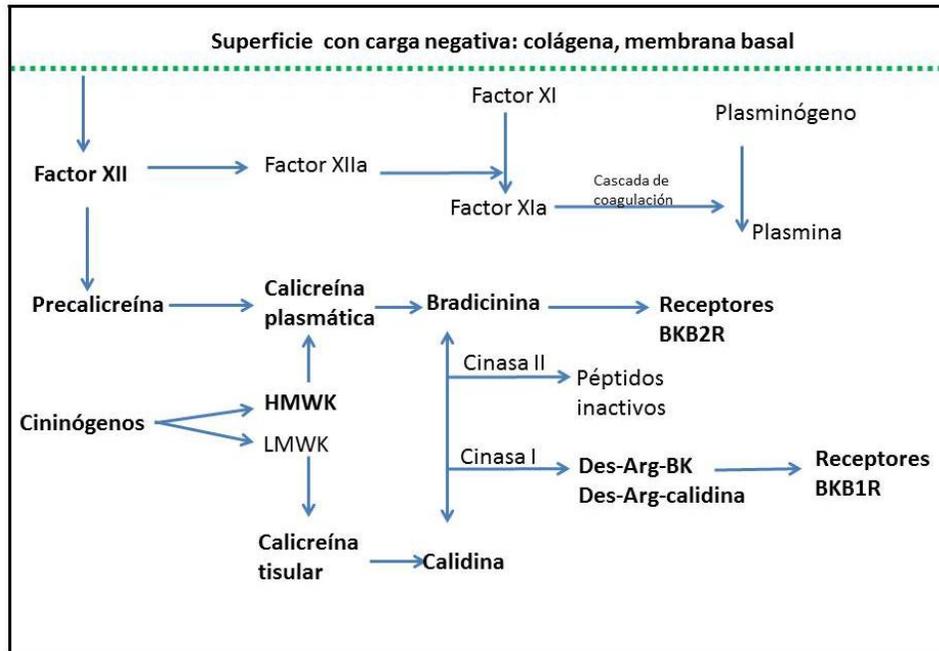


Figura. 15. Esquema de la producción y catabolismo de las cininas a partir de los cininógenos de alto peso molecular (HMWK) y de bajo peso molecular (LMWK). Cuando acontece un proceso inflamatorio el factor XII, la precalicreína y los cininógenos salen de los vasos. El factor XII es activado por contacto con la superficie cargada negativamente, lo que favorece la conversión de precalicreína en calicreína sobre la que actúa el cininógeno (HMWK), para dar lugar a la formación del agonista para los receptores BKB2R Bradicinina . El cininógeno de (LMWK) actúa sobre la calicreína tisular para generar el otro agonista de los receptores BKB2R calidina. Mediante la cinasa I ambos agonistas Bradicinina y Calidina son descarboxilados para dar lugar a la formación de los agonistas de los receptores BKB1R Des-Arg-BK y Des-Arg-Calidina

8.3. Mecanismos de Señalización intracelular.

Ambos receptores BKB1R y BKB2R presentan siete dominios transmembranales, estructura típica de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Su secuencia de aminoácidos es homóloga en aproximadamente 36 %. El receptor BKB2R esta formado por 359 aminoácidos y tiene un peso molecular de 41 kDa, mientras que el receptor BKB1R tiene 353 aminoácidos.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen una gran familia de receptores sobre la superficie celular, con más de mil miembros, aproximadamente el 2% (entre 800) de los genes presentes en el genoma de

mamíferos codifican para estos tipos de receptores. Estos receptores celulares median respuestas a su interacción con diversas moléculas de señalización como lo son los neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas, péptidos vasoactivos, aromatizantes, saborizantes, glucoproteínas y otros mediadores locales.

La mayoría de los receptores de esta clase tienen una estructura similar, la cual consiste en una cadena polipeptídica simple con siete segmentos α -hélice transmembranales que tienen una estructura tridimensional común (TM I-VII), estos dominios están unidos entre sí por asas polipeptídicas tres intracelulares (i1-i3), el asa larga compuesta básicamente de aminoácidos hidrofílicos entre las hélices 5 y 6 (asa i3) que es el sitio de interacción o acoplamiento a proteína G, y tres asas extracelulares (e1-e3) una cuarta asa citoplasmática puede formarse cuando el segmento C-terminal se une a la membrana por atracción lipídica a la cadena de aminoácidos (palmitoilación), un segmento N-terminal glucosilado extracelular, el segmento C-terminal a nivel citoplasmático⁵⁴ (Figura 16).

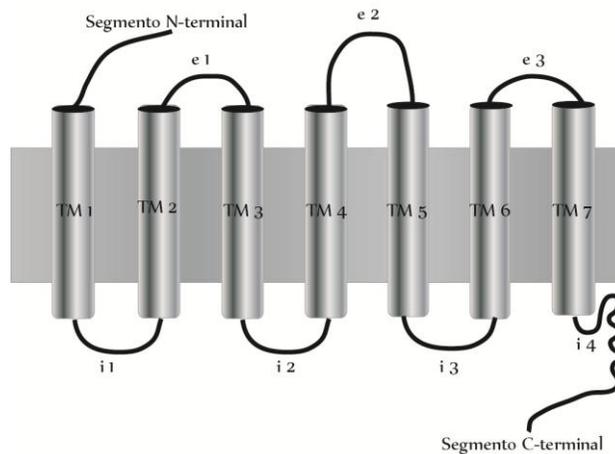


Fig. 16. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G. Consta de siete dominios transmembranales (TM), asas internas (i), asas externas (e) y segmentos terminales.

www.cucs.udg.mx/fisiologia/files/File/...LAB.../Lab_CF_Boletin_1.pdf

8.3.1 Vía de transducción de señales del receptor BKB2R

La BK es el principal agonista endógeno del receptor BKB2R, el cual se expresa de manera constitutiva en diversos tipos celulares, incluyendo las células endoteliales. Se ha determinado que su interacción es con la subunidad Gq/11 de proteínas G, sin embargo también ha mostrado interacción con la subunidad G α i,



en diversos tipos celulares como células endoteliales de aorta bovina y células HEK293.

La unión de bradicinina a su receptor activa a la proteína acopladora Gq, cuya subunidad α anclada a la membrana en complejo guanosin trifosfato (GTP) y se difunde lateralmente a lo largo de la membrana plasmática para activar la enzima fosfolipasa C (PLC) unida a la membrana. La PLC activada cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) en su enlace glicerol- fosfato, lo que origina inositol-1,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol. IP₃ estimula la liberación de Ca²⁺, atrapado en el retículo endoplasmático, que a su vez activa a la proteína cinasa C (PKC) y otros procesos celulares incluyendo la generación de óxido Nítrico (NO)^{55,56}.

Otro efector de la unión de bradicinina con el receptor BKB2R es la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) que libera ácido araquidónico, dando lugar a la formación de prostaglandinas vasodilatadoras como PGI₂. Se piensa que el NO y PGI₂ son importantes vasodilatadores del endotelio debido al papel que desempeñan en la hiperpolarización⁵⁶. El incremento de ácido araquidónico por bradicinina, puede generar mediante el citocromo P-450 la conversión del ácido epoxi-eicosatrienoico en epoxigenasas del endotelio vascular, las cuales actúan como hiperpolarizadores del endotelio abriendo los canales de calcio y potasio para relajar el músculo liso^{57,58,59}.

Otros estudios realizados en células HEK293 sugieren que la activación de una de las proteínas activadas por mitógeno (MAPK), la denominada cinasa de respuesta extracelular (ERK), se activa mediante las subunidades G α i y Gq/11. Considerando también que la activación del receptor BKB2R en células del músculo liso generan múltiples vías de segundos mensajeros que convergen para activar a las MAPK. Aunque se ha encontrado que en células de carcinoma y fibroblastos estas vías no son activadas^{58,60,61}.

Después de la unión de la bradicinina con el receptor BKB2R, este es rápidamente desensibilizado e internalizado y resensibilizado nuevamente a la membrana. La desensibilización puede ser una consecuencia de la endocitosis del receptor o



también resulta de la fosforilación del receptor, lo que impide la activación de proteínas G.

Diversos estudios de intercambio de C-terminal han permitido demostrar que el C-terminal del receptor BKB2R contiene motivos que intervienen en su rápida internalización mientras que el receptor BKB1R no tiene estos motivos por lo que muestra una limitada y lenta internalización. En 1997 Prado y colaboradores, en cultivo de células de rata-1 determinaron que el cluster Serina- Treonina (S/T), ubicado en la porción distal del C-terminal del receptor BKB2R juega un papel importante en la internalización del receptor⁶⁰. Así mismo mediante ensayos en ratas determinaron que la presencia de serina (S348) es crucial para la internalización del receptor⁶². En otros estudios realizados muestran que en humanos el receptor BKB2R se trunca después de las posiciones tirosina (Y320) y leucina (L334) y la sustitución con alanina en la posición S350, T344 y T347 llevaron a disminución de la internalización del receptor. En 1999 Pizard y colaboradores determinaron que la internalización del receptor era debida a la fosforilación⁶³. Mediante análisis de espectrometría de masas se mostró la fosforilación de cuatro serinas y dos treoninas en el C-terminal, los cuales son componentes para la internalización⁶⁴.

8.3.2 Vía de transducción de señales del receptor BKB1R

Los metabolitos des-Arg⁹-Bk y des-Arg¹⁰- calidininina, son los agonista para el receptor BKB1R, el cual no se expresa de manera constitutiva en la células, Sin embargo, es inducido pocas horas después de daño tisular. Su mecanismo de señalización depende de la acción de una carboxipeptidasa en el C-terminal de la arginina en bradicininina o calidina para generar los agonistas de este receptor des-Arg⁹-BK o des-Arg¹⁰-calidina.

La carboxipeptidasa M es ideal para realizar la descarboxilación, debido a que está unida a la membrana. Basados en su estructura cristalina y el potencial electrostático de superficie se determinó que su centro activo puede interactuar con otras proteínas de membrana, así como también se demostró que se heterodimeriza con el receptor BKB1R en la membrana celular⁶⁵. Otros estudios

de co-inmunoprecipitación y transferencia de energía resonante fluorescente muestran una co-localización del receptor BKB1R y la carboxipeptidasa M en microdomios de membrana, lo que permite la interacción del agonista con el receptor y facilita la señalización del receptor BKB1R⁶⁶.

Se ha demostrado que este receptor BKB1R esta acoplado a la subunidad Gαq/11 y Gαi de proteínas G. Una vez activado dicho receptor estimula el incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular por la afluencia de Ca²⁺ extracelular, así como la activación la vía MAPK (ERK). Sin embargo, en otros estudios en células endoteliales de pulmón humano o células transfectadas HEK, se demostró también que la activación de ERK mediada por los receptores BKB1R depende del acoplamiento a las subunidades Gαi y Gβγ y la activación resultante de SRC, Ras, Raf y MEK^{60,61} (Fig. 17).

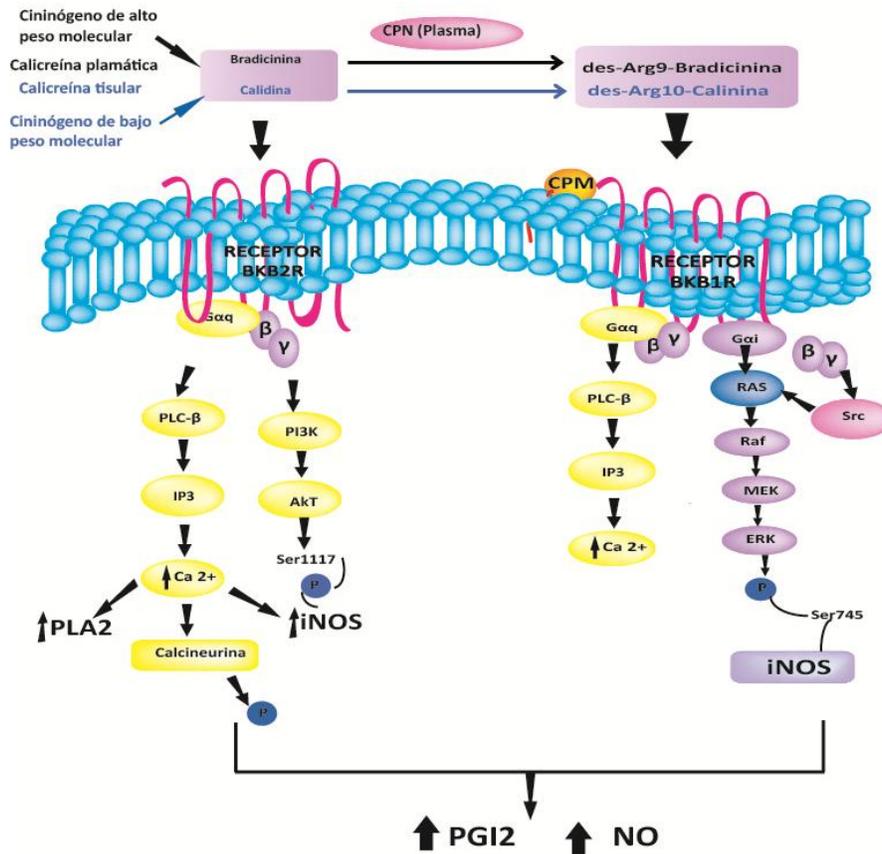


Fig. 17. Vías de transducción de señales de los receptores BKB2R y BKB1R. Las acciones de señalización de BKB1R en respuesta a desArg9-BK o desArg10-Calidina son muy similares a los de BKB2R con respecto a la activación de fosfatidilinositol (PI), incremento PLA₂ y por lo tanto la producción de ácido araquidónico. (F. Kuhr et, al. Neuropeptides. 44:145–154 (2010))



8.4 Regulación de la expresión génica de los receptores a bradicininina a nivel transcripcional y post-transcripcional

Con pocas excepciones celulares, el receptor BKB2R se expresa de manera constitutiva en la superficie celular. Este receptor se presenta el fenómeno de desensibilización, luego del estímulo de bradicininina, el receptor se internaliza y la resensibilización de dicho receptor, es regulada mediante la activación de la maquinaria para la expresión del receptor. A diferencia de la expresión del receptor BKB1R, la cual es a través de genes inducibles. Su expresión es estimulada después de una lesión tisular. Sin embargo se ha encontrado evidencia que sugiere una mínima expresión constitutiva de este receptor. Ricupero et al., (2000) mostró que basalmente se expresa el receptor BKB1R, ya que observó aumento en la síntesis de colágeno en respuesta a des-Arg¹⁰-calinidina. Estas observaciones sugirieron que a veces la transcripción genética incluso baja es suficiente para permitir la función del receptor BKB1R antes de su inducción^{67,68}.

Para la síntesis *de novo* del receptor BKB1R, están involucradas miembros de la familia de las MAPK cinasa como p38 que precede la expresión del receptor BKB1R⁶⁹.

La expresión del gen para el receptor BKB1R está altamente regulada y es un buen modelo de estudio de genes inducibles Este gen es de única copia y abarca más de 10 kb, está formado por tres exones e interrumpidos por dos intrones. Mientras que la región 5' sin traducir se distribuye en los tres exones, la región codificante se encuentra en el tercer exón.

La secuencia de empalme exón-intron es altamente conservada. El análisis de extensión del cebador asigna la iniciación de la transcripción en el sitio 21pb río abajo de la secuencia TATA y río abajo de numerosos motivos de reconocimiento de factores de transcripción^{68,69}. Con los estudios de Yang y Polgar⁶⁹ en 1996, se localizó un elemento regulador positivo entre la posición -604 a -448 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Fig.18). Este elemento regulador positivo contiene un clásico amplificador y un regulador negativo en la posición -682 a -604pb. En la caracterización del amplificador se han encontrado dos motivos esenciales para su actividad, uno de los cuales está vinculada a la de factor de

transcripción AP-1, mientras que la proteína nuclear que se une al otro motivo no ha sido identificada. Ambos factores son reguladores críticos para la activación del amplificador. Las investigaciones realizadas por los grupos de Ni y Schnstra en el año de 1998⁷⁰, reportaron la regulación de genes humanos para el receptor BKB1R por IL-1 β a nivel transcripcional así como su relación con la activación del factor de transcripción NF- κ B. Sin embargo ambos grupos han reportado diferencias en la localización del dominio de NF- κ B. Un estudio identifica a este motivo en la posición -1172 a -1162 pb, mientras que el otro estudio apunta a la posición -67 a -57 pb⁷¹.

Se ha demostrado también que la regulación de la expresión de genes para el receptor BKB1R es a través de la estabilización del RNAm. La región corta 3' no traducida (3'UTR) del receptor BKB1R contiene 14 bases con una señal de poliadenilación (AUUAAA), que se superpone con el codón de término.

Estudios realizados mediante un constructo acoplado a luciferasa del gen del receptor BKB1R (3'UTR) observaron que este muestra una vida media de ~1 h, más corta que la vida media de ~6 h del constructo silvestre. Con estos datos se confirmó que la región (3'UTR) participa en la regulación de la estabilidad de RNAm del receptor BKB1R y en su máxima expresión^{72,73,74}.

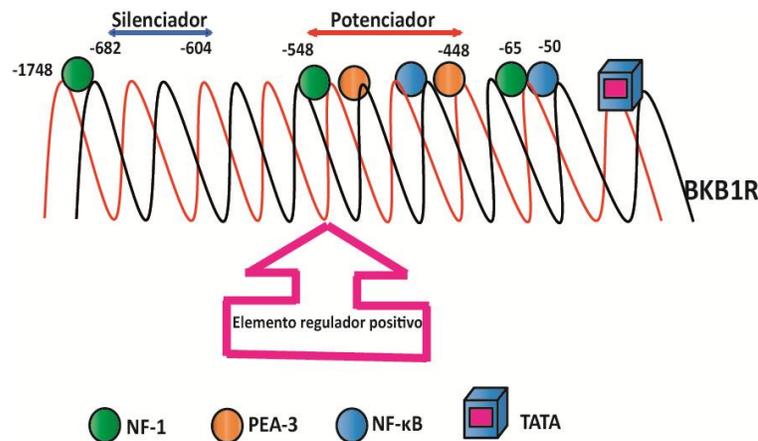


Fig.18. Representación del promotor BKB1R del gen humano con sus supuestos sitios de unión a factores nucleares. Los óvalos de diversos colores representan los sitios reportados de los elementos cis dado que incluye NF-1-como, PEA-3, AP-1 y NF- κ B. La caja TATA consenso se indica mediante una caja. El potenciador y las regiones silenciador se indican mediante flechas. Un elemento regulador positivo (PRE) se encuentra en posición 604 a 448 aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción.



BKB2R. Los factores nucleares implicados en la regulación de la expresión de genes del receptor BKB2R son desconocidos. Estudios realizados en rata mostraron la falta de la secuencia TATA, pero se identificaron factores de transcripción como AP-1, NF-B, SP-1 y Egr-1⁷⁵. En otros estudios en rata se identificó la región promotora del gen del receptor BKB2R así como el sitio de unión con p53. Identificaron dos sitios de unión de p53.y AP1. p53 es y activado durante lesiones tisulares e inflamación crónica, se ha demostrado también un papel en la regulación de la expresión génica del receptor BKB2R en células de riñón^{75,76}. Sin embargo esta función de p53 sigue siendo poco clara.

8.5 Similitudes y diferencias entre BKB2R y BKB1R

A primera vista las señales generadas por ambos receptores BKB2R y BKB1R, parecen idénticas ya que ambos receptores al activar a las subunidades Gαq y Gαi de la proteína G promueven la movilización de Ca²⁺, a través de la fosfolipasa C (PLC). Sin embargo una inspección más cercana revela que la cinética del aumento de la concentración de Ca²⁺ es distinta, lo que sugiere que la señalización intracelular que promueve la movilización de Ca²⁺ es distinta para ambos receptores^{77,78}.

El aumento de la concentración de Ca²⁺, por activación del receptor BKB1R, es en gran parte por el Ca²⁺ extracelular, mientras que el receptor BKB2R utiliza principalmente el calcio intracelular del retículo endoplasmático³⁹. Estos datos sugieren que diferentes vías de señalización son utilizadas por estos dos receptores para dar lugar al aumento de la concentración de Ca²⁺⁷⁹.

Por otra parte el papel esencial de cininas como agentes terapéuticos y protección en las enfermedades cardiovasculares, diabetes y especialmente en la insuficiencia renal necesita más debate con el fin de eliminar el dogma que existe en farmacología, pues se ha atribuido a los receptores BKB2R efectos favorables y los receptores BKB1R efectos negativos⁸⁰. Ya que existen evidencias que demuestran que tanto los receptores BKB1R y BKB2R están implicados en tanto aspectos fisiológicos benéficos como patológicos⁸¹.



8.6 Antagonistas y perspectivas terapéuticas

Existe gran interés en el desarrollo de agonistas y antagonistas para los receptores BKB1R y BKB2R como posibles fármacos para regular procesos como dolor, inflamación, enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades cardiovasculares. Los antagonistas de bradicinina han permitido obtener mayor conocimiento de las acciones de las cininas.

El descubrimiento de los antagonistas para los receptores BKB2R en 1984 revitalizó el estudio de las cininas porque, el sistema de la cininas era todo un misterio debido a la rápida degradación de bradicinina in vivo, en estados fisiológicos y fisiopatológicos.

En 1977 Regoli y su grupo de investigación reportaron el primer antagonista de la cininas, [Leu⁸]des-Arg⁹-bradicinina, el cual fue obtenido por sustitución del residuo de fenilalanina por Leucina en el C-terminal este agonista era específico para el receptor BKB1R. Debido a que los receptores BKB1R no se expresan constitutivamente en los tejidos, el descubrimiento de los de los antagonistas para esto receptores tuvo poco impacto en el campo de la cininas, sin embargo permitió delinear el papel de las cininas en condiciones normales y patológicas⁸².

En 1984 con la investigación de John M. Stewart⁸³ y su grupo de investigación descubren el primer antagonista para los receptores BKB2R, basados en la secuencia de bradicinina ellos sustituyeron el residuo de prolina en la posición siete por un aminoácido aromático surgiendo el antagonista [D-Phe⁷]-BK y el desarrollo de la primera generación de antagonistas.

El antagonista más útil de la primera generación fue el péptido conocido como NPC-349. Este péptido además del residuo de D-fenilalanina en la posición siete, los dos residuos de fenilalanina en las posiciones cinco y ocho fueron sustituidos por tienilalanina. El grupo tienilo tiene un carácter más aromático que el grupo fenilo, y estas sustituciones significativamente aumentaron la afinidad de los antagonistas por el receptor a bradicinina, bloqueando la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).



La adición de D-arginina en último residuo N-terminal aumento considerablemente la vida media *in vivo* de los antagonistas así como bloqueo la acción de la Aminopeptidasa P.

A pesar de estas modificaciones, los antagonistas de primera generación eran todavía sustratos de la carboxipeptidasa M, por lo que Regoli en 1986 mostró que la exposición de estos antagonistas a la carboxipeptidasa M elimina el residuo de arginina en el C-terminal, generando antagonistas para los receptores BKB1R.

Antagonistas de segunda generación:

La segunda generación de antagonistas de bradicinina comenzó con el antagonista Hoechst HOE-140 (Icatibant). Hock⁸⁴ y su grupo de investigación sustituyeron dos aminoácidos no naturales en la estructura de los antagonistas de primera generación: D-tetrahidroisoquinolina-3-ácido carboxílico (TIC), en la posición siete y octahidroindol-2-ácido carboxílico (OCI), en la posición ocho, en comparación con los antagonista de primera generación HOE-140 aumento la vida media *in-vivo*. Muchos estudios biológicos con HOE-140, incluyendo ensayos en humanos demostraron su eficacia de este antagonista para el tratamiento de asma y rinitis alérgica.

Otros investigadores sustituyeron D-cis-4.proxiprolina en la posición siete, encontrando una acción más prolongada, sin embargo poco se reportó del uso de este antagonista. Por otra parte investigadores sintetizaron dímeros de antagonistas de la primera generación por reticulación de péptidos Cys-sustituido con enlazadores de diferentes longitudes. El más ampliamente estudiado es Bradycor. En el que el antagonista de 6-Cys es reticulado por bis-maleimidohexano, se llevaron a cabo amplios estudios con este agonista, incluyendo ensayos para el shock séptico en humanos y traumatismo craneal. Bradycor demostró no se efectivo para el shock séptico, pero fue efectivo para el traumatismo craneal.

La tercera generación de antagonistas vino con la introducción por parte del laboratorio de John Stewart de un nuevo aminoácido α -2-indanilglicina (Igl), el cual fue sustituido en las posiciones 5 (L-isómero) y siete (D-isómero) de la



estructura de HOE-140. El residuo de la Igl en la posición cinco bloqueo la acción de la endopeptidasa neutal (EPN) y encefalinasa.

La cuarta generación de antagonistas de bradicinina vino con la sustitución del residuo en la posición siete por pentafluorofenilalania (f5f), este antagonista mostró una potencia mayor así como un efecto tanto para los receptores BKB1R y BKB2R⁸⁵.

En la búsqueda de antagonista para los receptores a bradicinina se han sintetizado antagonistas no peptídicos, el primer descubrimiento llegó por parte de Pfizer con la sustancia P (SP), desde entonces se han encontrado antagonistas no peptídicos para la angiotensina II, vasopresina, somatostatina y otros. Existen diversas investigaciones acerca de la síntesis de antagonistas no peptídicos para los receptores a bradicinina, sin embargo poco se sabe de estos compuestos.

La perspectiva terapéutica para el desarrollo de antagonistas para los receptores a bradicinina esta enfocada a el tratamiento de cáncer, dado que una característica de esta enfermedad es el proceso inflamatorio y como es sabido bradicinina es un mediador primario de la inflamación, aumenta la permeabilidad del tejido, y también es un factor de crecimiento, por lo tanto se piensa que los tumores utilizan bradicinina para su crecimiento y migración. Se ha reportado que los tumores neuroendocrinos como el cáncer de próstata y cáncer de pequeñas células de pulmón estimulan la producción de bradicinina. Así como también se ha encontrado un gran número de receptores a bradicinina en líneas tumorales. Stewart y su grupo de investigación han sintetizado antagonistas a bradicinina, los cuales ha demostrado bloquear la producción de bradicinina por tanto el aumento en la concentración de calcio, pero estos antagonista aun no has sido capaces de inhibir el crecimiento de la células en los tumores. Entre otros antagonistas desarrollados por este grupo de investigación esta la formación de dímeros, los cuáles han mostrado actividad apoptótica en células pequeñas de cáncer de pulmón. Stewart y su grupo de investigación han reportado que este dímero B9870, es selectivamente citotóxico a concentraciones bajas y no daña las células normales, en estudios realizados en ratones.



Se sigue en la búsqueda de potentes antagonistas para los receptores bradicinina, los cuales sean eficaces en el tratamiento de enfermedades como choque séptico, traumatismos grave y condiciones inflamatorias. El descubrimiento de antagonistas a bradicinina que estimulan la apoptosis en los cánceres abre una vía para el desarrollo de fármacos que puedan actuar sinérgicamente con los actuales y así tener un mejor tratamiento para esta enfermedad.



9. Objetivo General

Caracterizar el efecto de la Bradicinina sobre la expresión del receptor tipo Toll 3 en fibroblastos gingivales humanos.

9.1. Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto de Bradicinina sobre la expresión del receptor tipo Toll 3 a nivel traduccional y transcripcional.
- Determinar la vía de señalización involucrada en la expresión del receptor tipo Toll 3 en fibroblastos gingivales humanos.

10. Hipótesis

Si la bradicinina está involucrada en promover respuesta inflamatoria en la encía, entonces participará en la regulación y expresión de las moléculas que provocan la respuesta inflamatoria inicial como son los receptores tipo Toll 3.



11. Materiales y métodos

11.1 Población de estudio

Fibroblastos gingivales humanos (HGF), obtenidos de la clínica de exodoncia de la Facultad de Odontología, siguiendo el consentimiento informado de cada paciente (ISO/BQ-LIFO-RE-059).

11.2 Tamaño de la muestra

1, 000, 000 de células (1×10^6 células).

11.3 Criterios de inclusión

Cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos. Un millón de HGF, los cuales presentaron estructura homogénea, con morfología fusiforme y composición uniformes.

Células sanas que fueron previamente tratadas con antibióticos y antifúngicos para evitar contaminaciones con bacterias y hongos.

Cultivo celular sub-confluyente, medio translúcido.

11.4 Criterios de exclusión

Contaminación de células HGF por levaduras o bacterias.

Medio de cultivo acidificado y turbio.

Escasa o poca cantidad de proteína celular para cuantificación y para poder obtener resultados viables.

11.5 Selección de Variables

Independiente: Tiempo y Dosis.

Dependiente: Densidad óptica.

11.6 Método de Procesamiento de los datos

Programas de Cómputo DigiltDoc, LabsWork y Excel.



11.7 Materiales

11.7.1 Reactivos:

Medio Eagle modificado por Dulbecco (GIFCO BRL), suero fetal bovino (GIFCO BRL), Antibiótico-Antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomycin. Tripsina (Sigma), Acrilamida (Sigma), Bis-acrilamida (Sigma), Trisma (Sigma), Vanadato de sodio (Sigma), Persulfato de amonio, Glicina (Baker), Bradicinina (Sigma) Anticuerpos dirigidos contra TLR-3 y γ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology), oligodeoxinucleótidos (Invitrogen) del receptor TLR-3 sentido codificante (CAACGGTTCCTTCTCCTATCTC), sentido anticodificante (TTGCTTAGTAAATGCTCGCTTC), gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) sentido codificante (GCCAAAAGGGTCATCATCATCTC), sentido anticodificante (GTAGAGGCAGGGATGATGTT), Inhibidores, 2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona (PD98059), (4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol] (SB203580), 1,8-Piranolantrona (SP600125) , [(2*R*)-1-[3,10-dihidroxi-12-[(2*R*)-2-(4-hidroxifenoxi)carboniloxipropil]-2,6,7,11-tetrametoxi-4,9-dioxoperilen-1-il]propan-2-il] benzoato (calfostina C), 1-[6-[[17 β]-3-Metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il]amino]hexil]-1*H*-pirrol-2,5-diona (U73122), 2-(4-Morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona (LY294002), N-[2-[[3-(4-Bromofenil)-2-propenil]amino]etil]-5-isoquinolinasulfonamida (H-89), (1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (Curcumina) (Sigma), Kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology), Marcador de peso molecular (Bio-rad), Membrana de PVDF (Amersham Biosciences)

11.8 Métodos

11.8.1 Cultivo Celular.

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-059) 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 estuvo 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 (In vitrogen) suplementado con penicilina/ estreptomycin/ fungizona (In vitrogen). El tejido gingival se desmenuzó en fragmentos de 1 a 2 mm y se colocó en cajas con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (In vitrogen) suplementado con 2mM L-glutamina (In vitrogen), penicilina / estreptomycin / fungizona (In vitrogen) 100 ug/ml, 100 µg/ml y 1 mg/ml respectivamente y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. El explante se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de 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.

11.8.2 Ensayo de RT-PCR.

El RNA total se aisló de los fibroblastos gingivales humanos usando el método de Chomczynski y Sacchi. El RNA total (1 µg) fue transcrito en forma inversa (RT) usando el equipo One Step RT-PCR (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos para TLR-3, sentido codificante (5'-CAACGGTTCCTTCTCCTATCTC-3') y sentido anticodificante (3'-TTGCTTAGTAAATGCTCGCTTC-5'). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min. La reacción PCR se efectuó por 35 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda sencilla para los productos de cada gene, una banda sencilla de 309 pares de bases para el TLR-3 y 287 pares de bases para GADPH. La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se realizaron tres experimentos por separado de cada tratamiento.



11.8.3 Ensayo de Western-Blot.

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^6 células/pozo) se crecieron en cajas de 6 pozos. Después del estímulo la caja de 6 pozos se puso en un baño de hielo para mantener una temperatura de 4°C , posteriormente el medio se aspiró y se colocó solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio y con ayuda de un gendarme las células fueron desprendidas. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15' y la pastilla se colocó con 20 μl de solución amortiguadora de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio, (todos estos reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co). La muestra fue sonicada por 30 segundos en un baño con hielo. Para el ensayo de Western se utilizaron 50 μg de proteína que se mezclaron 1:1 con solución amortiguadora de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; (todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.), la muestra se cargó en un gel al 7.5% SDS-PAGE y se corrió a 40V por 1 h. Las proteínas celulares fueron transferidas a una membrana de PVDF (Amersham) 1 hr a 0.3 amperes y 5 V. Para verificar que se colocó igual concentración de proteína, las membranas fueron teñidas con Rojo de Ponceau (Sigma Chemicals Co.) y fueron desnudadas para tratar con alguna proteína total. Posteriormente la membrana fue bloqueada con 5 % de leche libre de grasa en buffer salino tris (TBS) pH 7.8 durante 1 hr, posteriormente la membrana fue lavada e incubada con el anticuerpo primario, se utilizaron los siguientes anticuerpos: TLR3 anti-cabra policlonal (3:10000), γ -tubulina (3:10000) (Santa Cruz Biotechnology), Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C y posteriormente fueron lavadas durante 3 ocasiones con TBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario, anti-cabra IgG (3:10000) (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Santa cruz Biotechnology) y la autoradiografía se obtuvo después de la exposición de la película durante 15 min. Los experimentos fueron realizados



en 3 ocasiones por separado. Las muestras fueron capturadas con el sistema DigiDocit y analizadas con el sistema digital Labs-Works

11.8.4 Inmunocitoquímica.

Las células se crecieron en cubreobjetos, posterior al tratamiento, se fijaron por 30 minutos con 2% de formaldehído en PBS y posteriormente se permeabilizaron durante 5 minutos con triton 0.1% en PBS y fueron lavadas 3 ocasiones con PBS. Para la visualización de receptores tipo Toll-3. Las células se incubaron durante 45 min con anti-cabra IgG acoplado a fluoresceína, se utilizó una dilución 1:200 en PBS, así como también de utilizó DAPI para la tinción de núcleo. Las muestras se montaron en resina y se observaron por microscopia confocal

11.9 Secuencia experimental

La secuencia experimental se inició con la comprobación de la expresión génica y proteica de los receptores tipo Toll-3 por ensayos de RT-PCR y Western Blot con dosis respuesta y cursos temporales.

Una vez establecido estos datos se realizaron los ensayos de inmunocitoquímica para determinar la localización de TLR3 y su regulación por BK.

Por último se utilizaron diferentes antagonistas a fin de establecer la cinasa involucrada en la regulación de la expresión del receptor tipo Toll-3.

11.10 Análisis Estadístico.

Los datos se expresaron como la media \pm S.E.M. Las diferencias significativas se determinaron con la prueba T de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$

12 RESULTADOS

Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente del tiempo.

El estímulo de Bradicinina ($1\mu\text{M}$) en el cultivo celular de HGF, promovió la expresión a nivel transcripcional del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente del tiempo. Encontrando la máxima expresión del TLR-3 a un tiempo de 6 horas después del tratamiento con bradicinina ($1\mu\text{M}$).

Con los experimentos realizados definimos que el tiempo óptimo al cual se encuentra la mayor expresión del TLR-3 es de 6 hrs después del estímulo con bradicinina ($1\mu\text{M}$).

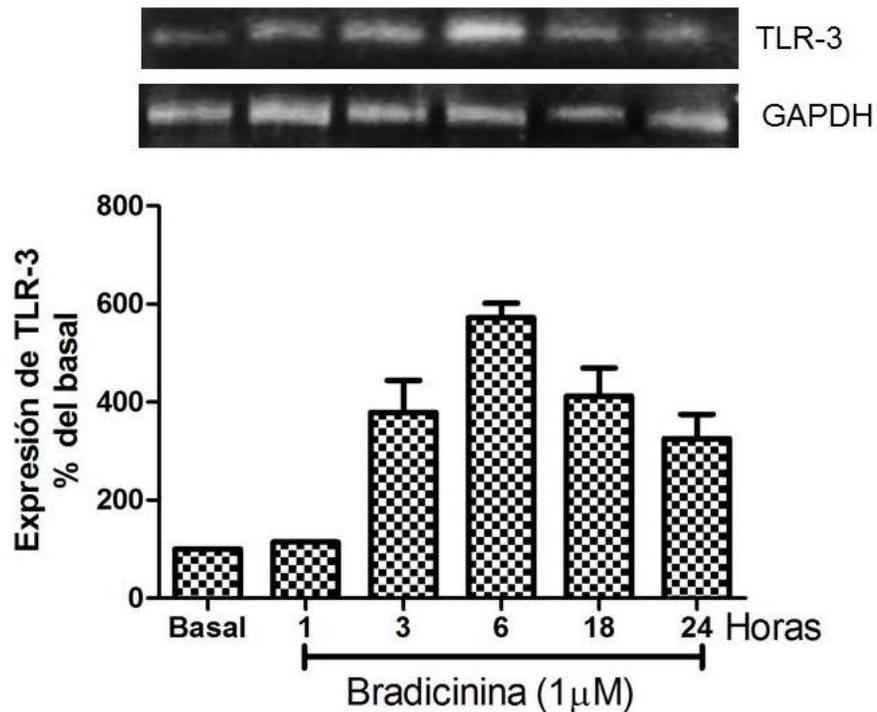


Figura 19. Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente del tiempo en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Los HGF, fueron sembrados e incubados en cajas de 6 pozos con DMEM al 10% SBF, posteriormente fueron ayunados durante 24 hrs con DMEM al 2%. Las monocapas se incubaron con bradicinina ($1\mu\text{M}$) a diferentes tiempos, hasta cumplir el tiempo de 24 hrs. Después de la incubación se extrajo el RNA y se procedió a realizar el ensayo de RT-PCR como se describe en la Materiales y métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado. Las bandas se analizaron con el sistema DigiDocIt y se cuantificaron con el sistema Labs Works, el gráfico representa la media \pm desviación estándar.

Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente del tiempo en Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF).

El estímulo de Bradicinina ($1\mu\text{M}$) en el cultivo celular de HGF, promovió la expresión a nivel traduccional del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente del tiempo. Encontrando la máxima expresión del TLR-3 a un tiempo de 6 horas después del estímulo con bradicinina ($1\mu\text{M}$)

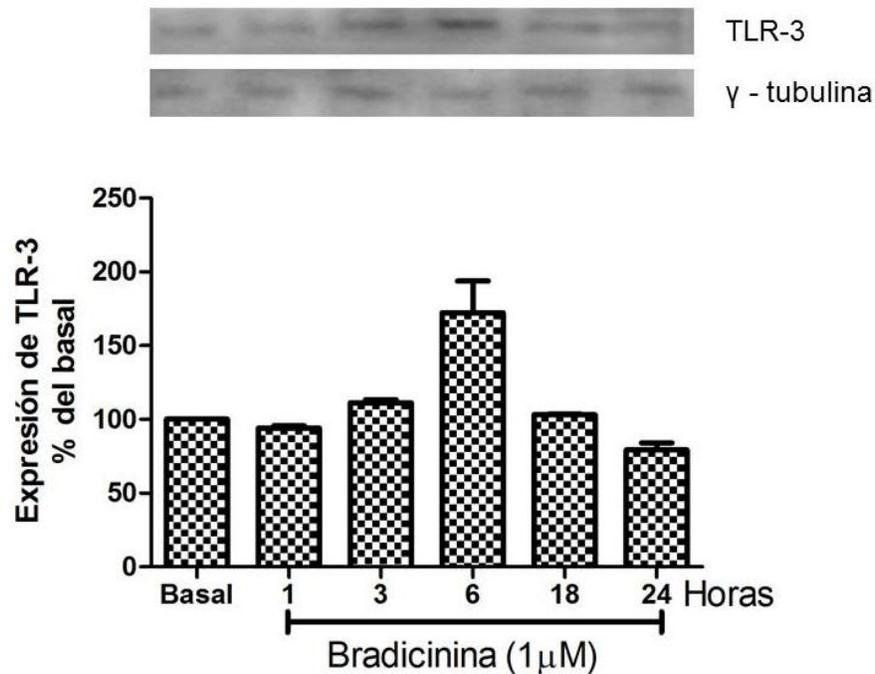


Figura 20. Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente del tiempo en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Los HGF, fueron sembrados e incubados en cajas de 6 pozos con DMEM al 10% SBF, posteriormente fueron ayunados durante 24 hrs con DMEM al 2 %. Las monocapas se incubaron con una dosis de bradicinina ($1\mu\text{M}$) a diferentes tiempos, hasta cumplir el tiempo de 24 hrs. Después del tiempo de incubación se extrajo la proteína total y se procedió a realizar el ensayo de Western blot como se describe en la Materiales y métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado. Las bandas se analizaron con el sistema DigiDocIt y se cuantificaron con el sistema Labs Works, el gráfico representa la media \pm desviación estándar.

Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3, de a nivel transcripcional de manera dependiente de la dosis.

La exposición con bradicinina en el cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos, promovió la expresión a nivel transcripcional del receptor semejante a Toll-3, de manera dependiente de la dosis. La máxima expresión se observó a una dosis de 1 μM de bradicinina.

Con los experimentos realizados definimos la dosis de bradicinina, a la cual se encuentra la mayor expresión del receptor TLR-3

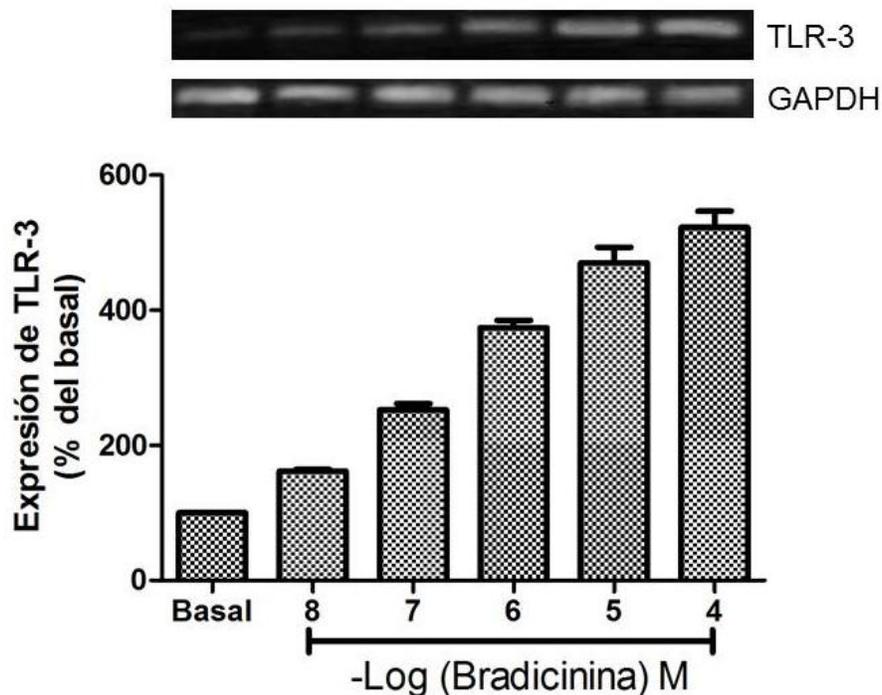


Figura 21. Efecto de la bradicinina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente de la dosis en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Los HGF, fueron sembrados e incubados en cajas de 6 pozos con DMEM al 10% SBF, posteriormente fueron ayunados durante 24 hrs con DMEM al 2 %. Las monocapas se incubaron con diferentes dosis de bradicinina 0.001 -1 μM durante 6 hrs. Después de la incubación se extrajo el RNA y se procedió a realizar el ensayo de RT-PCR como se describe en la Materiales y métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado. Las bandas se analizaron con el sistema DigiDocIt y se cuantificaron con el sistema Labs Works, el gráfico representa la media \pm desviación estándar

Efecto de la bradicininina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3, de manera dependiente de la dosis.

La exposición con bradicininina en el cultivo celular de fibroblastos gingivales humanos, promovió la expresión a nivel traduccional del receptor semejante a Toll-3, de manera dependiente de la dosis. Observándose la máxima expresión a una dosis de 1 μM de bradicininina.

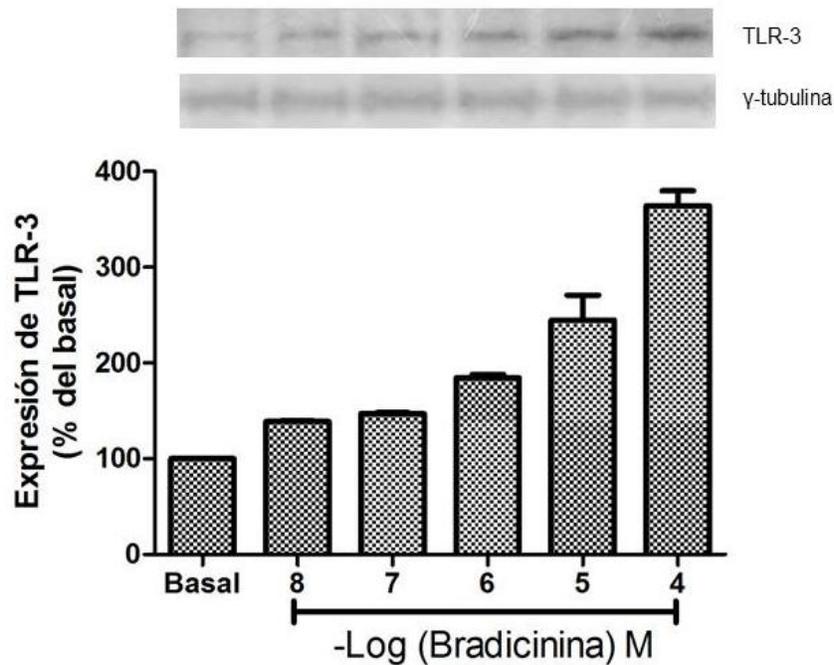


Figura 22. Efecto de la bradicininina sobre la expresión del receptor semejante a Toll-3 de manera dependiente de la dosis en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Los HGF, fueron sembrados e incubados en cajas de 6 pozos con DMEM al 10% SBF, posteriormente fueron ayunados durante 24 hrs con DMEM al 2 %. Las monocapas se incubaron con diferentes dosis de bradicininina 0.001 -1 μM durante 6 hrs. Después de la incubación se extrajo la proteína total y se procedió a realizar el ensayo de Western blot como se describe en la Materiales y métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado. Las bandas se analizaron con el sistema DigiDocIt y se cuantificaron con el sistema Labs Works, el gráfico representa la media \pm desviación estándar.

Fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), Proteína Cinasa A (PKA), Factor nuclear kappa (NF-κB) y Proteína Cinasa C (PKC) regulan a nivel traduccional la expresión del receptor TLR-3, estimulado con bradicinina en fibroblastos gingivales humanos.

Con la finalidad de caracterizar, las cinasas involucradas en la expresión del receptor TLR-3, los fibroblastos gingivales humanos fueron tratados con diversos inhibidores y posteriormente estimulados con bradicinina (1μM). Encontrando que los inhibidores LY294002 (PI3K), H-89 (PKA), curcumina (NF-κB) y calfostin C (PKC), están involucrados en la expresión a nivel transcripcional del receptor TLR-3. Mientras que los inhibidores de Meck, p38 y JNK no están involucrados en la vía de señalización para la expresión del TLR-3.

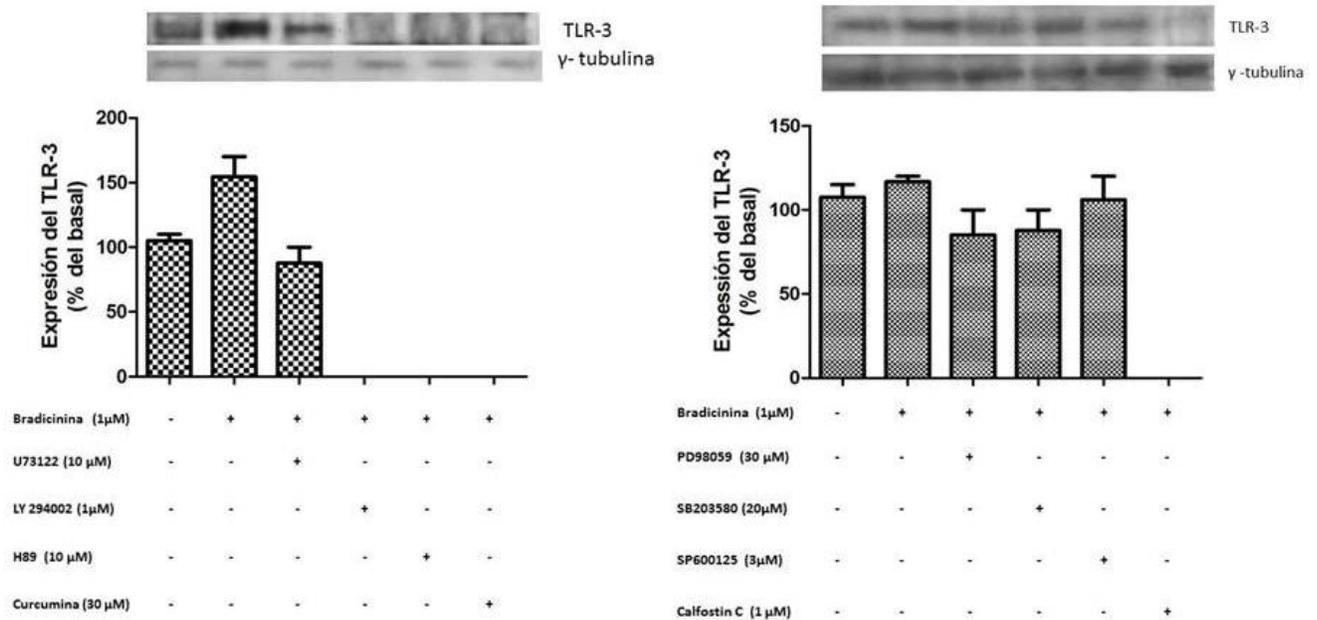


Figura 23. Efecto de los inhibidores sobre la expresión del receptor TLR-3 en fibroblastos gingivales humanos tratados con bradicinina (1μM). Los HGF, fueron sembrados e incubados en cajas de 6 pozos con DMEM al 10% SBF, posteriormente fueron ayunados durante 24 hrs con DMEM al 2 %. Las monocapas se incubaron con los diferentes inhibidores (U73122, LY294002, H-89, Curcumina, PD98059, SB203580, SP600125 y Calfostin C) durante 30 minutos, posteriormente fueron estimulados con bradicinina (1μM) durante 6 hrs. Después de la incubación se extrajo la proteína total y se procedió a realizar el ensayo de Western blot como se describe en la Materiales y métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado. Las bandas se analizaron con el sistema DigiDocIt y se cuantificaron con el sistema Labs Works, el gráfico representa la media ± desviación estándar.

Fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), Proteína Cinasa A (PKA), Factor nuclear kappa (NF- κ B) Y Proteína Cinasa C (PKC) regulan a nivel transcripcional la expresión del receptor TLR-3, estimulado con bradicinina en fibroblastos gingivales humanos.

Con la finalidad de caracterizar, las cinasas involucradas en la expresión del receptor TLR-3, los fibroblastos gingivales humanos fueron tratados con diversos inhibidores y posteriormente estimulados con bradicinina (1 μ M). Encontrando que los inhibidores LY294002 (PI3K), H-89 (PKA), curcumina (NF- κ B) y calfostin C (PKC), están involucrados en la expresión a nivel transcripcional del receptor TLR-3.

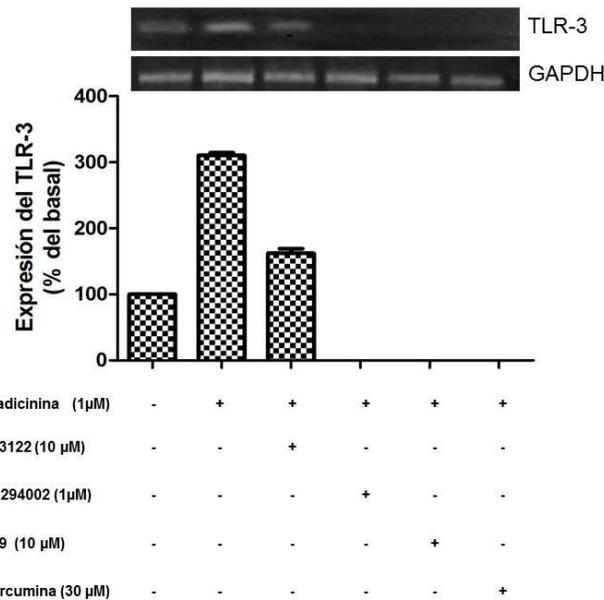


Figura 24. Efecto de los inhibidores sobre la expresión del receptor TLR-3 en fibroblastos gingivales humanos tratados con bradicinina (1 μ M). Los HGF, fueron sembrados e incubados en cajas de 6 pozos con DMEM al 10% SBF, posteriormente fueron ayunados durante 24 hrs con DMEM al 2 %. Las monocapas se incubaron con los diferentes inhibidores (U73122, LY294002, H-89 y Curcumina) durante 30 minutos, posteriormente fueron estimulados con bradicinina (1 μ M) durante 6 hrs. Después de la incubación se extrajo la proteína total y se procedió a realizar el ensayo de ensayo de RT-PCR como se describe en la Materiales y métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado. Las bandas se analizaron con el sistema Digi-DoctI y se cuantificaron con el sistema Labs Works, el gráfico representa la media \pm desviación estándar.



Efecto de la bradicinina (1 μ M) sobre la localización intracelular del receptor TLR-3 en fibroblastos gingivales humanos.

Para determinar la localización del receptor TLR-3 en los HGF, estos fueron estimulados con bradicinina y sus respectivos antagonistas para bradicinina. Nuestros resultados muestran que el receptor se encuentra localizado en citoplasma celular. Así como también nuestros resultados muestran la regulación de la expresión del TLR-3 por BK, ya que al ser estimulados con el antagonista HOE140 para el receptor BKB2RR y el antagonista Lys-(des-Arg9-Leu8)-Bradiginina para el receptor BKB1R, la expresión del TLR-3 disminuye.

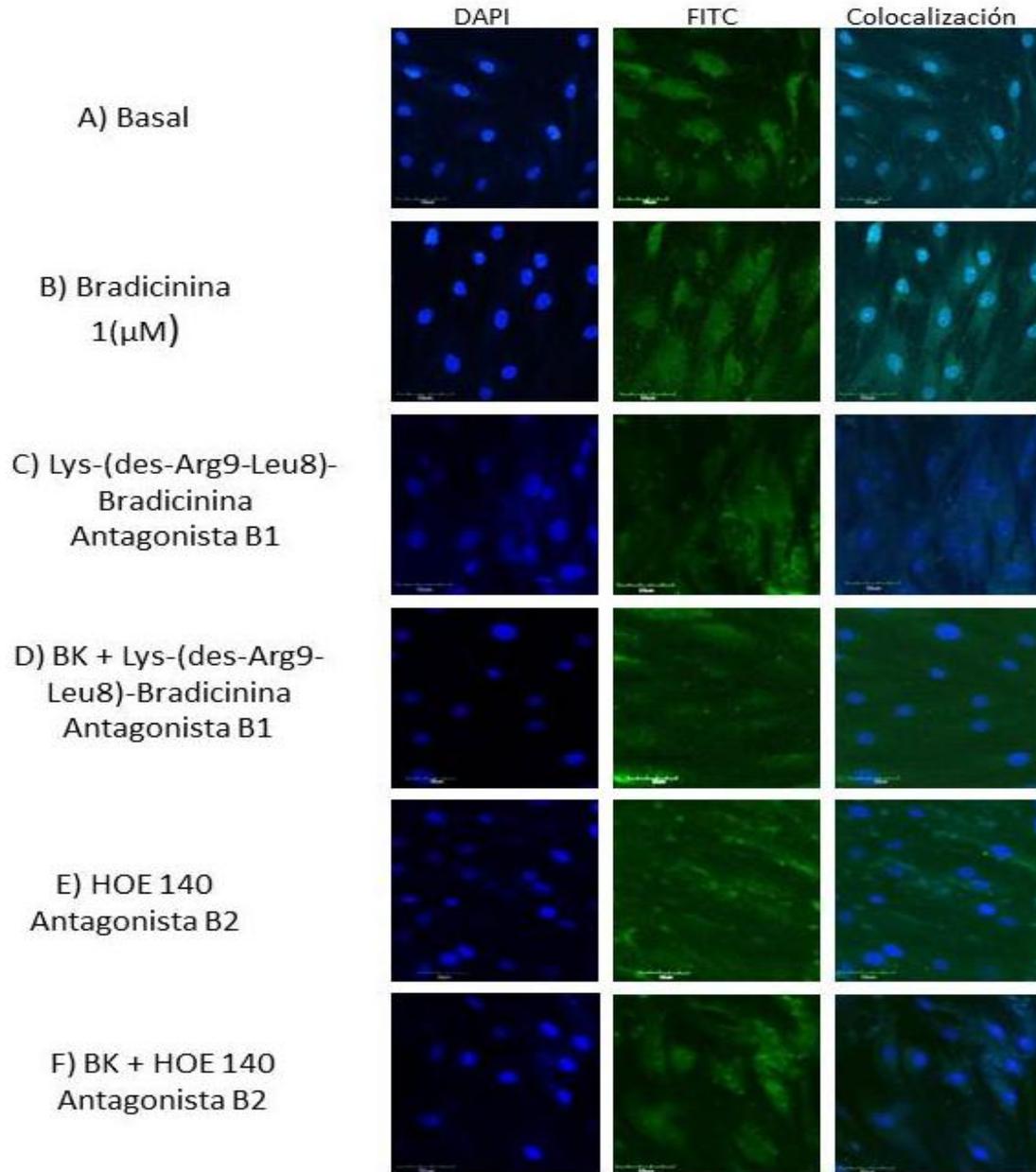


Figura 25. Localización intracelular del receptor TLR-3 en fibroblastos gingivales humanos tratados con bradicinina (1 μ M). Los HGF, fueron sembrados en cubreobjetos. A) Basal B) bradicinina (BK) (1 μ M), C) antagonista para el receptor B1R (Lys-(des-Arg9-Leu8)-Bradicinina), D) BK+ antagonista del receptor B1R (Lys-(des-Arg9-Leu8)-Bradicinina), E) antagonista para el receptor B2R (HOE140), F) BK + antagonista del receptor B2R (HOE140). Posteriormente las células fueron tratadas como se describe en materiales y métodos para el ensayo de inmunocitoquímica. La observación de las células se llevó mediante microscopía confocal.



13 Discusión

En el presente trabajo evaluamos la hipótesis de que si bradicininina está involucrada en promover la respuesta inflamatoria en la encía⁸⁶, entonces participará en la regulación y expresión de moléculas que participan en la respuesta inflamatoria inicial, como el receptor TLR-3.

Los fibroblastos gingivales humanos son células de tejido conectivo predominantes en la encía y el ligamento periodontal. Mediante estudios de PCR el grupo de investigación de Rangsiní⁸⁷ determinó que este tipo de células expresan receptores de reconocimiento a patógenos, entre ellos el TLR-3. Otros reportes^{88,89} indican que este tipo de células expresan receptores a mediadores proinflamatorios.

Existen diversos agentes químicos, biológicos y físicos capaces de desencadenar la respuesta inflamatoria. La enfermedad periodontal, es una afección de naturaleza infecciosa en la que están involucrados los PAMPs de microorganismos presentes en la placa dentobacteriana que contribuyen en la respuesta inflamatoria. Los PAMPs al ser reconocidos por componentes de la inmunidad innata, como los receptores semejantes a Toll promueven la expresión de citocinas promotoras de respuesta inflamatoria lo que conlleva a periodontitis de tipo crónico y generalizada. Diversos estudios clínicos muestran que en algunos pacientes afectados con periodontitis, presentan además de la infección por bacterias, infecciones de tipo viral, que son reconocidos por el TLR-3.

Las enfermedades virales de la mucosa oral y de la región perioral se identifican con frecuencia en la práctica dental, pero sólo han recibido investigación limitada. Los virus son importantes agentes ulcerogénicos y tumorogénicos de la boca humana. El hallazgo de una gran cantidad de genoma viral en las lesiones periodontales sugiere un papel de los virus en más enfermedades orales que no se reconocían anteriormente⁹⁰.

En nuestro estudio realizado en HGF, los resultados muestran que bradicininina regula la expresión del receptor TLR-3 en HGF, tanto de manera dependiente del tiempo como de la concentración, encontrando su máxima expresión a un tiempo de 6 horas y a una concentración de 1µM tanto a nivel transcripcional como



traduccional. Así mismo se ha reportado que bradicinina regula la expresión del TLR-2 y TLR-4 en fibroblastos gingivales humanos, estimulados con PAMPs de microorganismos presentes en la placa dentobacterina como el ácido lipoteicoico (LTA) de *Streptococcus sanguinis* y el lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*. Estos PAMPs, al ser reconocidos por el receptor, desencadenan una serie de señales intracelulares que promueven el aumento de la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) y la expresión de Cicloxigenasa 2 (COX-2) que participan en la respuesta inflamatoria^{91,92}.

Por otra parte nuestros resultados muestran que después de las 6 hrs, la expresión del receptor comienza a disminuir, comprobando que la BK está implicada en la regulación de la expresión del TLR-3, ya que de acuerdo a diversas investigaciones^{62,63}, el receptor BKB2R a BK, es rápidamente desensibilizado e internalizado, lo cual implica una disminución de dicho receptor. Diversos grupos de investigación han propuesto que la desensibilización e internalización del receptor es debido a la fosforilación del receptor lo que impide la activación de proteínas G, así como han demostrado que el C- terminal del receptor BKB2R contiene motivos que intervienen en la internalización del receptor.

En condiciones de proceso inflamatorio como la periodontitis y artritis reumatoide, la actividad de los osteoclastos y fibroblastos puede ser estimulada por diferentes citocinas inflamatorias, tales como la interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y Prostaglandina E₂ lo que conlleva a la reabsorción ósea. Interesantemente, las cininas no solo estimulan la reabsorción ósea, si no también potencian sinérgicamente la reabsorción ósea por efecto de la IL-1⁹³. Se ha demostrado que los receptores a BK están acoplados a proteínas Gq y activan a dos efectores, a saber, a la fosfolipasa C y a la fosfolipasa A2. La activación de la fosfolipasa C involucra la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) que actúa en un receptor canal localizado en el retículo endoplasmático y promueve la liberación de calcio, que junto con el diacilglicerol activan a la proteína cinasa C⁹⁴.



En nuestros resultados mostramos que Fosfoinositol 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), así como el Factor nuclear kappa (NF- κ B) están implicadas en la regulación de la expresión del TLR-3. Otras investigaciones muestran los receptores a BK, tanto en osteoblastos como fibroblastos, promueven la activación de NF- κ B y de la vía de las MAPK, ya que los TLR al ser activados por la unión de su ligando, se dimerizan y sufren un cambio conformacional el cual es necesario para el reclutamiento de moléculas adaptadoras que permiten la traslocación de NF- κ B al núcleo¹⁸, el cual induce diversas respuestas fisiológicas, como por ejemplo la respuesta inflamatoria o inmune, respuesta de supervivencia celular o una proliferación celular.

También, dentro de nuestros resultados, encontramos que el receptor TLR-3 se encuentra localizado en el citoplasma celular, sin embargo otros reportes indican²⁹ que en células dendríticas, macrófagos y células HEK293 transfectadas con TLR-3, el receptor TLR3 es localizado en compartimentos endosomales y su localización depende del tipo celular.

Conclusiones

Nuestra investigación muestra que Bradicinina regula la expresión del TLR-3 en Fibroblastos Gingivales Humanos, mediante la activación de una gama de señales intracelulares en la que están involucradas las cinasas PI3K, PKA, PKC, así como el factor de transcripción NF- κ B, el cual induce la producción de citocinas proinflamatorias que están involucradas en la enfermedad periodontal.

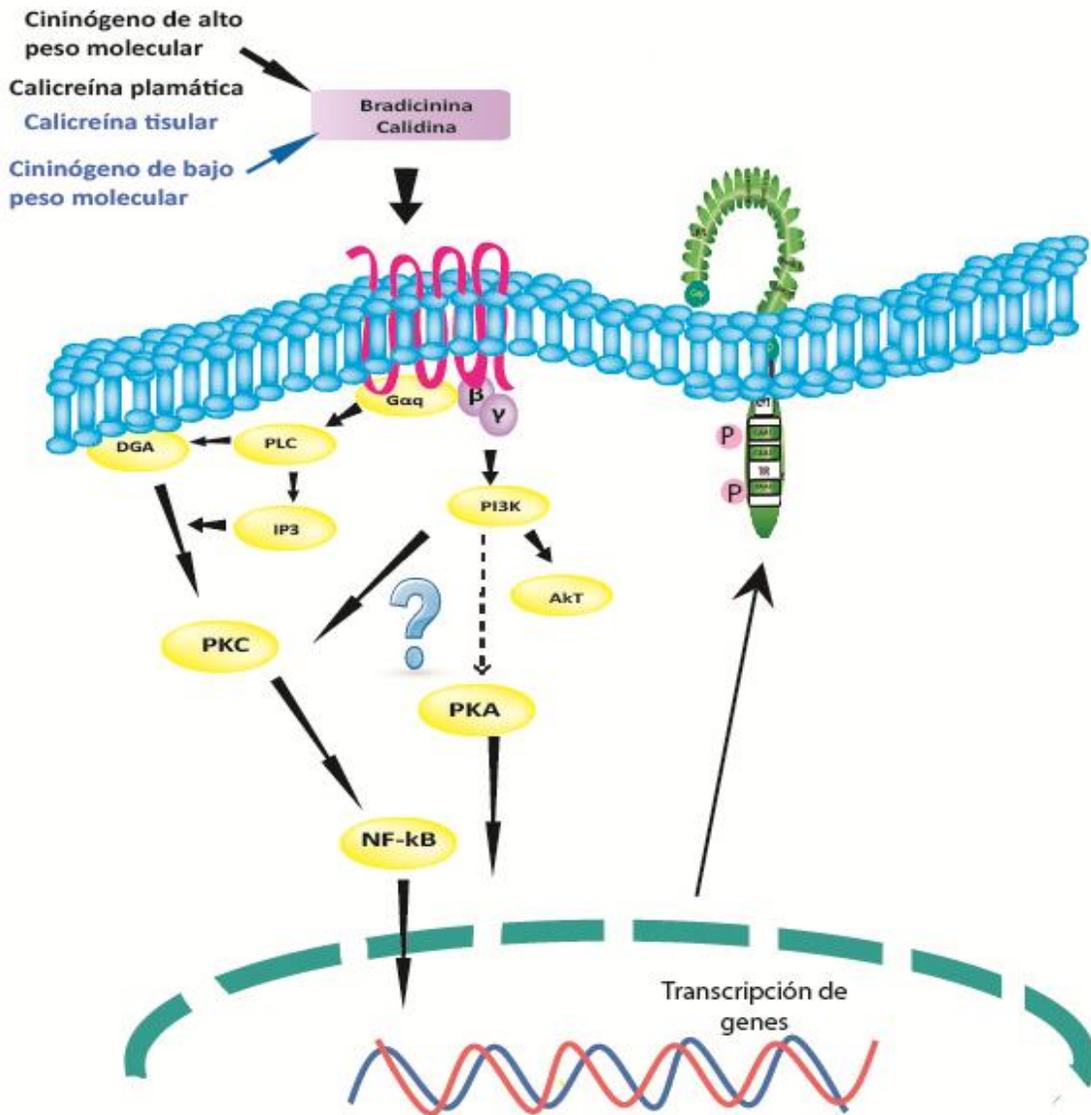


Fig.26. Posible vía de transducción de señales para la expresión del TLR3. La bradicinina se asocia a receptores acoplados a proteína G, los cuales al ser activados promueven la hidrólisis de la PLC, en DGA e IP₃ y la activación de PKC, así como las posibles activaciones de las cinasas PI3K, PKA y el factor de transcripción NF- κ B. Los cuales promoverán la expresión del TLR3.



14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Lindhe J. Periodontología clínica e implantología odontológicas. 5ª ed. Editorial Médica Panamericana. México 2008
- 2 Carranza FA, Newman MG, Takei HH. Periodontología clínica. 10ª ed. McGraw Interamericana. México 2008
- 3 Ulrich Welsch, Sabotta Welsh. Histología. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España 2006
- 4 Gómez de Ferraris Ma. Elisa, Campos Muños Carlos. Histología embrionaria e ingeniería tisular bucodental. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid España 2002
- 5 Abbas K. Abul, Litchman y Pillai. Inmunología Celular y Molecular. 6ª ed. Editorial Elsevier, 2008
- 6 Glickman Irving. Periodontología clínica de Gilckman. 7ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México 1993
- 7 Levine RS. The aetiology of dental caries an outline of current thought. *Int Dent J.* (1997) 27:341-348
- 8 Christersson LA., Zambon JJ., Genco RJ. Dental bacterial plaques. Nature and role in peridental disease. *J Clin Periodontol.* (1991) 18:441-446
- 9 Manjunath BC., Praveen K., Chandrashekar BR., Rani RM., Bhalla A. Periodontal infections a risk factor for various systemic diseases. *Natl Med J India.* (2011) 24:214-219
- 10 He XS., Shi WY. Oral microbiology: past, present and future. *Int J Oral Sci.* (2009) 1:47-58
- 11 Moreno C., Sánchez-Ibarrola A. Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev Med Uni Navarra* (2003) 47:29-33
- 12 Ruíz-López C., Gutiérrez-Venegas G. Receptores Toll y mecanismo de transducción en la inmunidad innata. *Revista de educación Bioquímica.* (2003) 22:67-75
- 13 Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev.* (2001) 1:135-145
- 14 Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature.* (2003) 426:33-38
- 15 Means TK., Golenbock DT., Fenton MJ. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sciences.* (2000) 68:241-258
- 16 Kimbrell DA., Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet.* (2001) 2:256-267
- 17 Huyton T., Rossjohn J., Wilce M. Toll-like receptors: structural pieces of a curve-shaped puzzle. *Immunol Cell Biol.* (2007) 85, 406–410
- 18 Leulier F., Lemaître B. Toll-like receptors taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet.* (2008) 9:165-178



- 19 Warner N., Núñez G. MyD88: A Critical Adaptor Protein in Innate Immunity Signal Transduction. *J Immunol.* (2013) 190:3-4
- 20 Shizuo A., Kiyoshi T. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* (2004) 4:499-511
- 21 Arron Joseph R., Walsh Matthew C., Choi Yongwon. *Current Protocols in Immunology* (2002) 11.9D.1-11.9D.14
- 22 Chapard C., Hohl D., Huber M. The role of the TRAF-interacting protein in proliferation and differentiation. *Exp Dermatol.* (2012) 21:321–326
- 23 Häcker H., Tsen PH., Karin M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat Rev Immunol.* (2011) 11: 45-468
- 24 Dai L., Thu CA., Liu XY., Xi J., Peter CF. TAK1, More Than Just Innate Immunity. *IUBMB Life.* (2012) 4(10): 825–834
- 25 Siomek A. NF-κB signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol.* (2012). 59:323–331
- 26 Reinhard., Huber M., Lohoff., Visekruna A. The role of NF-κB activation during protection against Leishmania infection. *Int J Med Microbiol.* (2012) 302:230– 235
- 27 Vercammen E., Staal J., Beyaert R. Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3. *Clin Microbiol Rev.* (2008) 21:13–25
- 28 Botos I., Liu L., Wang Y., Davies DR. The Toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *Biochim Biophys Acta.* (2009) 1789:667–674
- 29 Matsumoto M., Seya T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev.* (2008) 60:805–812
- 30 Sen GC., Sarkar SN. Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2005) 16:1–14
- 31 Modlin RL. A Toll for DNA vaccines. *Nature.* (2000) 408:659-660
- 32 Ichinohe T., Watanabe I., Ito S., Fujii H., Moriyama M., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Chiba J., Kurata T., Sata T., Hasegawa H. Synthetic Double-Stranded RNA Poly(I:C) Combined with Mucosal Vaccine Protects against Influenza Virus Infection. *J Virol.* (2005) 79: 2910–2919
- 33 Kutikhin AG. Association of polymorphisms in *TLR* genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Human Immunol.* (2011) 72:1095-1116
- 34 Nicodemus CF., Berek JS. TLR3 agonists as immunotherapeutic agents. *Immunotherapy.* (2010) 2(2):37–140
- 35 Yoo J., Chung C., Slice L., Sinnett SJ., Rozengurt E. Protein kinase D mediates synergistic expression of COX-2 induced by TNF-(alpha) and bradykinin in human colonic myofibroblast. *Am J Physiol Cell.* (2009) 297:6 C1576-87
- 36 Scully C., Felix DH. Oral medicine-update for dental practitioner. Aphthous and other common ulcers. *Br Dent J.* (2005) 199 259-264



- 37 Wachtfogel YT., DeLaCadena RA., Colman, RW. Structural biology, celular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thrombosis Res.* (1993) 73: 1-21
- 38 Maurer M., Bader M., Bas M., Bossi F., Cicardi M., Cugno M., Howarth P., Kaplan A., Kojda G., Leeb-Lundberg F., Lötvall J., Magerl M. New topics in bradykinin research. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology. Allergy.* (2011) 66: 1397–1406.
- 39 Tippmer, S., Qwitterer U., Kolm, V., Faussner, A., Roscher, A., Mosthaf, L., Müller-Esterl, W., and Häring H. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms. *Eur J Biochem.* (1994) 225: 297-304.
- 40 Prado GN., Taylor L., Zhou X., Ricupero D., Mierke DF., Polgar P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol.* (2002) 193:275–286
- 41 Rocha E Silva M., Beraldo WT., Rosenfeld G. Bradykinin, hypotensive and smooth muscle stimulating. *Am J Physiol.* (1949) 156:261–265
- 42 Regoli D., Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* (1980) 32:1–46
- 43 Voyno-Yasenetskaya TA., Panchenko MP., Nupenko EV., Rybin VO., Tkachuk VA. Histamine and bradykinin stimulate the phosphoinositide turnover in human umbilical vein endothelial cells via different G-proteins. *FEBS Lett.* (1989) 259:67–70.
- 44 McEachern AE., Shelton ER., Bhakta S., Obernolte R., Bach C., Zuppan P., Fujisaki J., Aldrich RW., Jarnagin K. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1991) 88:7724–7728.
- 45 Menke JG., Borkowski JA., Bierilo KK., MacNeil T., Derrick AW., Schneck KA., Ransom RW., Strader CD., Linemeyer DL., Hess FJ. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem.* (1994) 269:21583–21586.
- 46 Ma JX., Wang DZ., Ward DC., Chen L., Dessai T., Chao J., Chao L. Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B2 receptor. *Genomics.* (1994) 23:362–369.
- 47 Chai KX., Ni A., Wang D., Ward DC., Chao J., Chao L. Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics.* (1996) 31:51–57.
- 48 Mukae S., Aoki S., Itoh S., Nishio K., Iwata T., Ueda H., Geshi E., Fuzimaki T., Katagiri T.. Promoter Polymorphism of the β 2 Bradykinin Receptor Gene is Associated With Essential Hypertension. *Jpn Circ J.* (1999) 63: 759 –762
- 49 Wang H., Reaves PY., Gardon ML., Keene K., Goldberg DS., Gelband CH., Katovich MJ., Raizada MK. Angiotensin Converting Enzyme Antisense Gene Therapy Causes Permanent Antihypertensive Effects in the SHR. *Hypertension.* (2000) 35:202-208
- 50 Bachvarov DR., Landry M., Palletier I., Chevrette M., Bertard C., Ladel M., Marceu F. Characterization of two polymorphic sites in the human kinin B1 receptor gene: altered frequency of an allele in patients with a history of end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* (1998) 598:604



- 51 Zychma MJ., Gumprecht J, Zzechowska E., Grzeszczak W. Polymorphisms in the Genes Encoding for Human Kinin Receptors and the Risk of End-Stage Renal Failure: Results of Transmission/Disequilibrium Test. *J Am Soc Nephrol.* (1999) 10: 2120–2124
- 52 Ganong F William. *Fisiología médica.* 20ª edición. Manual moderno. México (2006). Pp. 560-56.
- 53 Proud, D., Kaplan, AP. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol.* (1988) 6: 49-83.
- 54 http://www.pdg.cnb.uam.es/cursos/DocBioInfo/CD_practicas/PRACTICAS/Gpcr/Gpcr.html
- 55 Kuhr F., Lowry J., Zhang Y., Brovkovich V., Skidgel RA.. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* (2010) 44: 145–154.
- 56 Dray, A., Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* (1993) 16: 99-104.
- 57 Koumbadinga GA., Petitclerc E., Bouthiller J., Adam A., Marceau F. Receptor tyrosine kinases as mediators of injury-induced bradykinin B1 receptor expresión in rabbit aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* (2009): 15; 606 (1-3): 233-239.
- 58 Leeb-Lundberg LM., Marceau F., Muller-Esterl W., Pettibone DJ., Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacology Rev.* (2005) 57: 27–77.
- 59 Campbell WB., Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* (2007) 49: 590–596.
- 60 Blaukat A., Barac A., Cross MJ., Offermanns S., Dikic I. G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals. *Mol Cell Biol.* (2000) 20: 6837–6848.
- 61 Velarde V., Ullian ME., Morinelli TA., Mayfield RK., Jaffa AA. Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* (1999) 277:C253–C261.
- 62 Prado GN., Taylor L., Polgar Peter. Effects of Intracellular Tyrosine Residue Mutation and Carboxyl Terminus Truncation on Signal Transduction and Internalization of the Rat Bradykinin B2 Receptor. *J Biol Chem.* (1997) 272:14638–14642
- 63 Pizard A., Blaukat A., Müller-Esterl W., Alhenc-Gelas F., Rajerison RM. Bradykinin induced Internalization of the Human B2 Receptor Requires Phosphorylation of Three Serine and Two Threonine Residues at Its Carboxyl Tail. *J Biol Chem.* (1999) 274:12738–12747
- 64 Zhang X., Tan F., Brovkovich V., Zhang Y., Skidgel RA. Cross-talk between carboxypeptidase M and the kinin B1 receptor mediates a new mode of G protein-coupled receptor signaling. *J Biol Chem.* (2011) 286(21):18547-61



- 65 Reverter D., Maskos K., Tan F., Skidgel RA., Bode W. Crystal structure of human carboxypeptidase M, a membrane-bound enzyme that regulates peptide hormone activity. *J Mol Biol.* (2004) 338: 257–269.
- 66 Zhang X., Tan F., Zhang Y., Skidgel RA. Carboxypeptidase M and kinin B1 receptors interact to facilitate efficient b1 signaling from B2 agonists. *J Biol Chem.* (2008) 283: 7994–8004.
- 67 Lung CC., Jagels MA., Daffern PJ., Tan EM., Zuraw BL. Induction of human B2 bradykinin receptor mRNA and membrane receptors by IFNgamma. *Immunopharmacology.* (1998) 39: 243–253.
- 68 Ricupero DA., Romero JR., Rishikof DC., Goldstein RH. Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA. *J Biol Chem.* (2000) 275:12475–12480.
- 69 Yang X., Polgar P. Genomic structure of the human bradykinin B1 receptor gene and preliminary characterization of its regulatory regions. *Biochem Biophys Res Comm.* (1996) 222:718–725.
- 70 Ni A., Chao L., Chao J. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem.* (1998) 273:2784–2791
- 71 Zhou X., Prado GN., Chai M., Yang X., Taylor L., Polgar P. Posttranscriptional destabilization of the bradykinin B1 receptor messenger RNA: Cloning and functional characterization of the 30- untranslated region. *Mol Cell Biol Res Commun.* (1999) 1:29–35.
- 72 Larrivee JF., Bachvarov DR., Houle F., Landry J., Huot J., Marceau F. Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J Immunol.* (1998) 160:1419–1426.
- 73 Bachvarov D., Hess JF., Menke JG., Larrivee JF., Marceau F. Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics.* (1996) 33:374–381.
- 74 Schanstra JP., Bataille E., MarinCastano ME., Barascud Y., Hirtz C., Pesquero JB., Pecher C., Gauthier F., Girolami JP., Bascands JL. The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest.* (1998) 101:2080–2091
- 75 Pesquero JB., Lindsey CJ., Zeh K., Paiva ACM., Ganten D., Bader M. Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J Biol Chem.* (1994) 269:26920–26925.
- 76 Saifudeen Z., Du H., Dipp S., El-Dahr SS. The bradykinin type 2 receptor is a target for p53-mediated transcriptional activation. *J Biol Chem.* (2000) 275:15557–15562.
- 77 Tropea MM., Gummelt D., Herzig MS., Leeb-Lundberg LM. B1 and B2 kininreceptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells:receptor-specific stimulation of inositol phosphate formation and arachidonic acid release by des Arg9-bradykinin and bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther.* (1993) 264:930–937



- 78 Marsh KA., Hill SJ. Des-Arg9-bradykinin-induced increases in intracellular calcium ion concentration in single bovine tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* (1994) 112:934–938.
- 79 Mathis SA., Criscimagna NL., Leeb-Lundberg LM. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* (1996) 50:128–139.
- 80 El-Dahr SS., Harrison-Bernard LM., Dipp S., Yosipiv IV., Meleg-Smith S. Bradykinin B2 null mice are prone to renal dysplasia: Gene-environment interactions in kidney development. *Physiol Genomics.* (2000) 3:121–131.
- 81 Mombouli JV., Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s) and the potentiation of kinins by converting enzyme inhibitors. *Am J Hypertens.* (1995) 8:19S–27S.
- 82 Marceau F., Regoli D. Bradykinin Receptor Ligands: Therapeutic Perspectives. *Nat Rev.* (2004) 3: 845-851
- 83 Stewart JM. Bradykinin antagonists: discovery and development. *Peptides.* (2004) 25: 527–532
- 84 Hock FJ., Wirth K., Albus U., Linz W., Gerhards HJ., Wiemer G., Henke St., Breipohl G., König W., Knolle J., Scholkens BA. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist:in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.* (1991) 102: 769-773
- 85 Bawolak MT., Gera L., Morissette G., Stewart JM., Marceau F. B-9972 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,Oic7,Igl8]-bradykinin) Is and Inactivation Resistant Agonist of the Bradykinin B2 Receptor Derived from the Peptide Antagonist B-9430 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,D-Igl7,Oic8]-bradykinin): Pharmacologic Profile and Effective Induction of Receptor Degradation. *J Pharmacol Exp Ther.* (2007) 323: 534–546
- 86 Souza PP., Brechter AB., Reis RI., Costa CA., Lundberg P., Lerner UH. IL-4 and IL-13 inhibit IL-1b and TNF-a induced kinin B1 and B2 receptors through a STAT6-dependent mechanism. *Br J Pharmacol.* (2013) 169: 400–412
- 87 Mahanonda R., Sa-Ard-Iam N., Montreekachon P., Pimkhaokham A., Yongvanichit K., Fukuda MM., Pichyangkul S. IL-8 and IDO Expression by Human Gingival Fibroblasts via TLRs. *J Immunol.* (2007) 178: 151-1157
- 88 Shirasaki H., Kanaizumi E., Himi T. Immunohistochemical localization of the bradykinin B1 and B2 receptors in human nasal mucosa. *Mediators Inflamm.* (2009) 10(2): 406-412
- 89 Bonde MM., Olsen KB., Erikstrup N., Speerschneider T., Lyngs C., Hungs S., Niesen MS., Sheikh SP., Hansen JL. The angiotensin II type 1 receptor antagonist Losartan binds and activates bradykinin B2 receptor signaling. *Regul Pept.* (2011) 161: 21-25
- 90 Scully C., Felix DH. Oral medicine-update for the dental practitioner. Aphthous and other common ulcers. *Br Dent J.* (2006) 199: 259-264
- 91 Gutiérrez-Venegas G., Arreguín-Cano JA. Bradykinin promotes TLR2 expression in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* (2011) 11: 2079–2085



- 92 Gutiérrez-Venegas G., Arreguín-Cano JA., Hernández-Bermúdez C. Bradykinin promotes Toll like receptor-4 expression in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* (2012) 14:538–545
- 93 Brechter AB., Persson E., Lundgren I., Lerner UH. Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor- α . Effects dependent on activation of NF- κ B and MAP kinases. *Bone* (2008) 43:72–83
- 94 Tippmer, S., Qwitterer U., Kolm, V., Faussner, A., Roscher, A., Mosthaf, L., Müller-Esterl, W., and Häring H. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms alpha, epsilon, and zeta. *Eur. J. Biochem.* (1994) 225: 297-304