



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

**Efecto de Cistatina C en fibroblastos gingivales humanos
incubados con *Porphyromonas gingivalis***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

CD. Blanca Esther Blancas Luciano

Tutor (a): Dra. Ana María Fernández Presas

Facultad de Medicina

Comité tutor: Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser

Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

Dr. Higinio Arzáte

Facultad de Odontología

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Noviembre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Índice

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 6 |
| Abstract | 7 |
| Introducción | 8 |
| Antecedentes | 10 |
| Enfermedad periodontal | 10 |
| Factores de riesgo | |
| Microbiología de la enfermedad periodontal | |
| Factores de virulencia de <i>Porphyromonas gingivalis</i> | |
| Colonización de <i>Porphyromonas gingivalis</i> | |
| Invasión de <i>Porphyromonas gingivalis</i> en células epiteliales | |
| Interacción de <i>Porphyromonas gingivalis</i> con fibroblastos gingivales humanos | |
| Péptidos antimicrobianos (AMPs)..... | 30 |
| Estructura de AMPs | |
| Mecanismo de acción | |
| Potencial inmunomodulador de AMPs | |
| Péptidos salivales y potencial inmunomodulador | |
| Familia de cistatinas | |
| Funciones fisiológicas de Cistatina C | |
| Planteamiento del problema..... | 52 |
| Pregunta de investigación..... | 52 |
| Justificación | 53 |
| Hipótesis | 53 |
| Objetivos | 53 |
| Materiales y métodos..... | 54 |
| Resultados | 57 |
| Discusión..... | 62 |
| Conclusiones..... | 68 |
| Referencias bibliográficas..... | 68 |
| Anexos..... | 77 |



Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Colonización bacteriana oral..... | 9 |
| Figura 2. Etapas de formación del biofilm..... | 10 |
| Figura 3. Interacción entre <i>P. gingivalis</i> y <i>S. gordonii</i> | 12 |
| Figura 4. Proceso inflamatorio en enfermedad periodontal..... | 13 |
| Figura 5. Factores de riesgo de enfermedad periodontal..... | 14 |
| Figura 6. Microbiología del biofilm..... | 15 |
| Figura 7. Manipulación del complemento, TLRs, y señalización por <i>P. gingivalis</i> .. | 20 |
| Figura 8. Internalización de <i>P.gingivalis</i> en células epiteliales gingivales..... | 26 |
| | |
| Figura 9. Eventos en membrana citoplasmática bacteriana después de la adsorción inicial del péptido antimicrobiano (AMPs)..... | 34 |
| Figura 10. Interacción entre AMPs y bacteria Gram negativa..... | 37 |
| Figura 11. Modelos propuestos para la activación de potencial inmunomodulador de AMPs en células huésped..... | 38 |
| Figura 12. Actividades antimicrobianas de péptidos catiónicos..... | 40 |
| Figura 13. Efecto de péptidos antimicrobianos sobre patógenos periodontales..... | 46 |
| Figura 14. Estructura tridimensional de Cistatina C..... | 50 |
| Figura 15. Efecto de Cistatina C en inhibición de crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> expresada en Unidades Formadoras de Colonias (UFC)..... | 60 |
| Figura 16. Efecto de Cistatina C en fibroblastos gingivales humanos..... | 61 |
| Figura 17. Efecto de Cistatina C en producción de a) TNF α e b) IL-6 en fibroblastos gingivales incubados con <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 62 |
| Figura 18. Efecto de Cistatina C en producción de a) IL-4 e b) IL-10 en fibroblastos gingivales incubados con <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 63 |



Lista de abreviaturas

| | |
|---------------------------------|---|
| AMPs | Péptidos antimicrobianos |
| AP-1 | Factor de transcripción AP-1 |
| APC | Células presentadoras de antígeno |
| APD | Base de datos de péptidos antimicrobianos |
| APP | APP Academia Americana de Periodoncia |
| ATCC | Amercian Type Culture Collection |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| Bcl-2 | Grupo de proteínas anti-apoptóticas |
| C5aR | Componente 5a del receptor del complemento 1 |
| CCR2 | Receptor de proteína quimioatrayente de monocitos |
| CCR6 | Receptor de quimiocina tipo 6 |
| CMV | Citomegalovirus |
| CRES | Cistatinas relacionadas con el epidídimo y espermatogonias en ratón |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados a daño |
| DCM | Modelo de cámara subcutánea de ratón |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPPIV | Dipeptidil aminopeptidasa IV |
| EphB4 | Receptor Efrina tipo- B4 |
| ERK | Cinasas reguladoras de señal extracelular |
| FPRL-1 | Proteína G acoplada a receptor tipo 1 péptido formil |
| GAPDH | Deshidrogenasa glicerol-3 fosfato |
| GCF | Fluido crevicular gingival crevicular |
| GEC | Células epiteliales gingivales |
| HDPs | Péptidos de defensa del huésped |
| HSV-1 | Herpes virus simples |
| ICAM | Molécula de adhesión intracelular-1 |
| IDRs | Reguladores de defensa inmune |
| IFN- γ | Intererona gamma |
| IL | Interleucina |
| IκB | Inhibidor de NF-K β |



| | |
|--------------------------------|--|
| JNK | Cinasas c-Jun N-terminal |
| LBP | Proteína unidora de LPS |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| MAPK | Proteína cinasa mitógeno activadas |
| MEROPS | Base de datos de enzimas proteolíticas |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| MIC | Concentración inhibitoria minima |
| MMP | Metaloproteinasas de matriz extracelular |
| MYD88 | Marcador de diferenciación mieloide |
| NDK | Dinucleosido difosfato cinasa |
| NF-Kb | Factor nuclear Kapa Beta |
| NO | Óxido nítrico |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPG | Osteoprotegerina |
| OPS | OPS Organización Panamericana de la Salud |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PDLSCs | Células troncales de ligamento periodontal |
| PGE | Prostaglandina E-2 |
| PICF | Fluido crevicular implantar |
| PRRs | Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos |
| RANKL | Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| TLR | Receptor Toll-like |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia Humana |



Resumen

Porphyromonas gingivalis es el principal agente patógeno de enfermedad periodontal, una patología caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte, y eventual pérdida del órgano dentario. Los fibroblastos gingivales, interactúan directamente con los productos de secreción bacteriana, induciendo la activación de genes que codifican para citocinas pro inflamatorias como **TNF α** , **IL-6** e **IL-1 β** . Se ha reportado que el péptido de Cistatina C, además de tener un efecto antimicrobiano contra *Porphyromonas gingivalis*, puede regular la respuesta inmune desencadenada ante la infección. El objetivo de este estudio fue el analizar el perfil de citocinas en fibroblastos gingivales humanos que induce *Porphyromonas gingivalis* y Cistatina C. Para ello los fibroblastos gingivales humanos fueron cocultivados con *P. gingivalis* (MOI 1:1) y estimulados con 20 μ g de Cistatina C en cajas de 24 pozos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Los niveles de citocinas proinflamatorias (**TNF α** , **IL-6**) y anti inflamatorias (**IL-10**, **IL-4**) fueron determinados por ELISA. Los resultados obtenidos muestran que el fibroblasto gingival en condiciones basales puede producir citocinas **IL-10 e IL-4**; al ser estimulado con *P. gingivalis* induce la producción de citocinas **TNF α** e **IL-6**. La Cistatina C al coestimular con la bacteria, no solo disminuye las concentraciones de citocinas proinflamatorias, sino que incrementa los niveles de citocinas antiinflamatorias como **IL-10 e IL-4**. El estudio realizado demuestra que *P. gingivalis* es la encargada del establecimiento del proceso inflamatorio y destrucción ósea al inducir la producción de citocinas pro inflamatorias. La Cistatina C, ofrece un efecto protector contra el daño ocasionado por la bacteria, lo que podría convertirla en un agente terapéutico coadyuvante.



Abstract

Porphyromonas gingivalis is the main pathogen of periodontal disease, a pathology characterized by the destruction of supporting tissues, and eventual loss of the dental organ. Gingival fibroblasts interact directly with the products of bacterial secretion, inducing the activation of genes encoding pro-inflammatory cytokines such as **TNF α** , **IL-6** and **IL-1 β** . Cystatin C peptide to having an antimicrobial effect against *Porphyromonas gingivalis*, and has been reported to regulate the immune response triggered by infection. The objective of this study was to analyze the cytokine profile in human gingival fibroblasts induced by *Porphyromonas gingivalis* and Cystatin C. The human gingival fibroblasts were co-cultivated with *P. gingivalis* (MOI 1: 1) and stimulated with 20 μ g of Cystatin C in a 24-wells plate at 37 ° C in an atmosphere of 5% CO₂. The levels of proinflammatory cytokines (**TNF α** , **IL-6**) and anti-inflammatory (**IL-10**, **IL-4**) were determined by ELISA. The results obtained show that gingival fibroblasts under basal conditions can produce **IL-10** and **IL-4** cytokines, when the human gingival fibroblast was stimulated with *P. gingivalis* induces the production of **TNF α** and **IL-6** cytokines. Cystatin C, co-stimulating with the bacteria, not only decreases proinflammatory cytokine concentrations, but also increases the levels of anti-inflammatory cytokines such as **IL-10** and **IL-4**. The study shows that *P. gingivalis* is responsible for the establishment of inflammatory process and bone destruction by inducing the production of pro-inflammatory cytokines. Cystatin C offers a protective effect against the damage caused by the bacterium, which represents a good candidate as coadjuvant therapeutic agent.



Introducción

La cavidad oral es una estructura colonizada con aproximadamente 700 especies microbianas, que constituyen la flora normal ^[1]. La salud oral depende del balance homeostático entre la respuesta inmune del hospedero y la flora bucal residente. Cualquier desequilibrio entre alguna de ellas condiciona el estado disbiótico de la cavidad ^[2,3], lo cual genera desórdenes principalmente de tipo inflamatorio como la enfermedad periodontal. ^[4]

La enfermedad periodontal es una patología con alta incidencia y prevalencia a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (**OMS**) reporta una afección del 20% en adultos de edad media (35-44 años) en el mundo. ^[5] Por otro lado la Academia Americana de Periodoncia (**AAP**) indica que el 70.1% de la población americana padece la enfermedad, siendo el sexo masculino el más afectado en un 56.4%. Así mismo reporta que para la población mexicana existe una prevalencia del 66.7%. ^[6] Al respecto la Organización Panamericana de Salud (**OPS**) ha reportado que a nivel nacional esta patología es la segunda causa de atención odontológica en la consulta diaria. ^[7]

Ésta patología se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico que destruye tejidos de soporte del diente y conduce a la pérdida del órgano dentario. ^[8] *Porphyromonas gingivalis* es el agente etiológico de formas severas de la enfermedad. ^[9] Los principales constituyentes del tejido conectivo gingival son los fibroblastos gingivales, que pueden interactuar directamente con la bacteria y con sus productos de secreción (lipopolisacáridos o gingipaínas),^[10] induciendo la producción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-6 e IL-1 β que son las responsables de la destrucción de los tejidos periodontales. ^[11, 12]

Es de suma importancia explorar mecanismos protectores naturales para eliminar las bacterias que causan esta enfermedad. En los últimos años se ha intensificado el estudio de moléculas conocidas como péptidos antimicrobianos (**AMPs**). Se ha descrito que los AMPs poseen propiedades reguladoras y antimicrobianas que les permiten modular procesos inflamatorios mediante la quimiotaxis, ^[13] promoción de angiogénesis y reparación de tejido dañado. ^[14,15,16] En cavidad bucal, éstas moléculas reciben el nombre de péptidos salivales, debido a que son producidas por glándulas salivales mayores. ^[17,18] En estudios previos, se ha aislado de cavidad oral, específicamente del flujo salival,



algunos péptidos como histatinas, estaterrinas, cininógenos y cistatinas. ^[19,17,20] Sin embargo recientemente se ha reportado que específicamente la cistatina C es un péptido ubiquitario ^[21], que además de proteger la cavidad oral de la infección por *P. gingivalis*, mediante su unión firme a las cisteína ^[22,23] puede regular mecanismos inmunes. No obstante, tales efectos aún no se han probado en fibroblastos gingivales humanos incubados con *Porphyromonas gingivalis*



Antecedentes

La enfermedad periodontal es una patología inflamatoria crónica que afecta la integridad de los tejidos de soporte del órgano dentario (encía, ligamento periodontal, cemento radicular, hueso alveolar).^[24] Está caracterizada por un proceso de transición del periodonto sano a enfermo en el que existe un mecanismo disbiótico que perturba la comunidad polimicrobiana gingival, de tipo aerobia Gram positiva (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*) y anaerobia Gram negativa, (*Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium sp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*.).^[25, 26]

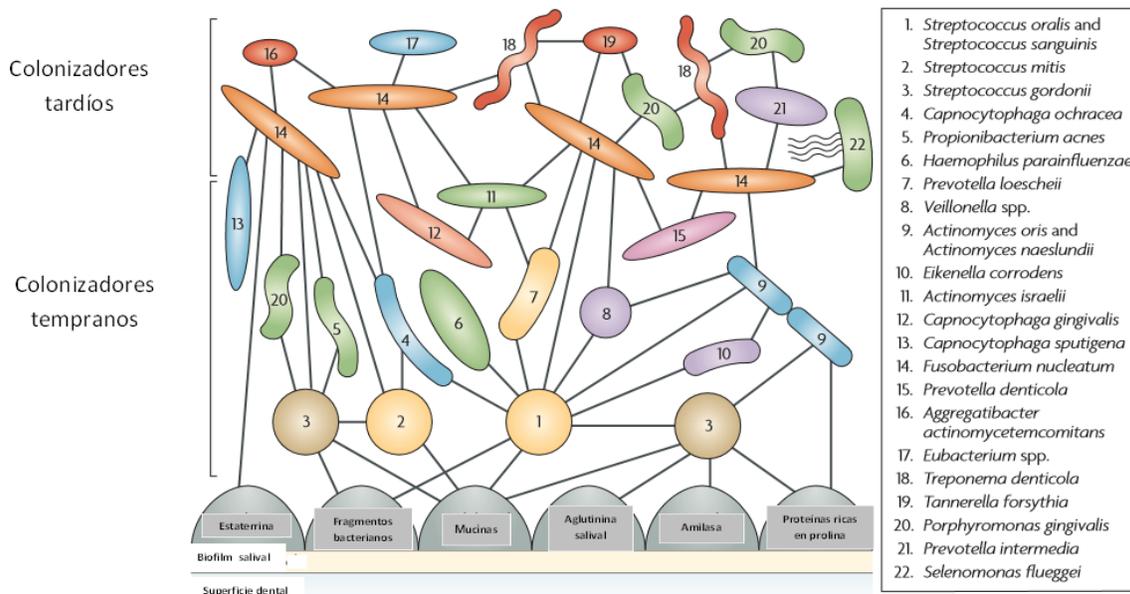


Figura 1. Colonización bacteriana oral. Modelo espacio temporal que muestra bacterias colonizadoras iniciales, coagregaciones entre colonizadores iniciales y tardíos. Nature Reviews Microbiology 2010

La fisiopatología de la enfermedad cursa con diferentes etapas que se describen a continuación:

- a) **Formación de biofilm bacteriano.** El biofilm microbiano puede estar constituido por 800 especies bacterianas en la placa dental humana. (Figura 1) Los patógenos putativos son principalmente anaerobios Gram negativos,



espiroquetas [27,28] y algunos virus (herpes virus simple [HSV-1], citomegalovirus [CMV], virus Epstein-Barr [EBV]). [29,30]

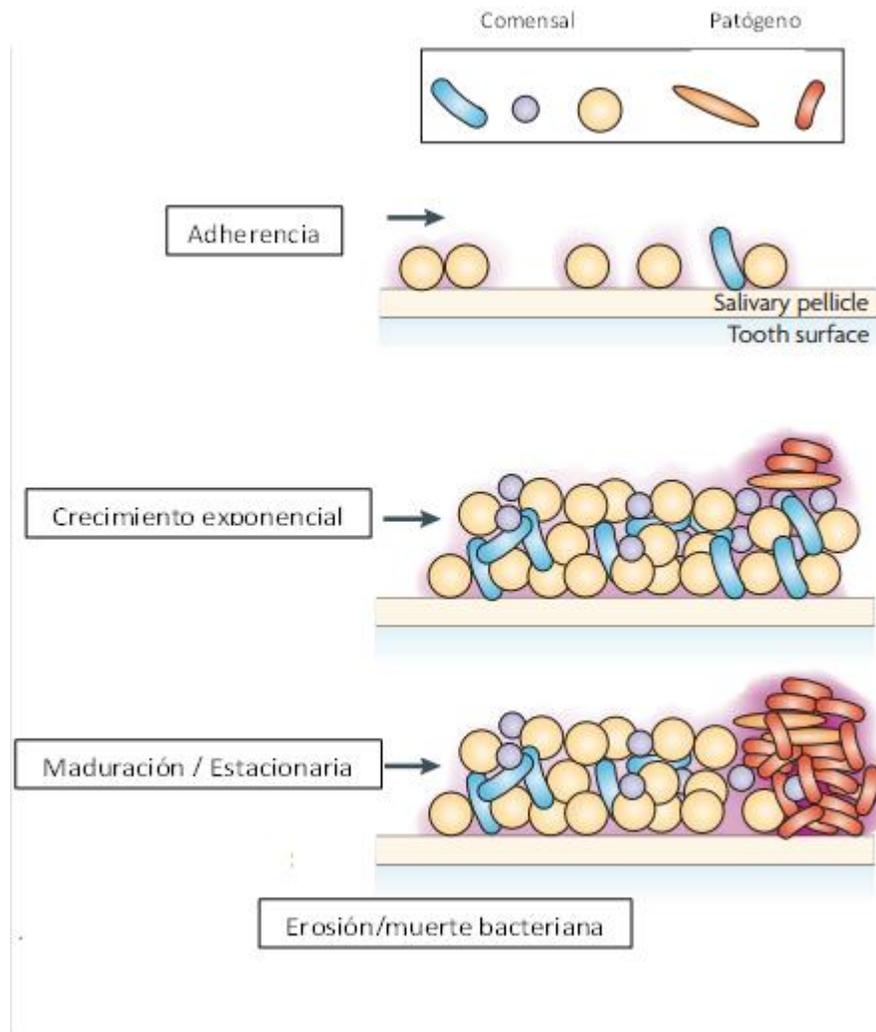


Figura 2. Etapas de formación del biofilm. Nature Reviews Microbiology 2010

Específicamente, las bacterias orales son las que colonizan las superficies duras. Las características físicas y morfológicas de estas superficies crean diferentes ecosistemas o nichos con distintos perfiles bacterianos. Estos nichos son el resultado de un equilibrio dinámico que existe entre las fuerzas de adhesión de los microorganismos y las fuerzas de deglución y masticación, el flujo salival y crevicular y las medidas de higiene bucal. [31,32] El primer paso para la formación del biofilm es la inserción o adherencia de moléculas orgánicas, en donde el metabolismo bacteriano es reducido, aunque se encuentra sujeto a diferentes



condiciones como la composición del estrato, el medio en donde se desarrolla, pH u oxígeno presente. ^[33] La segunda etapa conocida como crecimiento exponencial, consiste en un transporte pasivo de bacterias, mediada por fuerzas de débil atracción (interacciones de van der Waals) y por mecanismos de motilidad, y quimiotaxis. La etapa de maduración o estacionaria, consiste en una adhesión irreversible dada por fuerzas de corto alcance (enlaces covalentes y de hidrógeno). Los colonizaciones primarios forman un biofilm por autoagregación (atracción entre especies) y coagregación (atracción entre diferentes especies). El microambiente cambia ahora de aeróbico a anaeróbico facultativo. Las bacterias unidas se multiplican y secretan una matriz extracelular, lo que resulta en un biofilm maduro. **(Figura 2)** ^[34,35] La formación y desarrollo del biofilm es además resultado de señales sensoriales denominadas *quorum sensing* o comunicación célula-célula, la cual depende de la capacidad bacteriana para percibir su propia densidad celular detectando la concentración de moléculas que han sido liberados en su medio de señalización. Esta habilidad funciona a través de la secreción de moléculas acumuladas dependientes de densidad celular, llamadas autoinductores, que pueden difundirse a través de membranas celulares o ser transportadas activamente fuera de la célula. ^[36] Son codificados por gen *luxS*. En *Streptococcus gordonii*, *luxS* regula la expresión de *sspA* y *sspB*, que codifica para una proteína que provee sitio de unión para fimbrias de *P. gingivalis*. Por lo tanto *P. gingivalis* es considerada un colonizador secundario capaz de unirse en presencia de *S. gordonii*. ^[37] **(Figura 3)**

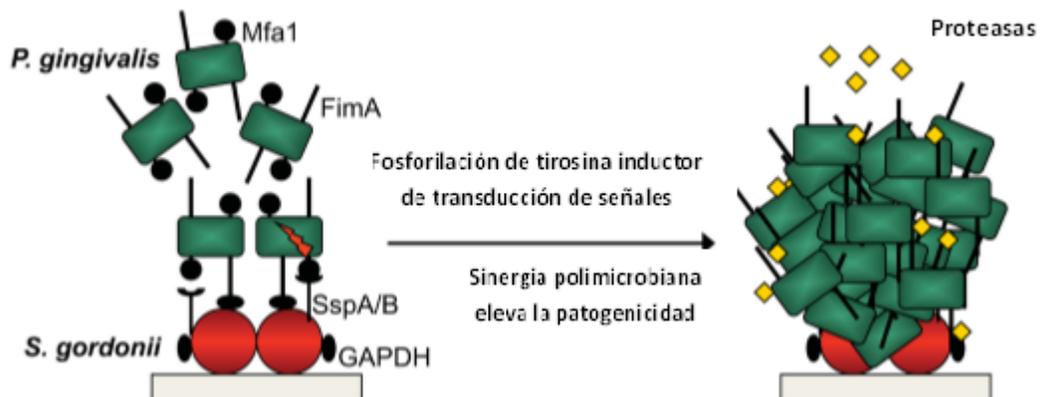


Figura 3. Interacción entre *P. gingivalis* y *S. gordonii*. Eur J Immunol. 2014



Calcificación del biofilm. Causada por iones del trasudado sérico, así como iones fosfato, fosforo y flúor. Los tejidos calcificados están expuestos a las secreciones salivales y al fluido crevicular que contiene moléculas que interactúan directamente con las bacterias favoreciendo su colonización en las superficies dentales y área subgingival. ^[38]

Inducción excesiva del proceso inflamatorio. La enfermedad ocurre cuando existe un desequilibrio entre el biofilm microbiano y una exacerbada respuesta inmune del huésped a la presencia microbiana, este desequilibrio es complejo debido a variaciones notables tanto en la placa dental como en los perfiles genéticos e inmunológicos del huésped, dando como resultado un estado inflamatorio aumentado que conduce al daño tisular. ^[39] Las células epiteliales funcionan como una barrera física contra patógenos y provocan el desencadenamiento de respuesta inmune innata y adquirida. ^[40] Las células dendríticas de Langerhans dentro del epitelio capturan material antigénico microbiano y lo llevan al tejido linfoide para su presentación a los linfocitos. ^[41] Los neutrófilos intentan engullir y matar las bacterias, pero la magnitud y la persistencia crónica del biofilm microbiano, les dificulta esta función. ^[42] Los neutrófilos producen además mediadores proinflamatorios (**TNF, IL-17**) y regulan el desarrollo de linfocitos T cooperadores (Th). La IL-17, actúa sobre varios tipos celulares del sistema inmune y del tejido conectivo, tales como neutrófilos, fibroblastos y osteoblastos. A través de estas interacciones, IL-17 induce la producción de quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz (**MMPs**), y otras moléculas destructoras de tejidos (especies reactivas de oxígeno [**ROS**]), así como la expresión de ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B, (**RANKL**), que impulsa la maduración de los precursores de los osteoclastos. Los linfocitos activados (Th1 y Th17) juegan un importante papel en la resorción ósea a través del mismo mecanismo **RANKL**-dependiente. Los neutrófilos activados expresan RANKL y puede estimular directamente la osteoclastogénesis, degradación de las fibras del ligamento por las metaloproteinasas de la matriz y la formación de tejido de granulación. ^[43]



Esta situación fisiopatológica persiste hasta que se exfolia el diente o se elimina exitosamente el biofilm microbiano y el tejido de granulación terapéuticamente. **(Figura 4)**

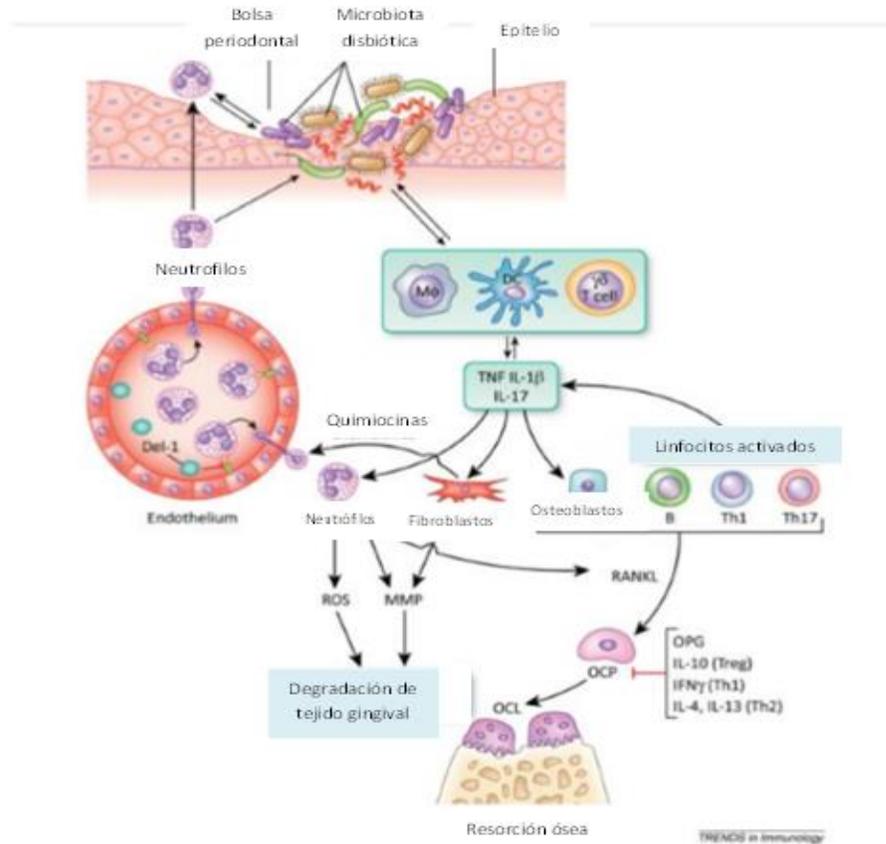


Figura 4. Proceso inflamatorio en enfermedad periodontal. Trends in Immunology 2014

Factores de riesgo

En la **Figura 5** se incluyen los factores de riesgo que contribuyen en la patogénesis de la enfermedad periodontal. El riesgo de enfermedad periodontal aumenta con varios factores como el tabaquismo, enfermedades sistémicas, medicamentos de tipo esteroide, antiepilépticos, fármacos para terapia del cáncer, mala colocación de prótesis dentales, apiñamiento dental, embarazo y uso de anticonceptivos. Además de estos factores, cualquier condición de salud que desencadene infecciones recurrentes como el virus de la inmunodeficiencia humana (**VIH**), diabetes y trastornos de los neutrófilos, pueden predisponer a la enfermedad. [44,45]



| FACTOR DE RIESGO | DESCRIPCIÓN |
|-------------------------------|--|
| Microorganismos orales | Más de 700 especies microbianas en boca |
| Genéticos | Síndromes que afectan fagocitos, estructura epitelial, tejido conectivo. Haim-Munk, Papillon Lefevre, Chediak –Higashi, Ehlers Danlos, Kindlers |
| Tabaco y alcohol | Las personas fumadoras son más propensas a desarrollar enfermedad periodontal. Su asociación con consumo de alcohol puede conducir a pérdida del tejido de soporte |
| Nutrición | Deficiencias de vitamina C Cancrum Oris ; más común en individuos malnutridos. |
| Osteoporosis | Perdida de inserción del órgano dentario |
| Diabetes | Respuestas exageradas de monocitos a antígenos de biofilm Respuesta quimio táctica de neutrófilos dañada Progresiva destrucción ósea |
| Estrés | Estrés emocional y psicosocial pueden causar enfermedad periodontal. |

Figura 5. Factores de riesgo de enfermedad periodontal. AJMR 2015

Microbiología de la enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa que requiere, la asociación de bacterias que colonizan el nicho subgingival. La cavidad oral facilita el crecimiento de la microbiota residente, al estar influenciada por la temperatura, el pH y ambiente local. La temperatura gingival en individuos sanos es de 34 a 37°C, durante la enfermedad periodontal la temperatura de la cavidad oral alcanza los 39°C. Las altas temperaturas coadyuvan en la expresión de genes de fimbrias de *Porphyromonas gingivalis* (fimA). [46,47]

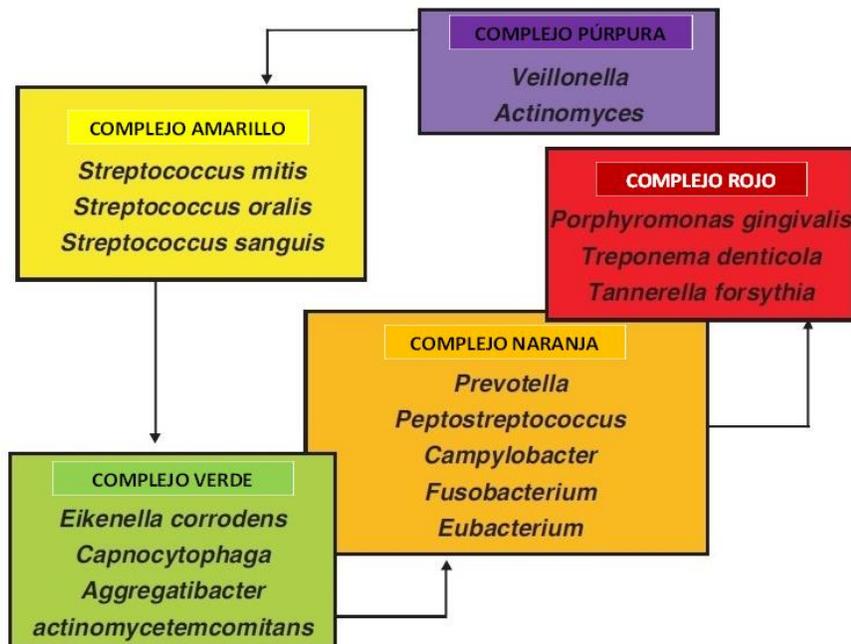


Figura 6. Microbiología del biofilm. J Indian Soc Periodontol 2011

Las bacterias son responsables de estimular la respuesta del hospedero, lo que determina los cambios tisulares y las consecuentes lesiones periodontales. Éstas bacterias se encuentran dentro de un glicocálix que forma un biofilm. Como se mencionó anteriormente la formación del biofilm permite a los microorganismos unirse, multiplicarse, protegerse de las sustancias tóxicas del ambiente; facilita la absorción de nutrientes, la eliminación de los productos metabólicos; es decir desarrollar un entorno adecuado con condiciones fisicoquímicas para su crecimiento^[48] En cavidad oral los nichos microbiológicos se encuentran en la mucosa masticatoria, dorso de la lengua, saliva, área subgingival y superficies duras tales como superficies dentales y materiales de restauración^[47].

Se ha descrito 5 principales complejos microbianos en el biofilm subgingival. Algunas especies se han asociado con la salud periodontal, como los complejos amarillo (*Streptococcus*) y púrpura (*Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*).^[49] Sin embargo en es en el denominado complejo rojo (*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis*) y naranja (*Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum* y *Aggregatibacter*



actinomycetemcomitans) donde se encuentran las principales microorganismos peridontopatógenos causantes de la enfermedad. **(Figura 6)** ^[50,51]

A pesar de que *P. gingivalis*; se encuentra presente en la microbiota oral (0.01%, en periodontitis murina), ^[52] en bajos niveles, se ha demostrado tener la capacidad de inducir procesos de tipo inflamatorio, que conducen a destrucción ósea, pérdida del ligamento periodontal y subsecuente destrucción tisular. ^[8]

P. gingivalis es un coco bacilo asacarolítico Gram-negativo, no móvil, anaerobio facultativo estricto, productor de pigmento negro, capacidad asociada con la incorporación a su envoltura nuclear del grupo hemo, ^[53,54] lo que condiciona su crecimiento en complejos nutricionales ricos en vitamina K y hierro (protoporfirina IX), el cual puede obtener de diferentes moléculas: hemoglobina, haptoglobina, mioglobina, hemopexina, oxihemoglobina, albúmina, lactoperoxidasa, catalasa y citocromo C. ^[55,56,9]

Porphyromonas gingivalis no es considerada una bacteria intracelular, sin embargo diversos estudios revelan que la bacteria podría tener esta característica, ya que puede adherirse a las proteínas de unión de células epiteliales gingivales, por lo que puede interiorizarse en las profundidades del tejido conectivo a través de una vía paracelular y destruirlo. ^[54]

La patogenicidad y virulencia de *Porphyromonas gingivalis* está asociada a factores o moléculas, que además de ayudar al establecimiento, mantenimiento y simbiosis de huésped-bacteria, son capaces de modular la respuesta inmune conduciendo a condiciones inmunopatológicas esenciales para el desarrollo de la enfermedad periodontal. ^[57]

Factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis*

Fimbrias

Prolongaciones finas y filamentosas múltiples localizadas en la superficie celular de *P. gingivalis* que favorecen la adherencia a proteínas salivales, matriz extracelular y células eucariotas como fibroblastos, células endoteliales, epiteliales, eritrocitos, así como a bacterias colonizadoras tempranas de la misma especie, participando de esta manera en la formación del biofilm maduro. ^[58]



Las fimbrias de *P.gingivalis* se clasifican en seis genotipos (I a V, 1b), basándose en las diferentes secuencias de nucleótidos que codifican para el gen Fim A. Las fimbrias de tipo I (mayores) son las responsables del proceso de colonización e invasión mientras que las de tipo II (menores) poseen una alta capacidad pro inflamatoria mediante la inducción de producción de citocinas (**IL-1 β** , **IL-6**, **IL-8**, **TNF- α**) y producción de metaloproteinasas de matriz (**MMP**) como **MMP-9**.^[59] Se ha reportado que las fimbrias de tipo II seguidas de las de tipo IV de *Porphyromonas gingivalis*, son las más encontradas en pacientes con enfermedad periodontal.^[60]

Las fimbrias representan un factor de virulencia importante en la internalización de la bacteria. El proceso inicia con la fijación mediada por FimA de *P. gingivalis* a receptores de integrina β 1 en la superficie de células epiteliales gingivales (**GEC**), y la subsecuente activación de adhesiones focales de tipo integrina^[61], induciendo directamente vías de señalización. La primera mediada por la activación de receptores Toll-like (**TLR-2**) que estimulan al factor nuclear kB (**NF-kB**) a través de **TLR 2** y **CD14**, lo que resulta en la inducción de citocinas implicadas en la resorción ósea, como Factor de necrosis tumoral α (**TNF- α**), Interleucina - 1 β (**IL - 1 β**), **IL - 8**, e **IL - 6**, molécula de adhesión vascular celular-1 (**VCAM-1**) y selectina E.^[62,63] Esto es posiblemente debido a que las fimbrias son los componentes más externos y los primeros en interactuar con los receptores de la célula huésped. Como sustento de lo anterior otros estudios reportan que *P. gingivalis* **ATCC 33277** induce una significativa pérdida de hueso periodontal en un modelo de ratón con delección de gen de fimA.^[64]

Las fimbrias de *P. gingivalis* pueden interactuar además con receptor 3 del complemento (**CR3**) para activar la cinasa reguladora de señales extracelulares 1/2 que inhibe la producción de **IL-12** mediada por señalización **TLR-2**.^[65] Esta interacción, favorece la inhibición de lipopolisacáridos (**LPS**) de otras bacterias, como *A. Actinomycetemcomitans*. **IL-12** es una citocina clave implicada en la eliminación de patógenos a través de la producción de **IFN- γ** . Así la inhibición de la IL-12, promueve la supervivencia de *P. gingivalis* *in vitro* e *in vivo*^[66].

Cápsula



Para el establecimiento en la cavidad oral los microorganismos pueden adherirse al órgano dentario o a superficies de mucosa. La adherencia es indispensable para proveer resistencia al flujo y saliva. Las adhesinas microbianas son componentes de la pared celular o pueden estar asociadas a la cápsula y fimbrias.^[67] Existen al menos 6 serotipos de antígenos capsulares (K1-K6), su composición química difiere entre las variedades de cepas de *P. gingivalis*.^[68] Singh y col demostraron que la capsula de *P. gingivalis* está relacionada con el incremento a la resistencia de fagocitosis, resistencia al suero y disminución en la capacidad de reclutamiento de polimorfonucleares (**PMN**).^[69] La presencia de este factor de virulencia es significativo en la adhesión inicial de la bacteria a las bolsas periodontales humanas, debido a que interactúa con proteínas de superficie y facilita su unión a células del hospedero, especialmente a células epiteliales gingivales.^[70] Por otra parte los niveles y mecanismos de coagregación entre *P. gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* han mostrado ser dependientes de la cápsula. Estudios en modelo de infección de ratones han revelado que las cepas capsuladas de *P. gingivalis* son más virulentas que las no capsuladas. Las cepas no capsuladas causan menor invasión, abscesos localizados, e incrementan la fagocitosis o la muerte rápida por macrófagos y células dendríticas.^[71] Estudios recientes por Brunner y col ha demostrado que la cápsula de *P. gingivalis* puede modular la respuesta del hospedero al reducir la síntesis de citocinas como **IL-6**, **IL-8** en fibroblastos. Una explicación para este fenómeno es que al inhibir mecanismos de fagocitosis, incrementa la supervivencia de la bacteria dentro de las células hospedero.^[72] La cápsula de *P. gingivalis* determina necesariamente su supervivencia, ya que reduce los efectos de bactericidas de péptidos antimicrobianos pequeños como las defensinas. La respuesta del hospedero-bacteria utilizando como modelo a *Drosophila melanogaster*, infectada con *P. gingivalis* demostró que la cápsula es la que determina la sobrevivencia del microorganismo.^[73]

Gingipainas (cisteínas- proteasas)

P. gingivalis es una bacteria asacarolítica, que requiere degradar proteínas del huésped para obtener energía. Esta función la llevan a cabo las cisteínas proteasas. Son enzimas responsables del 85% de actividad proteolítica de la



bacteria. ^[74] Con base al sustrato específico se dividen en cisteína proteasa de tipo Arginina-X (**RgpA, RgpB**) y las de tipo Lisina-X (**Kgp**). ^[75,76]

El sistema del complemento en particular es uno de los componentes de la respuesta inmune innata particularmente afectado por las cisteína-proteasas. Las gingipaínas **Arg-X (HRgpA, RgpB)** pueden escindir la molécula **C5**, mediante su actividad parecida a **C5 convertasa**, ^[77] resultando en la escisión de **C5** en **C5a** que es crucial para el reclutamiento de **PMNs**. En el tejido periodontal murino, la señalización **C5aR** sinergiza con **TLR2** para inducir la secreción de citocinas que promueven la inflamación periodontal y la pérdida ósea (**TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-17A**). Esto favorece especialmente a *P. gingivalis* y otras bacterias asociadas con la enfermedad puesto que requieren un ambiente inflamatorio para asegurar nutrientes críticos; producto de degradación de tejidos que incluyen péptidos y hierro derivado de hemina. ^[78,79]

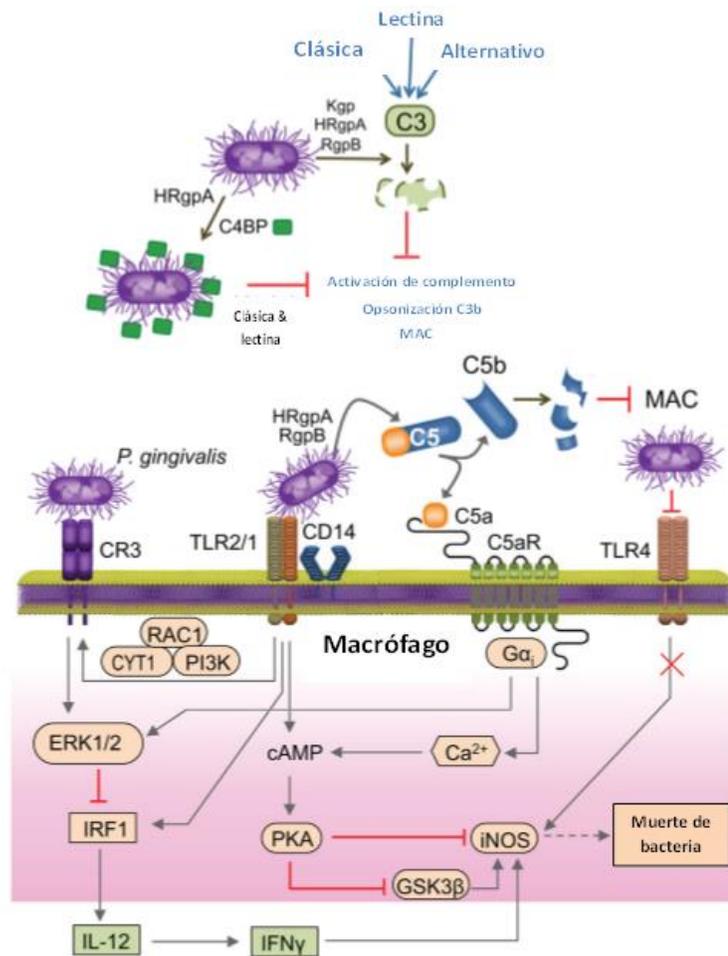




Figura 7. Manipulación del complemento, TLRs, y señalización por *P. gingivalis*. Eur J Immunol. 2014

Estas enzimas pueden además degradar la molécula **C3**, contribuyendo potencialmente a disminuir la opsonización bacteriana, confiriéndole de esta manera una mayor resistencia a actividades bactericidas. Es debido a esta degradación de **C3**, que *P. gingivalis* puede bloquear la cascada complementaria canónica independientemente de la vía de inicio (clásica, lectina o alternativa), puesto que es el componente central del complemento donde convergen todas las vías de iniciación.^[80,81] Como consecuencia, se suprime la deposición de **C3b** opsonina o el complejo de ataque de membrana sobre la superficie bacteriana^[82]. Aunque las tres enzimas median la inactivación del complemento a través de la degradación de **C3**, **HRgpA** y **RgpB** son más potentes que gingipaínas tipo- Lys (**Kgp**).^[80] (Figura 7)

P. gingivalis también emplea mecanismos independientes de la degradación para interferir con la activación del complemento. Específicamente, *P. gingivalis* utiliza **HRgpA** para capturar la proteína que se une a **C4b** en circulación en su superficie celular, adquiriendo así la capacidad de regular negativamente las vías clásicas y de las lectinas.^[81]

En general, estas enzimas tienen múltiples efectos en componentes moleculares de la respuesta inmune. Pueden escindir varios receptores de células T, tales como **CD2**, **CD4** y **CD8**, obstaculizando así la respuesta inmune mediada por células.^[82] Las gingipaínas también pueden estimular la producción de **IL-6** por células epiteliales orales y la producción de **IL-8** por fibroblastos gingivales, mejorando así las respuestas inflamatorias. Sin embargo, también pueden inhibir proteolíticamente las citocinas antiinflamatorias (**IL-4**, **IL-5**).^[83]

Las gingipaínas también pueden afectar la permeabilidad vascular y el sangrado en el sitio periodontal mediante la activación proteolítica de calicreína plasmática y la bradisinina o, alternativamente, aumentar la liberación de trombina y protrombina, lo que puede dar como resultado una mayor permeabilidad vascular. Además, al degradar fibrinógeno, pueden contribuir a la inhibición de la coagulación sanguínea y aumentar el sangrado en el sitio, incrementando así la disponibilidad de hemina para el crecimiento de *P. gingivalis*.^[84]



Lipopolisacárido (LPS)

Complejo glucolipídico de membrana externa, compuesto por una porción de polisacáridos hidrofílicos (antígeno O) y un dominio hidrofóbico (lípidos A); que es el responsable de la mayoría de los efectos biológicos, debido a que es altamente mitogénico. ^[85] El LPS puede ser reconocido por el receptor **CD14** (expresado en monocitos, macrófagos, **PMNs** y fibroblastos) a través de la unión de su lípidos A con la proteína unidora de LPS (**LBP**), una glicoproteína que se encuentra en la fase aguda y fase normal de suero. El complejo **LPS/CD14/LBP** induce la activación de diversas proteínas como la proteína cinasa C, proteínas tirosinas, cinasas y proteínas cinasa mitogénico activada (**MAPK**). ^[86]

El LPS también puede ser reconocido por receptores de tipo Toll como **TLR2** y **TLR4** expresados en las células dendríticas, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos gingivales. (**Figura 7**) La diferencia en el tipo de receptor que reconozca el LPS depende de los patrones de acilación del lípidos A, el cual presenta dos formas, dependiendo de la concentración de hemina presente en el microambiente: tetra-acilado y penta-acilado. Cuando existe mayor cantidad de hemina el lípidos A se encuentra tetra-acilado y actúa como antagonista de **TLR4**. Por el contrario, cuando existe menor cantidad de hemina el lípidos A está penta-acilado induciendo la activación del receptor **TLR 4** y la expresión de E-selectina. Ésta heterogeneidad que posee el lípidos A favorece además la interacción del LPS con **TLR-2**, conduciendo a una regulación negativa inmunológica característica de enfermedad periodontal. ^[4, 87]

Estudios *in vitro* realizados con células dendríticas incubadas con LPS de *P. gingivalis* activan linfocitos **TCD4+**, los cuales se diferencian en células efectoras tipo Th1. También se ha observado que el LPS puede inducir maduración en células dendríticas y la secreción de calprotectina por neutrófilos humanos, la cual funciona como un marcador de enfermedad ^[88]

Estudios recientes demuestran que el LPS de *P. gingivalis* aumenta la expresión de **EphB4** (Ephrin type-B receptor 4) mientras inhibe la expresión de **EphrinB2**. ^[89] La familia de Eph de receptores tirosina cinasa se encuentra involucrada en procesos de angiogénesis, desarrollo óseo, remodelación ósea, y de manera



general en la homeóstasis ósea. Se ha demostrado que **EphrinB2** es un precursor de osteoblastos, mientras que la señalización a través de **EphB4** disminuye la diferenciación osteogénica. ^[90]

El **LPS** de *Porphyromonas gingivalis* inhibe la actividad de fosfatasa alcalina, colágena1- α 1, así como la producción de osteocalcina y la mineralización en células troncales de ligamento periodontal (**PDLSCs**) positivas para **STRO-1** y **SSEA-4**. También promovió la proliferación celular y la estimulación de niveles de expresión de todas las moléculas de adhesión. ⁽⁸⁷⁾

Dipeptidil aminopeptidasa IV (DPPIV)

Kumagai y col. demostraron que la **DDPPIV** de *P. gingivalis* participa en la degradación de la colágena induciendo la actividad de las metaloproteinasas de matriz (**MMPs**) del tejido conectivo del huésped. La **DPPIV** se localiza en la cara externa de la membrana plasmática de la bacteria y su actividad se debe a su dominio extracelular. Esta molécula consta de una proteasa serina que se une en el extremo amino terminal de los dipéptidos X-Pro o X-Ala de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de la matriz extracelular. La región carboxilo terminal de la **DPPIV** se ha asociado con actividad peptidasa. ^[91]

En estudios recientes se ha planteado la participación de este factor de virulencia en la formación de biofilm y su relación con la patogenicidad de la bacteria en diversos aislados clínicos de *P. gingivalis*. En modelo murino, los aislados formadores de biofilm con alta actividad de **DPPIV**, mostraron ser más patógenos. ^[92]

La **DPPIV** contribuye a satisfacer las necesidades nutricionales y de colonización de *P. gingivalis* a través de la ruptura del tejido. El tejido conectivo es rico en colágena tipo I y posee principalmente secuencias ricas en glicina, prolina, sustratos potenciales a los que pueden unirse las peptidasas específicas de la prolina como la **DPPIV**. Esta molécula también puede digerir a los productos degradados por la **MMP-2** y **MMP-9** (gelatinasas). La **DDPPIV** interfiere en la interacción entre la fibronectina y el receptor $\alpha 5\beta 1$, mediante su receptor, lo que podría impedir que los fibroblastos se adhieran a la fibronectina alterando el equilibrio en la remodelación de tejido conectivo. ^[93]



Colonización de *Porphyromonas gingivalis*

La colonización de *P. gingivalis* se encuentra influenciada por la saliva, la cual funciona como un vector para su transmisión y entrada en el ambiente oral. Por otro lado la película adquirida de la saliva que se deposita sobre la superficie dental facilita la adhesión de las fimbrias de la bacteria, las cuales se unen a las superficies sólidas con una afinidad muy alta lo que previene su remoción por el flujo salival. Más adelante, en el proceso de infección la bacteria encuentra su nicho ideal (el surco gingival), por proliferación o reubicación de los patógenos, además los colonizadores secundarios, como son los estreptococos anaerobios facultativos facilitan su entrada al nicho por reducción de los niveles de oxígeno dentro del nicho, que facilita el crecimiento de los anaerobios estrictos. [94]

La sobrevivencia en tejido gingival, específicamente en bolsas periodontales se asocia a su colonización tardía una vez que existe un biofilm maduro debe a que se trata de un colonizador tardío que interactúa estrechamente con el tejido gingival yuxtapuesto. Es decir *P. gingivalis* se basa en colonizadores tempranos como estreptococos y *Fusobacterium nucleatum* para reducir la tensión de oxígeno y proporcionar apoyo metabólico. [95] La coadhesión entre estos organismos facilita las interacciones nutricionales y de señalización. [96] *P. gingivalis* se desarrolla en comunidades heterotípicas con *Streptococcus gordonii* mediante una adhesión de FimA y Mfa1 (fimbrias de *P. gingivalis*) proteínas de superficie de *S. gordonii* (GAPDH y SspA / B), lo que origina cascadas de señales dentro de *P. gingivalis*, caracterizada por el aumento de expresión proteína tirosina fosfatasa (Ltp1) que eleva la cantidad de transcripción del factor CdhR, que inhibe el desarrollo de la comunidad microbiana. [97,98] (Figura 3). Además, la fosforilación/ desfosforilación de la tirosina también regula la expresión de la proteasa por *P. gingivalis*, influyendo así en el potencial patogénico. [99]. La capacidad de *S. gordonii* para aumentar la patogenicidad de *P. gingivalis* también se ha establecido *in vivo*: la co-infección oral de ratones con ambos organismos induce más pérdida de hueso alveolar en comparación con la infección con cualquiera de las dos especies. [100]

Invasión de *Porphyromonas gingivalis* en células epiteliales gingivales.

Porphyromonas gingivalis tiene la capacidad de invadir varios tipos celulares, incluyendo células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y células de músculo liso. (83) Sin embargo,



existen varios estudios en donde se reporta que la bacteria internaliza en una vía no fagocítica, dependiente de clatrina en el epitelio gingival. La invasión de *P. gingivalis* en células epiteliales gingivales es mediada por la adhesión de las fimbrias con receptores de integrina $\alpha 5$ - $\beta 1$ lo que induce a cambios morfológicos prolongados (24 horas), principalmente fosforilaciones de proteínas de adhesión focal (**FAK**), paxilina, talina y vinculina lo que genera fuerzas que regulan señalizaciones para rearrreglos dinámicos de actina, microtúbulos del citoesqueleto y balsas lipídicas. ^[101] **(Figura 8)**

El aumento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular es otro fenómeno asociado a la invasión de *P. gingivalis* en células epiteliales. Este incremento condiciona oscilaciones en los espacios citoplasmáticos y nucleares activando el flujo de iones de calcio a través de canales presentes en las células epiteliales gingivales **(Figura 7)**. Las fluctuaciones de calcio median la señalización que dispara cascadas de respuestas intracelulares que favorecen la remodelación del citoesqueleto. La invasión de las células epiteliales es completada alrededor de 20 minutos tiempo después del cual existe una acumulación de bacterias en la región perinuclear de las células. ^[102]

Por otro lado, se ha reportado que las células epiteliales infectadas con *P.gingivalis* no presentan muerte celular por apoptosis. Esto es debido a que la bacteria tiene la capacidad de secretar una molécula putativa efectora/antiapoptótica; la cinasa difosfato nucleósido de *P.gingivalis* (*P.g.*- **NKD**). El mecanismo de acción de **NKD** consiste en el consumo de ATP celular disponible. Yilmaz y col. mostraron que la **NKD** se produce intracelularmente por la bacteria y puede interferir con la activación del receptor dependiente de apoptosis P2X7. La interacción **ATP** con el receptor P2X7 en macrófagos inducen una gran variedad de eventos celulares incluyendo la activación del inflamósoma, secreción de IL-1 β , mediando entre la muerte de la bacteria intracelular y la inducción de la muerte celular del hospedero por apoptosis y/o necrosis. Por lo tanto, la enzima **NKD** se secreta durante la infección y puede participar modificando la biología de celular del hospedero suprimiendo la muerte celular que permite que la bacteria sobreviva, prolifere durante períodos prolongados en el epitelio gingival y se disemine. ^[103]

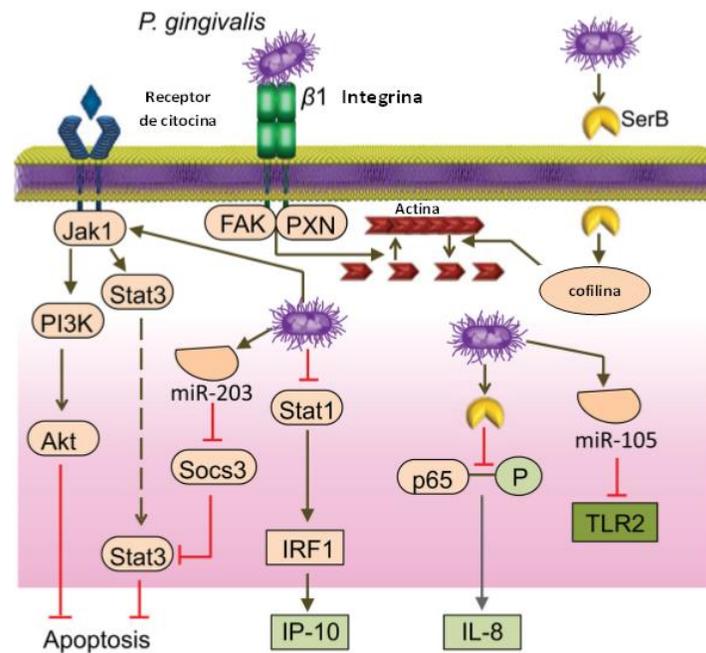


Figura 8. Internalización de *P.gingivalis* en células epiteliales gingivales. Eur J Immunol. 2014

Las células epiteliales viven aproximadamente una semana y *P. gingivalis* ha desarrollado además de las ya mencionadas estrategias, otras que le permiten evitar que la muerte de las células afecte su sobrevivencia. Una de estas estrategias es que la bacteria puede balancear la expresión de moléculas pro-apoptóticas como Bax y antiapoptóticas como Bcl-2 para prevenir la muerte de células epiteliales gingivales ^[104]

P. gingivalis puede evadir la respuesta inmune, diseminándose de célula a célula, a través del citoesqueleto de actina sin causar muerte celular. Después del establecimiento de la bacteria, se observa que el ciclo celular se encuentran alterado. Se presenta proliferación acelerada de células epiteliales gingivales que se refleja en un agrandamiento del epitelio gingival, característica importante que se observa en la enfermedad periodontal. ^[101]

Interacción de *P. gingivalis* con fibroblastos gingivales humanos

Los fibroblastos gingivales son los principales tipos celulares encontrados en el tejido conectivo del periodonto. Tiene la función de mantener y regular la integridad de tejido conectivo mediante la secreción de matriz extracelular y degradación de tejido, con la finalidad de preservar la homeostasis del tejido. ^[105] Son células de origen mesenquimal



esenciales, que participan en el proceso de cicatrización de heridas y reparación. Son consideradas células “centinela”, ya que están expuestas a patógenos bacterianos una vez que se rompe la barrera epitelial.

Fueron inicialmente considerados como células inmunológicamente inertes, sin embargo, diversos estudios han mostrado que tienen la capacidad de sentir patógenos o patrones moleculares asociados a patógenos (**PAMPs**), como el **LPS**. Una respuesta inicial de los fibroblastos gingivales a la presencia del **LPS**, involucra un incremento en la síntesis de ácido hialurónico glicosaminoglicano de matriz extracelular, que aumentan la motilidad celular. El aumento del ácido hialurónico parece estar mediado por la presencia de **LPS** e inducida por el incremento de niveles de prostaglandina E-2 (**PGE2**).^[106, 107, 108] Graves y col. sugieren que probablemente el **TNF α** que se produce en la encía inflamada resultado de la infección por *P.gingivalis*, se une al receptor TNF tipo 1 en fibroblastos gingivales, los cuales inducen una serie de eventos que conducen a la activación de caspasas y a los eventos que conlleva a la muerte celular por apoptosis.^[109,110]

La transducción de señales inducida por **LPS** dispara cascadas de señalización intracelulares que activan factores de transcripción, como **NF- κ B**, este heterodímero es mantenido en el citoplasma mediante su unión a las proteínas inhibidoras de **NF- κ B** (**I κ B**). La activación mediante el polisacárido bacteriano induce la fosforilación de estas proteínas inhibidoras mediante el complejo **I κ B** cinasa (**IKK**), la proteína **I κ B** fosforilada es establecida como objetivo para degradación proteosomal, lo que libera el **NF- κ B** para su traslocación al núcleo y posterior unión a promotores de genes que induce la codificación para proteínas proinflamatorias como **TNF α** , **IL-1 β** e **IL-6** iniciando así el proceso inflamatorio periodontal.^[12]

Además de este factor nuclear existen otras vías que son activadas por proteínas cinasas activada por mitógenos (**MAPK**): vía de cinasas reguladas por señales extracelulares (**ERK-1 y 2**), vía c-Jun cinasas N terminal (**JNK**) y la vía p38. Estas vías activan a su vez factores como **NF- κ B** (p50p65) y **AP-1**(c-Fos/cJun). Esta molécula es reconocida vía receptor de reconocimiento de patrones (**PRR**) generando señales de daño y secretando mediadores inflamatorios que regulan la respuesta inflamatoria. Los receptores expresados por estas células son tipo Toll (**TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR9**) y **CD14**.^[108]



Péptidos antimicrobianos

Los organismos vivos tienen que defenderse del ataque constante de patógenos. Éstos patógenos, son tolerados, y se mantienen en la superficie de las capas epiteliales, como en algunas áreas de vías superiores. ^[111]

El sistema inmunológico de mamíferos tiene varios mecanismos para eliminar estos patógenos y neutralizar sus toxinas o alérgenos ambientales. ^[112] El reconocimiento de los antígenos por el sistema inmunológico se realiza mediante dos conjuntos de receptores. El primer conjunto está codificado por los genes en la línea germinal del huésped y detecta patógenos o daños (auto-) asociados a patrones moleculares (**PAMPs o DAMPs**), dando lugar a respuestas inmunes innatas. El segundo conjunto de receptores tiene especificidad de antígenos extraños individuales generados por la recombinación somática de los genes que codifican los receptores y activan respuestas inmunes adaptativas ^[113].

El sistema inmune innato es la primera línea más primitiva de los organismos multicelulares. Los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas son las principales células inmunes implicadas, mientras que las células no inmunes incluyen epitelio mucoso de las vías respiratorias, tractos gastrointestinal y genitourinario, fibroblastos y células mesoteliales. La respuesta innata es desencadenada por proteínas como, complemento. Los receptores unidos a membrana y citoplásmicos, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (**PRRs**) son también parte integral del sistema inmune innato y se unen a **PAMPs o DAMPs**. Las interacciones entre **PRRs y PAMPs / DAMPs** activan las vías de señalización celular, llevando a la inducción de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, péptidos antimicrobianos, radicales libres, aminas bioactivas, etc., que pueden ser secretadas a partir de las células. ^[114, 115] Los péptidos antimicrobianos (**AMPs**) también se conocen como péptidos de defensa del huésped (**HDPs**), una terminología que abarca funciones antimicrobianas, así como la reciente estudiada capacidad inmunomoduladora. ^[116]

Los **AMPs**, son moléculas efectoras de inmunidad innata y son capaces de matar bacterias, virus, hongos y protozoos. Constituyen arsenales antimicrobianos de prácticamente todo tipo de organismos vivos, incluidos los vertebrados, invertebrados y plantas. ^[117] Representan uno de los mecanismos de defensa más antiguos para proteger



al huésped que evolucionó mucho antes del sistema inmune adaptativo. Fueron reportados por vez primera a mediados de la década 1980-1990 a través de dos líneas de investigación: la primera dirigida a la definición de los mecanismos de la hemolinfa (sangre) de los insectos inmunizados para combatir crecimiento microbiano; mientras que la segunda estudiaba los mecanismos de las células fagocíticas de mamíferos para matar bacterias después de haberlas ingerido. ^[118]

La mayoría de los microorganismos tienden a invadir el organismo a través de las superficies mucosas, donde se encuentran parte de los AMPs, que son sintetizados rápidamente por las células epiteliales mucosas mediante estímulos microbianos y secretados en el medio extracelular. ^[119] En la circulación sistémica, las AMPs derivados de neutrófilos montan la primera línea de defensa antimicrobiana después de ser liberadas en los fagosomas que contienen los patógenos fagocitados. ^[118]

Actualmente la base de datos de péptidos antimicrobianos (**APD**) tiene registrados 2578 **AMPs**, incluyendo 257 bacteriocinas de bacterias, 2 de arqueas, 7 de protistas, 13 de hongos, 319 de plantas y 1939 de animales. ^[120,121]

Estructura de AMPs

Los **AMPs** comparten características comunes que les otorgan un diseño óptimo para eliminar a los microbios. Son pequeños péptidos cargados positivamente de 6-100 aminoácidos. ^[122] Algunos **AMPs** catiónicos mayores como la lisozima, lactoferrina y cistatina a pesar del mayor número de aminoácidos exhiben propiedades antimicrobianas y se engloban dentro de este grupo. ^[123] En general, son moléculas anfipáticas con un extremo hidrófobo y un extremo catiónico. Estas moléculas están enriquecidas con residuos hidrofóbicos, incluyendo Triptofano (Trp), Leucina (Leu), Isoleucina (Ile), Fenilalanina (Phe) y Valina (Val), lo que les permite adoptar estructuras anfipáticas diversas en presencia de la membrana fosfolipídica. Por lo general tienen un exceso de aminoácidos catiónicos, como Arginina (Arg) y Lisina (Lys), que les imparten una carga positiva neta del orden de +2 a +9. ^[124,125]

AMPs se sintetizan como pre-propeptidos, donde la parte "pre", como péptido señal, dirige la proteína al retículo endoplasmático. Después de la eliminación de esta parte, las **AMP** se someten adicionalmente a escisión proteolítica, y el péptido maduro se forma con la eliminación de la parte "pro". ^[126] A pesar de sus propiedades físicas similares, los



péptidos comparten homologías de secuencia muy limitadas y se agrupan en cinco clases estructurales principales basadas en dicroísmo circular y estudios de magnetización remanente natural (NRM). Estos incluyen hojas α -helicoidales (con puentes disulfuro múltiples), bucle (caracterizado por un solo puente disulfuro), extendido y estructuras cíclicas ^[127]. Los AMPs se clasifican en diferentes familias; en los mamíferos, se encuentran la defensinas, familia de las catelicidinas y péptido salivales, producidos y secretados en la saliva por glándulas salivales mayores; parótida, mandibular y submandibular ^[128, 129, 123]

Regulación génica de AMPs

En los últimos años se han logrado importantes avances en el conocimiento bioquímico y genético sobre la estructura y mecanismos de regulación de los genes de **AMPs** en mamíferos e insectos, particularmente en *Drosophila*. Se ha demostrado que en el genoma pueden presentarse una o varias copias de estos genes, con variado número de intrones e incluso transposones. En *Drosophila* se ha demostrado que los genes codificadores de **AMPs** contienen secuencias de **DNA** reguladoras conocidas como elementos **kB**. ^[112] Este tipo de secuencias son similares a las responsables de la regulación de la expresión de la cadena ligera k de la inmunoglobulina y de proteínas de respuesta de fase aguda en mamíferos. Por otra parte, en las células del cuerpo graso de *Drosophila* también se han caracterizado tres factores de transcripción del tipo **rel** conocidos como Dorsal, Dif y Relish, los cuales se translocan al núcleo celular en respuesta a un estímulo microbiano. ^[127,128,129] Estos factores nucleares **kB (NFk)** reconocen secuencias **kB** en la región reguladora del gen y, consecuentemente, promueven la producción de **AMPs**. La activación de los genes de **AMPs** están bajo el control de diversas rutas reguladoras, donde la mejor caracterizada es la ruta Toll, la cual incluye la activación de proteínas de reconocimiento que se unen a receptores (Toll). La unión al receptor activa una cascada de fosforilación de proteínas citoplasmáticas (Tir, Tube, Pelle) que a su vez inactivan al inhibidor I κ B (cactus), para permitir la translocación de los factores de transcripción **kB** (Dorsal, Dif) al núcleo, activando la expresión de genes de la respuesta inmune, incluyendo los **AMPs**. ^[130]

Clasificación de AMPs



Los péptidos antimicrobianos son pequeñas moléculas de composición variable de aminoácidos (6-100 aminoácidos), catiónicos con una carga positiva global de 2-9 que le asegura la acumulación en las superficies microbianas polianionicas con polímeros como lipopolisacáridos y ácidos teicoico de bacterias Gram negativas y positivas, y con una carga del 30% de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos.^[131] Estas propiedades permiten al péptido plegarse en una estructura anfifílica en tres dimensiones. Basándose en su estructura secundaria los **AMPs** son clasificados en clases:

AMPs alfa helicoidales: representan los péptidos más estudiados de las ranas africanas. Se encuentran estabilizados por dos o cuatro puentes de disulfuro. Numerosos estudios indican que alfa hélice se unen a la membrana con la superficie hidrofóbica, contribuyendo como factor de citotoxicidad para las células. La anfipaticidad de estos péptidos es usualmente segregado a lo largo del eje alfa hélice. Los péptidos pueden liberarse paralelamente a la membrana durante la interacción inicial con los lípidos. Las propiedades de los tallos alfa hélice influyen en la profundidad e inserción en la membrana para llevar a cabo la actividad antimicrobiana. Pueden incorporarse en la membrana a través de poros toroidales compuestos por asociación de péptidos. La formación del poro esta siempre asociada con los cambios locales de la membrana en donde las moléculas lipídicas se curvan y solo dos péptidos se localizan en el centro, mientras que los demás se localizan en la periferia. Posteriormente ellos se traslocan al interior de las células y los péptidos se mantienen paralelamente a la bicapa lipídica.
[132,133,134]

Péptidos hoja beta. Estabilizados por dos o cuatro puentes de disulfuro. La mayoría de estos péptidos irrumpen en la membrana bacteriana a través de la formación de poros toroidales como los observados en la péptido protegrina I. Éstos péptidos forman barreras transmembrana oligomericas en membranas anionicas, formando agregados en la superficie. Adicionalmente se sugiere que emplean mecanismos no líticos, por ejemplo el péptido lactoferrina puede actuar sinérgicamente con otros agentes antimicrobianos afectando el potencial transmembrana y fuerza protónica, resultando en la inhibición del flujo de **ATP**. Estos péptidos análogos son potentes contra el espectro de actividades de



Pseudomonas aeruginosa.^[135,136] La conformación de estos péptidos está estabilizada por puentes de disulfuro entre residuos de Cys conservada. A este grupo pertenecen las defensinas (**HBD-1**) con propiedades contra *Candida Albicans* y algunas bacterias Gram-negativas.^[137,138]

AMPs extendidos. No poseen elementos estructurales secundarios regulares, sin embargo poseen altas concentraciones de aminoácidos como arginina, tripsina, prolina. Las moléculas extendidas ricas en tripsina y arginina poseen residuos peptídicos que incluyen RRWQWR y RAWVAWR los cuales son identificados como fragmentos antimicrobianos y con gran espectro de actividad.^[139] Por ejemplo el hexapeptido WRWYCR identificado como inhibidor unido a uniones Holliday, lo que podría asociarlos con prevención en mecanismos de replicación, recombinación y reparación de DNA bacteriano. Su función antimicrobiana se da a través de la penetración de la membrana y ejercen sus efectos antimicrobianos con la interacción específica con proteínas intracelulares que sirven como chaperonas y tienen actividad ATPasa, acumulándose principalmente en el citoplasma bacteriano.^[140, 141] Dentro de este grupo se encuentran los péptidos salivales como las Histatinas y Cistatinas.^[142]

Mecanismo de acción

La actividad antimicrobiana de péptidos de defensa del huésped se antagoniza a extensiones variables por cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} (a concentraciones fisiológicas de 1-2 mM), cationes monovalentes como Na^{+} y K^{+} (100 mM), y polianiones tales como glicosaminoglicanos (heparina y otros) y mucinas.^[143] Por tanto solo aquellos péptidos que han demostrado la capacidad de matar directamente microbios bajo tales condiciones fisiológicas se consideran antimicrobianos.^[144,145]

Los péptidos entran en contacto con la superficie aniónica del citoplasma y se insertan de tal manera que inicialmente la interfase de los grupos de cabeza hidrófilos y las cadenas de ácidos grasos de membrana de fosfolípidos. Después de la inserción en la membrana, los péptidos antimicrobianos actúan ya sea alterando la integridad física de la bicapa, por adelgazamiento de la membrana, poración transitoria o por interrupción de la función de barrera, o trasladarse a través de la membrana y actuar sobre objetivos internos.^[146,147]



Para explicar el mecanismo de permeabilización de la membrana medida por los **AMPs** se han propuesto diversos modelos que ocurren en la membrana citoplasmática bacteriana después de la adsorción inicial del péptido antimicrobiano (**AMPs**). Sin embargo estos eventos no son necesariamente exclusivos unos de otros. Los péptidos situados en la membrana alcanzan una concentración umbral, se insertan a través de la membrana para formar poros revestidos de péptido en el modelo de barril, solubilizar la membrana en estructuras micelares en el modelo de alfombra o formar poros en el modelo de poro toroidal. **(Figura 9)** En el modelo de poro toroidal desordenado, la formación de poros es más estocástica e implica menos péptidos. El espesor de la bicapa puede ser afectado por la presencia de los péptidos, incluso la propia membrana puede ser remodelada para formar dominios ricos en lípidos aniónicos que rodean a los péptidos. La absorción de péptidos a la membrana puede potenciarse dirigiéndolos a fosfolípidos oxidados. Un péptido, también puede acoplarse con aniones pequeños a través de la bicapa, dando como resultado su eflujo, generando que el potencial de membrana se disipe sin generar daño. ^[148,149]

A continuación se exponen a profundidad algunos de los modelos que explican el mecanismo de acción de los **AMPs**.

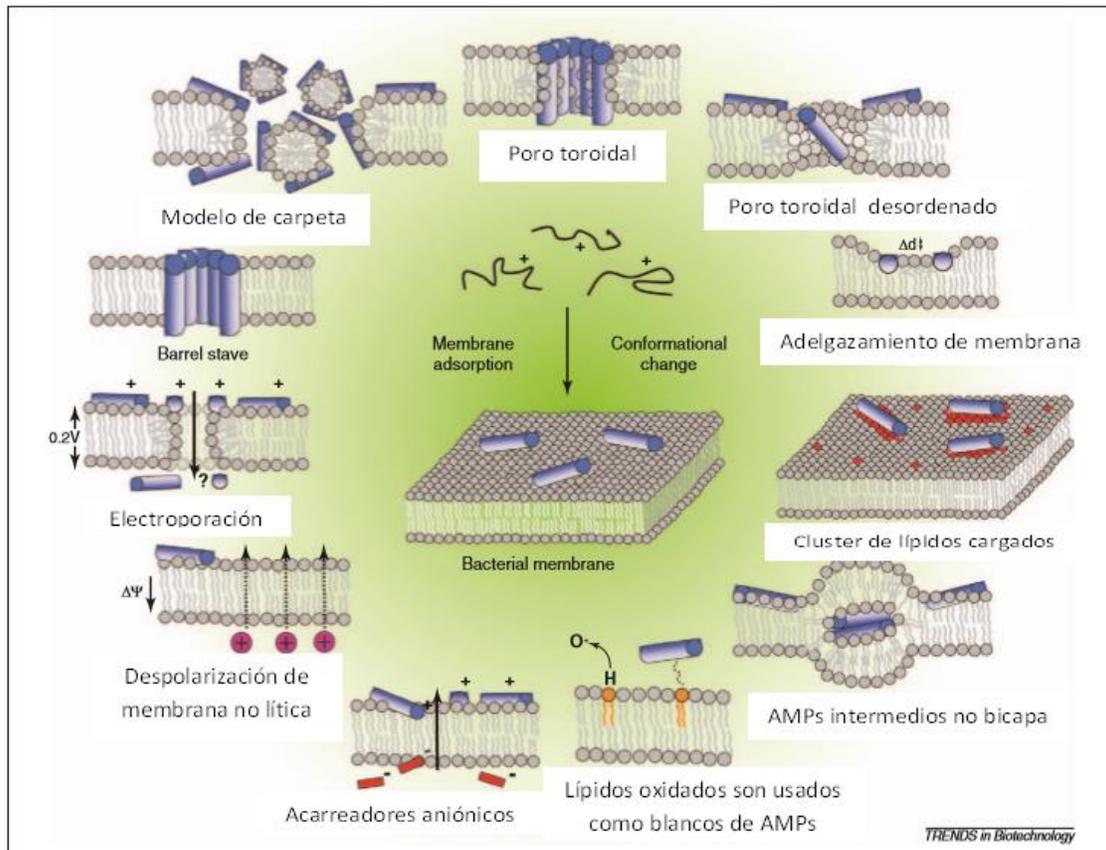


Figura 9. Eventos en membrana citoplasmática bacteriana después de la adsorción inicial del péptido antimicrobiano (AMPs).

Trends in Biotechnology 2011.

Modelo hoyo polilla/ carpet mechanism. En este modelo los **AMPs** son orientados paralelamente a la superficie de la capa lipídica. Primero los péptidos son atraídos por cargas electrostáticas a los grupos fosfato en diversos sitios, cubriendo la membrana, una vez cubierta, se orientan y actúan como detergentes, rompiendo la membrana a través de la formación de micelas. Este tipo de poro transmembranal es inducido por alameticina (un tipo de **AMPs**).^[150,151] Este modelo ha sido el mecanismo más encontrado al usarse altas concentraciones *in vitro* de **AMPs**.^[152,153]

Modelo de tapón de barril. En este modelo los péptidos forman un poro en la membrana con un lumen central que semeja a un tapón compuesto por péptidos helicoidales. Las regiones hidrofóbicas del péptido se alinean con la región lipídica



central de la membrana y la región hidrofílica del péptido forma la región interior del poro. ^[154,155]

Modelo del poro toroidal. Los **AMPs** con alfa hélices unidos a la membrana, se agregan e inducen a la monocapa de lípidos a plegarse sobre sí misma de forma continua, estabilizando la formación del poro por las interacciones hidrofóbicas entre las regiones apolares del péptido que envuelven a las cabezas de los lípidos de la membrana, alcanzando a interactuar simultáneamente con las cadenas acilares de los lípidos. Esto forma un poro con los grupos hidrofílicos orientados hacia el centro del poro, atrapando agua en el centro del mismo. Este tipo de poro transmembranal es formado por diferentes **AMPs** como magaininas (**AMPs** de anfibios), protegrinas (**AMPs** de cerdo) y melittina (**AMPs** de abejas). ^[152,156, 157]

Modelo de agregación. En este modelo los péptidos se orientan en el espacio de la membrana en forma de agregados, con complejos de péptidos y lípidos parecidos a una micela, pero no adoptan una orientación en particular. ^[158,159]

Electroporación molecular. La interacción de los péptidos con la membrana celular de la bacteria promueve un potencial electrostático de hasta 0.2 V, a través de la bicapa que es suficiente para la formación del poro, por medio de una densidad de carga alcanzada, representada por altas concentraciones de aminoácidos catiónicos en los **AMPs**. ^[149, 160]

Balsas lipídicas que se hunden. Los péptidos anfipáticos pueden causar una pérdida del balance por unión y deformación (hundimiento) de las balsas lipídicas en la bicapa lipídica, creando curvaturas con gradientes que permiten a los péptidos introducirse en la membrana creando poros transitorios que son letales para los microorganismos. ^[161]

Independientemente del mecanismo utilizado por los péptidos el efecto antimicrobiano puede ser atribuido a los blancos, puesto que inhiben proteínas funcionales del



microorganismo, así como la síntesis de **DNA**, **RNA** o por la interacción con ciertas blancos intracelulares por penetración directa o endocitosis. ^[13, 152]

Estudios recientes enfatizan que el impacto de la actividad de estas moléculas en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La muerte de éstas ocurre cuando la membrana celular está completamente saturada por **AMPs**. Cuando éstos interactúan con ácido lipoteico aniónico puede reducir la concentración local de péptidos requeridos para la desestabilización de la membrana plasmática y la formación del poro. La ruptura de la bacteria Gram-positiva puede cubrirse con péptidos mediante la interacción molecular entre los péptidos como **GL13K** y ácido teicoicos en la pared celular. Los ácidos teicoicos tienen gran afinidad por los péptidos catiónicos por sus altas propiedades aniónicas. Los grupos fosfato cargados negativamente de estos ácidos en la pared celular, crean un ambiente ácido que mantiene la actividad de autolisina a bajas concentraciones. Así mismo los péptidos pueden interactuar con grupos fosfato de los ácidos teicoicos que permiten la liberación de protones. El resultado será el incremento del pH local. ^[162,163]

El mecanismo de acción de **AMPs** sobre bacterias Gram negativas es directamente mediante membranas de despolarización y permeabilización o mecanismos donde el objetivo letal es el citoplasma. ^[164,165] En bacterias Gram-negativas, los péptidos se asocian primero con los restos cargados negativamente de la membrana externa, produciendo grietas estructurales. También se unen a los sitios de unión de cationes divalentes de **LPS** de superficie polianiónica y expanden la membrana externa desplazando cationes divalentes, que normalmente estabilizan la estructura de la membrana externa. La interrupción de la función de barrera y la integridad de la membrana externa permite entonces el paso de moléculas tales como grandes antibióticos hidrófobos y los mismos **AMPs**. ^[166] **Los AMPs** se unen entonces a membrana citoplasmática, cuando alcanzan concentraciones suficientes, se agregan dentro de la membrana. **(Figura 10)**

La resistencia de las bacterias a la muerte por péptidos está determinada por una serie de propiedades bacterianas, incluyendo densidad de carga y estructura de componentes de pared externa tales como **LPS**, composición lipídica de la membrana citoplásmica, presencia de un potencial electroquímico a través de la membrana citoplásmica, cambios



y tensiones ambientales y mecanismos de ruptura, transporte y eflujo de los péptidos.
[167, 168]

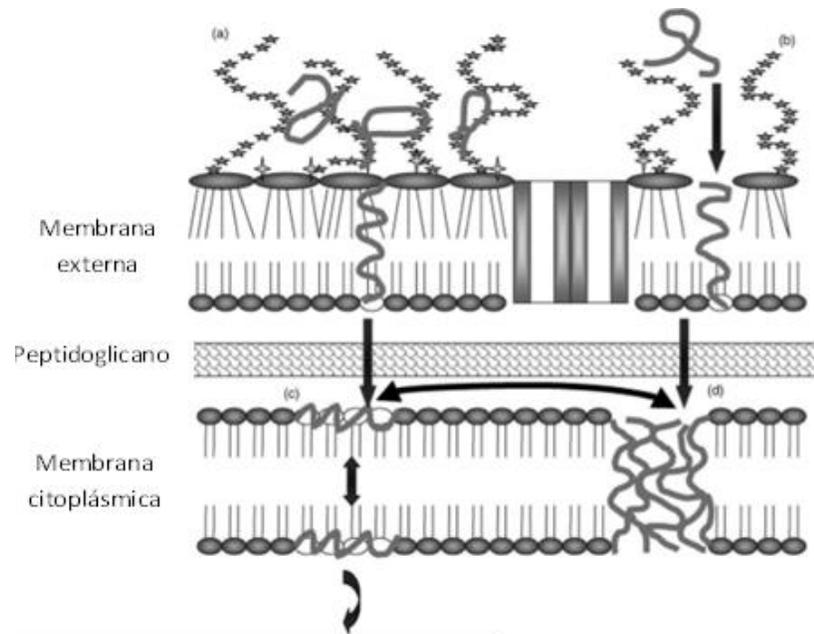


Figura 10. Interacción entre AMPs y bacteria Gram negativa. *Molecular Immunology* 2003

Potencial inmunomodulador de AMPs

La importancia de los **AMPs** en la inmunidad innata, y sus propiedades inmunomoduladoras ha sido ampliamente estudiada durante la última década. [169,170]. Las funciones inmunomoduladoras de éstas moléculas esta mediado por la disrupción de la membrana que altera o inactiva a los receptores de membrana del hospedero (**TLR4**), mediante dos vías. En el primer modelo (trans-activación) el AMPs estimula la liberación de factores de crecimiento unidos a la membrana, posteriormente los **AMPs** se unen y activan a receptores de factores de crecimiento como Factor de crecimiento epidermal unido a heparina (**HB-EGF**), y su receptor (**EGF**). En el segundo modelo (ligando alternativo) los **AMPs** actúan como un ligando directo para un receptor específico. La activación del receptor específico seguido de la unión con **AMPs** inicia la señalización de receptores; receptor de quimiocina tipo 6 C-C, (**CCR6**) y el receptor tipo 1 péptido formil acoplado a proteína G (**FPRL-1** (**Figura 11**)) [171,172]

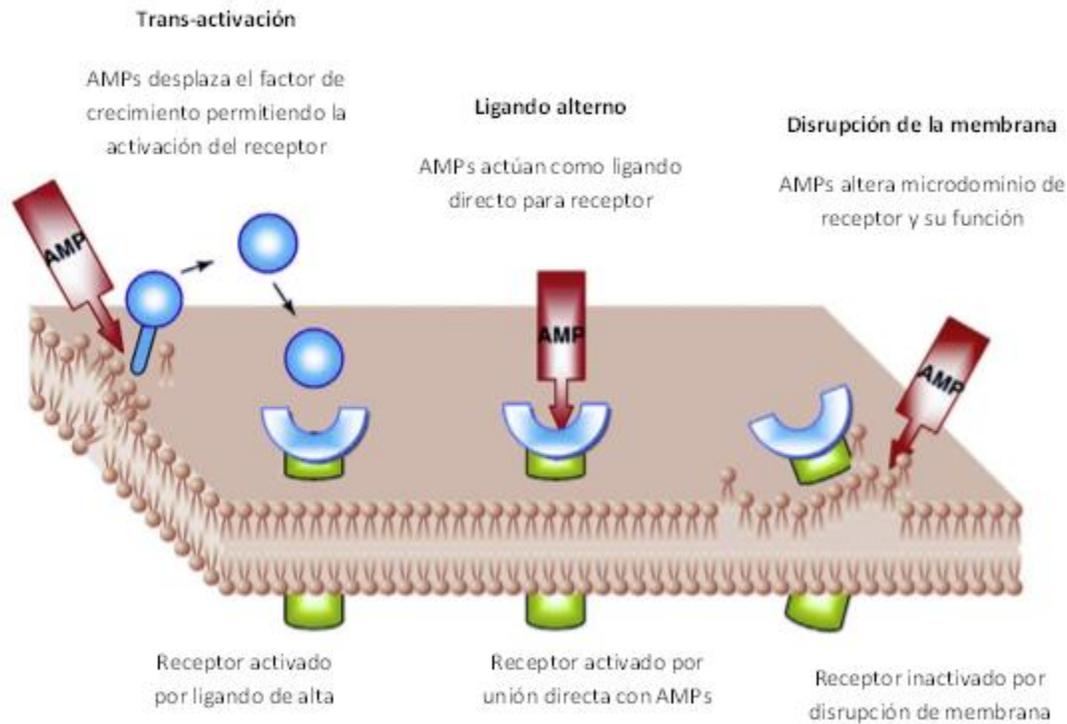


Figura 11. Modelos propuestos para la activación de potencial inmunomodulador de AMPs en células huésped. Acta biomaterialia

2017

Se han realizado estudios con péptidos sintéticos para evaluar su capacidad de inmunomodulación y que sean capaces de imitar las funciones de los **AMPs** naturales. Los **AMPs** sintéticos que se utilizan para las inmunoterapias, como son los reguladores de defensa inmune [**IDRs**] presentan funciones inmunomoduladoras incrementadas ^[173] Una ventaja significativa de los **AMPs** sintéticos es la terapia peptídica combinada, particularmente útil, ya que la actividad antimicrobiana mejora o se complementa con otras funciones, tales como la actividad anti-endotoxina. Por ejemplo, el pentahidrocloreuro de Omiganan un péptido catiónico [secuencia ILRWPWWPWRK amida], obtenido de neutrófilos bovinos, ha demostrado gran actividad contra una variedad de microorganismos Gram positivos, negativos y hongos (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*) y actualmente este péptido, se encuentra en el ensayo clínico de fase 3 para ser aplicado en el tratamiento para pacientes que presentan rosácea papulopustular. ^[174] Opebacan, es una proteína humana con funciones bactericidas, que se encuentra en ensayo de Fase I / II para tratar endo-toxemia en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas. OP145, es un derivado estructural de



catelicidina LL37, capaz de potenciar la unión a **LPS** y **LTA**. Se han realizado estudios en sujetos adultos que presentan otitis crónica media bacteriana, y se encuentra en ensayos clínicos de fase. ^[175] IB-367 un análogo de protegrina sintética, capaz de reducir el crecimiento bacteriano de especies Gram positivas (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* y *Staphylococcus aureus*) a dosis de 0,13 y 64 $\mu\text{g} / \text{ml}$, mientras que la concentración que se utiliza para reducir crecimiento de especies Gram negativas (*Klebsiella*, *Escherichia* y *Pseudomonas*) es de 0,06 a 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$. A la fecha éste péptido se encuentra en fase III de ensayo clínico en pacientes con mucositis oral ^[176]

Péptidos salivales y su potencial inmunoregulador

Los péptidos antimicrobianos son capaces de reconocer una gran variedad de especies microbianas y mantener la homeostasis hospedero- microorganismo. El epitelio oral (epitelio escamoso estratificado) y la saliva son los mecanismos de defensa más importantes de cavidad oral, ya que actúan, como una barrera mecánica, y tienen la propiedad de lavado mecánico, denominado autoclisis. ^[177]

Estudios recientes de proteoma salival reportan la existencia de 1100 proteínas en la saliva humana. **(Ver anexos)** Existen reportes en la literatura que muestran que la ausencia de un solo **AMPs** puede conducir al aumento de la enfermedad periodontal. ^[178]

La variedad de funciones de los **AMPs** parece ser una estrategia exitosa contra la resistencia bacteriana. Los péptidos antimicrobianos inducen la estimulación de quimiotaxis, fagocitosis, mediadores de inflamación y regulan la función de sistema de complemento. ^[179]

La diversidad de péptidos antimicrobianos en cavidad oral pueden agruparse en seis familias funcionales, como a continuación se describen:

Péptidos catiónicos

Estos péptidos tienen propiedades bactericidas y basteriostaticos. A éste grupo pertenecen péptidos como adrenomedulina, alfa y beta defensinas, catelicidinas, histatatina 1,3 y 5, estaterrina, quimiona 28 motivo C-C, azurocidina entre otros. Sus principales blancos se muestran en la **(Figura 12)**. ^[180, 181, 182,183]



| Péptido antimicrobiano | Blanco | Actividad |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Adrenomedulina | <i>P. gingivalis</i> | MIC $7.75 \cdot 10^{-4}$ µg/ml |
| | <i>S. Mutans</i> | MIC 12.5 µg/ml |
| HNP-1 | <i>S. mutans</i> | MIC 4.1 µg/ml |
| | <i>P. aeruginosa</i> | MIC 10.3 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | MIC 52.5 µg/ml |
| | Virus envueltos | Inactivación |
| | HIV-1 | Inhibe replicación |
| | <i>P. gingivalis</i> | > 200 µM |
| | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | > 500µM |
| HNP-2 | <i>P. gingivalis</i> | > 200 µM |
| | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | > 500µM |
| | Herpes virus simple-1 | Inactivación |
| | HIV-1 | Inhibe replicación |
| HNP-3 | <i>P. gingivalis</i> | > 200 µM |
| | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | > 500µM |
| | Herpes virus simple-1 | Inactivación |
| | HIV-1 | Inhibe replicación |
| HNP-4 | <i>E. coli</i> | LD ₅₀ 0.085 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | LD50 0.5µ g/ml |
| hBD-1 | <i>P. gingivalis</i> | MIC 50 µg/ml |
| | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | MIC 50 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | MFC 7 µM |
| hBD-2 | <i>P. gingivalis</i> | MIC 34.6→250 µg/ml |
| | <i>S. mutans</i> | MIC 4–8 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | MIC 5–59 µg/ml |
| | HIV-1 | IC ₅₀ 9–19 µg/ml |
| hBD-3 | <i>P. gingivalis</i> | MIC 42.1 µg/ml |
| | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | MIC 45.6 µg/ml |
| | <i>S. mutans</i> | MIC 3–5 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | MIC 3–7 µg/ml |
| | HIV-1 | IC ₅₀ 20–40 µg/m |
| LL-37 | <i>P. gingivalis</i> | MIC >125 µg/ml |
| | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | MIC 37.8 µg/ml |



| | | |
|---------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | <i>S. gordonii</i> | MIC 102.6 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | LD ₅₀ 0.8 µM |
| Histatina 5 | <i>P. gingivalis</i> | Neutraliza leucotoxinas |
| | <i>C. albicans</i> | LD ₅₀ 1.6 µM |
| Estaterina | <i>Anaerobios orales</i> | MIC <12.5 µg/ml - >100 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | Agregación |
| CCL28 | <i>S. mutans</i> | IC ₅₀ 1.7 µM |
| | <i>C. albicans</i> | IC ₅₀ 0.7 µM |
| Azurocidina /CAP37 | <i>E. coli</i> | LD ₅₀ 1.3 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | MIC 40 µg/ml |
| Sustancia P | <i>P. aeruginosa</i> | MIC 15.7 µg/ml |
| | <i>S. mutans</i> | MIC 171.6 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | MIC 8.1 µg/ml |
| Psoriasina | <i>E. coli</i> | MBC 100 µg/ml |
| Lisozima C | <i>Bacterias Gram- positivas</i> | Lisis de la pared celular |
| Neuropeptido Y | <i>P. aeruginosa</i> | MIC 134.3 µg/ml |
| | <i>S. mutans</i> | MIC 210.9 µg/ml |
| | <i>C. albicans</i> | MIC 243.2 µg/ml |
| SKALP/Elafina | <i>P. aeruginosa</i> | LD ₉₆ 2.5 µM |

Figura 12. Actividades antimicrobianas de péptidos c catiónicos. Periodontology 2000, 2009

Péptidos de aglutinación y adhesión bacteriana

Dentro de ellos se encuentran, incluidas la mucina salivar pequeña MUC7 (MG2), expresada en células acinares mucosas de las glándulas sublinguales y submandibulares, por tanto se encuentra en saliva.^[184] Esta proteína posee 377 aminoácidos con cuatro sitios de N glicosilación potenciales. Mucina-7 promueve la aglutinación bacteriana, sus niveles en saliva estimulada son dos veces más bajos en pacientes con periodontitis que en sujetos sanos (16,7 µg/ml frente a 30,6 µg/ml). Además MUC7 y mucina Muc5b, impiden la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en las células huésped.^[185] Otro de las moléculas pertenecientes a este grupo es la aglutinina salival (GP340 / DMBT1); es una glicoproteína con repeticiones ricas en cisteína. La proteína se encuentra



en la saliva y se expresa en las glándulas salivales, el tejido mucoso ocular, la glándula lacrimal, el pulmón, la tráquea, el tracto gastrointestinal y los macrófagos. [186,187] Los polimorfismos de DMBT1 se han asociado con una alta incidencia de caries, debido a que la proteína actúa en la unión y aglutinación de bacterias, incluyendo los estreptococos orales [188,189]. DMBT1 también actúa como un receptor de opsonina para promover el aclaramiento bacteriano. Por otro lado las proteínas ricas en prolina, agrupadas en la familia de péptidos de aglutinación, también se encuentran en saliva y se unen a la superficie del diente y afectan la adhesión bacteriana. [184] La fibronectina otra glicoproteína localizada en saliva (2386 aminoácidos de tamaño) se expresa en hepatocitos, células epiteliales y otras células. Esta proteína induce la aglutinación bacteriana y reduce la adhesión bacteriana a las superficies orales [190, 191]. La fibronectina también se une directamente a la fibrinina de *P. gingivalis* y por lo tanto inhibe la expresión inducida por fibrinina de las citocinas inflamatorias en los macrófagos. Tanto las proteínas ricas en prolina como la fibronectina afectan la adhesión bacteriana y la formación de biofilms, retardando la colonización bacteriana de las superficies orales. [192]

Quelantes de iones metálicos

Las proteínas de unión a iones metálicos inhiben el crecimiento bacteriano actuando como catalizadores de cationes divalentes. El dímero de calgranulina (A (S100A8) y B (S100A9); denominado calprotectina, se expresa en el citosol de neutrófilos, monocitos y queratinocitos. Los niveles de expresión de calgranulina A y B están regulados en las células epiteliales orales H400 expuestas a *P. gingivalis* o *Fusobacterium nucleatum* [193]. Por consiguiente, la calprotectina se regula positivamente en la enfermedad periodontal y se detecta a niveles aumentados en el fluido crevicular gingival de los pacientes con periodontitis. Los niveles de calprotectina también aumentan en la saliva de los pacientes con candidiasis [194]. Por otro lado la glicoproteína lactoferrina (lactotransferrina) actúa como un eliminador de iones Fe^{3+} , une dos iones Fe^{3+} asociados con bicarbonato u otro anión. Es producido por las células epiteliales de la mucosa y se encuentra en sus secreciones, incluyendo la saliva (250) y el fluido crevicular gingival. [195] La lactoferrina actúa sobre bacterias, virus, hongos y parásitos. En específico se ha



estudiado su acción contra *A. actinomycetemcomitans*, y *P. gingivalis*.^[196, 197] Además de sus efectos sobre los patógenos periodontales, la proteína induce apoptosis en *C. albicans* en un proceso que depende de los canales celulares de K^+ . La lactoferrina también se une a la parte del lípido A del Lipopolisacárido, dando lugar tanto a la actividad antiinflamatoria y bactericida como resultado del aumento de la permeabilidad de la membrana.^[198]

Peroxidasas

La lactoperoxidasa (peroxidasa salival) es una hemo peroxidasa que se encuentra en la saliva y la leche. La lactoperoxidasa y la mieloperoxidasa forman los componentes principales del sistema de peroxidasa de la saliva.^[199] Las enzimas catalizan la oxidación de los iones tiocianato (SCN) por peróxido de hidrógeno, y la reacción de la producción de hipotiocianita (OSCN) es bactericida. Además, la mieloperoxidasa puede producir hipoclorito (OCl⁻), un oxidante más fuerte implicado en proceso inflamatorio del tejido. La mieloperoxidasa se encuentra en la fluctuación creatinina gingival de aproximadamente 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$.^[200]

AMPs con actividad contra paredes celulares bacterianas.

Dentro de este grupo se encuentran la lisozima y proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos 3 y 4. La 1-4 Beta-N-acetilmuramidasa (lisozima) es una enzima bacteriolítica que hidroliza los (1, 4) -alcalinos entre el ácido N-acetilmurámico y los residuos de N-acetil-D-glucosamina en los peptidoglicanos. Actúa contra la pared celular de bacterias Gram positivas. Se expresa en el epitelio de la mucosa y se encuentra en la saliva, la leche y las lágrimas. La lisozima se encuentra en el líquido crevicular gingival.^[201] Las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano 3 y 4 (homodímeros o heterodímeros disulfílicos de 89-115 kDa) se expresan en la piel y epitelio de la mucosa humana, incluyendo las glándulas salivales. La proteína de reconocimiento de peptidoglicano 1 se encuentra en la saliva. En general estas proteínas ejercen su efecto bactericida uniéndose a los peptidoglicanos de la pared celular de bacterias Gram positivas patógenas y no patógenas.^[202]

Inhibidores de proteasa



En este grupo se engloban el inhibidor secretor de proteasa leucocitaria, elafina (SKALP) y cistatinas, que se explicara más adelante. El inhibidor secretor de proteasa leucocitaria una proteína no glicosilada catiónica de 11,7 kDa, con 16 residuos de cisteína que forman ocho puentes de disulfuro. Se expresa en células epiteliales mucosas y secreciones, incluyendo queratinocitos gingivales y saliva. El inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora actúa como un inhibidor de la serina proteasa bacteriana y es una proteína antibacteriana y antiinflamatoria. El dominio catiónico N-terminal es antimicrobiano con actividad contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*.^[203] La antileucoproteinasas derivada de la piel (SKALP) o elafina es una proteína de 12 kDa expresada en la glándula submandibular humana y en la saliva.^[204] La proteína tiene un dominio N-terminal que actúa como un sustrato transglutaminasa y un dominio C-terminal que exhibe actividad anti-elastasa. Además, la proteína mata las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas; Esta actividad depende de la presencia de ambos dominios peptídicos.^[205]

Debido a que la enfermedad periodontal se encuentra en forma localizada, es importante señalar que la concentración de los **AMPs** en saliva puede estar significativamente diluida y esto puede no ser relevante en la concentración que se encuentra en las bolsas periodontales. Los neutrófilos, por ejemplo, al ser reclutados en el sitio de lesión y al encontrar un biofilm maduro, pueden ser incapaces de fagocitar las bacterias del biofilm, lo que conduce a una "fagocitosis frustrada" causando la liberación de enzimas y productos de la estallido oxidativo que ocasiona la destrucción de tejidos en la bolsa periodontal.^[206]

A la fecha más de 45 **AMPs** se han identificado en la cavidad oral.^[172] Su producción se encuentra a cargo del epitelio oral, epitelio sulcular, neutrófilos en el tejido conectivo y epitelio de unión, el epitelio de la lengua, amígdalas, las glándulas salivales, pulpa dental y pueden detectarse fácilmente en la saliva, fluido crevicular gingival (**GCF**) y fluido crevicular implantar (**PICF**).^[207] A pesar del gran número y variedad de **AMPs** orales la evidencia sugiere que sólo un grupo de **AMPs**, incluyendo las histatinas, estaterrinas, proteínas ricas en prolina y cistatinas están presentes en la saliva en concentraciones superiores a la concentración inhibitoria mínima (**MIC**).^[208] En el genoma humano los genes que codifican para los péptidos están agrupados en el cromosoma 3, 4, 12, 20 y



21. La presencia de estas moléculas en cavidad oral impacta en su homeostasis, ya que previene la desmineralización por bacterias acidogénicas, protegiendo contra caries dental e infecciones fúngicas. ^[209]

Los péptidos antimicrobianos utilizan receptores de quimioquinas como **CCR2 y CCR6**, para llevar a cabo la señalización y otros péptidos antimicrobianos que son quimiotácticos para monocitos, células T, células dendríticas, mastocitos, células de Langerhans y neutrófilos. Al activar y madurar las células dendríticas se inicia la diferenciación celular, producción de citocinas anti inflamatorias, expresión de **ICAM-1, CD11b y CD11c** por neutrófilos, aumento de expresión de **IL-8 y ENA-78 (CXCL5)**, degranulación de mastocitos, liberación de histamina y prostaglandina D2, así como regulación de complemento. Actuando de esa manera como adyuvantes del sistema inmunológico y como biomarcadores de las enfermedades bucales. ^[210, 211, 212]

En conjunto, estos péptidos protegen los tejidos orales de los efectos inflamatorios de los microorganismos comensales y patógenos y sus productos. Su importancia se puede demostrar claramente en enfermedades orales en donde la producción de péptidos antimicrobianos se encuentra alterada. Los neutrófilos de individuos con Morbus Kostmann son deficientes en LL-37 (catelicidina) y concentraciones reducidas de HNP α -defensinas 1-3, manifestando enfermedad periodontal severa. ^[213] Otros estudios reportan que en individuos con enfermedad periodontal asociada a *A. actinomycetemcomitans* tienen menor producción de mucina-7 (MG2) y lactoferrina. ^[214] y los individuos con hipofunción de las glándulas salivales y concentraciones disminuidas de lactoferrina salival y HBD tienen incidencias aumentadas de candidiasis oral. ^[215] La defensina LL-37 posee también propiedades inmunomoduladoras ya que induce la migración de células madre de pulpa dental por activación de receptor de factor de crecimiento epidermal y cinasa C-Jun N-terminal. También activa la vía **MAPK/ERK** que incrementa la secreción de factor de crecimiento endotelial vascular. ^[216] Además de éstos péptidos, la presencia de histatinas en el biofilm evita procesos de desmineralización de esmalte. La adición de Histatina-1 a apatita confiere resistencia a la degradación proteolítica lo que la potencializa como una péptido terapéutico contra caries dental. ^[217]



| Patógeno periodontal | Péptido antimicrobiano |
|--|------------------------|
| <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> | hBD-2 |
| | hBD-3 |
| | hCAP 18 |
| | fibronectina |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | PSP/SPLUNC2 |
| | hBD-2 |
| | hBD-1 |
| | hBD-3 |
| | Adrenomedulina |
| | LL-37 |
| | Calgranulina |
| Cistatina C | |
| <i>Tannerella forsythia</i> | hBD-2 |
| | hBD-1 |
| | hBD-3 |
| | LL-37 |
| <i>Treponema denticola</i> | hBD-2 |
| | hBD-1 |
| | hBD-3 |
| | LL-37 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | hBD-2 |
| | hBD-1 |
| | hBD-3 |
| | LL-37 |
| | Calgranulina |
| <i>Prevotella intermedia</i> | hBD-2 |
| | hBD-1 |
| | hBD-3 |
| | LL-37 |

Figura 13. Efecto de péptidos antimicrobianos sobre patógenos periodontales. Periodontology 2000, 2009

En años recientes se ha analizado la importancia del Cistatina, péptido perteneciente a la familia de inhibidores de proteasas de microorganismos como *P. gingivalis* y otros periodontopatogenos, siendo de los pocas moléculas que se ha comprobado inhiben su



crecimiento ^[208] **(Figura 13)** Actualmente también se pondera a esta molécula como una potencial moduladora de procesos inflamatorios como a continuación se describe.

Familia de Cistatinas

Las cistatinas son inhibidores de cisteína proteasa que bloquean la acción de las proteasas bacterianas sobre los tejidos diana. ^[218] Basándose en similitudes estructurales, recientemente se ha propuesto que la catelicidina evolucionó gradualmente de las cistatinas ^[219]. Estudios recientes comprueban que las cistatinas C y S inhiben el crecimiento de *P. gingivalis*. ^[220]

La superfamilia de las cistatinas compromete un grupo de proteínas ancestrales que muestran una potente capacidad de inhibición de cisteínas proteasas, están presentes en una amplia variedad de organismos. Su funcionamiento intracelular y extracelular es a través de la formación de complejos reversibles estrechos con sus enzimas diana. El primer inhibidor de proteínas aislado y parcialmente caracterizado de cisteína proteasas fue, de clara de huevo de pollo e inhibía papaína, ficina ^[221] y catepsina B y C. ^[222] Posteriormente para la misma proteína se propuso el nombre "cistatina", indicando su función. ^[223]

La base de datos de peptidasas, proteasas, proteinasas y enzimas proteolíticas **(MEROPS)**, actualmente tiene registrada 61 miembros de la familia de las cistatinas. Distribuidas en protozoos, plantas, hongos, animales y virus. En células humanas y tejidos existen aproximadamente 12 miembros con función la función de inhibición de cisteína proteasa que conservan el arquetipo de Cistatina de pollo. ^[224]

Todas las secuencias de cistatinas conservan tres regiones: un residuo de glicina en región N-terminal, un motivo QXVXG en una horquilla loop y un motivo PW en una segunda horquilla loop, siendo todos importantes para la unión de cisteínas proteasas como las catepsinas. **(Figura 14)** Estas regiones forman una superficie en la molécula de la cistatina que puede acoplarse al sitio de unión del sustrato de las enzimas de la familia C1 (papaína). Se han identificado subgrupos dentro de tres grupos (A-C). Las cistatinas humanas están englobadas dentro de la subfamilia A (subfamilia 125A) B (subfamilia 125B). ^[225] Alternativamente las cistatinas humanas se dividen en 3 tipos basándose en organización molecular; cistatinas tipo 1 (A, B), cistatinas tipo 2 (C, D, M/E, SA, S, SN, G) y



cininógenos multifuncionales presentes en plasma de mamíferos. Las Cistatinas tipo 1 (A-B) son proteínas intracelulares presentes en el citosol de varios tipos celulares, presente en grandes cantidades en fluidos corporales. Presentan una cadena polipeptídica de 100 aminoácidos, no posee enlaces disulfuro ni cadenas laterales de carbohidratos. ^[226]La Cistatina A fue purificada de piel de rata como una de las primeras cistatinas de mamífero purificadas. Se localiza en células epiteliales, neutrófilos, células reticulares del tejido linfoide, corpúsculos de Hassall y células medulares del timo. ^[227]El análisis de estas moléculas revela que están involucradas en sistema inmune de piel, así como fuerte expresión en piel de epidermis de ratas neonatales. La Cistatina B es principalmente expresada en diferentes tipos de tejidos. A nivel subcelular se localiza en el núcleo de células en proceso de proliferación y en el citoplasma de células diferenciadas ^[228]

Las cistatinas tipo 2 son principalmente extracelulares. Se encuentran dentro de la subfamilia 125B. Son sintetizadas con 20-26 residuos de péptido señal, permitiendo el transporte de la proteína madura sobre la membrana celular hacia el espacio extracelular. Se encuentran ampliamente distribuidas en varios fluidos corporales. Las cistatinas tipo 2 presentan dos puentes de disulfuro conservados en la región COO- terminal. ^[229] Las Cistatinas clásicas humanas tipo 2 son las moléculas C, D, S, SA, SN con un 50% de secuencia idéntica. La Cistatina D es reconocida con altos niveles de similitud en secuencia con Cistatina C. La proteína madura es compuesta por 120 aminoácidos originalmente encontrados en glándula parótida, ha sido identificada en saliva pero en pequeñas cantidades. Estudios recientes muestran que es benéfica contra cáncer de colon y regulación de vitamina D. ^[230,231] la Cistatina E/M fue identificada en células epiteliales. Está compuesta de 121 aminoácidos y es sintetizada con un péptido señal. A diferencia de los genes de la familia 2 de cistatinas, Cistatina E/M se encuentra en el cromosoma 11 y no en el 20. ^[232, 233] la Cistatina F es una glicoproteína que fue descubierta con altos niveles de expresión en linajes de células sanguíneas. Es considerada una de las cistatinas del tipo 2 que participan en la presentación antigénica. Los niveles de proteína en tejidos y fluidos corporales humanos son bajos pero se ha reportado que el suero sanguíneo de pacientes sano posee 1 µg/l, mientras que en pacientes con desordenes inflamatorios de pulmón presentan 3 µg/l. ^[234] Dos sitios de Glucosilación han sido detectados en su secuencia polipéptidica, uno en la porción amino terminal en la posición 36 y sobre el la porción carboxilo terminal en la posición 88. ^[235] La



cistatina G es producto de uno de varios genes parecidos a Cistatina expresados en glándulas sexuales conocidas como **CRES** (Cistatinas relacionadas con el epidídimo y espermatogonias en ratón) ^[236]

Las cistatinas salivales S, SA y SN. Poseen un 90% de similitud en secuencia. Estas proteínas se encuentran en lágrimas, orina, y plasma seminal. Poseen 121 residuos aminoácidos no glucosilados, sintetizados como péptido señal. Los patrones de expresión de estos genes está restringido a la saliva, lágrimas y glándulas sexuales masculinas. ^[225]

La Cistatina C es una glicoproteína ubiquitaria está codificada por gen CST3, que se encuentra en tándem en el cromosoma 20. ^[237] Es producida por todas la células nucleadas, principalmente fagocitos mononucleares, células dendríticas. ^[238]

Estructuralmente están conformadas por 120 aminoácidos y un peso molecular de 13,343 Da. Ha sido encontrada en tejidos y fluidos corporales en altas concentraciones, por ejemplo está presente en plasma seminal (51 mg/l), líquido cefalorraquídeo (5,8 mg/l) y a menores niveles en fluidos como plasma, saliva y orina. ⁽²²⁵⁾

Sus funciones son diversas pero dentro de ellas se encuentran regulación de reabsorción ósea, la quimiotaxis de neutrófilos o la respuesta inflamatoria, modulación de actividad de proteasas secretadas o liberadas de células dañadas o en proceso de necrosis. ^[239]



Figura 14. Estructura tridimensional de Cistatina C

Funciones fisiológicas de Cistatina C (Cst C)

Se han realizado estudios *in vivo* con rata, en este estudio los autores inocularon Cst C en el hipocampo de rata, y demostraron que la Cst C se correlaciona con la muerte celular



por apoptosis del hipocampo inducida por estrés oxidativo. ^[240] ^[241] La inducción de apoptosis por esta molécula en células neuronales incluye la disminución de **Bcl-2** y el aumento de niveles activos de la caspasa-9 a través de la ruta dependiente de la cinasa N-terminal de JNK (**JNK**). ^[242] En contraste, existen estudios en los que se demostró que la Cistatina C tenía efectos anti-apoptóticos en las células neuronales. En estos estudios realizados en una línea celular (PC12) de un feocromocitoma derivado de médula suprarrenal de rata, mostraron que la Cst C evita la muerte inducida por estrés oxidativo *in vitro*. ^[243]

Como potente inhibidor de las catepsinas de cisteína, Cst C ha sido implicada en regulación del desarrollo de la presentación de moléculas MHCII en células dendríticas mediante la inhibición de la catepsina S en la escisión de cadena invariante, por lo tanto en la formación de complejo péptido **MCH II**. ^[244] Se ha reportado la localización de Cistatina C como uno de los péptidos unidos al MHC II indicando con ello que es endocitada y escindida con material antigénico. ^[245] Otros experimentos utilizando **DCs** derivados de médula ósea indican que la interleucina 6 (**IL-6**) mediada (**STAT3**) disminuyó la expresión de Cst C y los niveles de dímeros α \ beta de **MHCII**. ^[246, 247]

La estructura de Cistatina C le permite, además comportarse como una proteína secretada, con funciones extracelulares, debido a ello Cst C se encuentra en todos los fluidos corporales a concentraciones significativas, lo que la convierte en un regulador principal de la actividad de la cisteína proteasa en el medio extracelular. ^[248] En enfermedades como aterosclerosis se sabe que metaloproteinasas de la matriz y serina proteasas, así como cisteína proteasas lisosómicas están presentes en cantidades sustanciales en las paredes normales del vaso. Bajo este ambiente se encontró que la expresión de Cst C se redujo severamente en lesiones tanto ateroscleróticas como aneurismáticas, además el aumento del diámetro aórtico abdominal se ha correlacionado con niveles más bajos de Cst C en el ser humano. ^[249]

Por otro lado, se ha reportado que Cistatina C también participa en procesos metastásicos, en donde las células tumorales invaden los tejidos del huésped, a través de enzimas proteolíticas (catepsinas) para degradar componentes de la matriz extracelular. ^[250] La Cistatina C es un importante inhibidor endógeno de cisteínas proteasas por lo que se le atribuye una probable participación en la prevención del desarrollo tumoral, al inhibir las actividades de una familia de catepsinas de cisteína



lisosómica. Por tanto los niveles reducidos de Cst C se correlacionan con el aumento de metástasis de diferentes tumores en tejidos o pacientes. ^[251, 252] Además, La sobreexpresión del Cst C en el microambiente del tejido huésped podría conducir a una reducción exitosa de la metástasis mediante la inhibición de la catepsina en un modelo tumoral experimental. ^[253]

Otra de las funciones más estudiadas de CistatinaC es la de proteger el huésped contra microorganismos invasores y parásitos que utilizan cisteína proteasas para entrar al organismo. ^[254] La cistatina de pollo fue reportada como una de las primeras moléculas de la familia de cistatinas en bloquear parcialmente la replicación del poliovirus en células humanas infectadas. ^[255] Un estudio adicional demostró que podría inhibir una cisteína proteasa específica para el crecimiento de estreptococos del grupo A, bloqueando el crecimiento de estas bacterias tanto *in vivo* como *in vitro*. ^[256] Análogamente se demostró que Cst C inhibe el crecimiento del virus del herpes simple y de los coronavirus humanos. ^[257] Otro de los microorganismos en los que se ha reportado la función inhibitoria del péptido, es *Leishmania*, este parásito posee cisteína proteasas de catepsina L y B, que son necesarias para el crecimiento y virulencia. Estas cisteínas proteasas de *Leishmania* pueden no sólo digerir la matriz extracelular del huésped para facilitar su invasión, sino también ayudan a asegurar una respuesta de tipo Th2 que conduce a la proliferación del parásito. El tratamiento con Cst C en combinación con el interferón y (IFN γ) conduce a la reducción del parásito, conversión de una respuesta de **Th2** a **Th1** y generación de **NO**, lo que finalmente conduce resultó en la supresión de la infección de parásito en un modelo de ratón infectado con *Leishmania*. ^[258] Esta molécula también ha probado actividad antibacteriana contra *Porphyromonas gingivalis*. ^[220] Sin embargo, el último estudio acerca de ello se reportó hace 20 años. Las numerosas funciones de Cst C indican que puede tener varias aplicaciones en diversos procesos fisiopatológicos, lo que conduciría a mayor uso y posterior regulación de este inhibidor multifuncional de la proteasa.



Planteamiento del problema

Entre las enfermedades bucodentales más comunes y con mayor prevalencia a nivel mundial son la caries dental y la enfermedad periodontal. La enfermedad periodontal afecta a los tejidos de soporte, provocando infecciones en cavidad oral que van desde inflamación gingival hasta la destrucción de tejidos periodontales llevando a pérdida del hueso alveolar y finalmente, la pérdida del órgano dentario. La etiología de la enfermedad periodontal no es de tipo específico, es una infección polimicrobiana en la que participan diferentes bacterias, entre los que se encuentra *Porphyromonas gingivalis*; una bacteria Gram negativa. Esta bacteria periodontopatógena presenta varios factores de virulencia que tienen actividad pro-inflamatoria y proteolítica. La saliva constituye un mecanismo de defensa natural al producir moléculas antimicrobianas que protegen a los tejidos orales de la actividad proteolítica e inflamatoria de los factores de virulencia bacterianos. La familia 2 de las cistatinas ha sido reportada como una molécula que ejerce funciones de regulación de respuesta inmune. Esta capacidad podría ser crucial para el control de proceso inflamatorio y subsecuente pérdida ósea.

Dada la importancia de encontrar mecanismos protectores contra bacterias que causan enfermedades bucodentales, se decidió estudiar el efecto que ejerce la cistatina C sobre el perfil de citocinas que induce *P. gingivalis* en fibroblastos gingivales humanos (HGF). Es justamente debido, a que las proteínas de bajo peso molecular, como las cistatinas y otros péptidos que se encuentran en saliva, ejercen diferentes funciones antiinflamatorias, será interesante analizar si la cistatina C puede modificar el perfil proinflamatorio expresado en lesiones inflamatorias periodontales. La capacidad de controlar la expresión de estos mediadores proinflamatorios es crucial para controlar la pérdida ósea y la subsecuente patología asociada a la infección por *P. gingivalis*.

Con base a esta problemática de estudio se decidió plantear lo siguiente.

Pregunta de investigación

¿La Cistatina C ejerce un efecto inmunoregulador sobre la incubación de fibroblastos gingivales humanos con *Porphyromonas gingivalis*?



Justificación

Desde principios de los 1950, la terapéutica de la patología periodontal, ha estado encaminada a la eliminación de placa dentobacteriana y su consecuente efecto inflamatorio, mediante la aplicación de agentes antimicrobianos y antiinflamatorios. Sin embargo en ambos casos, existen numerosos efectos (resistencia antibiótica, estado de inmunosupresión variable), que incluso pueden potencializar las condiciones crónicas de la enfermedad periodontal.

Se ha reportado que los péptidos antimicrobianos (**AMPs**) presentes en cavidad oral presentan amplio espectro de actividad. En específico la Cistatina C ofrece efectos pleiotropicos con gran impacto en procesos fisiológicos. Sin embargo actualmente se desconoce el efecto inmunoregulador que puede ofrecer éste péptido en **FGH** después de su incubación *Porphyromonas gingivalis*.

En este contexto, es justificable una mayor investigación y desarrollo de agentes alternativos que sean seguros para el huésped, manteniendo la especificidad y la eficacia. El estudio del efecto de Cistatina C sobre *Porphyromonas gingivalis* es de gran importancia ya que permitirá entender la relación huésped-bacteria.

El presente estudio tiene por objetivo, además, estudiar el perfil de citocinas en cultivos en HGF incubados con *Porphyromonas gingivalis*, analizando si la incubación con Cistatina C modifica el perfil de citocinas proinflamatorio característico de la enfermedad, a un perfil antiinflamatorio. Este cambio podría favorecer la eliminación de bacterias periodontopatógenas y se podría implementar como agente coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Hipótesis

Si la Cistatina C ejerce un efecto inmunoregulador sobre los fibroblastos gingivales incubados con *P. gingivalis*, entonces se podrá detectar un disminución en la secreción de perfil de citocinas pro- inflamatorio.

Objetivos



General

Analizar el efecto inmuno-regulador de cistatina C en fibroblastos gingivales humanos (FGH) incubados con *Porphyromonas gingivalis*

Específicos

- Evaluar el perfil de citocinas producido por FGH
- Evaluar el perfil de citocinas producido por FGH incubados con Cistatina C
- Evaluar el perfil de citocinas producido por FGH incubados con *P. gingivalis*
- Evaluar el perfil de citocinas producido por FGH incubados con *P. gingivalis* y Cistatina C

Materiales y métodos

Cultivo de fibroblastos gingivales humanos

Se estableció el cultivo de fibroblastos gingivales humanos (HGF), que fueron donados amablemente por el Dr. Higinio Arzate. Los fibroblastos gingivales humanos se cultivaron en cajas de 75 cm² a 37°C en una atmósfera de 5% de CO², en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen), suplementado con 10 U de penicilina por mL, 25 µg estreptomina por mL y 10 % de suero fetal bovino de complementado (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA). Se le adicionó cada tercer día medio al cultivo celular, hasta alcanzar confluencia. Los experimentos fueron realizados con las células que se obtuvieron entre los pases 5 y 7.

Cultivo de bacteria

Los ensayos experimentales se realizaron con la cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Las bacterias se cultivaron en agar cerebro corazón (BHI) suplementado con hemina (5µg/ml), menadiona (1 µg/ml) y 5% de sangre de carnero desfibrinada. Las placas de agar sembradas se colocaron en una jarra con el sistema de anaerobiosis Gaspak (BD Biosciences) y se incubaron a 37°C. Se evidenció el crecimiento de *P. gingivalis* y la pureza del cultivo mediante morfología colonial y tinción de Gram.

Cistatina C.



La Cistatina C liofilizada se obtiene de *Pichia Pastoris* (Sigma Aldrich, Sigma St. Louis, MO, USA), y se reconstituyo en Buffer Tris Base NaCl (pH 7.4) a una concentración final de 100 mg/ml, y conservando en alicotas de 100 μ l a temperatura de 4°C

Determinación de viabilidad bacteriana mediante conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) de *Porphyromonas gingivalis*

Para realizar los ensayos experimentales las bacterias se cultivaron hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Una vez alcanzada esta fase las *P. gingivalis* ser recuperaron/cosecharon con asa bacteriológica de placas de agar infusión cerebro corazón (BHI) y se depositaron en 10 ml de Buffer Tris Base (50mM Tris Base 50 mM/ NaCl, pH 7.4). Se lavaron dos veces por centrifugación a 4000 rpm durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendido en solución amortiguadora Tris Base (50mM Tris Base 50 mM/ NaCl, pH 7.4).

La cantidad de bacterias se monitoreo en un espectrofotómetro (Jenway Genova R0027) a una longitud de onda de 675 nm. Se determinó la densidad óptica en el espectrofotómetro para después igualar con un tubo Mc Farland a escala 3×10^7 que corresponde a una absorbancia de 0.030. Se realizaron diluciones de bacterias con la solución amortiguadora mencionada Tris Base para alcanzar una concentración de 5×10^5 UFC/ml a una absorbancia de 0.0025 de acuerdo a los estándares de turbidez en la muestra.

Esta concentración de bacterias se colocó en tubos eppendorf, que se centrifugaron 4000 rpm por 3 minutos, se decantó y el botón de bacterias fue resuspendido de acuerdo al grupo control y condiciones experimentales planteadas, como a continuación se indica:

- Grupo control: 375 μ l de infusión cerebro corazón (suplementado con 3 μ g/ml de menadiona, 5 μ g/ml de hemina)
- Grupo experimental 1: 275 μ l de infusión cerebro corazón (suplementado con 3 μ g/ml de menadiona, 5 μ g/ml de hemina) y 10 μ g(100 μ l) de Cistatina C.
- Grupo experimental 2: 175 μ l de infusión cerebro corazón (suplementado con 3 μ g/ml de menadiona, 5 μ g/ml de hemina) y 20 μ g (200 μ l) de Cistatina C.
- Grupo experimental 3: 75 μ l de infusión cerebro corazón (suplementado con 3 μ g/ml de menadiona, 5 μ g/ml de hemina) y 30 μ g (300 μ l) de Cistatina C.

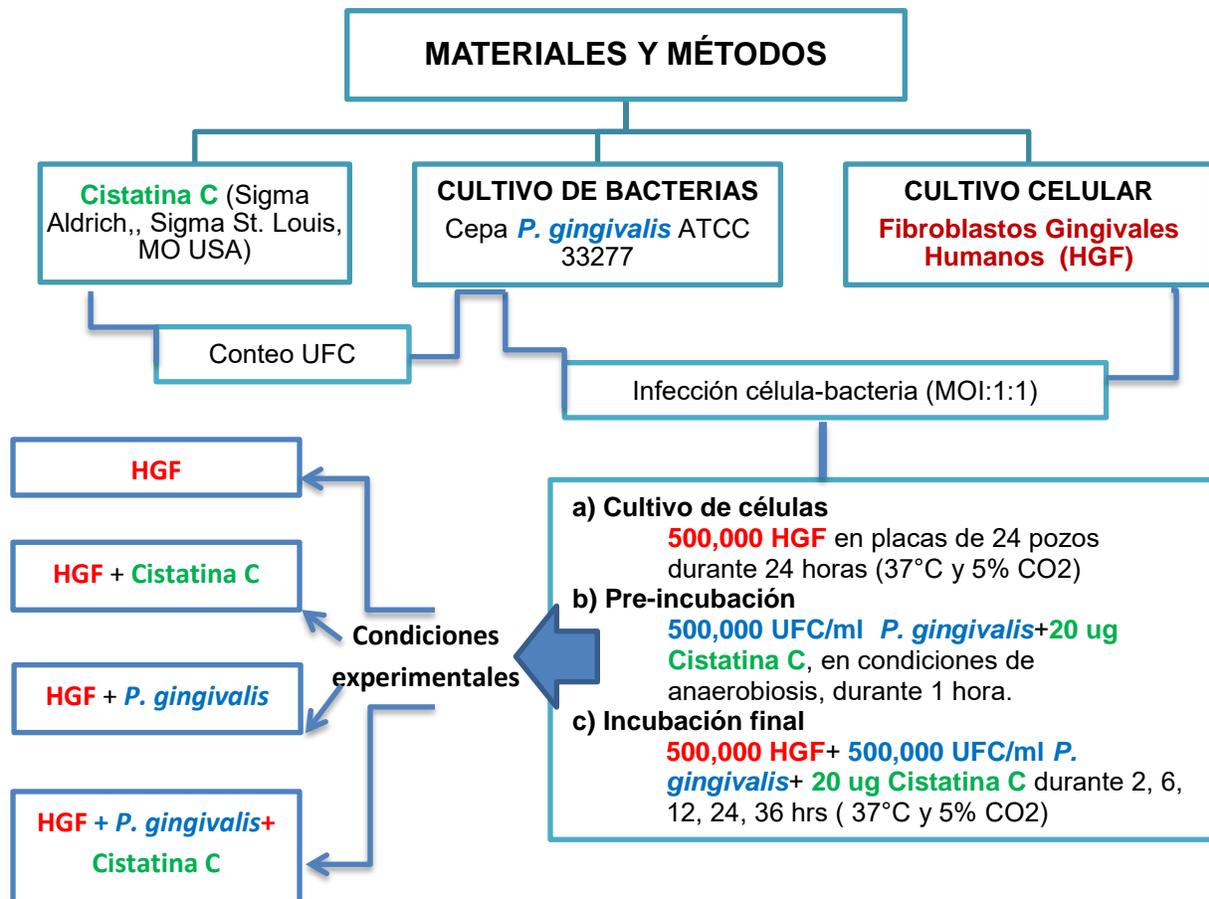


El grupo control y experimentales se incubaron durante 1 hora en condiciones de anaerobiosis, tiempo después del cual se tomó 20 µl de cada muestra, cultivando este volumen en cajas de agar sangre (BHI). Las cajas de agar sangre se incubaron durante un periodo de 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió al conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) reportándose como

$$\text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{Factor de dilución.} = \text{UFC/ml}$$

Infección de fibroblastos gingivales con *Porphyromonas gingivalis*.

Los fibroblastos gingivales humanos se cultivaron en 0.5 ml de medio D-MEM suplementado con 10% SFB, a una densidad de 100,000 células /pozo en placas de 24 pozos en atmósfera de presión con 37°C y 5% de CO₂. Después de 24 horas de incubación el medio fue reemplazado con 0.2 ml de medio D-MEM. Las células fueron tratadas con *Porphyromonas gingivalis* a una multiplicidad de infección (MOI) 1:1. Siguiendo el siguiente esquema de infección





Ensayo de viabilidad celular XTT

Se cultivaron las células en una placa de 96 pozos a una densidad de 100,000 células por pozo en 100 μ l de medio de cultivo. Se prepararon 4 mg de XTT (diluido en PBS 10mM) en 4 ml de medio de cultivo a 37°C. Se añadió 25 μ l de solución XTT / PMS directamente a cada pozo. Se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación las placas se leyeron en lector de ELISA a una absorbancia a 450 nm.

Determinación de citocinas por Ensayo de ELISA

Se recuperaron los sobrenadantes de los grupos experimentales. El ensayo de ELISA se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Kit Titer Zyme EIA Human TNF α , IL4, IL-6 e IL-10). Se determinó la expresión de citocinas proinflamatorias; TNF α e IL-6, y antiinflamatorias; IL-4 e IL-10. Las lecturas se realizaron en lector de ELISA para microplacas (EL312e BIO-TEK INSTRUMENTS) a una longitud de onda de 405 nm con ayuda del programa KC4. Las lecturas se realizaron cada 5 minutos. Las concentraciones de citocinas se expresaron en pg/ml. **(ver anexo)**

Análisis estadístico

El análisis de perfil de citocinas en fibroblastos gingivales incubados con *P. gingivalis* en las diferentes condiciones experimentales se compararon con el grupo control. Los datos se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias significativas se determinaron mediante análisis estadístico ANOVA y prueba post hoc Tukey.

Resultados

Efecto de Cistatina C sobre viabilidad de *Porphyromonas gingivalis*

Se realizaron ensayos de dosis-respuesta para determinar la concentración adecuada que mantuviera viable a la bacteria durante la incubación con los fibroblastos gingivales humanos. Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias (UFC),



mostraron que la incubación de *Porphyromonas gingivalis* con una concentración de 10 µg/ml de Cistatina C, no afecta el crecimiento bacteriano cuando se compara con el grupo control (500,000 *P. gingivalis*) ($p > 0.05$) como se muestra en la **Figura 15**. En contraste la incubación de la bacteria con 20 µg/ml del péptido inhibió el crecimiento a 210,000 UFC/ml ($p < 0.05$) lo que marca una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control. La incubación de *P. gingivalis* con 30 µg/ml de Cistatina C, es citotóxica para la bacteria ($***p = 0.0001$) (**Figura 15**). Los resultados del ensayo de viabilidad permitieron establecer que la dosis ideal para los ensayos experimentales es de 20 µg/ml de Cistatina C, ya que si bien esta dosis inhibió el crecimiento bacteriano, no fue citotóxica para la totalidad de la bacteria.

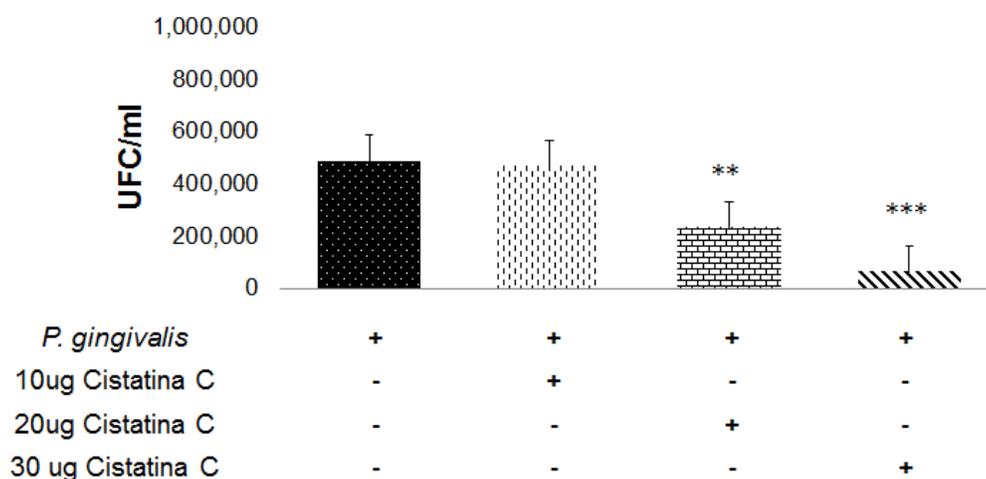


Figura 15. Efecto de Cistatina C en inhibición de crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* expresada en Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Datos de la media \pm SD de 3 experimentos realizados en triplicado por ANOVA una vía y prueba pos hoc Tukey. Las significancias estadísticas se consideraron con una * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p = 0.0001$

Efecto de Cistatina C sobre viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos

Una vez establecida la concentración del péptido, se procedió a realizar los ensayos de viabilidad celular con fibroblastos gingivales humanos mediante ensayo de XTT. Los resultados de la incubación (periodo de 1 hora) de *P. gingivalis* con el péptido (20 µg/ml) en las condiciones experimentales mostraron que esta dosis no fue citotóxica para las células. Esto se corrobora al observar las diferencias estadísticamente



significativas de los grupos experimentales con respecto al grupo control (** $p=0.0001$).

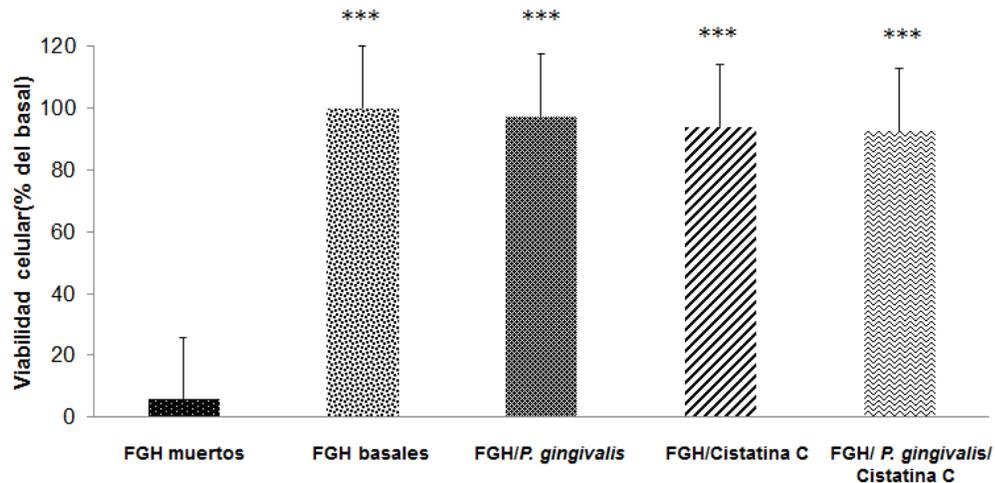


Figura 16. Efecto de Cistatina C en fibroblastos gingivales humanos

Datos de la media \pm SD de 3 experimentos realizados en triplicado por ANOVA una vía y prueba pos hoc Tukey. Las significancias estadísticas se consideraron con una * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p=0.0001$

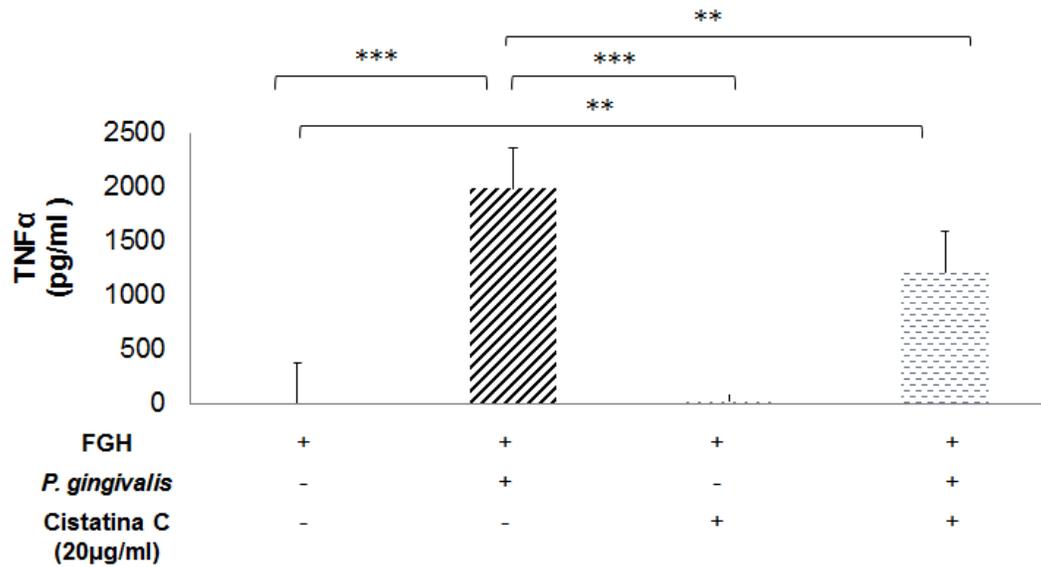
Efecto de Cistatina C en la síntesis de $TNF\alpha$ e IL-6 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con *Porphyromonas gingivalis*

La enfermedad periodontal es resultado de la interacción de las bacterias con las células del hospedero y de la respuesta inmune desencadenada. Las bacterias y sus productos estimulan a las células del huésped para la liberación de mediadores inflamatorios como las citocinas. Las citocinas como $TNF\alpha$, IL- β e IL-6 son las primeras proteínas que participan en la patogénesis de la enfermedad. Los resultados obtenidos de la incubación de *P. gingivalis* con fibroblastos gingivales mostraron un aumento de $TNF\alpha$ (1800 pg/ml), si lo comparamos con respecto al control (fibroblastos gingivales basales *** $p=0.0001$), mientras que en la incubación del fibroblasto gingival con la bacteria y 20 μ g/ml de Cistatina C mostró una disminución significativa de esta citocina (** $p<0.001$). Por otro lado, la incubación de *P. gingivalis* con fibroblastos gingivales humanos mostró un aumento en la producción de IL-6 (1500 pg/ml) comparado con respecto al control (fibroblastos gingivales basales) (** $p=0.0001$). En contraste en el cocultivo de fibroblasto gingival, *P. gingivalis* y Cistatina C, la producción se redujo significativamente (** $p<0.001$) a 500 pg/ml.



Nuestros resultados, mostraron que la Cistatina C está modulando la síntesis de citocinas.

a)



b)

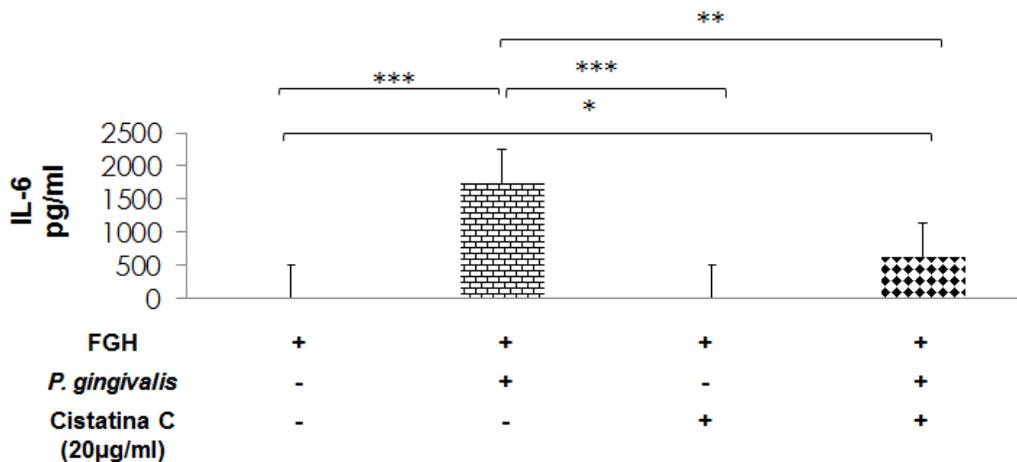


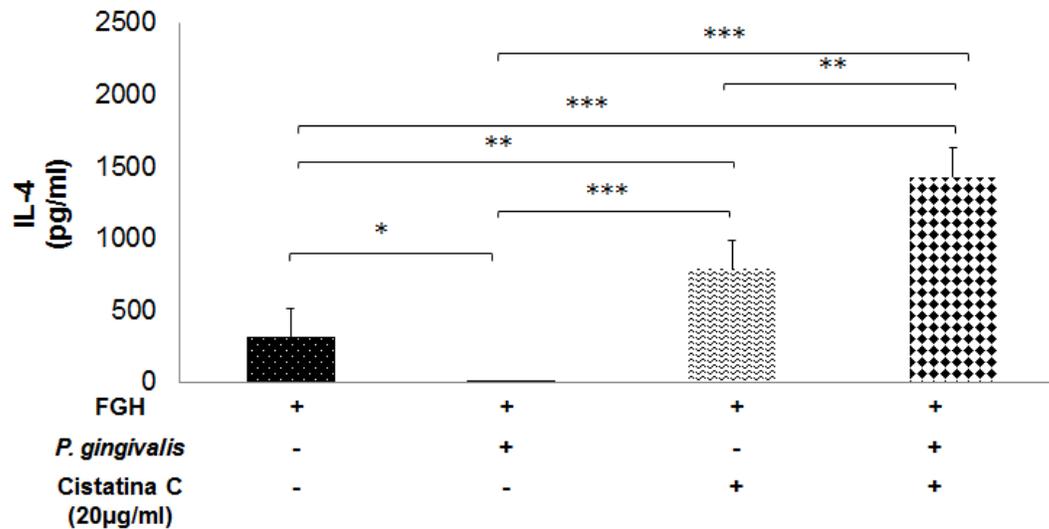
Figura 17. Efecto de Cistatina C en producción de a) TNFα e b) IL-6 en fibroblastos gingivales incubados con Porphyromonas gingivalis

Datos de la media ± SD de 3 experimentos realizados en triplicado por ANOVA una vía y prueba pos hoc Tukey. Las significancias estadísticas se consideraron con una *p<0.05, ** p<0.001, ***p=0.0001



Efecto de Cistatina C en la síntesis de IL-10 e IL-4 en fibroblastos gingivales humanos estimulados con *Porphyromonas gingivalis*

a)



b)

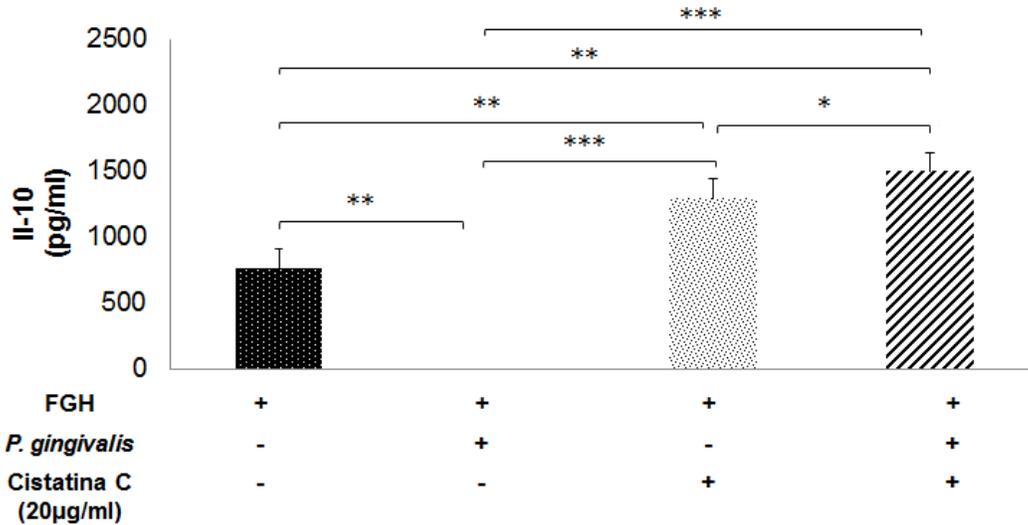


Figura 18. Efecto de Cistatina C en producción de a) IL-4 e b) IL-10 en fibroblastos gingivales incubados con *Porphyromonas gingivalis*

Datos de la media \pm SD de 3 experimentos realizados en triplicado por ANOVA una vía y prueba pos hoc Tukey. Las significancias estadísticas se consideraron con una * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p = 0.0001$



En la **Figura 18** se muestran los efectos de la incubación de fibroblastos gingivales humanos con *P. gingivalis* y Cistatina C en la producción de citocinas IL-4 e IL-10. Como se observa los fibroblastos gingivales en condiciones basales producen ambas citocinas. Si comparamos este control (fibroblastos gingivales en condiciones basales) con el grupo experimental en donde las células se incubaron únicamente con la bacteria, se observó que la producción disminuyó significativamente para ambas citocinas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$). Por el contrario la incubación de fibroblastos únicamente con Cistatina C incrementó significativamente la producción de ambas proteínas (** $p < 0.0001$). Al momento del cocultivo de fibroblasto gingival, bacteria y péptido esta producción siguió en un aumento con una significancia estadística de * $p < 0.05$. Los resultados obtenidos nos muestran que la cistatina C incubada con FGH tiene la capacidad de estimular la producción de citocinas anti-inflamatorias, además de seguir regulando esa producción aun cuando la bacteria este presente.

Discusión

La cavidad oral está expuesta a numerosos microorganismos que cohabitan y conforman la microbiota normal. Existen factores locales y sistémicos que alteran la homeóstasis de éste micro-ambiente oral, favoreciendo que algunos microorganismos específicos de cavidad participen en eventos patológicos como la enfermedad periodontal. ^[44] Ésta patología inicia con la formación de biofilms, en donde las bacterias que lo conforman, perturban las células epiteliales gingivales, lo que conduce a procesos inmunes que resultan en la destrucción de tejidos gingivales, pérdida de inserción y formación de bolsas periodontales. Son aproximadamente 400 las especies microbianas confinadas a las bolsas periodontales. ^[52] Sin embargo; es *P. gingivalis* y sus factores de virulencia los que se relacionan de manera significativa con la magnitud de la respuesta inflamatoria, característica de la enfermedad periodontal. ^[8]

El concepto de especie clave atribuido a *Porphyromonas gingivalis*, está relacionado con la baja abundancia en microbiota y el grado influencia en la comunidad microbiana para el desarrollo de enfermedad. ^[259] *P. gingivalis* no fue detectable en pacientes sanos y comprende, de acuerdo a diversos estudios, sólo el 0,8% de los microorganismos totales en la enfermedad periodontal ^[260] aunque su presencia se correlacionó significativamente con la pérdida ósea (84%) en pacientes con periodontitis crónica a 2 años de seguimiento.



[261] Bajos niveles de *P. gingivalis* también se han detectado en modelo de periodontitis de ratón (0.75×10^{12} unidades del total de bacterias orales). En esos estudios, la dosis infectante de *P. gingivalis* superó cualquier requerimiento de cooperación con la microbiota para inducir la pérdida ósea. [262] Es decir los bajos niveles de *P. gingivalis* pueden ser necesarios para la acción combinada con otras bacterias, para inducir pérdida ósea. Esto sugiere que la presencia continua de bajos niveles de colonización de *P. gingivalis* es necesaria para mantener un alto número de la microbiota oral que están directamente correlacionados con proceso inflamatorio y mayor pérdida ósea. Lo anterior queda dilucidado en nuestro estudio, ya que en la incubación *in vitro* del fibroblasto gingival con la bacteria únicamente, se detectaron altos niveles de **TNF α** , la citocina prioritariamente involucrada en procesos inflamatorios y apoptóticos.

Por otro lado, el ambiente inflamatorio inducido por *Porphyromonas gingivalis* resulta favorable para el crecimiento bacteriano ya que el exudado inflamatorio gingival es una fuente de nutrientes, como las proteínas del huésped degradadas (hemina). [263] Esto, además, altera la composición de la microbiota oral que favorece a aquellas bacterias oportunistas que aprovechan los cambios en el ambiente microbiológico. Los cambios resultan en una inflamación aún mayor y resorción ósea, permitiendo un nicho (bolsas periodontales más profundas) para las bacterias. [52] La respuesta inflamatoria, derivado de la infección por *P.gingivalis* se reportó en estudios realizados por Lin y col. que demostraron, en un modelo de cámara subcutánea de ratón (**DCM**), que la destrucción tisular es ocasionada en respuesta a *Porphyromonas gingivalis*. La infección local generada en las cámaras causó inflamación local, migración de leucocitos y acumulación de exudado inflamatorio, lo que condujo a la ruptura de piel y exfoliación de la cámara. Los fluidos originados fueron analizados y en ellos se detectó niveles crecientes de prostaglandina E2 y factor de necrosis tumoral (**TNF α**), durante la fase aguda y en el momento de la exfoliación de la cámara. [264] Otras investigaciones realizadas por Liang y col. demostraron que la colonización de *P. gingivalis* origina cambios en la microbiota comensal oral murina, a través de mecanismos que dependen de los receptores de anafilatoxinas (**C3aR** y **C5aR**). El receptor de anafilatoxina **C5aR** es activada como parte de la cascada del complemento y ejerce importantes funciones regulatorias, antimicrobianas e inflamatorias por lo menos, a través de las vías de TLRs. *P. gingivalis* tiene la capacidad de controlar la activación de C5aR de C5a a través de su propia



actividad enzimática tipo C5 convertasa. Este mecanismo es utilizado por la bacteria para inhibir en forma pro-activa y selectiva la producción de IL-12p70-TNF- α inducida por TLR2. Este patógeno participa también en la sobre-regulación de C5aR-TLR2, y de otras citocinas inflamatorias y de aquellas que participan en la reabsorción ósea (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). *P.gingivalis* tiene la habilidad de manipular *in vivo* la activación TLR-2 via C5s-C5aR, y evade ser eliminada a través de IL-12p7, además tienen la capacidad de inducir pérdida ósea en el modelo murino de periodontitis experimental. [265]

Es importante señalar que los eventos ocasionados por la invasión bacteriana inducen, que las células del hospedero sintetizan y liberen mediadores inflamatorios a través sistema inmune innato y adquirido, que atraen células inflamatorias hacia el sitio de infección, que contribuye a la destrucción de tejido, debido a la liberación de enzimas proteolíticas, inducción de osteoclastogénesis y apoptosis celular. (269) Una respuesta inicial del huésped es la secreción de proteínas antimicrobianas y péptidos (**AMPs**) por las glándulas salivales, las células epiteliales orales y los neutrófilos. Se han identificado más de 1100 proteínas en la saliva humana y un gran número de éstas son proteínas de función desconocida. El estudio de estas moléculas desde su aparición se ha centrado específicamente en la capacidad antimicrobiana, sin embargo a la fecha existen escasos estudios de sus propiedades inmunomoduladoras. [171]

Se han realizado estudios para analizar la capacidad antimicrobiana que algunos péptidos como lactoferrina e histatina 5 en contra microorganismos como *Streptococcus mutans* y *P. gingivalis*. Éstos péptidos tienen la capacidad de penetrar y acumularse en la pared celular y citoplasma del microorganismo. Sin embargo en años recientes se ha ponderado el uso de otra molécula con funciones similares, las denominadas cistatinas. Desde la aparición de la Cistatina de pollo, [270] se han llevado a cabo diversos estudios analizando su propiedad antimicrobiana. Blankenvoorde y col demostraron la capacidad de Cistatina C (>200 μ M) para inhibir el crecimiento de *P. gingivalis* en un 50% de la población bacteriana. [271] Se han descrito, además la síntesis y propiedades antibacterianas de derivados antimicrobianos peptídicos de Cistatina C (Cistapep 1 [-2- Na-benciloxicarbonil-arginil-leucilamido-1 - E -cinnamoylamido -3-metilbutano]), que mostró actividad contra varias bacterias Gram positivas clínicamente importantes como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, a una concentración de 1.0 gr/ml.



Esta importante capacidad antibacteriana se ve disminuida en bacterias como neumococos, enterococos y bacterias Gram negativas. ^[272] En nuestro estudio, encontramos que había inhibición del crecimiento bacteriano en un 50% pero a una mayor concentración (20 µg/ml) de Cistatina C. Probablemente esto se presenta por que Cistatina C posee una mayor eficacia a concentraciones todavía menores en un periodo de incubación menor.

El mecanismo de la interacción del péptido y la bacteria no está del todo clara, no obstante existen estudios recientes que han analizado el mecanismo de internalización de Cistatinas. A concentraciones de 0.1 uM en líneas celulares de carcinoma (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-468 [adenocarcinoma humano]), la localización del péptido (marcado con Alexa 488), es en membrana plasmática, citoplasma e intracelularmente en estructuras tipo lisosoma. ^[273]

Las funciones inmunomoduladoras de los **AMPs** como la quimiotaxis, la inducción de citocinas anti-inflamatorias e inmunosupresoras, la anti-apoptosis, la cicatrización de heridas, la angiogénesis, ^[13] en condiciones fisiológicas se han centrado en algunos grupos de péptidos como las defensinas y catelicidinas. **HNP-1**, 2 y 3 son quimioatrayentes para monocitos, mientras que **HNP-1** y -2 y **HBD-2** y -3 son quimioatrayentes para células dendríticas. Además su gradiente de concentración puede reclutar a células T de memoria CD4, monocitos y macrófagos. ⁽²⁷⁴⁾ Un mecanismo importante detrás de la quimioatracción inducida por HBD es la activación de receptores de quimioquinas específicos. Por ejemplo, **HBD1** y **HBD2** median su propiedad de quimioatracción a través de **CCR6**, el cual también se une a quimioquina LARC/CC120^[275]

LL-37 es el único miembro de la familia de catelicidina humana que tiene varias propiedades moduladoras del sistema inmune y que pueden estar relacionadas con condiciones como inflamación crónica y autoinmunidad. Estudios recientes han mostrado que **LL-37** es quimiotáctica a los monocitos, neutrófilos y células T, y que presentan propiedades anti-inflamatorias y que antagonizan la expresión de **IFN γ** , **TNF α** , **IL-12** en macrófagos murinos y células epiteliales de pulmón. ^[276] Por otro lado, se ha reportado que **LL-37** es capaz de inhibir la producción de TNF- α , IL-1 β and IL-6, inducido por lo LPS de *P.gingivalis* y además tienen la capacidad de neutralizar completamente las endotoxina



(LPS), que fue medida por el estuche comercial lisado de amebocito limulus (LAL).^[277] Más aún, este péptido atenúa la activación de la vía **MAPK** a través **p38** y **ERK**, inducida por extractos de *P. gingivalis*, y además disminuye la respuesta citocinas **IL-6**, **IL-8** e **IP-10 (CXCL10)** en fibroblastos gingivales humanos.^[278] En nuestro estudio el péptido de Cistatina C también disminuyó la producción de citocinas **TNF α** e **IL-6**, en cultivo *in vitro*, sin embargo, desconocemos la vía que utiliza el péptido para lograr esta disminución. Nosotros analizamos las propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras de la Cistatina C. Estudiamos el efecto de éste péptido en fibroblastos gingivales ya que éstos representan la principal fuente de tejido conectivo que mantiene la homeostasis e integridad del tejidos, y además tienen la capacidad de sensar la invasión microbiana, por ejemplo de (*Porphyromonas gingivalis*). Los fibroblastos ante este estímulo, responden con la producción de mediadores inflamatorio como citocinas, que tienen propiedades inflamatorias, hematopoyéticas, metabólicas e inmunomoduladoras. Las citocinas y sus receptores forman una red compleja que se encuentra bajo estricto control biológico incluyendo mecanismos de retroalimentación positiva y negativa.^[280] Por otro lado, la inmunidad depende principalmente de 2 tipos de respuesta inmune específica; la humoral y celular; el balance entre ambas, esta estrechamente regulada por factores asociados con las células presentadoras de antígeno (**APC**), y por las citocinas producidas por linfocitos T CD4+ cooperadores.^[282]

Górska y col. evaluaron en biopsias de tejidos gingivales inflamados y en muestras de sangre de pacientes con periodontitis crónica, la relación existente entre parámetros clínicos y las concentraciones de citocinas importantes para el inicio y la progresión de las enfermedades periodontales (**IL-1 β** , **TNF- α** , **IL-2**, **IFN- γ** , **IL-10** e **IL-4**). Los resultados que obtuvieron mostraron que había altas concentraciones de **IL-1 β** , **TNF- α** , **IL-2**, e **IFN- γ** en pacientes con periodontitis comparados con el grupo de sujetos sanos.^[283] Nuestros resultados coinciden con este estudio, ya que la estimulación de fibroblastos gingivales humanos con *Porphyromonas gingivalis* mostró un aumento significativo de **TNF- α** e **IL-6** (1800 y 1500 pg/ml respectivamente) con respecto al control. Por otro lado, la producción de citocinas **IL-10** e **IL-4** que se observó en la incubación de fibroblastos basales en condiciones basales sugieren que los fibroblastos lo producen constituitivamente e inducen una respuesta Th2 al expresar citocinas de tipo anti-inflamatorio.^[13]



Además el efecto pleitrópico de Cistatina C ha quedado demostrado en estudios realizados por Kar y col. en ratones BALB/c con leishmaniasis visceral. En este estudio se demostró que este péptido actúa en la maquinaria celular del macrófago, activando la vía de transcripción **MAPK** y **NF-kB**. Esto conduce a la generación de óxido nítrico y citocinas proinflamatorias, responsables de la actividad contra *Leishmania*. La activación de **NF-kB** es esencial para eventos de señalización río abajo y esta mediada por receptores **TLR2/4**. Esta vía es dependiente de **MyD88** y participan en ella proteínas como **IRAK1-TRAF6-TAK1**, necesarias para inducir la activación de **IKK/NF-kB** mediada por cistatina en macrófagos. La activación de esta vía ejerce un efecto curativo en leishmaniasis *in vivo* al inducir expresión de genes proinflamatorios de **TNF- α** e **iNOS**.^[284] Por otro lado, Frendeus y col. observaron que la respuesta mediada por macrófagos peritoneales de ratón causa una regulación negativa de la expresión de **IFN γ** , **TNF α** y **NF-kB** e induce la expresión de mRNA de **IL- 10**.^[285] Nuestro estudio muestra que la incubación con el péptido no solo disminuye la expresión de citocinas pro-inflamatorias (**TNF α** , **IL-6**), sino que además ofrece un efecto protector al incrementar los niveles de citocinas basales y en cocultivo con la *Porphyromonas gingivalis*.

Aunque se ha analizado la capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora de otros péptidos contenidos en cavidad oral, aún no pueden ser incluidos como agentes terapéuticos debido a que presentan una alta toxicidad.^[20] La Cistatina C a la concentración utilizada en nuestro estudio (20 $\mu\text{g/ml}$), no fue citotóxica para los fibroblastos gingivales humanos, sin embargo, se deberán realizar estudios *in vivo* e *in vitro* para que pudieran ser incluidos como agentes terapéuticos. Se ha reportado que la concentración de péptidos antimicrobianos está estrechamente relacionada con la actividad anti-inflamatoria y pro-inflamatoria. Las células expuestas a bajas concentraciones de péptidos antimicrobianos (generalmente menos de 1,0 $\mu\text{g/ml}$) producen cantidades menores de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias, y las células expuestas a mayores concentraciones de péptidos antimicrobianos (10 a > 100 $\mu\text{g/ml}$) producen mayores cantidades de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias.^[286] Nosotros encontramos que Cistatina C a una concentración de 20 μg tiene un comportamiento similar, ya que se demostró que después de su incubación con *P.gingivalis* y con los fibroblastos se inducen la producción de citocinas anti-inflamatorias .



Conclusiones

La incubación de *P.gingivalis* con fibroblastos gingivalis induce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-6) en contraste, la incubación de *P.gingivalis* con cistatina C induce un ambiente anti-inflamatorio ((L-4 e IL-10).

Los resultados sugieren que *P.gingivalis* podría ser la responsable de establecer el proceso inflamatorio característico de la enfermedad periodontal, que conduce a la destrucción ósea al crear un ambiente pro-inflamatorio en el surco gingival.

Con los resultados obtenidos se podría sugerir el uso de Cistatina C como un agente antibacteriano que coadyuve en el tratamiento de la enfermedad periodontal. Sin embargo, es necesario realizar más estudios *in vitro* e *in vivo*.

Referencias Bibliográficas

1. Bostanci N, Belibasakis G. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiology 2012; 33: 1-9.
2. Maekawa T, Krauss J, Abe T, Jotwani, Triantafyllou K, Hoch S, Lambris J. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. Cell Host Microbe 2014; 15(6): 768–778.
3. Darvaeeau R. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. Nat Rev Microbiology 2010; 8(2): 481-48
4. Mysak j, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya Y, Bartova J, Janantova T, Prochazcova J, Duskiva J. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen overview. Journal of Immunology Research 2014; 8:1-11.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Revista de la Salud [revista en línea] 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>. Fecha de acceso: mayo 2017.
6. American Academy of Periodontology. PERIO.ORG 2012. Disponible en: <https://www.perio.org/consumer/cdc-study.htm>. Fecha de acceso: Junio 2017.
7. Carvajal P. Enfermedades periodontales como un problema de salud pública: el desafío del nivel primario de atención en salud. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral 2016;9:177-183.
8. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat Rev Immunol 2015; 15: 30-44. Nat Rev Microbiol 2010;8: 481-90.
9. Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol 2000; 15: 341–349
10. Scheres N, Laine ML, Sipsos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, Everts V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res 2011; 46: 407–416.
11. Boronat-Catalá M, Catalá-Pizarro M, Bagan JV. Salivary and crevicular fluid interleukins in gingivitis. J Clin Exp Dent. 2014;6(2):175-9
12. Wang P, Ohura K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblast- CD14 and Toll Like Receptors. Crit Rev Oral Biol Med 2002; 13(2):132-142
13. Castañeda J, Ortega RJ, Venegas MM, Andrade AA, López SJ, Parra ES, Estrada I. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. Rev Ped Aler Asm e Inm 2009; 18(1):16-29.
14. Hancock R, Sahl H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat Biotechnol 2006; 24(12): 1551-1557.
15. Rivas L, Andreu D. Péptidos antibióticos eucarióticos: ¿una nueva alternativa en clínica?. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003;21(7):358-65.
16. Hancock, R.E.W. & Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. Trends Biotechnol 1998; 16: 82–88.
17. Almoharib H, Almubark A, Alrowis R, Geevarghese A, Anil S. Oral Fluid Based Biomarkers in Periodontal Disease: Part 1. Saliva. Journal of International Oral Health 2014; 6(4):95-103.
18. Peters B, Shirtliff M, Jabra MA. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs?. PLoS Pathogens 2010; 6(10): 1-5.



19. Alrowis R, Almoharib H, Almubarak A, Bhaskardoss J, Preethanath RS, Sakumaran A. Oral Fluid-Based Biomarkers in Periodontal Disease – Part 2. Gingival Crevicular Fluid. *Journal of International Oral Health* 2014; 6(5):126-135.
20. Seo M, Won H, Mishing O, Lee J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules* 2012; 17: 12276-12286.
21. Sharma A, Pradeep A, Raghavendra N, Arjun P, Kathariya R. Gingival crevicular fluid and serum cystatin c levels in periodontal health and disease. *Disease Markers* 2012; 5: 101–107.
22. Baron AC, DeCarlo AA, Featherstone JDB. Functional aspects of the human salivary cystatins in the oral environment. *Oral disease* 1999; 5: 234–240.
23. Frendéus K, Wallin H, Janciauskiene S, Abrahamson M. macrophage responses to interferon are dependent on Cystatin C levels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009: 2262–2269.
24. Pathirana R, O'Brien N, Reynolds E. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology* 2000 2010; 52: 218–237.
25. Ximenez FL, Haffajee H, Socransky S. Comparison of the microbiota of supra-and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 648–657.
26. Honda K. *Porphyromonas gingivalis* sinks teeth into the oral microbiota and periodontal disease. *Cell Host & Microbe* 2011; 17, 20-31.
27. Hajinshengallis G. immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology* 2014; 35(1): 1-11.
28. Perez-Chaparro, P. J. et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J. Dent. Res* 2014; 93(6): 846–858.
29. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S & Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2011; 8(23): 471–480
30. Ly M, Abeles S, Boehm T, Robles R, Naidu M, Santiago T, Pride D. Altered Oral Viral Ecology in Association with Periodontal Disease. *MBIO* 2014; 5(3): 133-134.
31. Danino J, Joachims HZ, Barak M. Predictive value of an adherence test for acute otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118:400–3.
32. Isogai E, Isogai H, Sawada H, et al. Bacterial adherence to gingival epithelial cells of rats with naturally occurring gingivitis. *J Periodontol* 1986; 57:225–30.
33. Tatakis D, Kumar P. Etiology and Pathogenesis of Periodontal Diseases. *Dent Clin N* 2005; 49:491-516.
34. Chandki R, Banthia P, Banthia R. Biofilms: A microbial home. *J Indian Soc Periodontol*. 2011 ; 15(2): 111–114.
35. Wadhams G, Armitage J. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Molecular cell biology* 2004; 5: 1024-1038.
36. Young J, Young H, Heithmen B, Ryu E, Yanjo S, Young K, Tae k. In Vivo Inhibition of *Porphyromonas Gingivalis* Growth and Prevention of Periodontitis With Quorum-Sensing Inhibitors. *Journal of Periodontology* 2016; 16(2):70-74.
37. Burgess N y col. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology* 2002; 14(8): 763–772
38. Pathirana R, O'Brien N, Reynolds E. Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology* 2000 2010; 52: 218-237.
39. Khan S, Kong E, Meiller T, Jabra M. Periodontal Diseases: Bug Induced Host Promoted. *Plos Pathogen* 2015; 23(4):1237-1245.
40. Mantyla, P. et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J. Periodontal Res* 2003; 38(5): 436–439.
41. Graves, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J. Periodontol* 2008; 79, 1585–1591.
42. Sorsa, T. et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol* 2016; 70, 142–163
43. Gemmell, E. & Seymour, G. J. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol* 2004; 35, 21–41.
44. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2002;28:12-55.
45. Enwonwu CO, Falkler WA, Idigbe EO . Oro-facial gangrene (noma/cancrum oris): pathogenetic mechanisms. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 2000; 11:159-171.
46. Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia J. the role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol* 2000 2007;34(2): 102- 134.
47. Escribano M, Matesanz P, Vascones A . Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Av Periodon Implantol* 2005; 17(2):79-87 .
48. Lamont RJ, Hajinshengallis GM, Jenkinson HF . *Oral Microbiology and Immunology* 2013; 23(7): 124-134.
49. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A (2013). Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol* 2000 62:95-162
50. Hajinshengallis G. immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology* 2014; 35(1): 1-11.
51. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL . Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
52. Hajinshengallis G, Liang S, Payne M, Hashim A, Jotwani R, Eskandari M Y COL. A Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and the Complement Pathway. *Cell Host Microbe* 2011; 10(5): 497–506.
53. Liu R, Desta T, Raptis M, Darveau RP & Graves DT 2008 P. gingivalis and E. coli lipopolysaccharides exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *J Periodontol* 2008; 79(5): 1241–1247.
54. Lamont R, Jenkinson. In or out: invasiveness of oral bacteria. *Periodontol* 2000 2002; 30(6): 61-69.



55. Lamont R, Jenkinson H. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Mol Biol Rev* 1998; 63(10): 1244-1263
56. Topazian R, Goldber M, Hupp J. Oral and maxillofacial infections. 4th edition. Saunders; 30-40, 126-142.
57. Kumagi Y, Yahishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipetidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *gingivalis*. *Infect Immun* 2005; 73: 2655-2664.
58. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco, Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology* 2005;29(1):119-144
59. Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K et al. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *Journal of Biochemistry* 2000; 128 (2):53-159.
60. Amano A., Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *Journal of Periodontal Research* 2004; 39(2):136-142.
61. Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol* 2002; 4:305-314.
62. Eskan MA, Hajishengallis G, Kinane DF. Differential activation of human gingival epithelial cells and monocytes by *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect Immun* 2007; 75: 8928.
63. Takahashi Y, Davey M, Yumoto H, Gibson FC III, Genco CA. Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells. *Cell Microbiol* 2006; 8: 738-757.
64. Umemoto T, Hamada N. Characterization of biologically active cell surface components of a periodontal pathogen. The roles of major and minor fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2003; 74: 119- 122.
65. Enersen M, Nakano K, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Journal of Oral Microbiology* 2013; 5(10): 202-210.
66. Hajishengallis G, Lambris JD. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 187-200
67. Yoshimura, F., Murakami, Y., Nishikawa, K., Hasegawa, Y., and Kawaminami, S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2009; 44: 1-12.
68. Laine M, Appelmek B. J, van Winkelhoff J. Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *J Dent Res* 1997; 76: 1840-1844.
69. Singh A, Wyant T, Anaya-Bergman C, Aduse-Opoku J, Brunner J, Laine ML. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect Immun* 2011; 79:4533-4542
70. Dierickx, K., Pauwels, M., Laine, M. L., Van Eldere, J., Cassiman, J. J., van Winkelhoff, A. J., et al. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* serotypes to pocket epithelium. *J. Periodontol* 2003; 74: 844-848.
71. Rosen G, Sela MN. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 25(6): 304-310.
72. Brunner, J., Scheres, N., Elidrissi, N. B., Deng, D. M., Laine, M. L., van Winkelhoff, A. J., et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol* 2010; 180-185.
73. Igboin C O, Tordoff K P, Moeschberger M L, Griffen AL, Leys E. J. *Porphyromonas gingivalis*-host interactions in a *Drosophila melanogaster* model. *Infect. Immun.* 2011; 79: 449-458.
- 74.
75. Travis J, Pike T, Imamura T, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 1997; 32(1): 120-125, 1997.
76. Ganuelas L, Li N, Yun P, Hunter N, Collyer C. The lysine gingipain adhesin domains from *Porphyromonas gingivalis* interact with erythrocytes and albumin: structures correlate to function. *European Journal of Microbiology & Immunology* 2013; 3,(3):152-162.
77. Wang M, Krauss JL, Domon H, Hosur KB, Liang S, Magotti P, Triantafyllou M, et al. Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. *Sci Signal.* 2010; 3:ra11.
78. Abe T, Hosur KB, Hajishengallis E, Reis ES, Ricklin D, Lambris JD, Hajishengallis G. Local complement-targeted intervention in periodontitis: proof-of-concept using a C5a receptor (CD88) antagonist. *J Immunol* 2012; 18(9):5442-5448.
79. Liang S, Krauss JL, Domon H, McIntosh ML, Hosur KB, Qu H, Li F, et al. The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *J Immunol* 2011; 18(6):869-877.
80. Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J Immunol* 2007; 17(8):7242-7250.
81. Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immun* 2009; 1:70-87.
82. Slaney JM, Gallagher A, Aduse-Opoku J, Pell K, Curtis MA. Mechanisms of resistance of *Porphyromonas gingivalis* to killing by serum complement. *Infect Immun* 2006; 7(4):5352-5361.
83. Hajishengallis G, Lamont R. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol.* 2014; 44(2): 328-338.
84. Amano A, Kuboniwa I, Nakagawa, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of Specific Genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and Periodontal Health Status. *Journal of Dental Research* 2000; 79:1664-8.
85. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanak S. et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol* 2005; 16(6): 3574-3579.
86. Nichols F, Riep B, Mun J, Morton M, Kawai T, Dewhirst F, Smith M. Structures and biological activities of novel phosphatidylethanolamine lipids of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Lipid Research* 2006; 74:844-853.



87. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. Porphyromonas gingivalis LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Archives of Oral Biology* 2014 ; 59(2): 167–175.
88. Pathirana R, O'Brien N, Reynolds E. Host immune responses to Porphyromonas gingivalis antigens. *Periodontology* 2000, 2010; 52: 218–237
89. Whitmore SE, Lamont RJ. The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Mol Microbiol* 2011; 81:305–314.
90. Zhang Y, Wang XC, Bao XF, Hu M, Xian W. Effects of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on osteoblast-osteoclast bidirectional EphB4-EphrinB2 signaling. *Exper and therapeutic Medicine* 2014; 7:80-84.
91. Banbula A, Bugno M, Goldstein J, Yen J, Nelson D, Travis J & Potempa J. Emerging family of proline-specific peptidases of Porphyromonas gingivalis: purification and characterization of serine dipeptidyl peptidase, a structural and functional homologue of mammalian prolyl dipeptidyl peptidase IV. *Infect Immun* 2000; 68: 1176–1182
92. Clais S, Boulet G, Kerstens M, Horemans T et al. Importance of biofilm formation and dipeptidyl peptidase IV for the pathogenicity of clinical Porphyromonas gingivalis isolates. *Pathogens and disease*. 2014; 70: 408-413.
93. Kumagai Y, Yahishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. Molecular mechanism for connective tissue destruction by didpetidyl aminopeptiase IV produced by the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun* 2005; 73(5): 3574, 3579.
94. Orrego CM, Parra GA, Salgado MY, Muñoz G E, Fandiño V. *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *CES Odontología* 2015; 28(1): 57-73.
95. Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontol* 2000, 2010; 52:38-52.
96. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol* 2013; 28:83–101.
97. Whitmore SE, Lamont RJ. Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *Int J Oral Sci* 2012; 4:1–6.
98. Maeda K, Tribble GD, Tucker CM, Anaya C, Shizukuishi S, Lewis JP, Demuth DR, Lamont RJ. A Porphyromonas gingivalis tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes. *Mol Microbiol* 2008; 69:1153–1164.
99. Whitmore SE, Lamont RJ. The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Mol Microbiol* 2011; 81:305–314.
100. Daep CA, Novak EA, Lamont RJ, Demuth DR. Structural dissection and in vivo effectiveness of a peptide inhibitor of Porphyromonas gingivalis adherence to Streptococcus gordonii. *Infect Immun* 2011; 79:67–74.
101. Yilmaz O, Young A, Lamont R, Kenny G. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to Porphyromonas gingivalis invasion. *Microbiology* 2003; 149: 2417-2426.
102. Yilmaz O. The chronicles of Poprhyromonas gingivalis: the microbium the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology* 2008; 15(4): 2897-2903.
103. Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 2006; 44(2):527–532.
104. Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H et al. Porphyromonas gingivalis enhances FasL expression via up-regulation of NFkB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cell. *Microbiology* 2006; 152: 797–806.
105. Ara T, Kurata K, Hirai k, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, Furusawa K, Kurihara S, Wang P. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J. Periodontal Res* 2009; 44(1): 21-27.
106. Steffen MU, Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Micriobiol Immunol* 2000; 15(3): 172-180.
107. Graber TM. Current principles and techniques. 3a. ed. Elsevier Mosby; 120-129.
108. Sun Y¹, Shu R, Zhang MZ, Wu AP. Toll-like receptor 4 signaling plays a role in triggering periodontal infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;52(3):362-9.
109. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODS in human gingival fibroblasts. *J Dent RES* 2007; 86(3): 249-254.
110. Mahanonda R, Sa Ard N, Montreekachon P, Pimkhaorkham , Yongvanichit K, Fukuda M. IL-8 andIDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol* 2007; 178: 1151-1157.
111. Montañó K, Vargas F. Péptidos antimicrobianos, un mecanismo de defense ancestral con mucho futuro. *Redalyc interciencia* 2002; 27(1): 21-27.
112. Chaplin, D.D. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol* 2010, 125: S3-23.
113. Fritz, J, Le Bourhis, Magalhaes, Philpott DJ. Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends Immunol* 2008; 29, (1): 41-49.
114. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392 (6): 245-252
115. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem* 2003, 27(8): 38105-38108.
116. Hancock R, George H S. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 2006; 24(12): 1551-1557.
117. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann. Rev. Immunol* 1995; 13: 61-92.
118. Amulic, B.; Cazalet, C.; Hayes, G.L.; Metzler, K.D.; Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, 30, 459-489.
119. Rivas L, Andreu D. Péptidos antibióticos eucarióticos: ¿una nueva alternativa en clínica?. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2003; 21(7):358-65.
120. Wang, G., Li, X. and Wang, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research* 2016; 44, D1087-D1093.
121. Wang, G., Li, X. and Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research* 2009; 37, D933-D937.



122. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000; 8:(9): 402-410.
123. Khurshid Z, Naseem M, Sheikh Z, Najeeb S, Shahab S, Sohail M. Oral antimicrobial peptides: types and role in the oral cavity. *Saudi pharmaceutical Journal* 2016; 24: 515-524.
124. Hancock, R, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol* 2006; 24:(12): 1551-1557. [
125. Hancock, R.E. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997; 34(9): 418-422.
126. Dutta P, Das S. Mammalian Antimicrobial Peptides: Promising Therapeutic Targets Against Infection and Chronic Inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2016; 1(6): 99-129.
127. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997; 34(9): 418- 422.
128. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol* 2003; 3(9): 710-720.
129. Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006; 17 (9): 1408- 1425.
130. Barillas C, Wizen B, Soo Han Y. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochem. Mol. Biol* 2000; 30: 429-442.
131. Bulet P, Hetru C, Dimarcq J-L, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Devel. Comp. Immunol* 1999; 23: 329-344.
132. Engström Y. Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophyla*. *Develop. Comp. Immunol* 1999; 23: 345-358.
133. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 28(4): 1313-1318.
134. Sass V et al. Human beta defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect Immun* 2010; 78: 2793-2800.
135. De Leeuw E et al. Functional interaction of human neutrophil peptide -1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Lett* 2010; 58(4): 1543-1548.
136. Wu Z et al. engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Nat Acad Sc.* 2003; 100: 8880-8885.
137. Schoroder BO et al. reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human B defensin 1. *Nature* 2005; 46(9): 419-423.
138. Wimley W. describing the mechanisms of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol* 2010; 5: 905-917.
139. Sass V et al. Human beta defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect Immun* 2010; 78: 2793-2800.
140. De Leeuw E et al. Functional interaction of human neutrophil peptide -1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Lett* 2010; 58(4): 1543-1548.
141. Wu Z et al. engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc Nat Acad Sc.* 2003; 100: 8880-8885.
142. Schoroder BO et al. reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human B defensin 1. *Nature* 2005; 46(9): 419-423.
143. Luque J et al. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide target of mitochondrial ATP synthase in *Leishmania*. *FASEB J* 2008; 22: 1817-1828.
144. Chan D et al. Tryptophan and arginine rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim biophys acta* 2006; 17(5): 1184-1202.
145. Su LY et al. An antimicrobial peptide that targets DNA repair intermediates in vitro inhibits *Salmonella* growth within murine macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1888-1899.
146. Hancock R, Sahl H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 2006;24(12): 1551-1557.
147. Peschel, A. & Sahl, H.G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol* 2006; 4: 529-536.
148. Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19, 491-511.
149. Nyugen L, Haney E, Vogel J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology* 2011; 29(9):464-472.
150. Teixeira V, Feio M, Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Pro lipid Res* 2012; 51: 149-177.
151. Yamaguchi S, Huster D, Waring A, Lehrer RI, Kearney W, Tack BF, Hong M. Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J* 2001; 81: 2203-2214.
152. Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 1992; 31: 12416-12423.
153. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 238-250.
154. Steintraesser L, Kranebrug U, Jacobsen F. Host defense peptides and their antimicrobial immunomodulatory duality. *Immunobiology* 2011; 216(3): 322-333.
155. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrelstave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 2001; 81: 1475-1485.
156. Spaar A, Munster C, Salditt T. Conformation of peptides in lipid membranes studied by X-ray grazing incidence scattering. *Biophys J* 2004; 87: 396-407.



157. Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 1996; 35: 11361-11368.
158. Hallock KJ, Lee DK, Ramamoorthy A. MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. *Biophys J* 2003; 84: 052-3060.
159. Wu M, E Maier R, Benz, Hancock RE. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1999; 38: 7235-7242.
160. Matsuzaki K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1376: 391-400.
161. Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1184-202.
162. Pokorny A, Almeida PF. Kinetics of dye efflux and lipid flipflop induced by delta-lysin in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, alpha-helical peptides. *Biochemistry* 2004; 43: 8846-8857.
163. Chen X, Hirt H, Li Y, Gorr S. Antimicrobial GL13K peptide coatings killed and ruptured the wall of *Streptococcus gordonii* and prevent formation and growth of biofilm. *PLoS ONE* 2014; 9(11): 1-8.
164. Lucca M, Maccari G, Nifosi R. treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactica and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathog Dis* 2014; 70: 257-270.
165. Yang D, Oppenheim JJ. Multiple functions of antimicrobial peptides in host immunity. In: *Mammalian Host Defense Peptides*. Devine, DA, Hancock, REW (Eds.). 2004 Cambridge University Press, Cambridge, 39-68
166. Devine, D.A., Hancock, R.E.W. Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance. *Curr. Pharm. Des* 2002; 8: 99-110.
167. Hancock, R.E.W., Chapple, D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999; 43, 1317-1323.
168. Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 1999; 274: 8405-8410.
169. Devine D. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Molecular Immunology* 2003; 40: 431-44.
170. Nijnik, A.; Hancock, R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg. Health Threats J.*, 2009, 2(77): 345-356.
171. Afacan N.J, Yeung AT, Pena OM, Hancock RE. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Curr Pharm Des* 2012; 18(6): 807-819.
172. Lai Y, Gallo R. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 2009; 30: 131-141.
173. Mai S, Mauger M, Niu L, Barnes J, Kao S, Bergeron B et al. Potential applications of antimicrobial peptides and their mimics in combating caries and pulpal infections. *Acta Biomaterialia* 2017; 49: 16-35.
174. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat. Med* 2003; 9(3): 269-277.
175. Zhang LT, Yao YM, Lu JQ, Yan XJ, Yu Y, Sheng Z. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein inhibits endotoxin-induced high-mobility group box 1 protein gene expression in sepsis. *Shock*, 2008; 29(2): 278-284.
176. Doi K, Hu X, Yuen PS et al. AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. *Kidney Int* 2008; 73(11): 1266-1274.
177. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R et al. Antiendotoxin activity of protegrin analog IB-367 alone or in combination with piperacillin in different animal models of septic shock. *Peptides* 2003; 24(11): 1747-1752.
178. Nakatsuji T, Gallo R. antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1551-1557.
179. Putsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus kostmann: An observation study. *The Lancet* 2002; 360:1144-1149.
180. Gorr S-U. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology* 2009; 18(5):152-180.
181. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 710-720.
182. Kapas S, Pahal K, Cruchley AT, Hagi-Pavli E, Hinson JP. Expression of adrenomedullin and its receptors in human salivary tissue. *J Dent Res* 2004; 83: 333-337.
183. Den Hertog AL, van Marle J, van Veen HA, Van't Hof W, Bolscher JG, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Candida-cidal effects of two antimicrobial peptides: histatin5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *Biochem J* 2005; 38(8):689-695.
184. Dickinson DP, Ridall AL, Levine MJ. Human submandibular gland statherin and basic histidine-rich peptide are encoded by highly abundant mRNAs derived from a common ancestral sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 14(9): 784-790.
185. Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W et al. The Proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J Proteome Res* 2008; 7: 1994-2006.
186. Groenink J, Walgreen-Weterings E, Nazmi K, Bolscher JG, Veerman EC, van Winkelhoff AJ, Nieuw Amerongen AV. Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 269-275.
187. Wilmarth P, Riviere M, Rustvold D, Lauten J, Madden T, David L. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *J Proteome Res* 2004; 3: 1017-1023.
188. Xie H, Rhodus NL, Griffin RJ, Carlis JV, Griffin TJ. A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4:1826-1830.



189. Jonasson A, Eriksson C, Jenkinson HF, Kallestål C, Johansson I, Stromberg N. Innate immunity glycoprotein gp-340 variants may modulate human susceptibility to dental caries. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 57.
190. Lightenberg AJ, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Mollenhauer J. Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: a single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer. *Biol Chem* 2007; 38(8): 1275–1289.
191. Llana-Puy MC, Montanana-Llorens C, Forner-Navarro L. Fibronectin levels in stimulated whole-saliva and their relationship with cariogenic oral bacteria. *Int Dent J* 2000; 50: 57–59.
192. Llana-Puy MC, Montanana-Llorens C, Forner-Navarro L. Optimal assay conditions for quantifying fibronectin in saliva. *Med Oral* 2004; 9: 191–196.
193. Murakami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Kitano S, Fujisawa S. Fibronectin in saliva inhibits *Porphyromonas gingivalis* fimbria-induced expression of inflammatory cytokine gene in mouse macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 22: 257–262.
194. Milward MR, Chapple IL, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF-kappaB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. *Clin Exp Immunol* 2007; 14(8): 307–324.
195. Kleinegger CL, Stoeckel DC, Kurago ZB. A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 9(2): 62–67.
196. DiPaola C, Herrera MS, Mandel ID. Immunochemical study of host proteins in human supragingival compared with denture plaque. *Arch Oral Biol* 1984; 29: 161–163.
197. Kalmar JR, Arnold RR. Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by human lactoferrin. *Infect Immun* 1988; 5(6): 2552–2557.
198. Aguilera O, Andres MT, Heath J, Fierro JF, Douglas CW. Evaluation of the antimicrobial effect of lactoferrin on *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 21: 29–36.
199. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 2004; 17: 189–196.
200. Ihalin R, Loimaranta V, Tenovuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys* 2006; 44(5): 261–268.
201. Ashby MT. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. *J Dent Res* 2008; 8(7): 900–914.
202. Friedman SA, Mandel ID, Herrera MS. Lysozyme and lactoferrin quantitation in the crevicular fluid. *J Periodontol* 1983; 54: 347–350.
203. Dziarski R, Gupta D. Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1059–1069.
204. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave J-M. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci* 2006; 110(1): 21–35.
205. Lee SK, Lee SS, Hirose S, Park SC, Chi JG, Chung SI, Mori M. Elafin expression in human fetal and adult submandibular glands. *Histochem Cell Biol* 2002; 117(7): 423–430.
206. Simpson AJ, Maxwell AI, Govan JR, Haslett C, Sallenave JM. Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett* 1999; 45(2): 309–313.
207. Gorr US. Antimicrobial peptides in periodontal innate defense. *Front Oral Biol* 2012; 15: 84–98.
208. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S et al. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontol* 2001; 36(5): 285–294.
209. Gorr S-U, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011 in press.
210. Yang D, Oppenheim JJ. Multiple functions of antimicrobial peptides in host immunity. In: *Mammalian Host Defense Peptides*. Devine, DA, Hancock, REW (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, 39–68 (2004). LIBRO
211. Biragyn A. Defensins—non-antibiotic use for vaccine development. *Curr. Protein Pept. Sci* 2005; 6(1): 53–60.
212. Rehaume LM, Hancock RE. Neutrophil-derived defensins as modulators of innate immune function. *Crit. Rev. Immunol* 2008; 28(3): 185–200.
213. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol* 2012; 12(7): 503–516.
214. Putsep K, Carlsson G, Boman H, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet* 2002; 36(4): 1144–1149.
215. Groenink J, Walgreen-Weterings E, Nazmi K et al. Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J. Clin. Periodontol* 1999; 26(5): 269–275.
216. Tanida T, Okamoto T, Okamoto A et al. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J. Oral Pathol. Med.* 32(10), 586–594 (2003).
217. Bowdish DM, Davidson D, Hancock R. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 30(6): 27–66.
218. McDonald E, Goldberg H, Tabbara N et al. Histatin 1 resist proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *J Dent Res* 2011; 90: 268–272.
219. Dickinson DP. Salivary(SD-type) cystatins: over one billion years in the making – but to what purpose? *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 485–508.
220. Zhu S. Did cathelicidins, a family of multifunctional hostdefense peptides, arise from a cysteine protease inhibitor? *Trends Microbiol* 2008; 16: 353–360.
221. Blankenvoerde MF, vant Hof W, Walgreen-Weterings E, van Steenberghe TJ, Brand HS, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biol Chem* 1998; 379: 1371–1375.
222. Fossum Kand J. R. Whitaker: Ficin and papain inhibitor from chicken egg white. *Arch Biochem Biophys* 125,367–375 (1968)



223. H. Keilová and V. Tomásek: Inhibition of cathepsin C by papain inhibitor from chicken egg white and by complex with cathepsin B1. *Coll Czech Chem Commun* 40, 218-224 (1975)
224. A. J. Barrett: Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods Enzymol* 80, 771-778 (1981)
225. Kordis D, Turk V. phylogenomic analysis of the Cystatin superfamily in eukaryotes and prokaryotes. *BMC Evol Biol* 2009; 9: 266-268.
226. Abrahamson M, Barret J, Salvensen G, Grubb A. isolation of six cystein proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzymatic kinetic properties and concentratios in biological fluids. *J Biol Chem* 1986; 21(6): 11282-11289.
227. Wallin H, Bjarnadottir M, Vogel L. et al. Cystatin extra and intracellular cysteine protease inhibitors: high-level secretion and uptake of Cystatin C in human neuroblastoma cells. *Biochimie* 2010; 34(7): 1625-1634.
228. Scott DK, Lord R, Muller HK, Malley RC, Woods GM: Proteomics identifies enhanced expression of stefin A in neonatal murine skin compared with adults: functional implications. *Br J Dermatol* 2007; 156:1156-1162.
229. Järvinen M, Rinne A: Human spleen cysteine proteinase inhibitor. Purification, fractionation into isoelectric variants and some properties of the variants. *Biochim Biophys Acta* 1982; 708:210-217.
230. Alvarez M, Abrahamson M. structural and protease inhibitor features of Cystatin in: Zerovnik E, Kopitar Jerala N. *Human stefins and cystatins*. Nova Biomedical Books, New York 2006 pp.23-42.
231. Freije J, Abrahamson M, Olafsson I, Velasco G. Structure and expression of the gene encoding Cystatin D a novel human cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1991; 14(7): 20538-20543.
232. Alvarez S, Valle N, Garcia J, Pena C, Freije J. Cystatin D is a candidate tumor suppressor gene induced by vitamin D in human colon cancer cells. *J Clin Invest* 2009;11(9):2343-2358.
233. Stenman G, Astrom E, Roijer E, Zhang M. Assignment of novel cysteine proetinase inhibitor (CST6) to 11q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997;96: 45-46.
234. Zeeuwen P, Vlijmen I, Hendriks W, Merckx G, Shalkwijk A. A null mutation in the Cystatin M/E gene of ichq mice cause juvenile lethality and defects in epidermal cornification. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2867, 2875.
235. Ni J, Fernández M, Danielsson R, Chillakuru J, Zhang A et al. Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1998; 27(3): 24797-24804.
236. Nathanson M, Wasselius J, Wallin H, Abrahamson M. regulated expression and intracellular localization of Cystatin F in human U937 cell. *Eur J Biochem* 2002; 26(9): 5502-5511.
237. Hsia N, Cornwall G. CCAAT/ enhancer binding protein beta regulates expression of the Cystatin- related epididymal spermatogenic (cres) gene. *Biol Reprod* 2001; 65: 441-447.
238. Sousa P, Amado F, Abrantes J, Ferreria P, Vitorino R. An evolutionary perspective of mammal salivary peptide families: Cystatin, histatins, statherin and PRPs. *Archives of Oral biology* 2013; 58: 451-458.
239. Thomas T, Schrelber G, Jaworoski A. developmental patterns of gene expression of secreted proteins in brain and choroid plexus. *Dev Biol* 1989; 13(4): 38-47.
240. Vray B, Hartmann S, Hoebeke J. Immunomodulatory properties of cystatins. *CMLS* 2002; 59: 1503–1512
241. Nishio C, Yoshida K, Nishiyama K, Hatanaka H, Yamada M. Involvement of cystatin C in oxidative stress-induced apoptosis of cultured rat CNS neurons. *Brain Res* 2000; 873: 252 –262.
242. Nagai A, Terashima M, Sheikh AM, Notsu Y, Shimode K, Yamaguchi S et al. Involvement of cystatin C in pathophysiology of CNS diseases. *Front Biosci* 2008; 13: 3470–3479.
243. Suzuki Y, Jin C, Yazawa I. Cystatin C triggers neuronal degeneration in a model of multiple system atrophy. *Am J Pathol* 2014; 184: 790 –799.
244. Kaur G, Mohan P, Pawlik M, DeRosa S, Fajiculay J, Che S et al. Cystatin C rescues degenerating neurons in a cystatin B-knockout mouse model of progressive myoclonus epilepsy. *Am J Pathol* 2010; 177: 2256 –2267.
245. Pierre P, Mellman I. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 1998; 93: 1135 –1145.
246. Hunt D, Michel H, Dickinson T, Shabanowitz J, et al. peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule. *Science* 1992; 25(6): 1817-1820.
247. El-Sukkari D, Wilson NS, Hakansson K, Steptoe RJ, Grubb A, Shortman K et al. The protease inhibitor cystatin C is differentially expressed among dendritic cell populations, but does not control antigen presentation. *J Immunol* 2003; 171: 5003–5011.
248. Hashimoto S, Suzuki T, Dong H, Nagai S et al. Serial analysis of gene express human monocyte-derived dendritic cell. *Blood* 1999; 94: 845-852.
249. Abrahamson M, Grubb A, Olafsson I, Lundwall A. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS Lett* 1987; 216: 229 –233.
250. Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT et al. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1999; 104: 1191–1197
251. Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161 –195.
252. Huh CG, Hakansson K, Nathanson CM, Thorgerirsson UP, Jonsson N, Grubb A et al. Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene. *Mol Pathol* 1999; 52: 332 –340.
253. Kolwijck E, Kos J, Obermajer N, Span PN, Thomas CM, Massuger LF et al. The balance between extracellular cathepsins and cystatin C is of importance for ovarian cancer. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 591 –599.
254. Kopitz C, Anton M, Gansbacher B, Kruger A. Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. *Cancer Res* 2005; 65: 8608 –8612.
255. Turk B, Turk D, Salvesen GS. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 1623–1637.
256. Korant BD, Brzin J, Turk V. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteases alters viral protein cleavages in infected human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 127: 1072–1076.



257. Bjorck L, Grubb A, Kjellen L. Cystatin C, a human proteinase inhibitor, blocks replication of herpes simplex virus. *J Virol* 1990; 64: 941–943. 47 Collins AR, Grubb A. Inhibitory effects of recombinant human cystatin C on human coronaviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2444–2446.
258. Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 455–460.
259. Das L, Datta N, Bandyopadhyay S, Das PK. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. *J Immunol* 2001; 166: 4020–4028.
260. Ebenman B, Jonsson T. Using community viability analysis to identify fragile systems and keystone species. *Trends Ecol Evol* 2005; 20:568–575.
261. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3665–3673.
262. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, and Actinobacillus actinomycetemcomitans in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 2000; 27:897–903.
263. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Brammar GC, Slakeski N, Reynolds EC. Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for Porphyromonas gingivalis virulence in the murine periodontitis model. *Infect Immun* 2007; 75:1436–1442.
264. Lin Y, Huang J, Lai Y, Huang H, Hu S. Tissue Destruction Induced by Porphyromonas gingivalis Infection in a Mouse Chamber Model Is Associated with Host Tumor Necrosis Factor Generation. *Infect and Immunity* 2005; 73:7946–7952.
265. Maekawa T, Krasuss J, Abe T, Jotwani R et al. Porphyromonas gingivalis manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host Microbe* 2014; 15(6): 768-778.
266. Liang S, Krauss JL, Domon H, McIntosh ML, Hosur KB, Qu H, Li F, Tzekou A, Lambris JD, Hajishengallis G. The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of Porphyromonas gingivalis and is required for induction of periodontal bone loss. *J Immunol* 2011; 186:869–877.
267. Wagn M, Krauss J, Domon H, Hosur K et al. microbial hijacking of complement-receptor crosstalk. *SC. Signal 3* ra11.
268. Bainbridge B, Verma RK, Eastman C, Yehia B, Rivera M, Moffatt C, Bhattacharyya I, Lamont RJ, Kesavalu L. Role of Porphyromonas gingivalis phosphoserine phosphatase enzyme SerB in inflammation, immune response, and induction of alveolar bone resorption in rats. *Infect Immun* 2010; 78:4560–4569.
269. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van D. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2014 ; 64(1): 57–80.
270. Korant BD, Brzin J, Turk V. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteases alters viral protein cleavages in infected human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 127: 1072–1076
271. Blankenvoerde MF, vant Hof W, Walgreen-Weterings E, van Steenberghe TJ, Brand HS, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen Porphyromonas gingivalis. *Biol Chem* 1998: 379: 1371–1375
272. Jasir A, Kasprzykowski F, Kasprzykowska R et al. New antimicrobial cystatinC-based peptide active against gram-positive bacterial pathogens, including methicillin-resistant Staphylococcus aureus and multiresistant coagulase-negative staphylococci. *APMIS* 2003; 11:1004-1010.
273. Ekstrom U, Wallin H, Lorenzo J, Holmqvist B, Avilés F. Internalization of cystatin C in human cell lines. *FEBS Journal* 2008; 75(2): 4571–4582.
274. Miles K, Clarke DJ, Lu W et al. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J Immunol* 2009;183(3), 2122–2132.
275. Kohlgraf KG, Ackermann A, Lu X et al. Defensins attenuate cytokine responses yet enhance antibody responses to porphyromonas gingivalis adhesins in mice. *Future Microbiol* 2010; 5(1): 115–125
276. Scott MG, Rosenberger CM, Gold MR, Finlay BB, Hancock RE. An alpha-helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. *J Immunol* 2000;165(6): 3358–3365.
277. Walters SM, Dubey VS, Jeffrey NR, Dixon DR. Antibiotic-induced porphyromonas gingivalis LPS release and inhibition of LPS-stimulated cytokines by antimicrobial peptides. *Peptides* 2010;31(9): 1649–1653.
278. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17:138-148.
279. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 28(4): 1313-1318.
280. Nguyen L, Haneye E, Vogel H. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology* 2011; 29(9): 464-472.
281. Zasloff M. antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415:389-395.
282. Haney E et al. solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function). *Biochip Biophys Acta* 2009; 17(8): 1639-1655.
283. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczevska M, Modalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30:1046-52.
284. Kar S, Ukil A, Das P. Cystatin cures visceral leishmaniasis by NF- κ B-mediated proinflammatory response through co-ordination of TLR/MyD88 signaling with p105-Tp12-ERK pathway. *Eur J Immunol* 2011; 41: 116–127.



285. Frendeus K H, Wallin H, Janciauskiene S, Abrahamson M. Macrophage responses to interferon-gamma are dependent on Cystatin C levels. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 2262–2269.
286. Brodgen K, Johnson G, Vincent S, Abbasi T, Vali S. Oral inflammation, a role for antimicrobial peptide modulation of cytokine and chemokine responses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11(10): 1097–1113.

Anexos

MEDIOS DE CULTIVO

Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (*DMEM*)

- 1) Diluir 1 sobre de D-MEM (**D5796 SIGMA**) en 800 ml de agua bidestilada estéril.
- 2) Ajustar pH a 7.4
- 3) Aforar a 1000 ml
- 4) En campana filtrar con unidad de filtración 0.020 mm.
- 5) Conservar medio a 4°C.
- 6) Suplementar con Suero Fetal Bovino 10% (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), penicilina / estreptomicina 50X (CORNING MANASSAS) 1%, glutamina (CORNING MANASSAS) 1%, aminoácidos no esenciales (CORNING MANASSAS) 1%, bicarbonato de sodio (CORNING MANASSAS) 1%.

Agar Infusión cerebro corazón (*BHI*)

Reactivos

Agar soya triptica (Bioxon, Becton Dickinson)

Agar cerebro corazón (BBLTM Becton Dickinson)

Extracto de levadura (Becton Dickinson)

- 1) Colocar 10 gr de agar soya triptica, 13 gr de agar cerebro corazón y 5 gr de extracto de levadura en matraz de 1L. agregar 500 ml de agua bidestilada estéril. Disolver bajo calor de mechero.
- 2) Esterilizar en autoclave por 15 min.
- 3) Una vez que el medio este a temperatura ambiente suplementar con 0.3 ug/ml de menadiona (C11H802-Vitamina K-Sigma Aldrich) , 5 ug/ml de hemina (Sigma) y 5% de sangre de carnero desfibrinada.
- 4) Vaciar en cajas Petri y esperar a que gelifique



- 5) Conservar a 4°C.

Infusión cerebro corazón

Reactivos

Caldo soya tripticasa (Bioxon, Becton Dickinson)

Caldo cerebro corazón (BBLTM Becton Dickinson)

Extracto de levadura (Becton Dickinson)

- 1) Colocar 10 gr de agar soya tripticasa, 13 gr de agar cerebro corazón y 5 gr de extracto de levadura en matraz de 1L. agregar 500 ml de agua bidestilada estéril. Disolver bajo calor de mechero.
- 2) Esterilizar en autoclave por 15 min.
- 3) Una vez que el medio este a temperatura ambiente suplementar con 0.3 ug/ml de menadiona (C₁₁H₈O₂-Vitamina K-Sigma Aldrich) y 5 ug/ml de hemina (Sigma).
- 4) Vaciar en tubos de vidrio.
- 5) Conservar a 4°C.

Soluciones amortiguadoras

Buffer TRIS BASE/ NaCl pH 7.4 (Vehículo de Cistatina C)

Reactivos

Tris BASE 50 mM

Cloruro de sodio NaCl 150 mM

- 1) Disolver 2.19 gr/mol de Cloruro de Sodio (NaCl 58,4 g/mol) y 1.51 g/mol de Tris BASE en 200 ml de agua MQ.
- 2) Ajustar pH a 7.4.
- 3) Aforar a 250 ml con agua MQ
- 4) Esterilizar por filtración (filtro 0.20 mm) en campana de extracción.
- 5) Conserva a 4°C.



Detección de citocinas por ELISA tipo sándwich

Material:

Placas de 96 pozos fondo plano (Costar 3590)

Puntas para micropipeta

Equipos e instrumentos:

Micropipetas

Lavador de microplacas (ELX50 Auto Strip Washer, BIO TEK Instruments , INC

Lector para micro placas (EL312e BIO TEK INSTRUMENTS)

Reactivos

- 1) Ácido clorhídrico 36.5-38%, HCl, PM 36.46 (9535-02 J. Baker, temperatura ambiente)
- 2) Albúmina de suero bovina, RIA grade, 96% (A-788 SIGMA , 4°C)
- 3) Albúmina humana (4°C)
- 4) Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) PM 84.01 (3506-01 J.T. Baker, temperatura ambiente)
- 5) Carbonato de sodio anhidro (Na CO_3) PM 105.99 (3604-01 J.T. Baker, temperatura ambiente)
- 6) Caseína (C-7078 SIGMA, temperatura ambiente)
- 7) Cloruro de magnesio (MgCl_2), PM 203.31 (M-0250 SIGMA, temperatura ambiente)
- 8) Cloruro de sodio (NaCl , PM 58.44 (3624-05 J.T. Baker , temperatura ambiente)
- 9) Dietanolamina 98.5% ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$), PM 105.14 (398179 SIGMA, temperatura ambiente)
- 10) Estreptavidina- fosfatasa alcalina (19542-018 Invitrogen , 4°C)
- 11) Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4), PM 142.0 (S-7907 SIGMA, temperatura ambiente)
- 12) Hidróxido de sodio anhidro (NaOH), PM 40.0 (S-8045 SIGMA, temperatura ambiente)



- 13) Suero de chivo (4°C)
- 14) Sustrato de fosfatasa 200 tabletas/5 mg (S-092 SIGMA , -20 °C)
- 15) TRIZMA base (C⁴H¹¹NO³), PM 121.1 (T-8524 SIGMA temperatura ambiente)
- 16) Tween 20 (P-1379 SIGMA, temperatura ambiente)
- 17) Tween 20 (P1379 SIGMA, temperatura ambiente)
- 18) Tween 80, polyoxyethylene- sorbitan monooleate (P—1754 SIGMA , temperatura ambiente)

Preparación de soluciones

a) Buffer de unión

Se utilizan diferentes amortiguadores para cada citocina

Fosfato dibásico de sodio anhidro 0.1 M a pH 9.0 o pH 6.0

Ajustar el pH con ácido clorhídrico diluido (en concentraciones 5M se usan aproximadamente 200 µl). Una vez preparada se recomienda filtrarlo y debe guardarse a 4°C

Buffer de fosfato salino (PBS) 1X

Buffer de marca GIBCO con n° de catálogo 70011-044. Concentración 10X pH 7.4, debe diluirse a una concentración 1X . Almacenado a temperatura ambiente.

Buffer de carbonatos a pH 8.0

Carbonato de sodio anhidro 0.1 M (1.06 g en 100 ml de agua destilada)

Bicarbonato de sodio 0.1 M (0.84 g en 100 ml de agua destilada)

Se agrega en 100 ml de agua destilada. Ajustar a pH 8.0

b) Solución para lavar placas: PBS 1X con 0.01 de Tween 20, se agita suavemente.

Una vez listo se filtra y debe guardarse a 4°C

c) Solución bloqueadora

Se preparan 100 ml de solución 0.1 N de hidróxido de sodio anhidro. Para disolver el hidróxido de sodio anhidro en los 100 ml de agua destilada se calienta y al momento de hervir se agregan lentamente 5.0 mg de caseína. Se agita lentamente hasta que la caseína se disuelva, se apaga el calor y se agrega lentamente 900 ml de PBS 1X pH 7.2 a 7.4, mientras se sigue agitando. Una vez que la solución se



enfriá se ajusta el pH a 7.4. Se hacen alícuotas de 40 ml y se congelan a -20°C .
Se conserva a 4°C

d) Soluciones para diluir el anticuerpo de detección

Se utilizan diferentes soluciones para cada citocina

Albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20. Se disuelve 1 gr de albúmina bovina en 100 ml de PBS 1X Ph 7.2 y se agregan 50 μl de Tween 20. Una vez preparada la solución se recomienda filtrarla y guardarse a 4°C .

Solución diluyente. Está compuesta de una solución de 0,1% de albúmina humana + 0.05% de Tween 20 en un buffer TRIZMA Base 20 mM y cloruro de sodio 150 mM. Se ajusta a pH 7.3

Buffer de sustrato. En un vaso de precipitado, pesar 10 g de dietanolamina, agregar 70 ml de agua destilada y 500 μl de solución 0.1 M de cloruro de magnesio, agitar y ajustar pH a 9.8 con ácido clorhídrico. Una vez preparado es recomendable filtrarlo y conservarlo a 4°C , tapado con aluminio.

Concentraciones de anticuerpos de captura y detección y preparación de curvas estándar con citocinas recombinantes

Las citocinas recombinantes se utilizan para las diferentes curvas estándar, estas se encuentran en alícuotas de tal forma que al agregar cierto volumen de RPMI O DMEM con 10% de SFB se tiene la mayor concentración de la curva patrón y posteriormente se harán diluciones

TNF α humano

Anticuerpo de captura (BD Pharmigen n° catalogo 551220) se almacena a 4°C , el vial tiene una concentración de 1mg/ml y se usan 4 $\mu\text{g/ml}$. se diluye en buffer de fosfato dibásico de sodio 0.1M pH 9.0 y se colocan 50 μl por pozo.

Anticuerpo de detección (BD Pharmigen n° de catalogo 554511) se almacena a 4°C : el vial tiene una concentración de 0.5 mg/ml y se usan 0.5 $\mu\text{g/ml}$ es decir 1 $\mu\text{l/ml}$. se diluyen en albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20 y se colocan 100 μl por pozo.



Recombinante 10 µg a 200 µg/ml (BD Pharmigen , n° catalogo 554618, para la curva estándar se colocan 100 µl por pozo (se almacena a -70° C)

2000 pg/ml en 5 µl de TNFa recombinante +495 µl de DMEM

1000 pg/ml en 250 µl del anterior + 250 µl de DMEM:

500 pg/ml en 250 µl del anterior + 250 µl de DMEM

250 pg/ml en 250 µl del anterior + 250 µl de DMEM

125 pg/ml en 250 µl del anterior + 250 µl de DMEM

62.5 pg/ml en 250 µl del anterior + 250 µl de DMEM

31.25 pg/ml en 250 µl del anterior + 250 µl de DMEM

15.62 pg/ml en 250 µl del anterior + 250 µl de DMEM

0 pg/ml solamente con DMEM

Procedimiento

- 1) Fijación del anticuerpo de captura a la micro placa
El anticuerpo se diluye en un buffer de unión, el tipo de buffer de unión y la concentración utilizada depende de la citocina que se determine. Se colocan 50 µl por pozo se tapa la placa y se deja a 4°C por un mínimo de 10 horas. Los anticuerpos de captura se encuentran a 4°C en alícuotas de 50 µl y en el caso de que se evapora parcial o totalmente se lleva a 50 µl con el buffer de unión correspondiente.
- 2) Lavado de placa
Se lava la placa 4 veces con PBS 1X y 0.01% de Tween 80
- 3) Bloqueo de placa
Se utiliza solución bloqueadora y se agregan 200 µl por pozo dejándola 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Lavado de placa



Se lavan 3 veces

5) Curva estándar y muestras problema

Se colocan 100 μ l por pozo tanto en la curva estándar como de la muestra. Se dejan 2 hora a temperatura ambiente o bien 4° C hasta el día siguiente. La curva estándar consiste en una serie de diluciones de la citocina recombinante y sirve como control positivo.

6) Lavado de placa

Se lava 4 veces

7) Anticuerpo de detección

Se diluye en albumina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20 a una concentración adecuada para cada citocina y se agregan 100 μ l por pozo. Se incuba 1 hr a temperatura ambiente.

8) Lavado de placa

se lava la placa 6 veces.

9) Estreptavidina- fosfatasa alcalina

Se diluye 1: 2000 en albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20 y se agregan 100 μ l por pozo. Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.

10) Lavado de placa

Se lava 8 veces

11) Solución reveladora

Se compone de un buffer de sustrato de fosfatas, se agregan 100 μ l por pozo y se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad de 5 a 60 minutos siendo variable para cada citocina. Para preparar la solución reveladora cada 5ml de Buffer sustrato y se agrega 1 pastilla de sustrato de fosfatasa que equivale a 0.005 mg/ml.



12) Lectura de placa. Se lee en lector de ELISA para microplacas (EL 312 e BIOTEK INSTRUMENTS) a una longitud de onda de 405 nm. Con ayuda el programa KC4 que proporciona las concentraciones de las citocinas en las muestras. Se recomienda leer las placas cada 5 min.

Principales proteínas y péptidos antimicrobianos encontrados en saliva humana

| Proteína/ Péptido | Gen | Concentración en saliva total (ug/ml) |
|--|-------------|---------------------------------------|
| Adrenomedulina | ADM | 0.006 |
| HNP-1 | DEFA1 | 8.6 |
| HNP-2 | DEFA1/DEFA3 | 5.6 |
| HNP-3 | DEFA3 | 0-2.7 |
| hBD-1 | DEFB1 | 0.15 |
| hBD-2 | DEFB4 | 0.150 |
| hBD-3 | DEFB103A | 0.31 |
| Catelicidina/LL-37 | CAMP | 1.6 |
| Histatina 1 | HTN1 | MS |
| Histatina 3 | HTN3 | 7.3 |
| Estaterrina | STATH | 26.5 |
| CCL28 | CCL28 | 0.9 |
| Azurocidina/CAP37/Proteína de unión a heparina | AZU1 | MS |
| Sustancia P | TAC1 | 7.5×10^{-6} |
| Péptido relacionado a gen de calcitonina | CALCA | 23.5×10^{-6} |
| Neuropeptido Y | NPY | 41.4×10^{-6} |
| Péptido intestinal vasoactivo | VIP | 39.9×10^{-6} |
| Mucina 7 | MUC7 | 40 |
| DMBT1/Aglutinina/GP340 | DMBT1 | MS |
| Proteína surfactante A | SFTPA1 | 0.9 |
| Microglobulina Beta 2- | B2M | 0.38 |



| | | |
|---|---------|----------|
| Proteínas ricas en prolina | PRH1 | MS |
| Fibronectina | FN1 | 1.2-0.13 |
| Calgranulina A | S100A8 | 1.93 |
| Calgranulina B | S100A9 | 1.93 |
| Psoriasina | S100A7 | MS |
| Lactoferrina | LTF | 20 |
| Cistatina A | CSTA | MS |
| Cistatina B | CSTB | MS |
| Cistatina C | CST3 | 0.9 |
| Cistatina D | CST5 | 3.8 |
| Cistatina S | CST4 | 53-116 |
| Cistatina SA | CST2 | 78 |
| Cistatina SN | CST1 | 39 |
| Inhibidor de proteasa leucocitico secretor | SLP1 | 2.9 |
| Lactoperoxidasa/ Peroxidasa salival | LPO | 1.9 |
| Mieloperoxidasa | MPO | 3 |
| Lisozima C | LYZ | 40 |
| Proteína 1 de reconocimiento de peptidoglicano | PGLYRP1 | MS |

MS= Detección de proteínas en saliva total no estimulada por espectrometría de masas.