



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Efecto de la Bradicinina sobre la expresión de receptores semejantes a Toll 1 y 6 en
Fibroblastos Gingivales Humanos.

TESIS DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS

PRESENTA:

Mtro. JUAN ANTONIO ARREGUIN CANO

TUTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO D.F

2016



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.

Abreviaturas

AP-1: Proteína Activadora-1

ATP: Adenosín trifosfato

BK: Bradicinina

BKB1R: Receptor 1 a Bradicinina

BKB2R: Receptor 2 a Bradicinina

COX-2: Ciclooxygenasa-2

DAG: Diacilglicerol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E.E: Error estándar

ERK: Cinasa extracelular

g: Gramo

GPCRs: Receptores acoplados a proteína G

GTP: Guanosín trifosfato

h: Horas

HGF: Fibroblasto gingival humano

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: Óxido nítrico sintasa inducible

IP3: Inositol-1,4,5-trisfosfato

IRAK: Receptor de IL1 asociado a cinasas

I κ B: Inhibidores de kappa B

IKK: I kappa B cinasa

JNK: Cinasa c-Jun N-terminal

LLR: Regiones ricas en leucina

Log: Logaritmo

LPS: Lipopolisacárido

LTA: Ácido lipoteicoico

M: Molar

MAPK: Proteína cinasa activada por Mitógeno

min: Minutos

mM: Milimolar

mL: Mililitro

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

MYD88: Factor de diferenciación mieloides 88

NF κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B

NO: Óxido Nítrico

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PGE2: Prostaglandina E2

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinasa

PKC: Proteína cinasa C

PLA2: Fosfolipasa A₂

PLC: Fosfolipasa C

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRAF6: Factor 6 del receptor de TNF

TRAM: Molécula adaptadora relacionada a TRIF

TRIF: Adaptador con dominio TIR que induce IFN- β

Ub: Ubiquitina

μ g: Microgramo

μ M: Micro molar

μ L: Micro litro

C: Grado centígrado

INDICE

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | Resumen | 1 |
| 2. | Antecedentes | 2 |
| 2.1 | Inmunidad innata | 2 |
| 2.1.1 | Inflamación | 3 |
| 2.1.1.1 | Bradicinina | 4 |
| 2.1.1.2 | Historia de la Bradicinina. | 4 |
| 2.1.1.3 | Sistema endógeno de calicreina- ciminógeno-cinina | 5 |
| 2.1.1.4 | Metabolismo | 7 |
| 2.1.1.5 | Receptores de Bradicinina | 8 |
| 2.1.1.6 | Antagonistas | 9 |
| 2.1.1.7 | Señalización intracelular | 9 |
| 2.1.1.8 | Antecedentes de Bradicinina en HGF | 14 |
| 2.1.2 | Receptores semejantes a Toll | 16 |
| 2.1.2.1 | Receptores Toll en Humanos | 17 |
| 2.1.2.2 | Estructura de los TLR | 20 |
| 2.1.2.3 | Señalización de los TLR | 21 |
| 2.1.2.4 | TLR 1 | 23 |
| 2.1.2.5 | TLR 2 | 24 |
| 2.1.2.6 | TLR 6 | 25 |
| 2.1.2.7 | Heterodímeros | 25 |
| 3 | Objetivos | 27 |
| 3.1 | Objetivo General | 27 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 27 |
| 4 | Hipótesis | 27 |
| 5 | Material y Métodos | 28 |

| | | |
|------|--|----|
| 5.1 | Cultivo Celular. | 28 |
| 5.2 | Ensayo RT-PCR | 29 |
| 5.3 | Ensayo de Western Blot | 29 |
| 5.4 | Ensayo de Inmunoprecipitación | 30 |
| 5.5 | Ensayo de Citometría de flujo | 31 |
| 5.6 | Silenciamiento con siRNA | 31 |
| 5.7 | Ensayo de Inmunofluorescencia | 32 |
| 5.8 | Análisis Estadístico. | 32 |
| 6 | Resultados | 33 |
| 6.1 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión génica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos | 33 |
| 6.2 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos a nivel transcripcional. | 34 |
| 6.3 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos | 35 |
| 6.4 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 en Fibroblastos Gingivales Humanos | 36 |
| 6.5 | Efecto de la Bradicinina sobre la localización del TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos | 37 |
| 6.6 | Efecto de la Bradicinina sobre la formación de interacción proteica del TLR-2 con TLR-1 y TLR-6 en Fibroblastos Gingivales Humanos. | 39 |
| 6.7 | Efecto de los antagonistas de B1 y B2 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. | 40 |
| 6.8 | Efecto de la inhibición de PLC, PI3K y PKC en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina | 41 |
| 6.9 | Efecto de la inhibición de p38, JNK, MEK y el factor de transcripción NFkB en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina | 42 |
| 6.10 | Efecto de la inhibición de PLC, PI3K, PKC, p38, JNK, MEK y factor de transcripción NFkB en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina | 43 |
| 6.11 | Efecto de la inhibición de PI3K, PLC y PKC en la fosforilación de AKT y P38 inducidas por Bradicinina. | 44 |
| 6.12 | Efecto de Bradicinina sobre la interacción de TLR-1 y TLR-6 con PKC α , ζ . | 45 |

| | | |
|------|---|----|
| 6.13 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducida por Bradicinina. | 46 |
| 6.14 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducida por Bradicinina | 47 |
| 6.15 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación de la vía canónica de TLR inducida por Bradicinina. | 48 |
| 6.16 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación MMP -2 y MMP-9 inducida por Bradicinina. | 49 |
| 6.17 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la producción de PGE2. | 50 |
| 7 | Discusión | 51 |
| 8 | Conclusiones | 53 |
| 9 | Bibliografía | 54 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|--------|---|----|
| Fig.1 | Esquema de la estructura química de Bradicinina. | 4 |
| Fig.2 | Esquema del receptor para Bradicinina | 8 |
| Fig.3 | Esquema del receptor serpentino acoplado a la proteína G | 12 |
| Fig.4 | Esquema del sistema fosfo-inositol calcio | 13 |
| Fig.5 | Vías de señalización de los receptores Toll y la comparación con Receptores semejantes a Toll | 17 |
| Fig.6 | Estructura molecular de los TRL | 21 |
| Fig.7 | Esquema de los diferentes tipos de receptores semejantes a Toll y su señalización | 22 |
| Fig.8 | Esquema del cromosoma 4 en el genoma del Humano donde se puede localizar la cercanía con el receptor TLR6 | 24 |
| Fig.9 | Esquema de la región codificante para el TLR2 dentro del cromosoma 4 en Humanos | 24 |
| Fig.10 | Esquema de la región codificante para el TLR6 dentro del cromosoma 4 en Humanos | 25 |
| Fig.11 | Esquema representativo de las interacciones de TLR2 con TLR1 y TLR6 | 26 |
| Fig.12 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión génica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos. | 33 |
| Fig.13 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos a nivel transcripcional. | 34 |
| Fig.14 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos | 35 |
| Fig.15 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 en Fibroblastos Gingivales Humanos. | 36 |
| Fig.16 | Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos. | 37 |
| Fig.17 | Efecto de la Bradicinina sobre la formación de interacción proteica del TLR con TLR-1 y TLR-6 en Fibroblastos Gingivales Humanos. | 39 |
| Fig.18 | Efecto de los antagonistas de B1 y B2 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. | 40 |
| Fig.19 | Efecto de la inhibición de PLC, PI3K y PKC en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. | 41 |
| Fig.20 | Efecto de la inhibición de P38, JNK, MEK y el factor de transcripción NFkB en la expresión de | 41 |

TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina.

| | | |
|---------|--|----|
| Fig.21 | Efecto de la inhibición de PLC, PI3K, PKC, P38, JNK, MEK y factor de transcripción NFkB en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. | 43 |
| Fig.22 | Efecto de la inhibición de PI3K, PLC y PKC en la fosforilación de AKT y P38 inducidas por Bradicinina. | 44 |
| Fig.23 | Efecto de Bradicinina sobre la interacción de TLR-1 y TLR-6 con PKC α , ζ . | 45 |
| Fig.24 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ , en la formación de complejos proteicos de TLR-2 con TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina | 46 |
| Fig.25 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducida por Bradicinina. | 47 |
| Fig. 26 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación de la vía canónica de TLR inducida por Bradicinina | 48 |
| Fig. 27 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación de la vía canónica de TLR inducida por Bradicinina | 49 |
| Fig. 28 | Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación de la vía canónica de TLR inducida por Bradicinina. | 50 |
| Fig.29 | Posible vía de transducción de señales en la expresión del TLR-1 y TLR-6 | 53 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|----------|-----------------------------|----|
| Tabla I | Clasificación de proteína G | 11 |
| Tabla II | Clasificación de los TLR | 19 |

1. Resumen

Se ha demostrado que la infección ocasionada por determinados patógenos estimula la producción de bradicinina (Bk), que es un mediador universal de respuestas inflamatorias, ejerciendo sus efectos a través de los receptores para Bk. Los fibroblastos gingivales humanos son las células más abundantes en el periodonto. Diversos reportes señalan que expresan receptores semejantes a Toll (TLR) como es el caso del TLR1 y TLR6. Estos a su vez podrán interactuar con el TLR2 para un aumento en la capacidad de reconocimiento de patógenos. Lo que favorece la activación de Bk y una posible retro alimentación del proceso inflamatorio, así como un aumento en la capacidad de reconocimiento de los diferentes ligando que iniciaron la respuesta. **MÉTODOS:** Mediante ensayos de “Western-Blot” y RT-PCR, se evaluara el efecto de BK en la expresión de los receptores TLR1, TLR6, así como la vía de señalización que conllevara a la producción de estos receptores. **RESULTADOS:** Nuestros resultados muestran que BK induce la expresión de los receptores TLR1 y TLR6, a nivel transcripcional y traduccional. Así como la formación de heterodímeros ante un estímulo de Bk. Lo que nos sugiere que BK participa en la retro alimentación de los procesos inflamatorios al aumentar la expresión de TLR1 y de TLR6 a nivel traduccional y transcripcional. Así como la interacción del TLR 2 con TLR1 y TLR6

Palabras clave: receptor tipo Toll, fibroblastos gingivales humanos, bradicinina

Abreviaturas: bradicinina, Bk; fibroblastos gingivales humanos, HGF; receptores semejantes a toll, TLR

2. Antecedentes

2.1 Inmunidad innata

Los humanos estamos expuestos a millones de microorganismos patógenos diariamente a través de inhalación, ingesta o contacto directo. Nuestra habilidad para evitar la infección depende en parte del sistema inmune adaptativo, el cual recuerda contactos previos con patógenos específicos y los neutraliza cuando vuelven a atacar. Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa se desarrolla lentamente en la primera exposición a un agente patógeno nuevo, ya que los clones específicos de células T y B que se activan y se expanden, tomando cerca de una semana para que las respuestas sean efectivas. Además, una sola bacteria puede producir al menos 20 millones de progenies en un solo día, por lo que en las primeras horas y días de la exposición, el sistema inmune innato nos protege contra la infección. Las respuestas inmunes innatas no son específicas para un patógeno en particular y están coordinadas por el sistema de complemento y células fagocíticas que reconozcan patrones conservados de los patógenos, activándose rápidamente para destruirlos.

Se cree que el sistema inmune innato constituye una antigua estrategia evolutiva de defensa, que predomina en plantas, hongos, insectos y microorganismos celulares primitivos. Dentro de las funciones del sistema inmune innato en vertebrados se encuentran:

- Reclutamiento de células inmunes hacia los sitios de infección e inflamación, mediante la producción de factores químicos denominados citocinas.
- Activación de la cascada del sistema complemento para identificar bacterias, activar células y promover el aclaramiento de células muertas o de los complejos de anticuerpos
- Identificación y remoción de sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa, a cargo de leucocitos.
- Activación del sistema inmune adaptativo mediante la presentación de antígeno. En los tejidos gingivales, las infecciones polimicrobianas causan inflamación gingival y resorción del hueso alveolar. La respuesta inmune mediada por el huésped contra esos microorganismos es lo que principalmente conlleva a la destrucción de los tejidos periodontales, aunque hay otros factores que pueden influir o exacerbar dicha destrucción. De manera general, los microorganismos residen en un matriz de glucopolímeros en donde crean un nicho simbiótico que les permite su supervivencia. Los microorganismos y sus endotoxinas, estimulan entonces a células y síntesis de mediadores químicos que regulan el proceso inflamatorio, como parte de la inmunidad innata.

2.1.1 Inflamación

La inflamación es una de las primeras respuestas del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. La inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica debido a la síntesis de múltiples moléculas que coordinan la activación de células para neutralizar el agente causal. En ocasiones, transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, periodontitis e incluso el cáncer. En cualquier caso, la respuesta inflamatoria está coordinada por mediadores que se organizan en complejas redes reguladoras. Para diseccionar tal entramado, es útil agrupar esas señales en categorías funcionales y distinguir entre inductores y mediadores de la respuesta inflamatoria. Las primeras señales inician el proceso, activando sensores especializados que promueven la síntesis de mediadores; estos, a su vez, alteran los estados funcionales de células, tejidos y órganos, que son los efectores de la inflamación, de manera que permiten la adaptación y reparación del daño infringido por el inductor.

La respuesta inflamatoria consta principalmente de 2 fases: una reacción vascular y una reacción celular. Muchos tejidos y células están implicados en éstas reacciones, incluyendo el líquido y las proteínas del plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y los elementos celulares y extracelulares del tejido conectivo. Las células circulantes incluyen neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son los mastocitos, que rodean íntimamente a los vasos sanguíneos, los fibroblastos del tejido conectivo; los macrófagos residentes y los linfocitos. La matriz extracelular consta de proteínas estructurales (colágena y elastina), glicoproteínas adherentes (fibronectina, laminina, colágeno no fibrilar, tenascina, etc.) y proteoglicanos. Por parte de los elementos liberados por las células encontramos a factores promotores de la inflamación Interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12), Serotoninas, Eicosanoides, Prostaglandinas (PGE₂, PGI₂, PGD₂), Leucotrienos (C, D, E), Óxido nítrico (NO), Factor de Necrosis Tumoral (TNF-α), Histamina y Bradicinina (Bk). Bk es una hormona de acción rápida y fuerte, encontrando diversos estudios donde demuestran la implicación de Bk en la respuesta inflamatoria y en el aumento de la inmunidad otra parte en estudios previos se ha encontrado que Bk puede retroalimentar el proceso inflamatorio ya que promueve la activación de Ciclo Oxigenas (COX-2) y consecutivamente la producción de PGE₂ y TNF-α. Así como promover procesos degenerativos como la osteoartritis.^{1,2,3}

2.1.1.1 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 vaso activos de la clase de las cininas a las que se les ha denominado Bradicinina (BK) y calidina en los tejidos. Dichos péptidos son autocoides que actúan localmente y producen dolor, vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular y

síntesis de prostaglandina. De este modo integran un subgrupo de un gran número de mediadores que contribuyen a la respuesta inflamatoria. Bradicinina es un nonapéptido de bajo peso molecular (1060.21 Da y de fórmula general = $C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$)⁴. (Fig. 1) 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 aminopeptidasa.^{5,6}

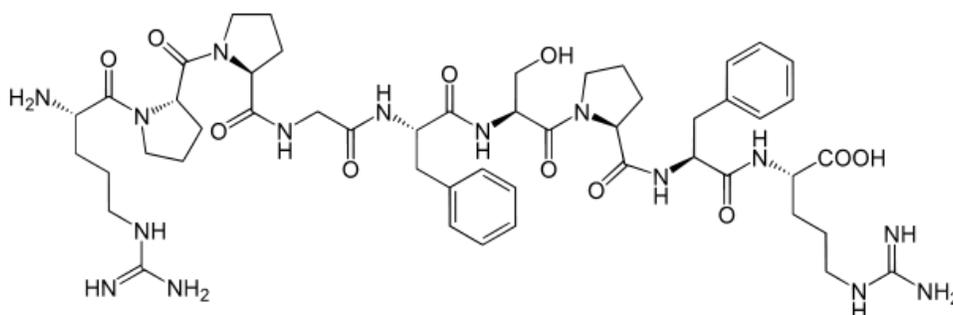


Fig. 1 Esquema de la estructura química de Bradicinina. Descripción

(www.hemicalbook.com)

2.1.1.2 Historia de la Bradicinina.

Entre 1920 y 1939, Frey y colaboradores identificaron una sustancia que causaba hipotensión y demostraron que podría obtenerse un material similar en saliva, plasma y diversos tejidos. El páncreas era una fuente rica de tal sustancia, razón por la cual la llamaron caliceína, con base en el sinónimo griego de dicho órgano Kallicrea. En 1937 Werle Gôtze y Keppler definieron que las caliceínas generan una sustancia farmacológicamente activa, a partir de algún precursor inactivo presente en el plasma. En 1948 Werle y Berek llamaron a la sustancia activa Calidina y demostraron que era un polipéptido separado de una globulina plasmática que llamaron calidinogeno.⁷

El interés en este campo se intensificó cuando Rocha y Silva en 1949 señalaron que la tripsina y algunos venenos de serpientes actuaban en la globulina plasmática para producir una sustancia que disminuía la presión arterial, ocasionado contracción de aparición lenta en el intestino. Ante esta respuesta lenta, llamaron a tal sustancia Bradicinina término proveniente de la raíz griega bradys que significa lento y kinein que es movimiento. En 1960 Elliot y colaboradores aislaron el nonapéptido Bradicinina que fue

sintetizado por Boissonnas. Muy poco después advirtió que la Calidina era un decapeptido es decir una Bradicinina mas un residuo de lisina.

En 1980 Regoli y Barabe dividieron los receptores de cinina en clases B1 y B2. A mediados del decenio de 1980 fue posible la síntesis de la primera generación de los antagonistas del receptor y por consiguiente el avance en el conocimiento en la señalización. Bradicinina siendo nonapéptido se deriva del plasma donde esta presente en forma de su precursor denominado ciminógeno de alto peso molecular (HMWK). Esta glicoproteína precursora es degradada por la enzima proteolítica, la calicreina que debe ser activada por su precursor la precalicreina por la activación de factor XII (HAGEMAN) que se genera del contacto del factor XII con los tejidos lesionados en especial con colágena y membrana basal vascular.⁸

2.1.1.3 Sistema endógeno de calicreina- ciminógeno-cinina

Este sistema fue descubierto en 1909 (Abelous & Bardier) cuando unos investigadores observaron que una inyección de orina (con un nivel elevado de Cininas) producía hipotensión. Los investigadores Emil Karl Frey, Heinrich Kraut y Eugen Werle descubrieron el ciminógeno de alto peso molecular en la orina hacia 1930. Encontrando dentro de este sistema diversos integrantes.⁹

De origen proteico:

El cininógeno de peso molecular elevado (CEPM) y el cininógeno de peso molecular reducido (CEPR) son precursores de los polipéptidos. Presentan actividad en sí mismos.

- El CEPM es un producto del hígado junto con la precalicreína. Actúa principalmente como cofactor de la coagulación y la inflamación y no presenta actividad catalítica intrínseca.
- El CEPR se produce de forma local en numerosos tejidos y se secreta junto con la calicreína tisular.

Polipéptidos

- Bradicinina, que actúa en el receptor B2R y levemente en el B1R, se produce cuando la calicreína la libera desde el CEPM. Se trata de un nonapéptido con la secuencia de aminoácidos Arg-Pro-Pro-Gli-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.
- La Calidina es liberada desde el CEPR por la calicreína tisular. Se trata de un decapeptido.¹⁰

El sistema calicreína-cinina es un sistema poco definido de proteínas sanguíneas de importancia en las inflamaciones, el control de la presión sanguínea, la coagulación y el dolor. Sus importantes mediadores, la Bradicinina y la Calidina son vasodilatadores y actúan sobre muchos tipos de células. Este sistema incluye un grupo de sustancias activas que provocan una reacción en cadena y es desencadenado por la activación superficial del factor Hageman; además este sistema da lugar a la liberación de un nonapéptido vasoactivo, denominado Bradicinina (BK), que es un potente agente que incrementa la permeabilidad vascular y estimula la contracción del músculo liso y la dilatación de los vasos sanguíneos. Su participación se limita a fases tempranas de permeabilidad vascular. La acción de la Bradicinina es corta ya que resulta inactivada rápidamente por la cininas. La bradicinina siendo nonapeptido se deriva del plasma donde esta presente en forma de su precursor inactivo denominado zimínógeno de alto peso molecular (HMWK). Esta glicoproteína precursora es degradada por la enzima proteolítica, la calicreína que debe ser activada por su precursor la precalicreína por la activación de factor XII (HAGEMAN) que se genera del contacto del factor XII con los tejidos lesionados en especial con colágena y membrana basal vascular.¹¹

Las cininas constituyen grupo de péptidos de 9 a 11 aminoácidos estructuralmente relacionados con el nonapéptido BK. El primer grupo de cininas incluye apenas los productos primarios liberados proteolíticamente de los cininógenos: BK o lis-BK. BK actúan como hormonas parácrinas, estimulando receptores transmembranal acoplados a la proteína G heterotrimérica (subtipo B₂) de Bradicinina. Entre diversas funciones biológicas importantes, la activación del receptor constitutivo B₂ induce la vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y sensibilidad al dolor, contracción de la musculatura lisa, maduración de células dendríticas. El efecto, a distancia, de BK sobre B₂R es controlado por enzimas que las degradan, como por ejemplo, por la enzima convertora de angiotensina. Mientras el B₂R é expresado constitutivamente en la superficie celular (células endoteliales, músculo liso, células epiteliales, fibroblastos, células neuronales y células dendríticas), el receptor de subtipo B₁ tiene una baja expresión en tejidos normales. La expresión celular de B₁R aumenta debido a la activación de cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), en respuesta al daño, infección o inflamación. Resulta importante destacar que la especificidad farmacológica del B₁R difiere de la del B₂R: por las diferencias de afinidad de los agonistas de B₁R ([des-Arg⁹]-BK y [des-Arg]-LBK), que son metabolitos generados por la acción proteolítica sobre la Arg C-terminal de BK o LBK, por la acción de la cininasa. En estados inflamatorios crónicos, la activación de B₁R induce el reclutamiento de leucocitos circulantes para los tejidos, contribuyendo con la fibrosis de tejidos y angiogénesis.¹¹

Bk participa en la respuesta inflamatoria cuando ésta es reconocida por su receptor de membrana desencadena señales intracelulares que culminarán en la producción de factores pro inflamatorio como IL-8¹. Por otra parte se ha demostrado que la Bradicinina aumenta la activación de COX-2 y su consiguiente producción de PGE₂.¹² Bk esta involucrada en la proliferación celular ya que algunos reportes demuestra REFERENCIA que al ser incubadas los fibroblastos gingivales humanos con esta hormona y algunos otros factores de crecimiento la tasa de proliferación aumenta considerablemente demostrando así que esta hormona a pesar de estar clasificada dentro de los agentes que causan inflamación también tiene un roll en la cicatrización de los tejidos.¹³ El sistema calicreína-cinina es un sistema poco definido de proteínas sanguíneas de importancia en las inflamaciones, el control de la presión sanguínea, la coagulación y el dolor. Sus importantes mediadores, la bradicinina y la Calidina son vasodilatadores y actúan sobre muchos tipos de células.¹⁴

2.1.1.4 Metabolismo

El decapeptido Calidina tiene casi la misma actividad que el nonapéptido Bradicinina y es innecesario que se transforme en este último para que genere sus efectos característicos. Se produce conversión moderada de Calidina en Bradicinina conforme la aminopeptidasa plasmática separa el residuo de lisina en la terminación amino. Sin embargo la reacción mencionada es lenta en comparación con la velocidad de inactivación por hidrolisis en la terminación carboxilo. La mínima estructura eficaz necesaria para desencadenar las respuestas clásicas de la Bradicinina.¹⁵

La Bradicinina tiene una existencia brevísima y su vida media en el plasma es solo de unos 15 segundos. Aun más en un solo paso por el lecho vascular pulmonar puede destruirse del 80 al 90% de las Cininas. En la circulación se identifican únicamente concentraciones pico molares.

2.1.1.5 Receptores de Bradicinina

Los receptores de Bk son receptores acoplados a proteínas G y se los llama así por la forma en la que funcionan interactuando con componentes intermedios en el proceso como la proteína G. Estos receptores también llamados receptores serpentinos en función a sus siete dominios transmembranal (Fig. 2). Dentro de los receptores para Bradicinina se encuentran B1R y B2R siendo los de mayor estudio que a continuación describiremos.¹⁶

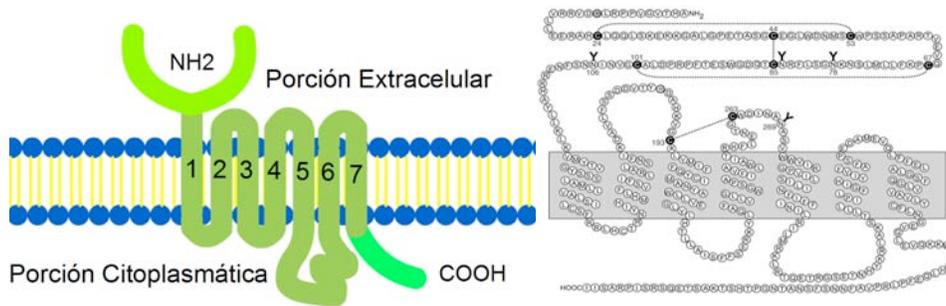


Fig. 2 Esquema del receptor para Bradicinina DESCRIPCIÓN mostrando los 7 dominios membranales con una porción extracelular y otra intracelular

Se conocen como mínimo dos receptores diferentes de Cininas que han sido llamados B₁R y B₂R. El receptor clásico, llamado ahora B₂, liga selectivamente Bradicinina y Calidina, siendo constitutivo en casi todos los tejidos normales. Media la mayor parte de los efectos de la Bradicinina y Calidina, en ausencia de inflamación. El receptor B₁R se liga de modo selectivo a los metabolitos des-Arg en la terminación carboxilo, de la Bradicinina y Calidina y es menor su número que el del receptor B₂R en casi todos los tejidos. Los receptores B₁ están en el músculo liso normal de vasos; son regulados en forma aditiva por la inflamación Durante situaciones de estrés, como traumatismo, presión tisular o inflamación, pueden predominar los efectos en receptores B₁R. Los mecanismos de envío de señales de dichas estructuras no se han definido con la precisión que se ha obtenido con los receptores B₂R.¹⁷

El receptor B₂R se acopla a proteínas G y activa a las Fosfolipasa A₂ y C. La activación de la Fosfolipasa C inducida por cinina hace que aumente IP₃ y por consiguiente el aumento del calcio citosólico así como el diacilglicerol que activaran a proteína cinasa C. Se ha demostrado que la Bradicinina activa a la proteína cinasa C dependiente de calcio y a la que no depende de este ion, así como a las isoformas atípicas. La estimulación de la Fosfolipasa A₂ libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana. El ácido araquidónico liberado puede ser metabolizado a la forma de mediadores inflamatorios potentes.¹⁸

2.1.1.6 Antagonistas

Los primeros antagonistas de cinina fueron agonistas parciales y su vida media fue breve por degradación enzimática in vivo. en los comienzos del decenio de 1990, se sintetizaron antagonistas de Cininas mas selectivos y de acción mas larga al sustituir aminoácidos sintéticos en posición clave como lo es HOE 140 y también se han obtenidos antagonistas no peptídicos para B₂ como es el caso de WIN 64338.¹⁹

El primero antagonista de B2R no peptídico de bradicinina se sintetizó por Sterling Winthrop en 1993, WIN 64338. Dicho compuesto, sin embargo, mostró baja actividad de unión al receptor B2 humano. Derivados de quinolina e imidazopiridina reivindicados por Fujisawa, que a partir de 1996, publicó datos farmacológicos y estudios con respecto al novedoso antagonista no peptídico FR 173657 y los análogos del mismo, han mostrado una actividad muy interesante. Este compuesto fue de primordial importancia en la búsqueda de antagonistas de B2R no peptídicos novedosos debido a su selectividad, potencia y actividad tras administración oral. Tras la publicación de las patentes de Fujisawa, se reivindicaron estructuras similares en patentes por Fournier y Hoechst. Los compuestos de Fournier también tienen una quinolina unida a diclorobenceno; una sulfonamida sustituida conecta esta parte de la molécula a un anillo aromático a través de un ligador básico. Fournier anunció en mayo de 1998 el inicio de la fase clínica I para el antagonista de B2R no peptídico LF 16.0687. En vista de las posibles ventajas de los antagonistas no peptídicos (estabilidades enzimáticas y metabólicas, alta biodisponibilidad) con respecto a los antagonistas peptídicos, es deseable la búsqueda de antagonistas de receptor B2R no peptídicos novedosos.

2.1.1.7 Señalización intracelular

Los receptores para bradicinina se localizan en membrana plasmática y en la porción citoplasmática se acopla a una proteína G. Llamándose así ya que esta proteína interactúa con Guanosin trifosfato (GTP) que conduce a la hidrólisis del nucleótido Guanosin difosfato (GDP) y de la inicial de guanosina, recibe este nombre. Encontrándose a estas proteínas dentro de una super familia que comprende a diversos miembros y cada uno de estos miembros tiene diversas vías por las que desencadenaran efectos diversos en la célula (Tabla. 1).²⁰

Debido a su estructura molecular, las proteínas G se clasifican en dos tipos, heterotrimérica y manométricas. Las primeras, grandes o heterotrimérica, están constituidas por tres subunidades distintas, denominadas α , β , γ . Las segundas, pequeñas o manométricas, con una única subunidad, se encuentran libres en el citoplasma y núcleo.²¹

Estas proteínas se encuentran activadas cuando poseen GTP en su estructura, e inactivadas cuando se trata de GDP. Por tanto, la actividad de GTPasa es crucial para su funcionamiento como interruptores biológicos. Dicha actividad hidrolítica se modula también mediante proteínas accesorias, como son las pertenecientes a los siguientes grupos:

- GEF, de las siglas en inglés de factor intercambiador de nucleotido de guaninan. Se trata de un factor proteico que facilita el intercambio de GDP de la estructura de la proteína G por GTP, por lo cual la activa.
- GAP, de las siglas en inglés de proteína aceleradora de la actividad GTPasa, que favorece la ruptura del enlace fosfodiéster del GTP a GDP, por lo cual inactiva a la proteína G.

Tabla 1 Clasificación de proteína G

| Clase G_A | Efactor asociado | Segundo mensajero | Receptores |
|-----------------|--------------------------------|--|---|
| $G_s\alpha$ | Adenil ciclasa | Aumento de AMPc | β -adrenérgico, glucagón, serotonina, vasopresina |
| $G_{i\alpha}$ | Adenil ciclasa, canal de K^+ | Disminución AMPc, cambio en el potencial de membrana | α_2 -adrenérgico, muscarínico de acetilcolina |
| $G_{olf\alpha}$ | Adenil ciclasa | Aumento AMPc | Olfatorios |
| $G_q\alpha$ | Fosfolipasa C | Aumento IP_3 , DAG | α_1 -adrenérgico |
| $G_{o\alpha}$ | Fosfolipasa C | Aumento IP_3 , DAG | Acetilcolina de células endoteliales |
| G_{tA} | cGMP fosfodiesterasa | Disminución cGMP | Rodopsina de las células bastón |

La vía de señalización para BK se encuentra acoplada al sistema fosfolinositol- calcio. Inicia con el reconocimiento del ligando por el sitio activo produciendo diversos cambios conformacionales que desencadenarán la activación de la proteína G que como ya mencionamos se encuentra en la porción citoplasmática de la célula. Una vez activada esta proteína las subunidades α , β , γ que se encontraban unidas por GDP e inactivas se desacoplan por la acción del GTP creando 2 subunidades (Fig. 3). A consecuencia de dicha interacción, G_α cambia su conformación, se disocia el GDP y se adopta GTP, por lo que la proteína se encuentra activa. G_α se desplaza separándose del resto de subunidades aprovechando su independencia derivada de la posesión de anclas en la bicapa lipídica. Una vez dissociada este complejo G_α activara a su efector que en este caso es la fosfolipasa C que tendrá como destino final la hidrólisis de un fosfolípido de la membrana plasmática con la liberación de 2 productos uno hidrófobo, por lo que permanece en la membrana y otro hidrofílico, que se solubiliza en el citoplasma.^{22,23,24}

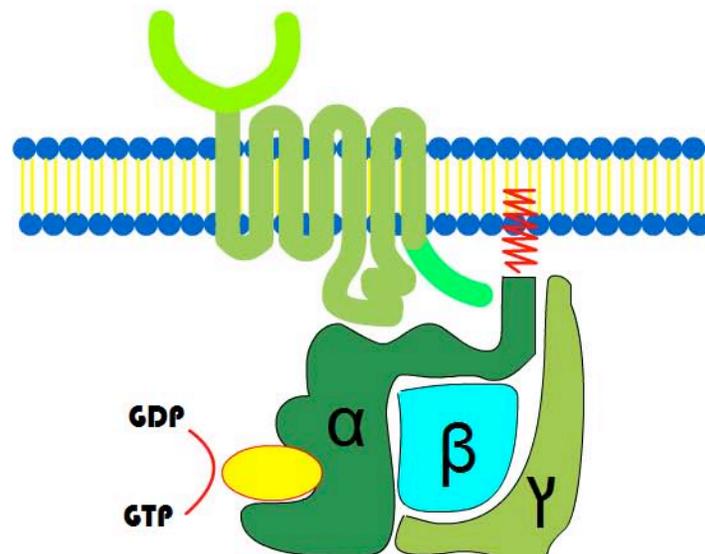


Fig. 3 Esquema del receptor serpentina acoplado a la proteína G que esta formada por 3 subunidades siendo estables cuando tiene unido el GDP

Una vez liberado inositol trifosfato al citoplasma este viajará hasta su sitio efector localizado en el retículo endoplasmático donde será reconocido por su receptor que desencadenará la liberación de calcio al citoplasma que tendrá como finalidad la activación de diversas proteínas como es el caso de PKC clasificada como serín/treonina cinasas, de las cuales se han caracterizado 12 isoformas que se encuentran agrupadas en 3 subfamilias; las convencionales integradas por PKC- α , - β I, - β II, y - γ , que requieren de calcio, diacilglicerol y fosfatidilserina para su activación; Nuevas integradas por PKC- δ , - ϵ , -

η , γ y θ , que requieren de diacilglicerol y fosfatidilserina pero no necesitan de calcio para ser activadas; las Atípicas, integradas por PKC- ζ and λ/ι , que requieren únicamente de fosfatidilserina para su activación.²⁵ Estas proteínas están implicadas en múltiples funciones biológicas como la desensibilización de receptores, en la modulación de la estructura de la membrana, regulación de la transcripción, respuesta inmune, crecimiento celular, aprendizaje y memoria. Estas funciones se consiguen mediante la fosforilación de PKC mediada de otras proteínas.²⁶ Esta proteína al momento de ser activada viajará a la membrana citoplasmática donde se unirá con el segundo producto de la hidrólisis del fosfolípido de la membrana Diacilglicerol que por su estructura hidrofóbica se quedará unido en a la membrana plasmática esperara la interacción con esta proteína recién activada para que pueda activar a otras proteínas como es el caso del factor de transcripción NF κ B que una vez activado viajará al núcleo donde se unirá al DNA para favorecer la transcripción de varios genes que darán origen a diversos mecanismos como la liberación de factores inflamatorios.²⁷ (Fig. 4)

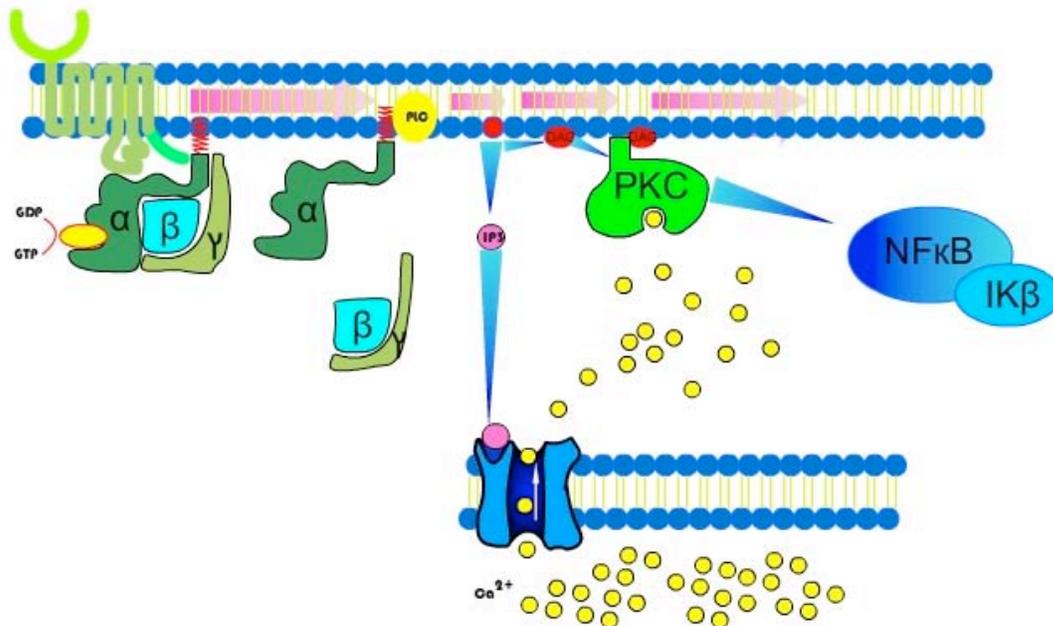


Fig. 4 Esquema del sistema fosfo-inositol calcio. que se inicia con la activación del receptor acoplado a una proteína G que desencadenara señales intracelulares para la liberación de calcio como segundo mensajero que activara proteínas como PKC y factores de transcripción como NF κ B

2.1.1.8 Antecedentes de Bradicinina en HGF

Los fibroblastos gingivales al ser células del tejido conectivo en donde se lleva a cabo procesos de inflamación presentan receptores para Bradicinina donde algunos reportes mencionan su detección por Inmunocitoquímica tanto en fibroblastos como células epiteliales, las glándulas submucosas, músculo liso, células del endotelio vascular y macrófagos.²⁸

Los receptores de Bk en algunos modelos experimentales se han determinado que juegan un papel importante en la señalización de diversos mecanismos como presión arterial elevada y cuando se bloquea el receptor B2 esta disminuye²⁹

La Bradicinina a pesar de ser un factor pro inflamatorio en los fibroblastos se ha demostrado que juega un papel importante en la proliferación celular, a través del receptor B2 y por la vía de señalización de las MAPKs. Ya que la tasa de proliferación aumenta con la presencia de Bk y cuando se inhibe al receptor B2 la proliferación disminuye³⁰

Así como Bk induce la proliferación de las células, existen procesos en los que aceleran los procesos inflamatorios como en la osteoartritis, por lo que se ha encontrado que el receptor implicado en la señalización intracelular es B2, ya que al bloquear a este receptor se ve disminuido el proceso degenerativo de la osteoartritis.³¹ En otros estudios se ha demostrado que Bk puede activar a diferentes proteínas citoplasmáticas, que están relacionadas con la producción de factores pro inflamatorios como COX-2 que está implicado en la producción de PGE₂, así mismo como la producción de otros mediadores como TNF- α ³²

Se ha visto que esta hormona al estar implicada en la proliferación celular, puede presentar un efecto de sinergia cuando se incubaba con otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico aumentando considerablemente el crecimiento.³³

La bradicinina también está implicada en procesos de cicatrización como se ha visto en los fibroblastos de ligamento periodontal, donde se crea una herida la cual presentaría un cierre más rápido en presencia de Bk.³⁴ Por otra parte en algunos otros modelos experimentales, se ha comprobado que la Bradicinina lleva a cabo procesos de angiogénesis, como es el caso de cardiomiocitos de ratón en donde se generaron momentos de hipoxia y al ser estimulados con Bk generaba se inicia la formación de nuevos vasos sanguíneos³⁵

Otros mecanismos descritos en HGF al ser estimulados con Bradicinina son su potente efecto inflamatorio, una retroalimentación del proceso inflamatorio que desencadena la

proteólisis de Bk, comprobándose con el aumento de la activación de la proteína citoplasmática COX-2, que darán lugar a la producción de Prostaglandinas, así como la producción de IL-8. Productos proteicos que serán liberados al espacio extracelular para desencadenar efectos en las células adyacentes.³⁶

Dentro de los procesos patológicos la Bradicinina también tiene efectos en el deterioro cognoscitivo. Se ha encontrado recientemente que se correlacionan con los cambios en las señales inflamatorias como el TNF- α y IL-1 β , siendo PKC una isoenzimas que regula los niveles de TNF- α , IL-6 y la liberación de otras Citocinas. Existen algunos estudios que tratan de explicar la relación de algunas proteínas citoplasmáticas que se activen como las MAPK en específico la fosforilación de Erk1 Erk2 en respuesta a los agonistas inflamatorios como lo es bradicinina, que activara las vías de PKC.³⁷

Otros efectos evaluados sobre la estimulación de Bk en células dendríticas inmaduras, han sido la maduración de estas células. Por lo que se ha descrito la relación que tiene esta hormona en el inicio de la inmunidad innata. Como se demuestra en modelos experimentales donde se bloquea la producción del receptor TLR-2 presentando infecciones en el tejido y al ser estimulados con Bradicinina el reconocimiento de patógenos aumenta al mismo tiempo que la producción de TLR-2.³⁸ Con todos estos datos se han dedicado a identificar la forma por el que Bk aumenta la expresión de los receptores toll-2 y 4 en músculo de tráquea. Encontrando una sobre activación de las vías de señalización de las MAPK como es JNK, p38 y ERK que al ser activadas darán el inicio a un proceso de transcripción para el aumento de los receptores tipo Toll.³⁹

2.1.2 Receptores Toll

La proteína Toll fue identificada como un componente esencial de la vía que establece el desarrollo dorso-ventral del embrión de *Drosophila melanogaster*. Dos investigadores Nüsslen- Volhard y Wieschaus Galardonados con el Premio Nobel por sus aportaciones en el estudio del desarrollo embrionario de *Drosophila*, estudiaron mutaciones letales que afectaban al desarrollo del cigoto de *Drosophila*. 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. Identificando el gen mutado y comprobaron que daba lugar a un receptor transmembranal que denominaron Toll. Este receptor activa también el factor de transcripción denominado⁴⁰ *Dorsal* (que es homólogo al factor de transcripción NF- κ B en vertebrados) al mediar la degradación de *Cactus*, una proteína represora de *Dorsal*. Una vez liberada de *Cactus*, *Dorsal* puede trastocarse al núcleo donde activa genes específicos, capaces de activar o reprimir la expresión de genes que intervienen en el desarrollo embrionario de *Drosophila*. Debido a la homología de Toll con el receptor de interleucina I (IL-1R) y a la conservación de los

canales de señalización en ambos sistemas, se propuso que Toll estaba involucrado en la regulación de la respuesta inmunitaria. Posteriormente, se descubrió que la proteína Toll tiene un papel central en la respuesta inmune de la *Drosophila* adulta y que la vía de señalización de Toll es necesaria para inducir la transcripción de un gen que da lugar a un péptido anti fúngico denominado drosomicina en respuesta a una infección por hongos. En estudios posteriores se observó que moscas adultas con mutaciones en el gen Toll eran incapaces de inducir la expresión del péptido drosomicina cuando eran infectados con *Aspergillus fumigatus*. Estos mutantes no eran susceptibles a infecciones bacterianas, lo que sugería que la respuesta antibacteriana y la respuesta anti fúngica seguían distintas vías de señalización.(Fig. 5)⁴¹

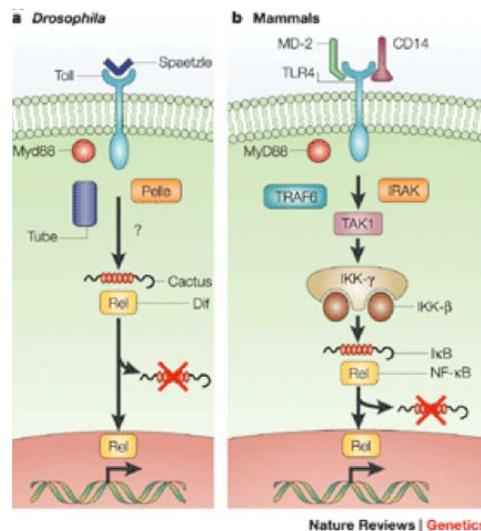


Fig. 5 Vías de señalización de los receptores TOLL y la comparación con Receptores semejantes a TOLL (Nature Reviews 2000) Pie de figura.

En la actualidad, en *Drosophila*, se han encontrado nueve miembros de la familia Toll entre los que se encuentran receptores capaces de reconocer componentes bacterianos como la proteína de la familia Toll presente en *Drosophila* denominada 18-Wheeler⁴². Poco tiempo después, mediante búsquedas en las bases de datos de identificadores de secuencias expresadas, y utilizando secuencias conservadas en el dominio de señalización de Toll/RIL1, se identificó un homólogo del receptor Toll de *Drosophila* en el humano.⁴³

2.1.2.1 Receptores Toll en Humanos

En los mamíferos, incluyendo al hombre, existe un sistema de receptores de reconocimiento de PAMPs que por su semejanza en estructura y función con el sistema Toll de *Drosophila* se denominan receptores semejantes a Toll. Tagushi en 1996 describió

el primer TLR en humanos, al que denominó TIL y que corresponde a TLR1⁴⁴. Medzhitov identificó la segunda molécula en 1999, la denominó Toll actualmente TLR4 y demostró que inducía la activación de factor nuclear kappa beta y la cascada de síntesis de Citocinas pro inflamatorias⁴⁵. La importancia de este descubrimiento fue la implicación de los TLR en la respuesta inmune innata en el humano. Hata el momento se han descrito 13 TLR en humanos, los cuales son proteínas transmembranal con un dominio extracelular de segmentos repetidos ricos en leucina, un dominio transmembranal y uno intracelular denominado TIR, el cual es similar al dominio intracelular del receptor de Interleucina1.⁴⁶

Los TLR se expresan tanto en tejido linfoide como no linfoide. El TLR 1 se expresa en monocitos, neutrófilos, células B y células NK. Los TLR2 en monocitos, neutrófilos y células dendríticas. TLR3 en células dendríticas. TLR4 en monocitos, neutrófilos, células dendríticas y endoteliales. TLR5 en monocitos y células dendríticas. El resto de TLRs se expresan fundamentalmente en monocitos y células dendríticas.⁴⁷

En los últimos años referencia, miembros de la familia TLR han sido clonados y su distribución en las distintas especies indica que el sistema de señalización de TLR está altamente conservado. Actualmente se han descrito once miembros de la familia TLR en mamíferos, su distribución en los distintos tejidos ha sido estudiada y se ha comprobado que una gran variedad de células expresan receptores similares a Toll de *Drosophila*, principalmente se encuentran presentes en células mieloides, miocitos cardiacos, células endoteliales y linfocitos T gamma/delta. Al estudiar los dominios extracelulares de las proteínas de la familia Toll se ha observado que son dominios muy divergentes. Comparando TLR2 y TLR4, su homología es del 24%, lo que explicaría su activación por distintos ligandos. Esta diferencia se hace patente también entre genes homólogos de diferentes especies, por ejemplo, el TLR4 de ratón presenta una homología del 53% con el TLR4 humano. A diferencia del dominio extracelular, el dominio citoplasmático esta bastante conservado a lo largo de la evolución, el TLR4 humano y del ratón presenta una homología del 83%.⁴⁸

Los TLR se encuentran clasificados como RRP, los cuales pueden activar vias de señalización que tiene como finalidad la producción y liberación de elementos antimicrobianos promoviendo así la inflamación (Tabla 2). La activación de los TLR expresados en células presentadoras de antígeno especializadas como las células dendríticas, desempeñan un papel crucial en la iniciación de respuestas inmunitarias adaptativas. La activación de los TLR provoca la expresión de péptidos antigénicos sobre su superficie celular, que están unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y activan células T específicas de antígeno.⁴⁹

Los péptidos propios expresados y presentados por las células presentadoras de antígenos no son reconocidos como extraños, porque las células T específicas para estos péptidos son eliminadas durante la selección negativa en el timo. De esta manera, la selección negativa y la inducción microbiana de moléculas co estimuladoras juntas, aseguran que la respuesta inmunitaria adaptativa sea generada contra patógenos infecciosos, pero no contra antígenos propios. Los TLRs se han especializado en el reconocimiento de diferentes PAMPs.⁵⁰

Referir la TABLA

Tabla 2 Clasificación de los TLR

| Receptor | Localización Genoma | Ligando | Origen de ligando | Adaptadora | Ubicación del receptor | Factor de Transcripción activado |
|----------|---------------------|--|---|-----------------------|------------------------|----------------------------------|
| TLR-1 | 4p14 | Lipopéptidos triaciles | Bacterias | MYD88 | Superficie celular | NFkB |
| TLR-2 | 4q32 | Glicolípidos lipopeptidos múltiples Lipoproteínas múltiples Ácido lipoteicoico Zymosan | Bacterias Bacterias Bacterias Bacterias Fungi | MYD88 | Superficie celular | NFkB |
| TLR-3 | 4q35 | ARN de doble cadena Poly:C | Virus | TRIF | Compartimiento celular | NFkB y C-JUN |
| TLR-4 | 9q32-33 | lipopolisacárido proteínas de choque térmico Fibrinógeno | Bacterias Bacterias Celulas hospedero | MyD88 TRIF TRAM | Superficie celular | NFkB |
| TLR-5 | 1q41-q42 | Flagelina | Bacterias | MYD88 | Superficie celular | NFkB y C-JUN |
| TLR-6 | 4p14 | lipopéptidos diaciles | Mycoplasma | MYD88 | Superficie celular | NFkB |
| TLR-7 | Xp22.3 | ARN de cadena simple | Virus | MYD88 | Compartimientos | Desconocido |
| TLR-8 | Xp22 | Compuestas sintéticas pequeñas; ARN de cadena simple | Virus | MYD88 | Compartimientos | Desconocido |
| TLR-9 | 3p21.3 | oligonucleótido ADN CpG no metilado | Bacterias | MYD88 | Compartimientos | Desconocido |
| TLR-10 | 4p14 | Desconocido | Hongos | MYD88 | Superficie celular | Desconocido |
| TLR-11 | Desconocido | Ácido hialurónico | Toxoplasma gondii | MYD88 | Compartimientos | Desconocido |
| TLR-12 | Desconocido | Desconocido | Desconocido | Desconocido | Desconocido | Desconocido |

2.1.2.2 Estructura de los TLR

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

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 LRR conduce al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.^{51,52}

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. 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 adaptadoras⁵³ (Fig.6).

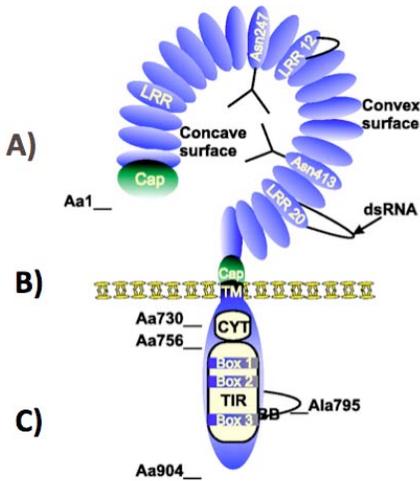
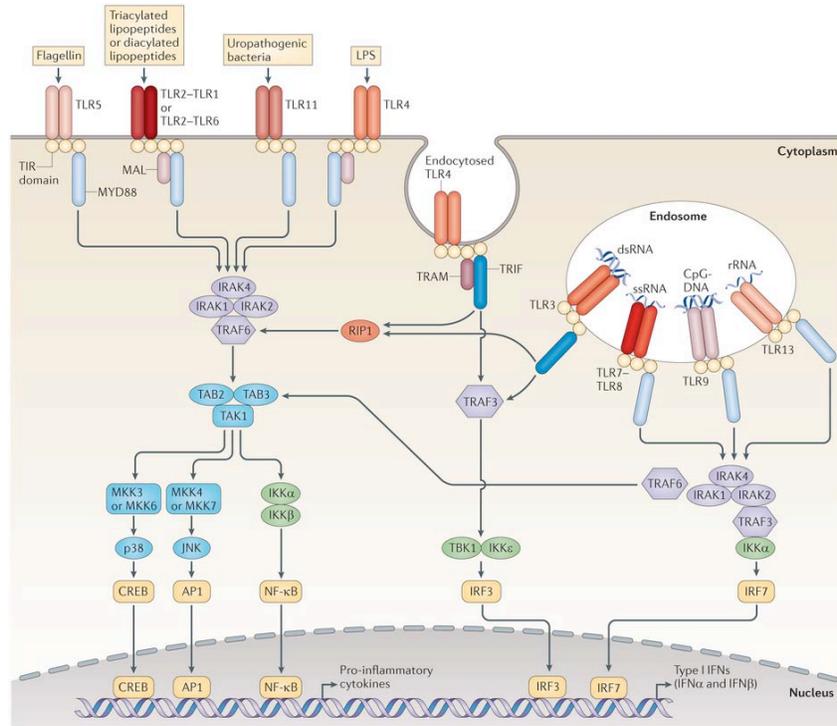


Fig.6 Estructura molecular de los TRL. A: Dominio extracelular rico en motivos de leucina (LRR), B: Dominio transmembranal, C: Dominio intracelular homologo al receptor de IL/Toll (TIR)

2.1.2.3. Señalización de los TLR

Una vez que el ligando es reconocido por el TLR este sufre un cambio conformacional reclutando en su dominio TIR proteínas adaptadoras siendo las responsables de iniciar la señalización intracelulares, las cuales están integradas MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM y SARM.^{54,55} MYD88 presente en la mayoría de los TLR a excepción del TLR-3 ya que presenta a TRIF al igual que TLR-4, pero este último presenta también a MYD88.⁵⁶(Fig. 7) Esta ultima proteína adaptadora de TLR desencadena señales intracelulares que conllevan a la activación de algunas vías de señalización como la familia de Mitógeno Activado por Proteína Kinasa (MAPK) dentro de las que encontramos a los miembros JNK, p38 y ERK por la vía de IL-1R asociado a Kinasa (IRAK), que activara a los factores de transcripción NFkB y AP1 los que darán lugar al inicio de la expresión de citosinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β y IL-12.⁵⁷



Nature Reviews | Immunology

Fig. 7 Esquema de los diferentes tipos de receptores semejantes a Toll y su señalización donde muestra que existe la dependiente de MYD88 o independiente de esta proteína adaptadora The history of Toll-like receptors redefining innate immunity

La finalidad de los TLR es el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) siendo molecularmente distintos desde lipopéptidos bacterianos, ácido lipoteicoico, LPS, y oligonucleótidos como CpG DNA, pequeños RNA, entre otros, pero hasta el momento no se han identificado los ligando naturales para los TLR10, TLR-12 y TLR-13.⁵⁸ Evolutivamente los patógenos han cambiado sus estructuras y mecanismo de invasión para evadir la respuesta inmune, por lo que los TLR para ser más eficientes ante el reconocimiento de los PAMPs se unen formando homodímeros o heterodímeros, como es el caso de TLR-2 de ser funcionalmente activo como monómero, ha evolucionado para formar heterodímeros con TLR-1 y TLR-6. Aumentando tanto la posibilidad de reconocimiento de moléculas atípicas como es el caso del periodonto patógeno, *Porphyromonas gingivalis* que presenta un LPS que puede ser reconocido tanto por TLR-2 como TLR-4.⁵⁹ Una vez que el ligando fue reconocido por su receptor se presentan cambios conformacionales que inducirán el reclutamiento de las proteínas adaptadoras que desencadenan señales diferentes en base a la proteína activada. Como es el caso del TLR-4 que necesita la activación de MAL para poder reclutar a MYD88 y MAL tiene un

dominio de unión a fosfatidilinositol -4, 5- bifosfato que se localiza en la membrana plasmática, donde interactúa con TLR. MYD88 es presumiblemente recluido por MAL después de la activación de TLR4 por LPS, pero hay que recordar que este receptor presenta tanto a MYD88 como a TRIF, por lo que para reclutar a TRIF es necesario activar a TRAM, siendo estas dos vías independientes la una de la otra^{60 61}

Se han manejado diversos modelos en los que se trata de dilucidar la formación de los complejos diméricos de los TLR, explicando desde que los ligando inducen la formación de estos dímeros, así como las moléculas adaptadoras en interacción con otras proteínas como fosfo-inositol trifosfato cinasa (PI3K) que presenta dominios de unión con las proteínas adaptadoras como Mal y esta a su vez con MYD88 presente en TLR2 donde se podrá formar el complejo TLR2/6.⁶²

2.1.2.4 TLR 1

El TLR-1 también conocido como CD281 es un receptor transmembranal de tipo 1 esta constituido por de 786 aminoácidos. El receptor TLR-1 se presenta como en 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. El TLR1 se localiza en el cromosoma 4p14 entre la region codificante del TLR6 y TLR10 (Fig. 8). Este receptor distingue lipopéptidos de bacterias y micobacterias. La identificación de los ligando para este receptor se descubrieron utilizando macrófagos de ratones deficientes en TLR1, observaron que estas células mostraban incapacidad para producir citocinas pro inflamatorias al exponerse a lipoproteínas y lipopéptidos triacilados, mientras que las mismas células produjeron citocinas normalmente al exponerse a lipopéptidos diacilados, así como factores solubles de *Neisseria meningitidis*⁶³. TLR1 principal mente funciona asociandose con TLR2 para reconocer la configuración lipídica de las lipoproteínas de micobacterias y tiene una homología alta con TLR6. Por lo tanto en momentos donde las celulas se encuantran carentes de TLR1 el TLR6 puede asociarse con TLR2 para cubrir la funcion de dicho receptor. Se a demostrado que TLR1 reconoce la lipoproteína de la superficie externa de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, el agente causal de la enfermedad zoonótica de Lyme, que es transmitida a animales y humanos por garrapatas del género *Ixodes*⁶⁴

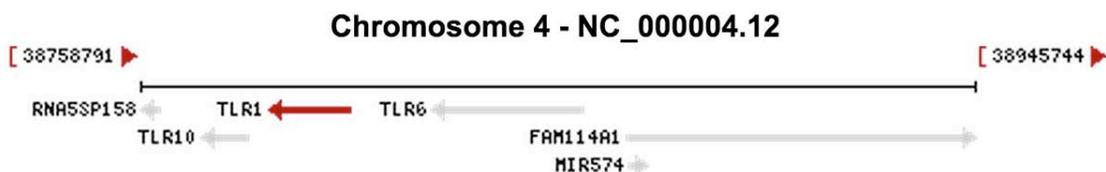


Fig. 8 Esquema del cromosoma 4 en el genoma del Humano donde se puede localizar la cercanía con el receptor TLR6 (Data Bank Gen Pubmed)

2.1.2.5 TLR2 Justificar y tipo de letra. Redacción

El receptor TLR2 esta constituido por 784 amino ácidos y es conocido como CD282. Este receptor esta codificado en el cromosoma 4 región q32. (Fig. 9) El receptor TLR-2 se presenta con 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. Este receptor reconoce diferentes productos bacterianos como lipoproteínas de bacterias Gram-negativas, peptidoglicanos de bacterias Gram positivas, ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, lipoarabinomanano de mico bacterias, como el *Micobacterium tuberculosis* una modulina soluble en fenol de *Staphylococcus epidermidis*, glicoinositolfosfolípidos de *Trypanosoma cruzi*, glicolípidos de *Treponema maltophilum*, porinas de *Neisseria*, y zymosan de hongos. El TLR2 también reconoce Lipopolisacárido (LPS) atípico de *Leptospira interrogans*, y LPS atípico de *Porphyromonas gingivalis*, que sugiere que TLR2 tiene capacidad específica de reconocimiento de los LPS de forma cilíndrica que inducen la producción de citoquinas. TLR2 reconoce la proteína 70 de choque térmico (HSP70) del hospedero, y como se habia mencionado en el parrafo anterior este receptor se asocia con otros TLRs incluyendo TLR 1 y TLR 6, e inicia la activación de genes característicos de una respuesta de tipo Th2. ⁶⁵

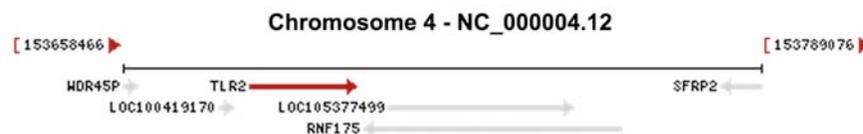


Fig. 9 Esquema de la región codificante para el TLR2 dentro del cromosoma 4 en Humanos (Data Bank Gen Pubmed)

2.1.2.6 TLR 6

El receptor TLR 6 esta constituido por 796 amino ácidos y es conocido como CD282. Este receptor esta codificado en el cromosoma 4 región q32 (Fig. 10). El receptor TLR-2 se presenta con 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. El TLR6 de humano tiene 69% de identidad con TLR1. Mientras que TLR2 reconoce lipoproteínas bacterianas triacetiladas, TLR6 reconoce sólo lipoproteínas diacetiladas como las producidas por micoplasmas, que son potentes activadores de macrófagos. TLR6 actúa de

manera sinérgica con TLR2 para reconocer peptidoglicanos, que son componentes de bacterias Gram positivas.⁶⁶

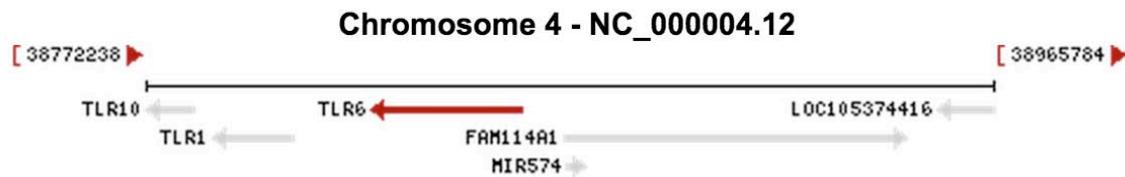


Fig. 10 Esquema de la región codificante para el TLR6 dentro del cromosoma 4 en Humanos (Data Bank Gen Pubmed)

2.1.2.7 Heterodimeros

Los Humanos presentan una familia de TLR comprendida por 13 integrantes que se expresan tanto en leucocitos hasta en células epiteliales y en mucosas.^{67, 68, 69} En relación al rol en la inmunidad innata los monocitos/ macrófagos expresan la mayoría de los receptores y en las células dendríticas se expresan algunos tipos en base al subtipo.^{70, 71}

Dentro de los ligandos presentes en los microorganismos se encuentran diversas estructuras, por lo tanto los TLR son diferentes. Por ejemplo TLR 3, 7, 8, y 9 colectivamente responden ante la presencia de ácidos nucleicos de bacterias y virus, expresándose en el interior de las células y desencadenando la expresión de tipo-1 IFNs que tiene actividad viral^{72, 73}. En contraste los TLR 1, 2, 4, 5, y 6 se expresan en la membrana citoplasmática para reconocer bacterias hongos y protozoarios. Sin embargo los TLR en su mayoría inician la señalización al interior en forma de homodimeros. Pero la presencia de variaciones en los PAMPs a inducido que las células creen Heterodimeros como es el caso de TLR2 que requiere de TLR1 o TLR6 para su actividad.⁷⁴

La interacción de TLR1/2 y TLR2/6 ayuda a discriminar las diferencias microbianas que presentan evolutivamente las bacterias como es el caso de lipoproteínas, ácidos lipoteicoicos, LPSs, fosfolipomanosas, fosfatidilinositol, mycobacterias⁷⁵ (Fig. 11). El reconocimiento de moléculas en la superficie inducen la activación de señales intracelulares que conllevarán a la activación de factores de transcripción como NF-κB, AP-1, que inducirán la producción de factores proinflamatorios, citoquinas, y moléculas de adhesión⁷⁶

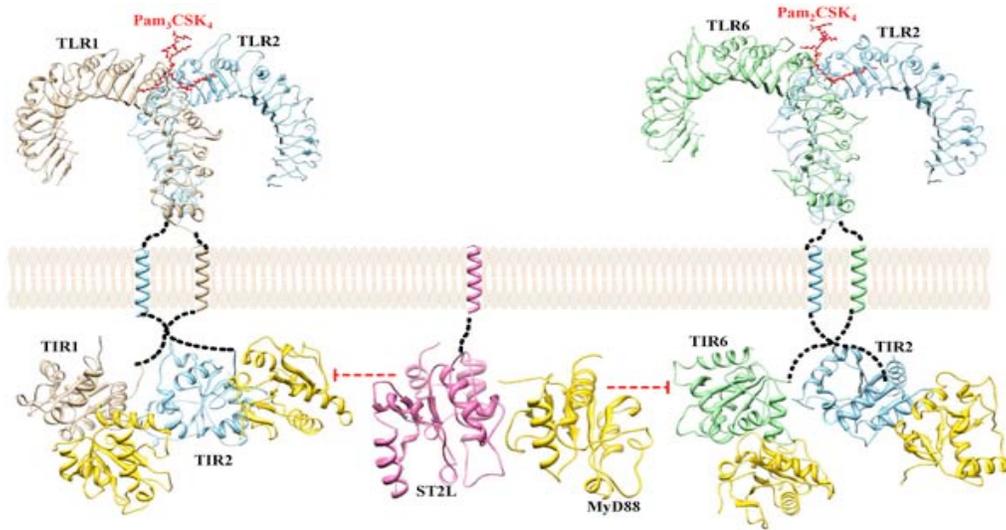


Fig. 11 Esquema representativo de las interacciones de TLR2 con TLR1 y TLR6 (Guan Y, 2010)

La cercanía de la region codificante de TLR1, TLR6, y TLR10 a demostrado que sean muy parecidos, por lo que se a demostrado que el TLR2 tambien puede crear heterodimeros con TLR10 donde presentara una señalizacion muy similar a la de TLR1 por acoplamiento de MYDD88.⁷⁷

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar el efecto de Bradicinina sobre la expresión de los receptores tipo Toll-1 y -6

3.2 Objetivos específicos

- 1.-Determinar el efecto de la Bradicinina sobre la expresión de TLR-1
- 2.- Determinar el efecto de la Bradicinina sobre la expresión del TLR-6
- 3.- Caracterizar la vía de señalización involucrada en la expresión de TLR1 o TLR6.
- 4.- Determinar el efecto de la Bradicinina sobre la formación de los heterodímeros TLR 2/6 y 1/2

4. Hipótesis

Si la Bradicinina se libera en respuesta a factores promotores de la inflamación entonces esta hormona participara en la regulación y expresión de las moléculas que provocaron la respuesta inflamatoria inicial como son los receptores semejantes a Toll 1 y 6.

5. Material y Métodos

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-1, TLR-2, TLR-6 y γ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology), oligodeoxinucleótidos (Invitrogen) del receptor TLR-1 (5'CGTAAACTGGAAGCTTTGCAAGA-3') en sentido codificante y (5'CCTGGGCCATTCCAATAAGTCC-3') en sentido anti codificante, para TLR-2 (5`GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG3`) Sentido codificante y (3`TTG AAG TTC TCC AGC TCCTG5`) sentido anti-codificante (tamaño 347 pb); para TLR-6 (5'-ACTGACCTTCCTGGATGTGG -3') en sentido codificante y (TGGCACACCATCCTGAGATA-3') sentido anti codificante. Y como control se utilizo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3') en sentido codificante y (5'-AGATCCACAACGGATACATT-3') en Sentido anti codificante con tamaño de 510pb, Inhibidores, 2-(2-Amino-3- metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona (PD98059), (4-(4-Fluorofenil)-2-(4- metilsulfinilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol] (SB203580),1,8-Pirasolantrona (SP600125) , [(2R)-1-[3,10-dihidroxi-12-[(2R)-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]-1H-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), 1,7- 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)

5.1 Cultivo Celular.

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron de una muestra de tejido sano de pacientes que acudieron a la clínica de exodoncia. Para la obtención de la muestra se solicito el consentimiento informado de cada paciente (ISO/BQ-LIFO-RE-001).

Dentro de los criterios de inclusión, exclusión y eliminación. La encía donadora obtenida se encontraba libre de inflamación, sangrado y cualquier otra patología tanto local como sistémica del paciente. El tejido gingival que se obtuvo de la parte distal del 3° molar, se corto quirúrgicamente del maxilar y posterior a la remoción se lavo por 6 ocasiones con solución de Hank (In vitrogen) suplementado con penicilina/ estreptomycin/ fungizona (In vitrogen). El tejido gingival se fracciono de 1 a 2 mm y para ser colocados en tubos clínicos con 1 ml de tripsina por 15 min para su digestión, la muestra se centrifugo por 5 min y se elimino el sobrenadante para posterior ser re suspendida en medio DMEM para ser sembradas en cajas con medio Eagle modificado por Dulbecco (In vitrogen) suplementado con 2mM L-glutamina (In vitrogen), penicilina / estreptomycin / fungizona (In vitrogen) 100 u/ml, 100 µg/ml y 1 mg/ml respectivamente y 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. El explante se incubo a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. El cultivo celular se cambio cada 3 días hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80%. Las células que se utilizaron fueron entre los pases 5 a 7.

5.2 Ensayo RT-PCR.

El RNA total se aisló de los fibroblastos gingivales humanos usando el método de Chomczynski y Sacchi (25,26). El RNA total (1ug) se retro transcripto (RT) usando el equipo One Step RT-PCR (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizo utilizando los oligonucleótidos para TLR-1 (5'CGTAAACTGGAAGCTTTGCAAGA-3') en sentido codificante y (5'CCTTGGCCATTCAAATAAGTCC-3') en sentido anti codificante, para TLR-2 (5'GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG3') Sentido codificante y (3'TTG AAG TTC TCC AGC TCCTG5') sentido anti codificante (tamaño 347 pb); para TLR-6 (5'-ACTGACCTTCTGGATGTGG -3') en sentido codificante y (TGGCACACCATCCTGAGATA-3') sentido anti codificante. Y como control se utilizo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3') en sentido codificante y (5'-AGATCCACAACGGATACATT-3') en Sentido anti codificante con tamaño de 510pb. 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 y una banda sencilla de 309 pares de bases para GADPH. La identidad del fragmento se caracterizo por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se realizaron tres experimentos por separado de cada tratamiento.

5.3 Ensayo de Western Blot

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^6 células/pozo) se crecieron en cajas de 6 pozos. Después del estímulo el medio se retiro y las células se desprendieron ayudados con gendarme en buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio, la muestra

se centrifugo a 5,000 rpm durante 10 minutos y la pastilla se colocó con 20 µl de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio), todos estos reactivos de Sigma Chemical Co. La muestra se sonicó por 30 segundos en un baño con hielo. Para el ensayo de Western se utilizaron 50 µg de proteína que se mezcló 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; (todos los reactivos de Sigma Chemical Co.), la muestra se cargó en un gel al 10% SDS-PAGE y se corrió a 40V por 2 h. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) por 1 hr a 16 Volts. Para verificar que se colocó igual concentración de proteína, las membranas se desnudaron y se colocaron anticuerpos para proteínas totales. Posteriormente la membrana se bloquearon con 150 mM NaCl, 100mM Tris- HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de suero albúmina de bovino por 1 hr, se lavó y se incubó con los anticuerpo primario, dentro de los que ocupamos a γ tubulina, TLR-2, TLR-1, TLR-6 policlonales (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con TBST, para ser incubados durante 2 hr con el anticuerpo secundario, anti-cabra IgG (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Invitrogen) y la auto radiografía se obtuvo después de exponer la película durante 7 min. Los experimentos se realizaron en 3 ocasiones por separado. Las muestras se capturaron con el sistema DigiDocit y se analizaron con el sistema digital Labs-Works

5.4 Ensayo de Inmunoprecipitación

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^6 células/pozo) se crecieron en cajas de 6 pozos. Después del estímulo el medio se eliminó y las células se desprendieron con la ayuda de gendarmes en buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio, la muestra se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10' y la pastilla se colocaron con 50 µl de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio), todos estos reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. La muestra se sonicó (1s x 30) en un baño con hielo. Posterior al lisado la muestra se cuantificó por medio del método de Bradford. Posteriormente, una cantidad equivalente de proteínas fue usada para la Inmunoprecipitación.

El lisado celular se incubó con sueros normales de ratón y/o conejo, para reducir la inespecificidad, por 15 minutos a 4°C con rotación. Posteriormente la muestra se incubó con proteínas A/G agarosa por 1 hora, para reducir la inespecificidad, se centrifugaron a 15000 rpm, 4°C por 15 minutos. El sobrenadante se incubó toda la noche con el

anticuerpo específico, y el complejo antígeno-anticuerpo se incubó con una solución de proteínas A/G agarosa y se centrifugó a 15000 rpm, 4°C por 15 minutos. Luego la columna de agarosa se lavó 4 veces con LDB conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas. Para eluir las proteínas inmunoprecipitadas de la columna de agarosa, esta se incubó con el buffer de muestra conteniendo SDS y β-mercapto etanol, para ser desnaturalizadas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, las proteínas eluidas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida más SDS al 8% y transferidas a una membrana de PVDF para seguir el procedimiento de Western Blot.

5.5 Ensayo de Citometría de flujo

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^6 células/pozo) se crecieron en cajas de 6 pozos. Después del estímulo el medio se eliminó y las células se desprendieron con la ayuda de tripsina que se colocó por 2 minutos, posterior a esto se adicionó 1 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SBF. Posteriormente se recolectó la muestra en un tubo eppendorf, se centrifugaron a 15000 rpm a una temperatura de 4°C por 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se re-suspendió en PBS para realizar 3 lavados. Posteriormente se toma la cantidad necesaria para tener 1×10^6 células por mililitro, las células se incubaron en presencia de los anticuerpos a una dilución de 1:20 por un tiempo de 15 min a 37°C en la incubadora. Posterior a la incubación se realizaron 3 lavados para la eliminación de las uniones inespecíficas y proceder a la incubación con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:10 por un tiempo de 15 min a 37°C. Finalmente las muestras se lavaron en 2 ocasiones con PBS y se terminó con la lectura en el Citómetro de Flujo

5.6 Silenciamiento con Si RNA

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^6 células/pozo) se crecieron en cajas de 6 pozos. Hasta alcanzar una confluencia del 80%. Se siguió el protocolo de transfección establecido por SantaCruz que es el que describe adelante. Se prepararon las siguientes soluciones A : Para cada transfección, se diluyó 7 µl del dúplex de siARN en 100 µl de Medio de Transfección. Solución B: Para cada transfección, diluir 7 µl de Reactivo de Transfección de siARN en 100 µl de Medio de transfección de siARN. Se añadió la solución de dúplex siARN (Solución A) directamente al Reactivo de Transfección diluido (solución B) utilizando una pipeta. Se mezcló suavemente arriba y abajo pipeteando e incubando la mezcla 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las células con 2 ml de medio de transfección de siARN. Para cada transfección, se añadió 0.8 ml de Medio de Transfección de siARN a cada tubo con la mezcla de Reactivo de Transfección de siARN (Solución A + Solución B). Se mezcló suavemente hasta cubrir las células lavadas con la mezcla. Incubando las células 5–7 horas a 37° C en la incubadora de CO₂. Transcurrido el

tiempo se añadió 1 ml de medio de crecimiento normal, que contenga 2 veces la concentración normal de suero y antibióticos (2x medio de crecimiento normal), sin retirar la mezcla de transfección. Se incubaron las células por 24 hr, una vez concluido el tiempo se eliminó el medio y reemplazó por medio fresco con 10% de SBF para concluir con el tratamiento indicado del experimento

5.7 Ensayo de Inmunofluorescencia

Las células se crecieron en cubreobjetos hasta tener una confluencia del 80%. Una vez obtenida esta confluencia se trataron con Bradicinina a diferentes dosis y tiempos. Al término las células se fijaron por 30 minutos con 2% de paraformaldehído en PBS a 4°C y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Posteriormente se permeabilizó durante 5 minutos con Tritón 0.1% en PBS, para ser lavadas durante 3 ocasiones con PBS. Para la visualización de TLR1, TLR2, TLR6, las células se trataron durante 1 hr con el anticuerpo primario diluidos 1:100 en PBS, posteriormente se realizó los lavados en cinco ocasiones con PBS. Posterior a los lavados las células se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo secundario anti-cabra IgG acoplado a fluoresceína (Santa Cruz Biotechnology) se utilizaron en dilución 1:100 en PBS. Las muestras se montaron en DABCO y se observaron por microscopia confocal. Los experimentos se repitieron en tres ocasiones por separado.

5.8 Análisis Estadístico.

Los datos se expresan como la media \pm S.E.M de 3 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias significativas se determinaron por con prueba T de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$

6.-Resultados

6.1 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión génica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos

Con el propósito de evaluar el efecto de Bradicinina sobre la expresión de los receptores semejantes a Toll 1 y 6 se realizó el ensayo de RT-PCR para determinar la expresión a nivel génico. Los resultados demostraron que Bradicinina incrementa la expresión de TLR-1 y -6 de manera dependiente del tiempo encontrando una expresión máxima a las 2 horas y decaer a las 4 horas. Siendo estos tiempos muy amplios se decidió realizar experimento a tiempos mas cortos. (Fig. 12)

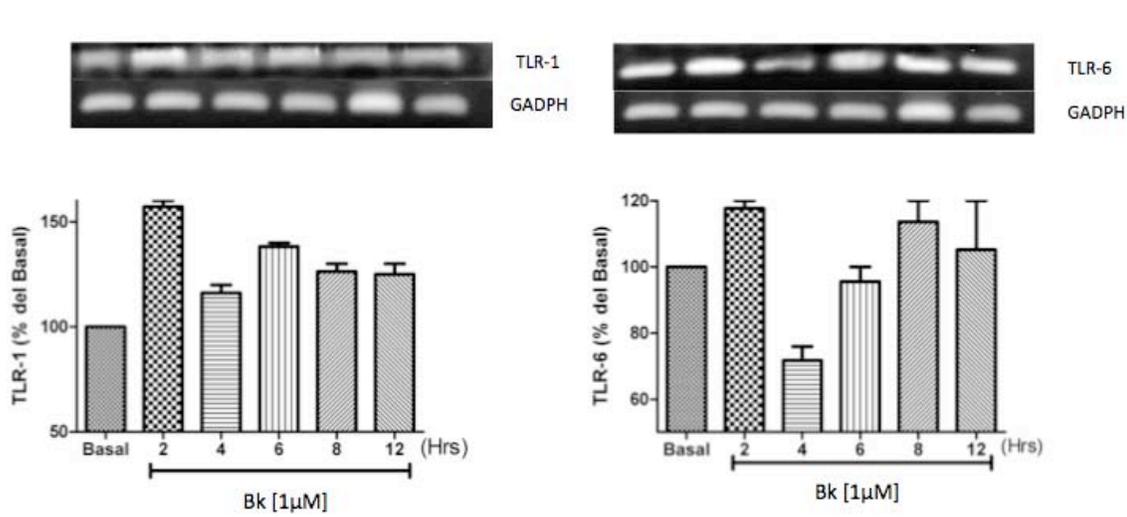


Fig. 12 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión génica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se trataron a dosis fija de Bradicinina de [1μM] a tiempos crecientes de (2, 4, 6, 8, 12 horas). Después de la incubación se extrajo el RNA y se procedió a realizar ensayo de RT-PCR como se describe en 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. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una $p < 0.05$ comparados contra el basal

6.2 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos a nivel transcripcional.

En base a los datos obtenidos en el experimento pasado se decidió evaluar el efecto de Bradicinina sobre la expresión de los receptores semejantes a Toll 1 y 6 a tiempos mas cortos(0, 30, 60,120, 180, 240 minutos) por ensayo de RT-PCR para determinar la expresión a nivel génico. Los resultados muestran que Bradicinina incrementa la expresión de TLR-1 con una máxima expresión a un tiempo de 1 hora que posterior a este tiempo decrece. Por otra parte el receptor TLR-6 muestra una máxima expresión a un tiempo de 30 min para decrecer(Fig.13). En base a estos tiempos de máxima expresión se realizaron los siguientes ensayos

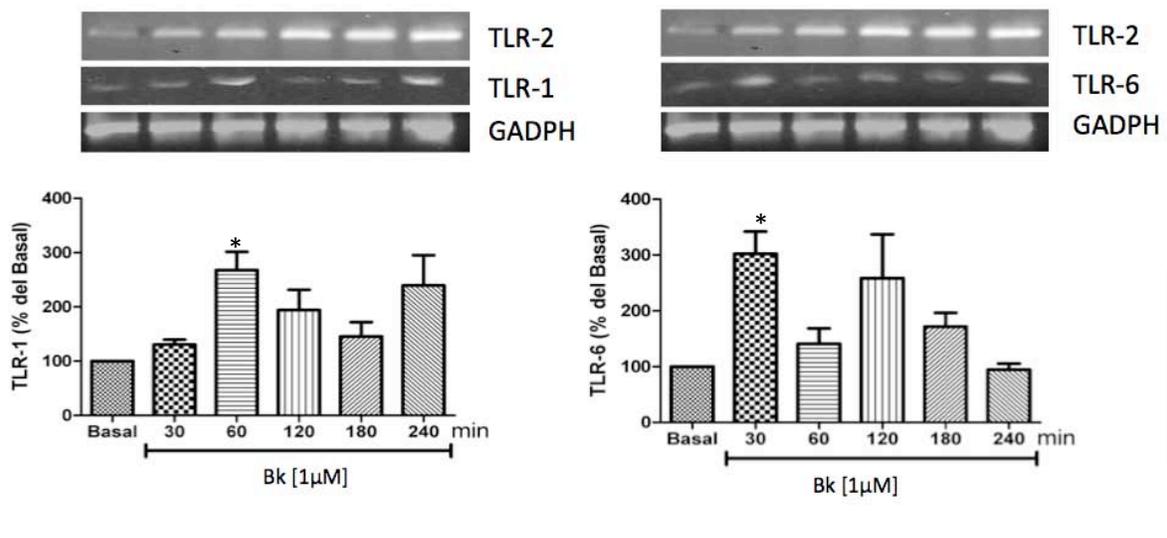


Fig. 13 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos a nivel transcripcional. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se trataron a dosis fija de Bradicinina de [1 μ M] a tiempos crecientes de (0, 30, 60, 120, 180, 240 minutos). Después de la incubación se extrajo el RNA y se procedió a realizar ensayo de RT-PCR como se describe en 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. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una $p < 0.05$ comparados contra el basal

6.3 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos.

Una vez que el receptor se expresa a nivel transcripcional, este será traducido a proteína por lo que se evaluó la expresión de los receptores semejantes a Toll -1 y -6 a nivel traduccional por ensayo de Western Blot. Los resultados muestran que Bradicinina incrementa la expresión de TLR-1 y -6 de manera dependiente del tiempo encontrando una expresión máxima a las 16 horas y posteriormente decaer. (Fig.14)

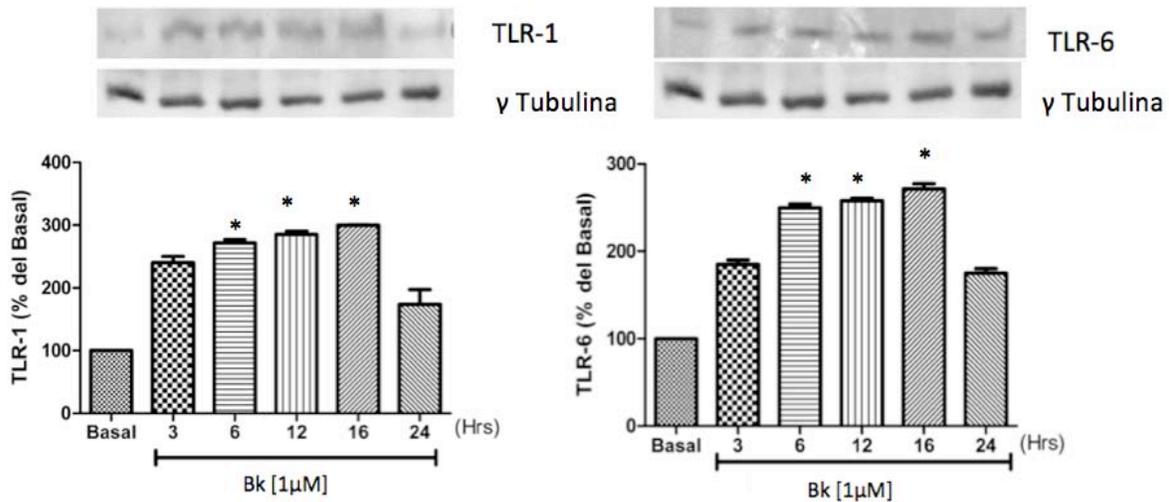


Fig.14 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se trataron a dosis fija de Bradicinina de [1μM] a tiempos crecientes de (0, 3, 6, 12, 16, 24 Horas). Después de la incubación se extrajo la proteína total de las células y se procedió a realizar ensayo de Western Blot como se describe en 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. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una $p < 0.05$ comparados contra el basal

6.4 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 en Fibroblastos Gingivales Humanos

Una vez demostrado que Bradicinina aumenta la expresión de TLR -1 y -6 tanto a nivel transcripcional como traduccional. Los TLR necesitan estar presentes en la membrana plasmática para ser funcionales. Por lo que se decidió evaluar la expresión de estos receptores por Citometría de flujo. En los resultados se encontró un desplazamiento en la expresión de TLR-1 cuando se tratan con Bradicinina a una concentración de $1\mu\text{M}$. Sugiriendo que Bradicinina aumenta la expresión la expresión de TLR1 en comparación con el grupo control. (Fig.15)

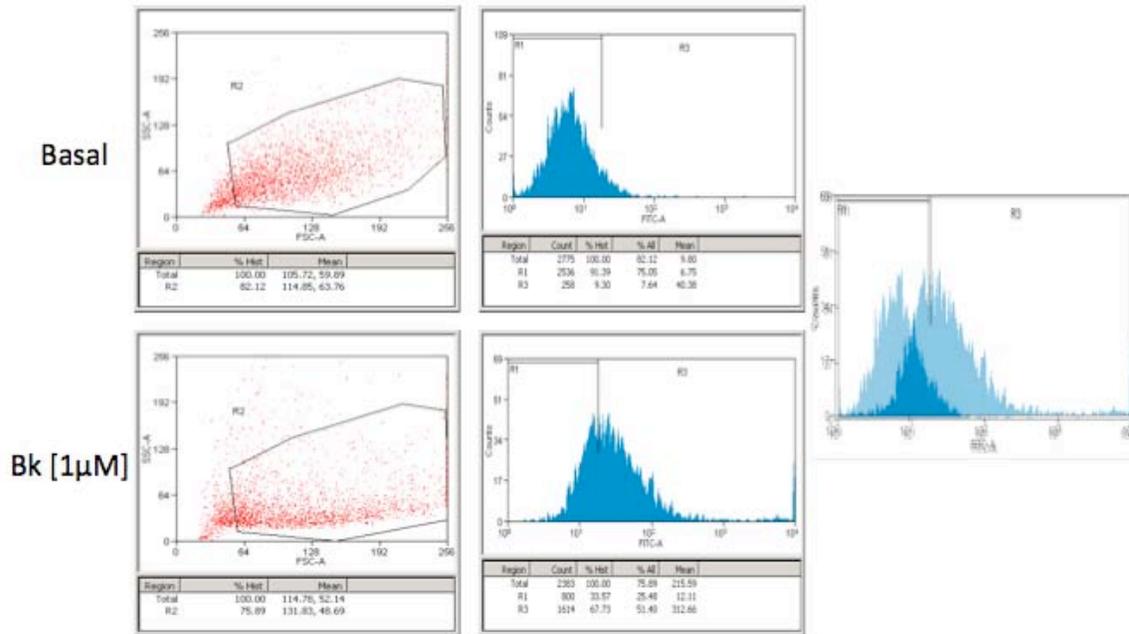
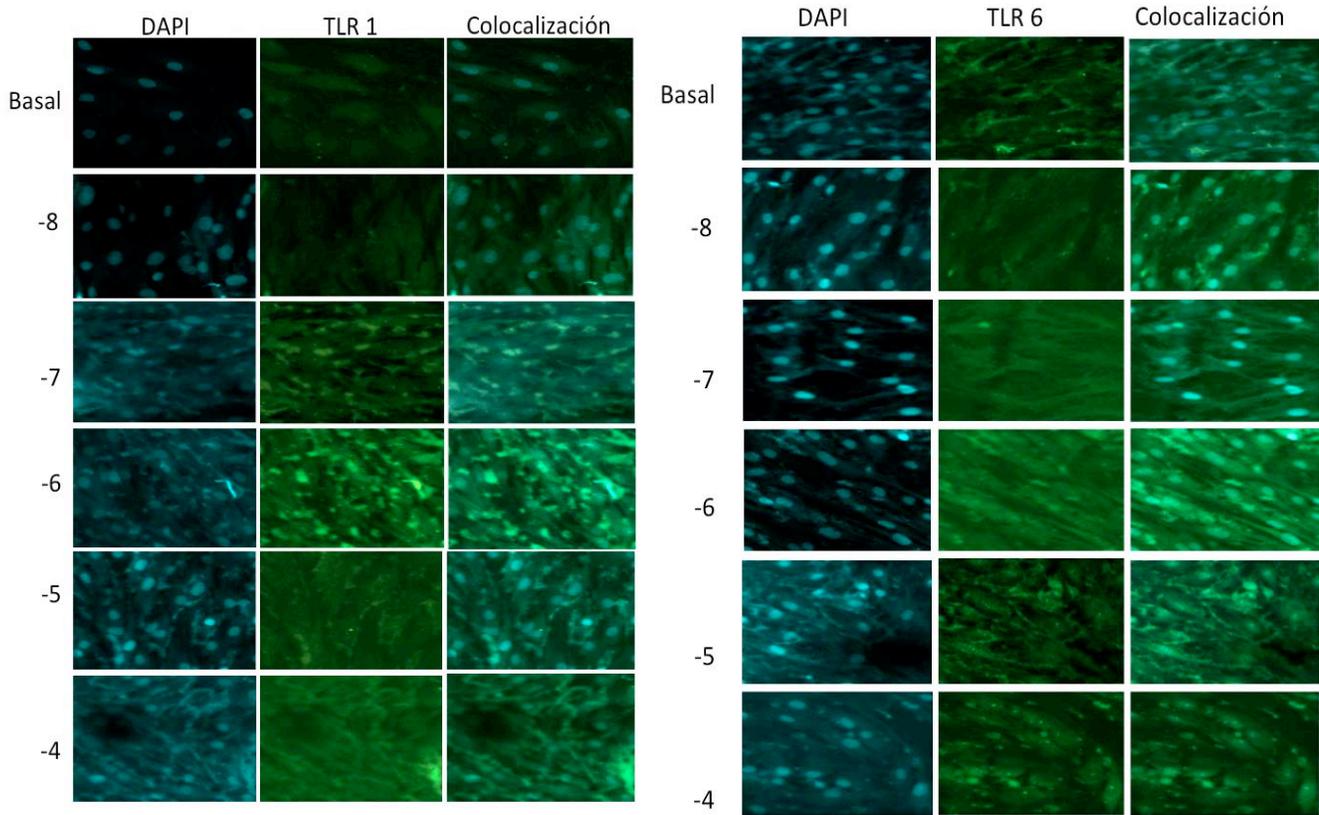


Fig. 15 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 en Fibroblastos Gingivales Humanos. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se trataron a dosis fija de Bradicinina de $[1\mu\text{M}]$ por 16 horas. Después de la incubación e procedió a realizar ensayo de Citometría de Flujo como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado.

6.5 Efecto de la Bradicinina sobre la localización del TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos

La expresión de los TLR por medio de ensayo de Citometría de flujo nos otorgaron datos del aumento en la expresión de TLR-1 ante un estímulo de Bradicinina. Pero los receptores TLR como se a mencionado forman heterodímeros con el TLR-2 por lo que se decidió evaluar por ensayo de Inmunofluorescencia la expresión de TLR-1, TLR-6 y la formación de los Heterodímeros TLR1/2 y TLR2/6. Encontrando que Bradicinina aumenta la expresión de manera dosis dependiente con una máxima expresión a una concentración de 1 μ M en los TLR-1, -2, -6 y la formación de dichos Heterodímeros. Esto nos sugiere que Bradicinina aumenta la expresión de estos receptores de forma individual así como en complejos, con la finalidad de aumentar la respuesta inmune. (Fig.16)



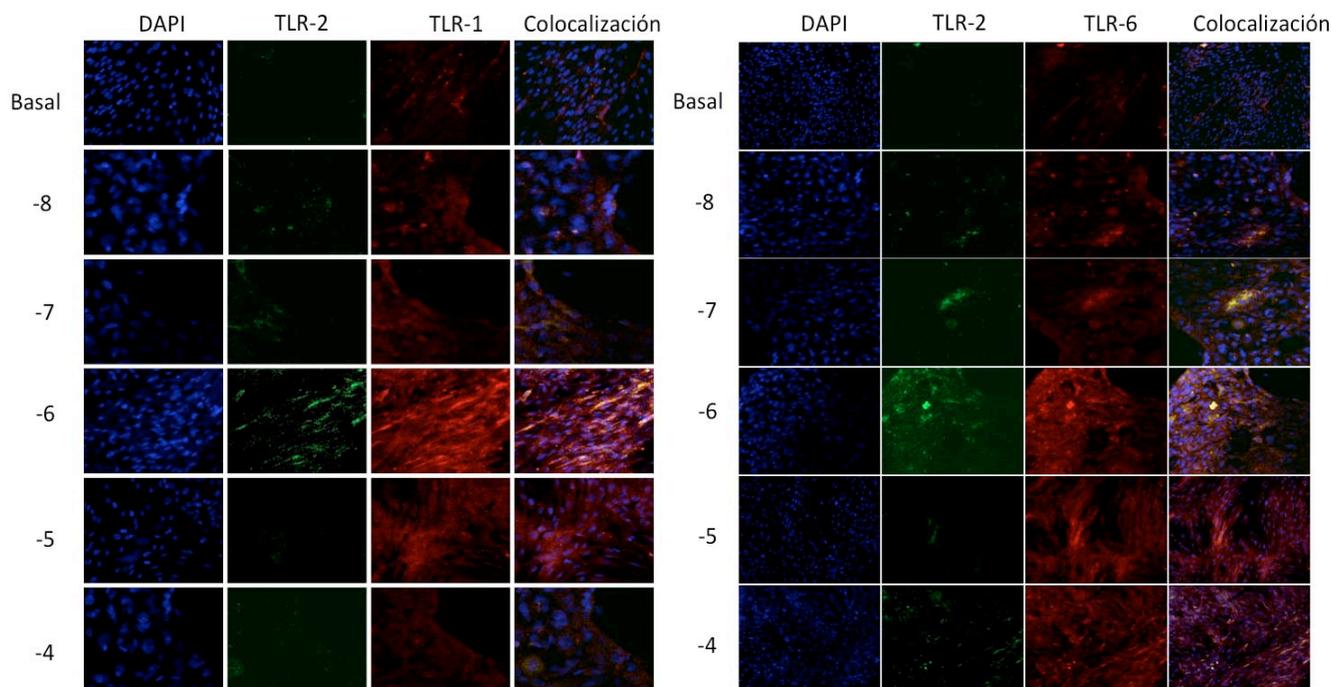


Fig.16 Efecto de la Bradicinina sobre la expresión proteica de TLR-1 y -6 en Fibroblastos Gingivales Humanos. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 24 pozos sobre cubreobjetos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se trataron a dosis crecientes de Bradicinina y a un tiempos establecido de 16 Hr. Después de la incubación las células se procesaron por ensayo de como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado.

6.6 Efecto de la Bradicinina sobre la formación de interacción proteica del TLR-2 con TLR-1 y TLR-6 en Fibroblastos Gingivales Humanos.

Con base a los resultados obtenidos en la Inmunofluorescencia encontrando que TLR-1, -2, -6 se colocalizan. Para demostrar estos datos con otra metodología, se decidió evaluar la interacción de TLR-2 con TLR-1 y -6, por ensayos de Inmunoprecipitación del TLR2 y realizar el Blotting para TLR-1 y -6. Encontrando que de manera dosis dependiente Bradicinina aumenta la formación de heterodímeros con TLR-1 y -6. Sugiriendo que Bradicinina tiene la capacidad de aumentar respuesta inmune en HGF con la formación de Heterodímeros.(Fig.17)

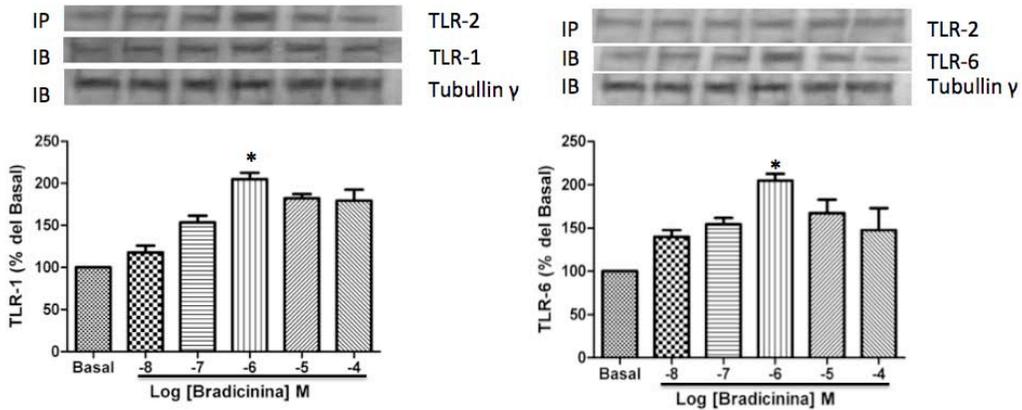


Fig.17 Efecto de la Bradicinina sobre la formación de interacción proteica del TLR con TLR-1 y TLR-6 en Fibroblastos Gingivales Humanos. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se trataron a dosis creciente de Bradicinina por 16 horas. Después de la incubación se aisló la proteína total de las células y se procedió a realizar ensayo de Inmunoprecipitación como se describe en 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. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una $p < 0.05$ comparados contra el basal

6.7 Efecto de los antagonistas de B1 y B2 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina.

Una vez que se demostró que Bradicinina aumenta la expresión a nivel génico como proteico, así como la formación de heterodímeros con el TLR-2. Se decidió evaluar la vía de señalización de Bradicinina en la expresión de TLR-1 y -6 en HGF. El primer paso para evaluar esta vía es caracterizar el receptor implicado en el reconocimiento de Bradicinina, por lo que se realizó ensayo de western Blot. Encontrando que el receptor implicado en la señalización es el Receptor para Bradicinina 2 (RB2), ya que al momento de estimular con Bk mas el antagonista HOE 140 para el RB2 la expresión de los TLR se mantiene a niveles basales. Caso contrario al estímulo con el antagonista de RB1 Lys-(des-Arg⁹, Leu⁸) mas el estímulo de Bradicinina la expresión de TLR1 y TLR6 aumenta. Estos resultados nos sugiere

que RB2 es el implicado de la señalización de Bradicinina para el aumento de TLR1 y 6. (Fig.18)

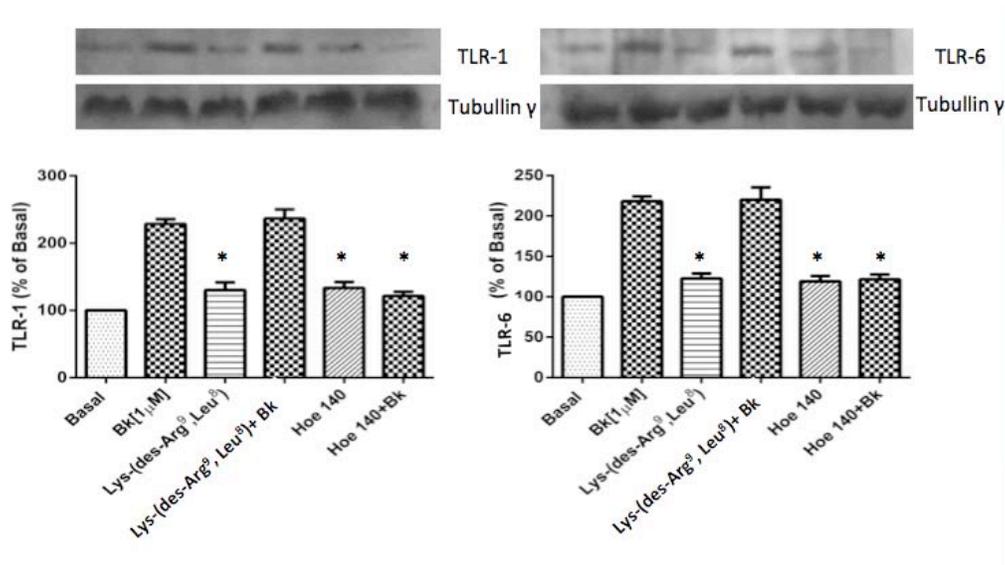


Fig.18 Efecto de los antagonistas de B1 y B2 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se trataron a dosis fija de 1 μ M de Bradicinina por 16 horas en presencia de antagonistas para RB1 (Lys-des-Arg⁹,Leu⁸) y para RB2 (Hoe140). Después de la incubación se extrajo la Proteína y se procedió a realizar ensayo de Western-Blot como se describe en 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. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una $p < 0.05$ comparados contra el estímulo de Bradicinina

6.8 Efecto de la inhibición de PLC, PI3K y PKC en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina

Una vez que Bradicinina es reconocida por RB2 induce la activación de diversas vías de señalización dentro de las que encontramos la vía canónica de Bk donde activa a la Fosfolipasa C para formar 2 productos DAG y IP3 este ultimo movilizara calcio del retículo endoplásmico al citoplasma donde activara a proteínas como algunos integrantes de la familia de PKC. Por otra parte se a descrito que la subunidad gama al disociarse de las subunidades alfa y beta activa la vía de PI3K. Para poder comprobar la implicación de cada una de estas vías en la expresión de TLR se realizaron inhibiciones selectivas de algunos integrantes de las vías ya mencionadas. Se ocuparon los siguientes inhibidores: para

Fosfolipasa C (U73122), PI3K (Wortmanina, Ly294002) y para la familia de PKC (BIM) con un pre tratamiento de 1 hora, posterior a este tiempo se estimulo con Bradicinina a una concentración de $1\mu\text{M}$. Se realizaron ensayos de Western–Blot para determinar la expresión de TLR-1 y TLR-6. Encontrando que Fosfolipasa C, PI3K y la familia de PKC están involucradas en la señalización de TLR-1 y TLR-6. Sugiriéndonos que Bradicinina ocupa la vía de activación de PI3k, Fosfolipasa C y PKC para aumentar la expresión de TLR1 y 6 en Fibroblastos Gingivales Humanos (Fig.19) DOSIS DE LOS INHIBIDORES.

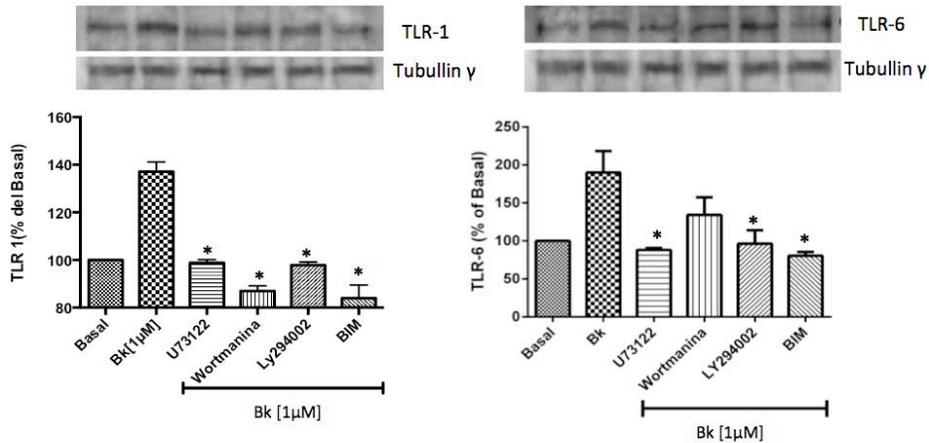


Fig. 19 Efecto de la inhibición de PLC, PI3K y PKC en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se pre trataron las células con inhibidores selectivos de para Fosfolipasa C (U73122), PI3K (Wortmanina, Ly294002) y para la familia de PKC (BIM) 1 hora antes, posterior a esto se trataron las células con un dosis fija de $1\mu\text{M}$ de Bradicinina durante 16 horas. Las células posteriormente a tiempo transcurrido fueron procesadas para ser analizadas por ensayo de Western Blot. Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una $*p < 0.05$ comparados contra el estímulo de Bradicinina

6.9 Efecto de la inhibición de P38, JNK, MEK y el factor de transcripción NFkB en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina

Ante el reconocimiento de Bk se activa vías que se han descrito con anterioridad, Bk activa otras vías de señalización como es el caso de las MAPK y la posibilidad de activar al factor de transcripción NFkB. Por lo que se decidió evaluar su implicación en la expresión de TLR1 y 6. Se ocuparon inhibidores selectivos para los integrantes de MAPK: para MEK (PD98059), p38(SB203580), JNK(SP600125) y para NFkB (Curcumin). Para demostrarlo se realizo ensayo de Western Blot. Encontrando que Bradicinina ante la inhibición de p38 y NFkB la expresión de TLR-1 y TLR-6 disminuye a niveles basales. Lo que nos sugiere que

Bradicinina esta ocupando la vía de p38 como NFkB en la señalización para un aumento en la expresión de TLR-1 y TLR-6. (Fig. 20)

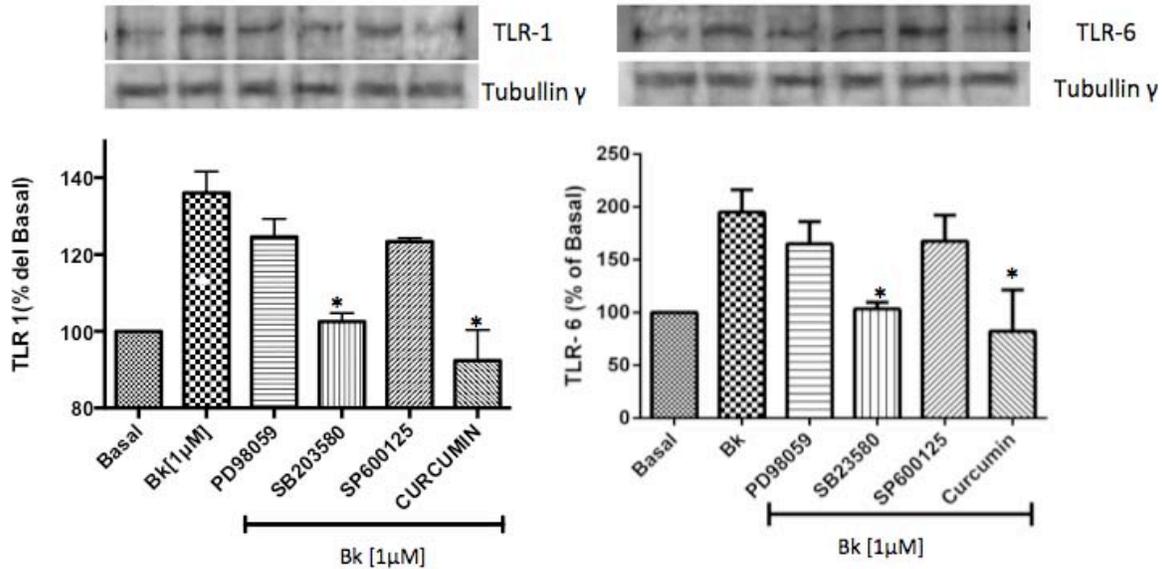


Fig. 20 Efecto de la inhibición de P38, JNK, MEK y el factor de transcripción NFkB en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se pre trataron las células con inhibidores selectivos de para MEK (PD98059), p38(SB203580), JNK(SP600125) y para NFkB (Curcumin) 1 hora antes, posterior a esto se trataron las células con un dosis fija de 1μM de Bradicinina durante 16 horas. Las células posteriormente a tiempo transcurrido fueron procesadas para ser analizadas por ensayo de Western Blot. Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media ± E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una *p<0.05 comparados contra el estímulo de Bradicinina.

6.10 Efecto de la inhibición de PLC, PI3K, PKC, P38, JNK, MEK y factor de transcripción NFkB en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. DOSIS

En experimentos pasados se demostró por ensayo de Western Blot que Bk esta utilizando diferentes vías para la expresión de TLR1 y 6 en fibroblastos Gingivales Humanos, pero esto no determina si los TLR se están expresando en membrana. Por lo que se procedió a realizar ensayos de Inmunofluorescencia para determinar la localización y expresión de los TLR ante la inhibición selectiva de MEK (PD98059), p38(SB203580), JNK(SP600125), para NFkB (Curcumin), Fosfolipasa C (U73122), PI3K (Wortmanina, Ly294002) y para la familia de PKC (BIM). Los resultados nos muestran datos similares a los valores del ensayo de

Western Blot del experimento pasado, encontrando que las vías implicadas en la expresión de TLR-1 y TLR-6 son la de P38, NFkB, PLC, PI3K y PKC. (Fig.21)

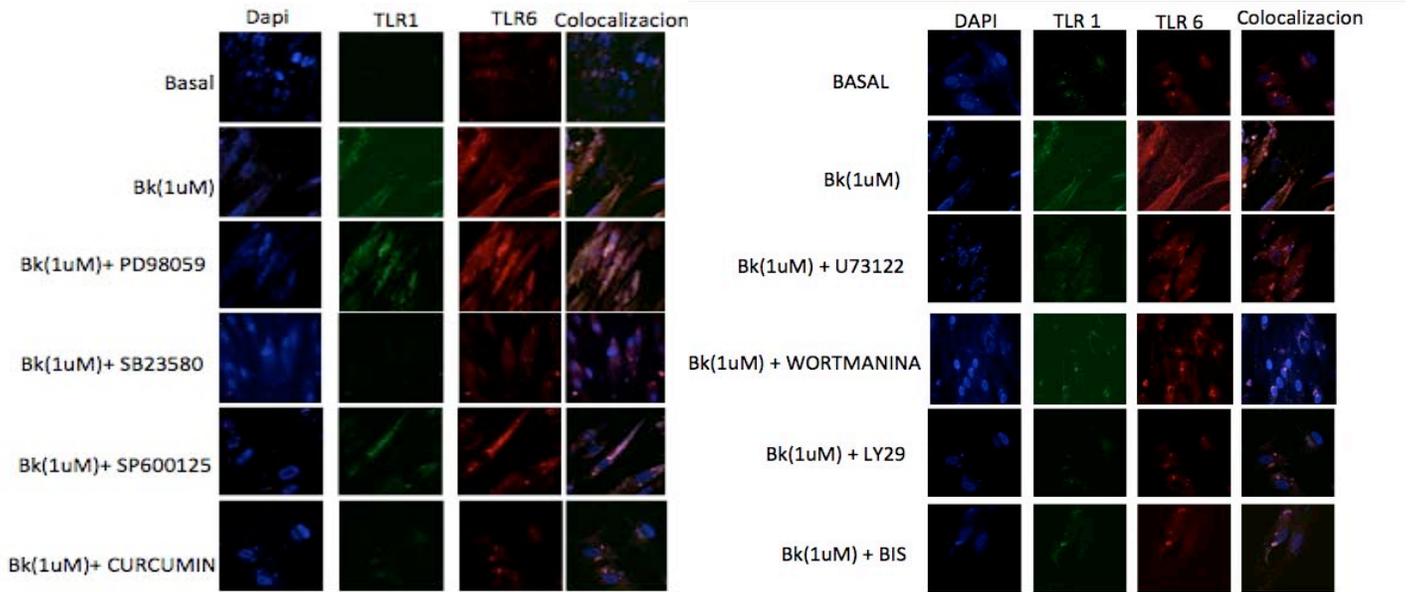


Fig. 21 Efecto de la inhibición de PLC, PI3K, PKC, P38, JNK, MEK y factor de transcripción NFkB en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 24 pozos sobre cubreobjetos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se trataron a dosis fija de (1 μ M) de Bradicinina y a un tiempo establecido de 16 Hr ante la presencia de los diversos inhibidores selectivos de MEK (PD98059), p38(SB203580), JNK(SP600125), para NFkB (Curcumin), Fosfolipasa C (U73122), PI3K (Wortmanina, Ly294002) y para la familia de PKC (BIM) para después determinar la expresión de los TLR 1 y -6 por ensayo de Inmunofluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados que se presentan corresponden a un experimento representativo de tres repeticiones por separado.

6.11 Efecto de la inhibición de PI3K, PLC y PKC en la fosforilación de AKT y P38 inducidas por Bradicinina.

Al demostrar dos posibles vías de señalización en la expresión de TLR-1 y TLR-6 ante un estímulo de Bk, se decidió evaluar la fosforilación de AKT y P38 ante la inhibición de PI3K con (Wortmanina y Ly294002), Fosfolipasa C (U73122), PKC con (BIM) ante la presencia de una dosis fija de Bk. Para demostrarlo se realizó ensayo de Western-Blot. Los resultados mostraron que Bk induce la fosforilación de P38 y AKT, con la inhibición de PI3K con Wortmanina, LY294002 y de Fosfolipasa C con U73122 la fosforilación de AKT disminuye hasta a llegar a niveles basales, caso contrario a la inhibición de PKC con BIM. Lo que nos

sugiere que Bradicinina induce la fosforilación de AKT por la vía de Fosfolipasa C así como por PI3K. Con respecto a la fosforilación de P38 por un estímulo de Bradicinina, encontramos que Bradicinina aumenta la fosforilación de P38 y esta utilizando las vías de Fosfolipasa C y PKC para su activación, ya que al inhibir a Fosfolipasa C y PKC la fosforilación de P38 disminuye a niveles basales.(Fig.22)

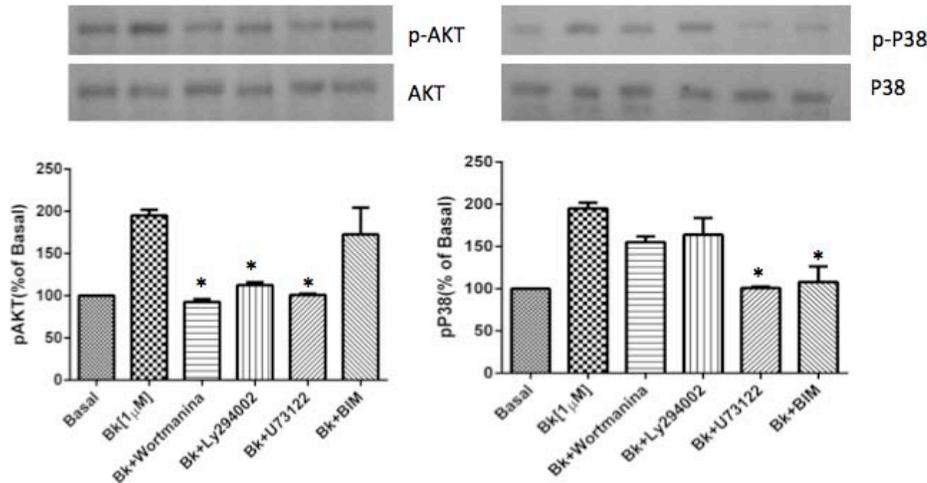


Fig. 22 Efecto de la inhibición de PI3K, PLC y PKC en la fosforilación de AKT y P38 inducidas por Bradicinina. Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se pre trataron las células con inhibidores selectivos de para PI3K con (Wortmanina y Ly294002), Fosfolipasa C (U73122) y PKC con (BIM) 1 hora antes, posterior a esto se trataron las células con un dosis fija de 1μM de Bradicinina durante 15 minutos. Las células posteriormente a tiempo transcurrido fueron procesadas para ser analizadas por ensayo de Western Blot. Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media ± E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una *p<0.05 comparados contra el estímulo de Bk

6.12 Efecto de Bradicinina sobre la interacción de TLR-1 y TLR-6 con PKC α, ζ.

Los TLR al reconocer a su ligando estos reclutan proteínas adaptadoras en el dominio TIR, estas proteínas adaptadoras desencadenan la activación de diversas vías de señalización rio abajo, pero se a encontrado que algunas proteínas como la familia de PKC pueden inhibir esta señal, ya que tienen dominios de unión a las proteínas adaptadoras como es el caso de PKC α, β, ε, ζ, δ por lo tanto se evaluó si Bk induce una interacción de PKC α y ζ con los TLR-1 y TLR-6. Para comprobar este mecanismo se estimularon los HGF con dosis crecientes de Bradicinina e inmunoprecipitó a TLR-1 y TLR -6 para realizar el inmunoblotting contra PKC α y ζ. Los resultados mostraron un aumento en la presencia de

PKC α y ζ de manera dosis dependiente. Esto nos sugiere que Bradicinina promueve la interacción de TLR con PKC α y ζ . con la posibilidad de que Bk retroalimenta la vía canónica de TLR. (Fig. 23)

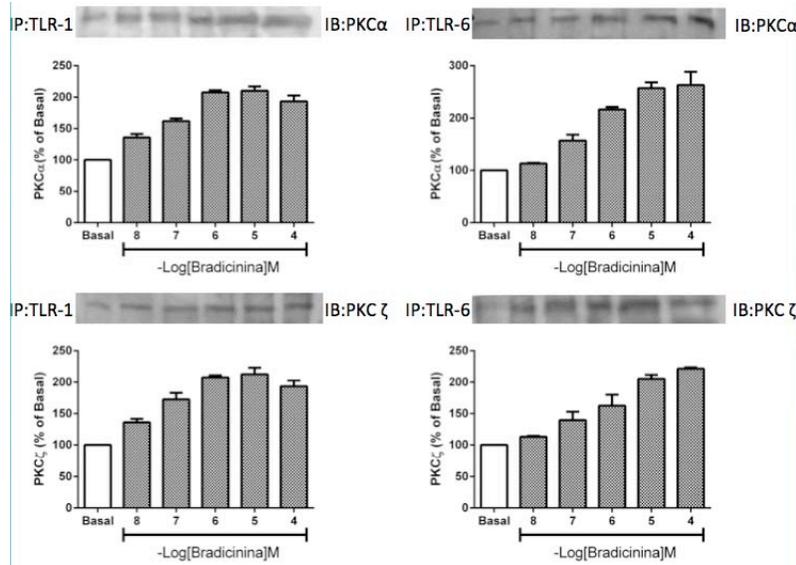


Fig. 23 Efecto de Bradicinina sobre la interacción de TLR-1 y TLR-6 con PKC α , ζ . Las células HGF fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células fueron ayunadas con medio DMEM al 2% de SBF por 24 hr. Se administro dosis crecientes de Bradicinina a (10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) de Bradicinina durante 16 Horas. Las células posteriormente a este tiempo transcurrido fueron procesadas para ser analizadas por ensayo de Inmunoprecipitación y terminar con ensayo de Western Blot. Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una * $p < 0.05$ comparados contra el estímulo de Bk.

6.13 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducida por Bradicinina.

Al encontrar que Bk induce la interacción de PKC con los TLR-1 y TLR-6 se decidió evaluar el papel que juegan PKC α , δ , ζ en la expresión de los TLR. Por lo tanto se realizo un silenciamiento de un integrante de cada subgrupo de la familia de PKC y estimular a los HGF con Bk, para poder comprobarlo se realizo ensayo de western Blot. En la Fig. 24 (A) se presentan las graficas e imágenes que comprueban el silenciamiento de PKC α , δ , ζ donde en presencia de Bk las fosforilación de PKC se mantiene a niveles basales, una vez determinado la eficiencia del silenciamiento, se decidió evaluar la interacción de PKC en la

expresión de los TLR panel (B). Encontrando que todas las isoformas de PKC y MYD88 están implicadas en la expresión de TLR-1 y TLR-6 ante la presencia de BK. Lo que nos sugiere que PKC α , δ , ζ y MYD88 están implicadas en la vías de señalización de Bk para sobre expresar TLR-1 y TLR-6.

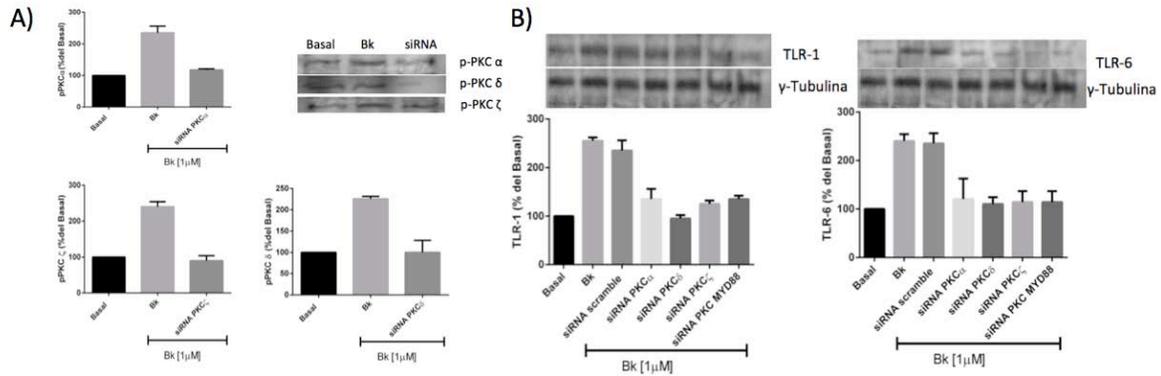


Fig.24 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ , en la formación de complejos proteicos de TLR-2 con TLR-1 y TLR-6 inducidos por Bradicinina. Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células tranfectadas con SiRNA para PKC α , δ , ζ , (A) ensayos de Western Blot para determinar la eficiencia del silenciamiento ante el estímulo de Bk a ($1\mu\text{M}$) y evaluar la forma fosforilada de PKC α , δ , ζ . (B) ensayo de Western Blot donde se muestra la expresión de TLR-1 y TLR-6 ante el silenciamiento de PKC α , δ , ζ , MYD88 y un SiRNA Scramble como control negativo, todos en presencia de BK. Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una $*p<0.05$ comparados contra el estímulo de Bk.

6.14 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducida por Bradicinina.

Al comprobar que PKC α , δ , ζ y MYD88 están implicadas en la señalización para la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducidas por Bk se decidió evaluar si estas Cinasas también están implicadas en la formación de los heterodímeros con el receptor TLR-2. Por lo que se evaluó por ensayo de Inmunoprecipitación hacia el TLR-2 ante la presencia de los silenciamientos de PKC α , δ , ζ y MYD88. Encontrando que PKC α , δ , ζ y MYD88 están involucrados también en la formación de heterodímeros con el TLR-2. Lo que nos sugiere

que Bk esta ocupando las vías de PKC para la formación de heterodímeros así como de la proteína adaptadora MYD88. (Fig.25)

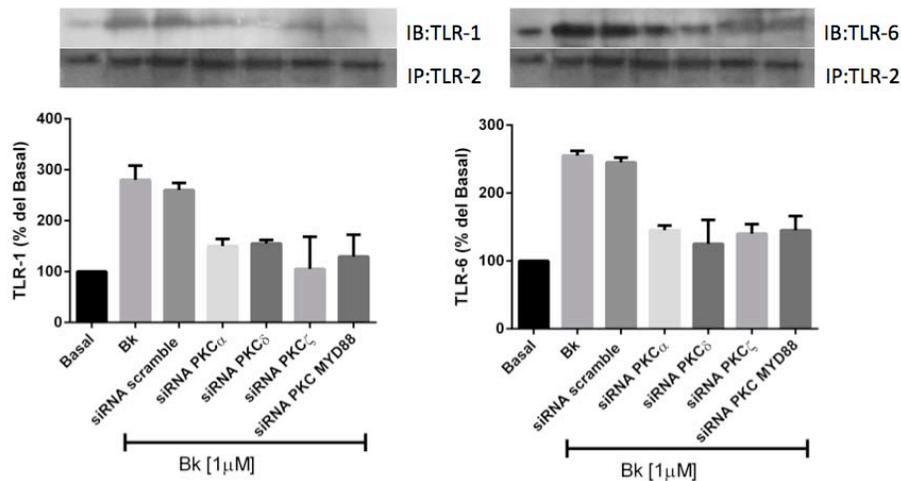


Fig.25 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la expresión de TLR-1 y TLR-6 inducida por Bradicinina. Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células tranfectadas con SiRNA para PKC α , δ , ζ y MYD88 (A) ensayos de Western Blot para determinar la eficiencia del silenciamiento ante el estímulo de Bk a (1 μ M) y evaluar la forma fosforilada de PKC α , δ , ζ . (B) ensayo de Western Blot donde se muestra la expresión de TLR-1 y TLR-6 ante el silenciamiento de PKC α , δ , ζ , MYD88 y un SiRNA Scramble como control negativo, todos en presencia de BK. Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de los receptores semejante a Toll 1 y 6. Los valores se analizaron mediante t-Student con una * $p < 0.05$ comparados contra el estímulo de Bk.

6.15 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación de la vía canónica de TLR inducida por Bradicinina.

Se a demostrado que Bradicinina ocupa las vías de PI3K, PLC, PKC en la expresión de TLR pero experimentos pasados demostraron que BK podría estar activando la vía canónica de los TLR por lo que se decidió evaluar la presencia de IRAK como primer Cinasa en la vía de los TLR. Para demostrarlo se evaluó por ensayo de Inmunoprecipitación la presencia de IRAK cuando las células presentaban silenciamiento en PKC α , δ , ζ y MYD88 y con el estímulo de Bk. Los resultados demostraron que BK induce un aumento en el peso

molecular de IRAK lo que confirma que BK esta activando la vía canónica de TLR y ante el silenciamiento de PKC α , δ , ζ el peso molecular de IRAK se mantiene en niveles normales lo que nos sugiere que PKC esta implicada en la activación de la vía canónica. Por otra cuando las células presentan un silenciamiento de MYD88 y se estimula con Bk IRAK no se localiza en el inmunoprecipitado, lo que confirma que MYD88 es la proteína adaptadora implicada en el reclutamiento de IRAK para dar inicio a la señalización rio abajo (Fig. 26)

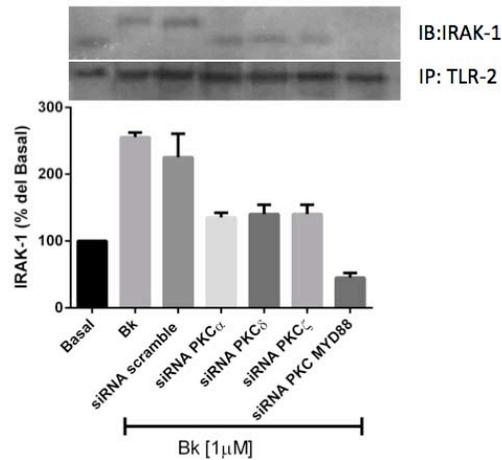


Fig. 26 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación de la vía canónica de TLR inducida por Bradicinina Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células tranfectadas con SiRNA para PKC α , δ , ζ , MYD88 y un SiRNA Scramble como control negativo para posterior a esto realizar ensayo de Inmunoprecipitación y concluir con Western Blot como se describe en Materiales y Métodos. Por ensayo de Western Blot se determino la presencia de IRAK en el inmunoprecipitado del TLR-2 ante un estímulo de Bk (1 μ M). Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la expresión de IRAK. Los valores se analizaron mediante t-Student con una *p<0.05 comparados contra el estímulo de Bk.

6.16 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación MMP -2 y MMP-9 inducida por Bradicinina

Se demostró en experimentos pasados que Bk induce un aumento en la expresión de TLR-1 y TLR-6, así como la identificación de vías de señalización implicadas en este proceso, sin embargo existe otras respuesta fisiológicas que están relacionadas con la presencia de los TLR en membrana. La activación de las MMP que están relacionadas con el remodelamiento de la matriz extracelular, y que se ha determinado que puede formar un

complejo proteico de MMP y TLR. Por lo tanto se decidió evaluar si BK induce la activación de MMP-2 y MMP-9, así como la implicación de PKC. Para demostrarlo se realizó silenciamiento de las isoformas α , δ , ζ de PKC y de la proteína adaptadora MYD88 en presencia de Bk ($1\mu\text{M}$). Los resultados nos muestran que Bk induce la activación de MMP-2 y MMP-9 una vez por arriba del basal y que las isoformas α , δ , ζ de PKC y MYD88 regulan la activación de dichas MMP. Lo que nos sugiere que PKC α , δ , ζ y MYD88 además de regular la expresión de TLR regulan la activación de MMP (Fig. 27)

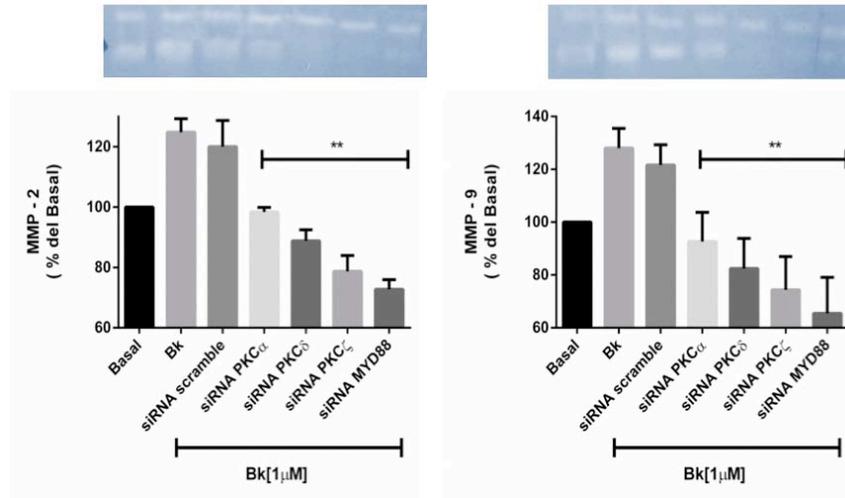


Fig. 27 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación de la vía canónica de TLR inducida por Bradicinina Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células tranfectadas con SiRNA para PKC α , δ , ζ , MYD88 y un SiRNA Scramble como control negativo, después se estimularon con Bk a una concentración de $1\mu\text{M}$ para posterior a esto recolectar el medio y realizar ensayo de Zimografía como se describe en Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la activación de MMP-2 y MMP-9. Los valores se analizaron mediante t-Student con una $**p < 0.01$ comparados contra el estímulo de Bk.

6.17 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la producción de PGE₂.

Bradicinina al ser un factor promotor de la inflamación así como un mediador en la inmunidad innata, esta muy relacionado con otros eventos fisiológicos como la activación de MMP como se demostró. Por lo tanto otras moléculas que están implicadas en el proceso inflamatorio son las PGE₂ por lo tanto se decidió evaluar la producción de PGE₂ cuando las células son estimuladas con Bk a una sola dosis y cuando las células tienen un silenciamiento en PKC α , δ , ζ y MYD88. Para demostrar esto se realizó ensayo de ELISA

donde se midió la producción de PGE₂ en el medio libre (Fig.28). Encontrando que Bk induce un aumento en la producción de PGE₂ con respecto al basal y el silenciamiento de las isoformas δ , ζ de PKC disminuyen la producción. Lo que nos sugiere que Bk necesita de estas dos cinasas para inducir la producción de PGE₂ en HGF.

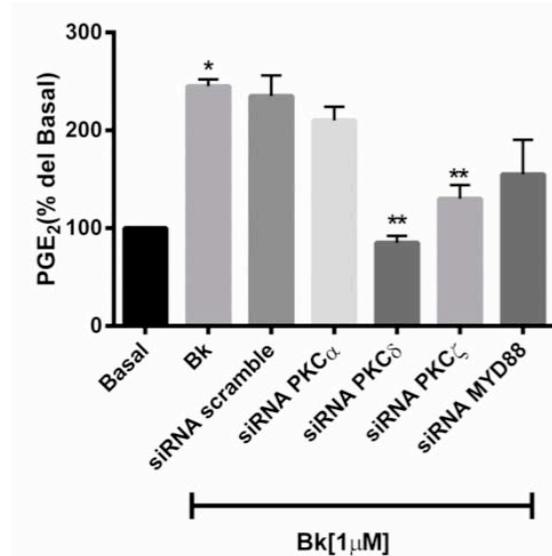


Fig. 28 Efecto del silenciamiento de PKC α , δ , ζ y MYD88 en la activación de la vía canónica de TLR inducida por Bradicinina. Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 80%. Posterior a esto las células tranfectadas con SiRNA para PKC α , δ , ζ , MYD88 y un SiRNA Scramble como control negativo, después se estimularon con Bk a una concentración de 1 μ M, para posterior a esto recolectar el medio y realizar ensayo de ELISA como se describe en Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E de la producción de PGE₂. Los valores se analizaron mediante t-Student con una **p<0.05 comparados contra el estímulo de Bk y **p<0.05 comparados contra el basal.

7. Discusión

La respuesta inflamatoria esta mediada por diversas moléculas liberadas por las células, y todas estas moléculas tienen como finalidad, delimitación del área afectada, eliminación del agente patógeno y remodelación de la zona afectada. Dentro de la cavidad oral se encuentran una gran cantidad de microorganismos que habitan de forma controlada, pero cuando existe un cambio en el entorno estos proliferan ocasionando una respuesta inflamatoria. Resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que toxinas de diversos orígenes como el LTA, LPS, Poly:IC que pueden estar presentes dentro de la cavidad oral, principalmente en la placa dentobacteriana son reconocidas por receptores de membrana como TLR-2, TLR-3 o TLR4. Se ha demostrado que en individuos con presencia de mayor índice de placa dentobacteriana presentan mayor activación del TLR4 respecto a los que presentaban placa en menor cantidad; sin embargo, en ambos casos hubo activación del TLR2, lo que sugiere que especies comensales Gram+ pueden interactuar con el TLR2 para iniciar la respuesta inflamatoria destructiva.^{78,79}

En el proceso inflamatorio juegan un papel muy importante las moléculas secretadas por las células que induzcan un aumento en la inflamación como son PGE2 y Bradicinina. Encontrando en nuestro laboratorio que Bk induce la expresión de diversos receptores como TLR-2, TLR-3, TLR-4 en HGF tanto de manera dependiente del tiempo como de la concentración, a una máxima expresión a las 16 horas tras el estímulo y una concentración de 1 μ M, así como también se ha demostrado las posibles vías de señalización para la expresión de estos receptores incluyendo a la vía de PLC, PKC, PI3K y la activación de factores de la transcripción como NF κ B, que conllevarán a la producción de PGE2 y la expresión de Cicloxigenasa 2 que participan en la respuesta inflamatoria^{80,81}

En la cavidad oral uno de los problemas más comunes es la periodontitis donde se ha identificado que los osteoclastos y los fibroblastos pueden ser estimulados por diferentes citosinas inflamatorias, como la interleucina 1, factor de necrosis tumoral y prostaglandinas E2 lo que conlleva a la reabsorción ósea.⁸² Interesantemente una de las hormonas más importantes en el proceso inflamatorio como es la Bradicinina ha demostrado poder retroalimentar la destrucción ósea y la remodelación del tejido conectivo con la activación de la Matriz Metaloproteínasa así como la producción de PGE2. Se ha demostrado que Bk al ser reconocido por su receptor B2 induce la activación de vías como la de Folsfolipasa C, PI3K y PKC en el aumento de la expresión de TLR-1 y TLR-6 así como la formación Heterodímeros con el TLR-2.⁸³ Así como se ha determinado que BK induce la activación de diversas proteínas nuestros resultados demuestran que Bk está activando la vía canónica de los TLR en el momento en que IRAK como primera cinasa de la

via de TLR retrasa su movilidad en el gel de SDS-PAGE sugiriendo esta sufriendo una activación y una rápida ubiquitinización para posteriormente ser degradada

Los dominios de los TLR se encuentran altamente conservados pero la diversidad de estos receptores a determinado 2 vías de señalización, la dependiente de MYD88 y la independiente que esta involucrada TLR3, TLR4 y TLR7. pero el reconocimiento de los diversos ligandos se da en LRR. por esta razón existen muchas variaciones en los TLR. pero la diversas moléculas que son reconocidas por los TLR presentan mutaciones las cuales es más difícil de reconocer, por lo tanto los TLR se asocian creando Heterodímeros u Homodímeros como TLR-2 que se asocia con TLR-1 y TLR-6 donde pueden reconocer variaciones de ácidos lipoteicoico, peptidoglicanos, y ligandos endógenos como proteína de choque térmico así como ácido hialurónico.⁸⁴ en específico el heterodímero de TLR2/6 reconoce lipopeptidos diacetilados y TLR2/1 lipopeptidos triacetilados.^{85, 86} nuestros resultados demuestran por primera vez que una hormona que juega un papel muy importante en la inflamación así como con un aumento en la expresión y formación de heterodímeros TLR2/6 y TLR2/1

La interacción de los TLR con otros receptores como los GPCR y las MMP que están relacionadas con la degradación de matriz extracelular en diversos tejidos, así como con Sialidasas se ha demostrado con anterioridad.⁸⁷ Siendo modelos muy importantes en diversas patologías como Diabetes y Cáncer, por lo que se sigue en investigaciones para determinar la importancia de los TLR en enfermedades no inmunitarias. Encontrando en nuestros resultados que Bk aumenta la activación de MMP-2 y MMP-9 en HGF, así mismo como la identificación de 3 isoformas de PKC α , δ , ζ y la proteína adaptadora MYD88 en la activación de estas Matriz Metaloproteasas, así mismo la producción de PGE₂ esta relacionada con la activación de las isoformas de PKC α , δ por medio de BK. Por lo tanto el reconocimiento de Bk por los HGF ha demostrado que aumenta la expresión de TLR1 y TLR6 así como la formación de heterodímeros y que no solo aumenta la presencia de estos receptores si no también juega un papel muy importante en la respuesta fisiológica como la remodelación de la matriz extracelular y retroalimentar la respuesta inflamatoria con la producción de PGE₂

9. Bibliografía

¹ Bellucci F, Cucchi P, Catalani C, Giuliani S, Meini S, Maggi CA. Novel effects mediated by bradykinin and pharmacological characterization of bradykinin B2 receptor antagonism in human synovial fibroblasts. *Br J Pharmacol*. 2009 Vol. 135 pp:450-4.

² Yoo J, Chung C, Slice L, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Protein kinase D mediates synergistic expression of COX-2 induced by TNF- α and bradykinin in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Vol 297 pp:1576-87.

³ Sukma M, Tohda M, Suksamran S, Tantisira B. Γ -Mangostin increases serotonin 2A/2C, muscarinic, histamine and bradykinin receptor mRNA expression. *J Ethnopharmacol*. 2011 Vol. 135 pp: 450-4,

⁴ Space-filling model of bradykinin Created using Accelrys DS Visualizer Pro 1.6 and GIMP.

⁵ Scharfstein J, Monteiro AC, Schmitz V, Svensjö E. Angiotensin-converting enzyme limits inflammation elicited by *Trypanosoma cruzi* cysteine proteases: a peripheral mechanism regulating adaptive immunity via the innate kinin pathway. *Biol Chem*. 2008 Vol. 8 pp: 110-20

⁶ Sadowski J, Badzyska B. Intrarenal vasodilator systems: NO, prostaglandins and bradykinin. An integrative approach. *J Physiol Pharmacol* 2008 Vol 59 pp: 105–19.

⁷ Sukma M, Tohda M, Suksamran S, Tantisira B. Γ -Mangostin increases serotonin 2A/2C, muscarinic, histamine and bradykinin receptor mRNA expression. *J Ethnopharmacol*. 2011 Vol 135 pp:450-4.

⁸ Van arman cg. The origin of bradykinin. *Exp Biol Med*. 1952 Vol.79 pp:356-9.

⁹ Werle e. Kallidin and bradykinin *Int Pharmacodyn*. 1953 Vol. 92 pp:427-31

¹⁰ Dendorfer A, Wolfrum S, Dominiak P. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *Jpn J Pharmacol* 1999 Vol.79 pp:403-26.

¹¹ Julio Scharfstein Activación del Sistema Cinina: un papel para la cruzipaina en la inmunopatogénesis de la enfermedad de Chagas experimental Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil 2010

¹² Nakao S, Ogata Y, Modéer T, Segawa M, Furuyama S, Sugiya H. Bradykinin induces a rapid cyclooxygenase-2 mRNA expression via Ca²⁺ mobilization in human gingival fibroblasts primed with interleukin-1 beta. *Cell Calcium*. 2001.

-
- ¹³ M Callister BS, Leeb-Lundberg F, Mellonig JT, Olson MS. The functional interaction of EGF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1995 Vol.66 pp:429-37
- ¹⁴ Bawolak MT, Touzin K, Moreau ME, Désormeaux A, Adam A, Marceau F. Cardiovascular expression of inflammatory signaling molecules, the kinin B1 receptor and COX2, in the rabbit: effects of LPS, anti-inflammatory and anti-hypertensive drugs. *Regul Pept.* 2008 Vol 114 pp:157-68
- ¹⁵ Hamberg u. Structure and biological activity of bradykinin. *Ann acad sci fenn a.* 1964 Vol.106 pp:1-16.
- ¹⁶ Tsai YJ, Hao SP, Chen CL, Lin BJ, Wu WB Involvement of b2_receptor_in bradykinin-induced proliferation and proinflammatory effects in human nasal mucosa-derived fibroblasts isolated from chronic rhinosinusitis patients. *Plos One.* 2015 Vol.13 pp:10-15
- ¹⁷ Erdös EG, Tan F, Skidgel RA Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension.* 2010. Vol.55 pp:214-20
- ¹⁸ Zhou XB, Wulfsen I, Utku E, Sausbier U, Sausbier M, Wieland T, Ruth P, Korth M. Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. Vol 107 pp:8005-10
- ¹⁹ Heitsch H Non-peptide antagonists and agonists of the bradykinin B(2) receptor. *Med Chem.* 2002 Vol.9 pp:913-28
- ²⁰ Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb J.* 2015 Vol 6 pp:13-17
- ²¹ Naidu N, Botha JH, Naidoo S. B1 but not B2 bradykinin_receptor agonists promote DU145 prostate cancer cell proliferation and migration. *Afr Health Sci.* 2014 Vol.14 pp:657-62
- ²² Couture R, Blaes N, Girolami JP. Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014 Vol.12 pp:223-48
- ²³ Tippmer S, Quitterer U, Kolm V, Faussner A, Roscher A, Mosthaf L, et al. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms α , ϵ , ζ . *Eur J Biochem* 1994 Vol.225, pp:297–304.
- ²⁴ Moreau ME, Bawolak MT, Morissette G, Adam A, Marceau F. Role of nuclear factor kappa B and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B1 receptor in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2007 Vol. 71 pp:949–56.

-
- ²⁵ Daniel J. Loegering¹ and Michelle R. Lennartz². Protein Kinase C and Toll-Like Receptor Signaling. *Enzyme Research Article* 2011 pp. 7.
- ²⁶ Pallab Singh³, Shachee Doshi¹, Jennifer M. Spaethling³, Adam J. Hockenberry³, Tapan P. Patel³, Donna M. Geddes-Klein³, David R. Lynch^{1, 2}, and David F. Meaney^{3*} NMDA receptor mechanosensitivity is governed by the c-terminus of the nr2b *subunit j biochem.* 2011
- ²⁷ Choi H, Allahdadi KJ, Tostes RC, Webb RC Diacylglycerol Kinase Inhibition and Vascular Function. *Curr Enzym Inhib.* 2009 Vol. 5 pp:148-152.
- ²⁸ Shirasaki H, Kanaizumi E, Himi T. Immunohistochemical localization of the bradykinin B1 and B2 receptors in human nasal mucosa. *Mediators Inflamm.* 2009 Vol.10 pp:406-12.
- ²⁹ Bonde MM, Olsen KB, Erikstrup N, Speerschneider T, Lyngsø C, Haunsø S, Nielsen MS, Sheikh SP, Hansen JL. The angiotensin II type 1 receptor antagonist Losartan binds and activates bradykinin B2 receptor signaling. *Regul Pept.* 2011. Vol.167 pp :21-5
- ³⁰ Cheng CY, Tseng HC, Yang CM. Bradiquinina mediada por la proliferación de células depende de la transactivación del receptor de EGF en la córnea fibroblastos. *J Cell Physiol.* 2011 Vol. 10 pp.1002
- ³¹ Bellucci F, Cucchi P, Catalani C, Giuliani S, Meini S, Maggi CA. Novel effects mediated by bradykinin and pharmacological characterization of bradykinin B2 receptor antagonism in human synovialfibroblasts. *Br J Pharmacol.* 2009.
- ³² Yoo J, Chung C, Slice L, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Protein kinase D mediates synergistic expression of COX-2 induced by TNF- alpha and bradykinin in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009. Vol.297 pp: C1576-87
- ³³ mcallister BS, Leeb-Lundberg F, Mellonig JT, Olson MS. The functional interaction of EGF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblasts. *Periodontol.* 1995. Vol.66 pp:429-37
- ³⁴ Erices R, Corthorn J, Lisboa F, G. Valdés Bradicinina promueve la migración y la invasión de los derechos humanos trofoblasto inmortalizado. *Biol Reprod Endocrinol.* 2011 Vol.5 pp:97
- ³⁵ Sanchez de Miguel L, Neysari S, Jakob S, Petrimpol M, Butz N, Banfi A, Zaugg CE, Humar R, Battegay EJ B2-kinin receptor plays a key role in B1-, angiotensin converting enzyme inhibitor-, and vascular endothelial growth factor-stimulated in vitro angiogenesis in the hypoxic mouse heart. *Cardiovasc Res.* 2008.

-
- ³⁶ Nakao S, Ogata Y, Modéer T, Segawa M, Furuyama S, Sugiya H. Bradykinin induces a rapid cyclooxygenase-2 mrna expression via Ca²⁺ mobilization in human gingival fibroblasts primed with interleukin-1 beta. *Cell Calcium*. 2001. Vol.29 pp:446-52
- ³⁷ Khan TK, Alkon DL. An internally controlled peripheral biomarker for Alzheimer's disease: Erk1 and Erk2 responses to the inflammatory signal bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. Vol.103 pp:13203-7
- ³⁸ Monteiro AC, Schmitz V, Svensjo E, Gazzinelli RT, Almeida IC, Todorov A, de Arruda LB, Torrecilhas AC, Pesquero JB, Morrot A, Bouskela E, Bonomo A, Lima AP, Müller-Esterl W, Scharfstein J. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. 2010 Vol.177 pp:6325-35.
- ³⁹ Bachar O, Adner M, R Uddman, LO Cardell. Peaje -como la estimulación del receptor induce a las vías respiratorias hiper-respuesta a la bradicinina, un efecto mediado por JNK y NF-kappa B vías de señalización. *Eur J Immunol*. 2004. Vol.31 pp:2090-7
- ⁴⁰ C. Moreno, A. Sánchez-Ibarrola. Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev Med Univ Navarra* 2003 Vol.47 pp:29-33
- ⁴¹ Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll like receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 2003 Vol. 21 pp:335-76
- ⁴² Carrillo-Esper R. Inmunidad innata, receptores Toll y sepsis. *Cir Ciruj* 2003. Vol.71 pp:252-8
- ⁴³ Schaubert J., Dorschner R., Coda A., Büchau A., et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J. Clin. Invest*. 2007. Vol.117 pp:803-11
- ⁴⁴ Koch W., Hoppmann P., Pfeufer A., Schömig A., Kastrati A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. *European Heart Journal*. 2006 Vol.114 pp:604-17
- ⁴⁵ Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest*. 1999 Vol.104 pp:271-80.
- ⁴⁶ Manoj Kumar, Polentarutti N, Bosisio D, Mantovani A. Toll Like Receptor. *Biochem Soc Trans*. 2003 Vol 5 pp:563-6

-
- ⁴⁷ Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovani A. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans.* 2000 Vol.28 pp:563-6
- ⁴⁸ Mitsuyama M, Suzuki K. Mechanisms of pathogenicity and host defense in infections by intracellular parasitic microbes. *Kekkaku.* 2000. Vol.75 pp:557-60
- ⁴⁹ Kaisho T, Akira S Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol.* 2000 Vol.20 pp:393-405
- ⁵⁰ Bautista C., Mosqueda J. Papel de los receptores tipo Toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. *Vet. Méx.* 2005.
- ⁵¹ Janeway Jr., C. A., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002 Vol. 20, pp:197-216.
- ⁵² Iwasaki, A., Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2004 Vol. 5, pp:987–995.
- ⁵³ Hoebe, K., Janssen, E., Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 2004 Vol. 5, pp:971–974.
- ⁵⁴ Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006 Vol. 124, pp:783–801.
- ⁵⁵ O’Neill, L.A. & Bowie, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 Vol. 7 pp: 353–364.
- ⁵⁶ Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- γ promoter in the Toll like receptor signaling. *J. Immunol.* 2002 Vol. 15 pp: 6668-72.
- ⁵⁷ Akira, S. Toll-like receptors: lessons from knockout mice *Trans. Biochem Immunol* 2000 Vol 28, pp: 551–556.
- ⁵⁸ Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2003 Vol. 73, pp: 5137-43.
- ⁵⁹ Matthew Hirschfeld, Ying Ma, John H. Weis, Stefanie N. Vogel and Janis J. Weis. Cutting Edge: Repurification of Lipopolysaccharide Eliminates Signaling Through Both Human and Murine Toll-Like Receptor 2 *J Immunol.* 2000 Vol. 165, pp:618-622.

-
- ⁶⁰ Fitzgerald, K.A. et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* 2003 Vol. 198, pp: 1043–1055.
- ⁶¹ Yamamoto, M. Et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated myd88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol* 2003. Vol. 4, pp:1144–1150.
- ⁶² Sandra Santos Sierra¹, Sachin D Deshmukh, Julia Kalnitski, Peter Kuznetsov, Matthias P Wymann, Douglas T Golenbock y Philipp Henneke, Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization *The EMBO Journal* 2009 Vol. 28 pp: 2018–2027.
- ⁶³ Iwasaki Y1, Taguchi T, Nishiyama M, Asai M, Yoshida M, Kambayashi M, Takao T, Hashimoto K. Lipopolysaccharide stimulates proopiomelanocortin gene expression in adult corticotroph cells. 2008 Vol.55 pp:285-90.
- ⁶⁴ West A.P., Koblansky A., Ghosh S. Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006. Vol.22 pp:409-37
- ⁶⁵ Brownlie R, Allan B. Avian toll-like receptors. *Cell and tissue research.* 2011 Vol. 343 pp:121-130.
- ⁶⁶ Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014 Vol.25 pp:461.
- ⁶⁷ Muzio, M.D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. Van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, A. Mantovani, Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 2000 Vol. 164 pp:5998–6004.
- ⁶⁸ Zarembek, K. A., P. J. Godowski. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* 2002 Vol 168 pp:554–561
- ⁶⁹ Faure, E., O. Equils, P. Sieling, L. Thomas, F. Zhang, C.J. Kirschning, N. Polentarutti, M. Muzio, M. Arditi Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2011. Vol 275 pp:11058–11063.
- ⁷⁰ Adowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, Y. J. Liu. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 2001 Vol. 194 pp: 863–869.

-
- ⁷¹Barton, G. M., R. Medzhitov. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* . 2002. Vol.14 pp: 380–383.
- ⁷²Krieg, A. M., J. Vollmer. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol. Rev.* 2007 Vol.220 pp: 251–269
- ⁷³Uematsu, S., S. Akira. Toll-like receptors and Type I interferons. *J. Biol. Chem.* 2007 Vol.282 pp:15319–15323.
- ⁷⁴Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, A. Adere. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000 Vol.97 pp:13766–13771.
- ⁷⁵ Akira, S., S. Uematsu, O. Takeuchi. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006 Vol.124 pp:783–801.
- ⁷⁶Ozinsky, A., D.M. Underhill, J.D. Fontenot, A.M. Hajjar, K.D. Smith, C.B. Wilson, L. Schroeder, A. Adere. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000 Vol.97 pp:13766–13771.
- ⁷⁷ Shinkai, H., Y. Muneta, K. Suzuki, T. Eguchi-Ogawa, T. Awata, H. Uenish. Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: complete sequencing of genomic region and expression analysis. *Mol. Immunol.* 2006 Vol.43 pp:1474–1480
- ⁷⁸ Yoshioka, H., Yoshimura, A., Kaneko, T., Golenbock, D. T. & Hara, Y. Analysis of the activity to induce toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated stimulation of supragingival plaque. *J. Periodontol.* 2008 Vol.79 pp:920–928.
- ⁷⁹ Burns, E., Bachrach, G., Shapira, L. & Nussbaum, G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J. Immunol.* 2006 Vol.177 pp:8296–8300.
- ⁸⁰ Gutiérrez-Venegas G., Arreguín-Cano JA. Bradykinin promotes TLR2 expression in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 2011 Vol.11 pp: 2079–2085
- ⁸¹ Gutiérrez-Venegas G., Arreguín-Cano JA., Hernández-Bermúdez C. Bradykinin promotes Toll like receptor-4 expression in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 2012 Vol. 14 pp:538–545
- ⁸² 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 Vol. 43 pp:72–83

⁸³ Tippmer, S., Quitterer 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 Vol. 225 pp: 297-304

⁸⁴ Zahringer U., Lindner B., Inamura S., Heine H., Alexander C., TLR2 – promiscuous or specific A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity, *Immunobiology* 2008 Vol.213 pp:205–224.

⁸⁵Takeuchi O., Kawai T., Muhlradt P.F., Morr M., Radolf J.D., Zychlinsky A., et al., Discrimination of bacterial lipoproteins by toll-like receptor 6, *Int. Immunol.* 2001 Vol. 13 pp:933–940.

⁸⁶ Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., et al., Cutting edge: role of Toll like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins, *J. Immunol.* 2002 Vol. 169 pp:10–14.

⁸⁷Samar Abdulkhalek, Merry Guo, Schammim Ray Amith , Preethi Jayanth , Myron R. Szewczuk G-protein coupled receptor agonists mediate Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk to induce transactivation of Toll-like receptors and cellular signaling *Cellular Signalling* 2012