

01475



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

“CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN  
PARA LA EXPRESIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA  
INDUCIBLE EN FIBROBLASTOS GINGIVALES  
HUMANOS TRATADOS CON LPS”

**TESIS DE MAESTRÍA**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A :  
**CARLA PORTILLO GARCÉS**

TUTOR: DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ



MÉXICO, D. F.

2005

M: 350303



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por las oportunidades que me ha brindado para mi formación y por abrirme las puertas al conocimiento. A todos los profesores de esta casa de estudios que han contribuido en mi desarrollo profesional.

A mi Madre, porque tu amor me ha hecho vivir y crecer y ha sido pilar para mi formación personal. Por darme siempre lo mejor de ti. Por proveerme siempre de comprensión, aliento y ánimo entre otras muchas cosas.

A mi Padre†, por darme las bases de mi vida: tu mejor legado. Por procurarme siempre lo mejor. Por haberme dedicado tu tiempo. Por tu amor. Porque estuviste y siempre estás a mi lado.

A mi hermana Gabriela, por tu enorme cariño y porque en todo momento he recibido tu apoyo incondicional. Por ser la mejor hermana.

A mi abuelo Fidel, por ser amigo y guía. Por ser ejemplo de lucha y disciplina. Por querer siempre compartir conmigo tus experiencias.

A mi tía Alejandra y a mi tío Fidel, porque siempre han estado muy cerca de mí compartiendo buenos y malos momentos. Por orientarme en mis decisiones y apoyarme en mi camino.

A Cuca, Elisa, Fer, Tere†, Vicky y Reyes, porque de ustedes he aprendido que la amistad es sinónimo de presencia, ayuda y equipo. Por lo cercano que estuvimos y hemos permanecido. Su amistad fue y es muy importante para mí.

A Andrea, Hiroko, Nancy, Libertad, Iris, Dalia, Ivonne y Patrick, porque más que amigos han sido mis compañeros de vida. Les agradezco todo lo que hemos vivido juntos.

A John y Donna, por compartir conmigo su espacio y tiempo en un momento específico de mi vida. Porque la experiencia vivida me hizo crecer como persona y ha sido punto de partida.

A Perla y Pedro, por ser mis acompañantes en esta aventura de la maestría y por la sincera amistad que iniciamos. Por prestarme oídos y tener siempre un consejo.

A la Dra. Gloria Gutiérrez, por haberme impulsado para continuar mi formación en el ámbito de la investigación, por el tiempo y conocimientos dedicados para el desarrollo de este proyecto.

A los integrantes del laboratorio de bioquímica a Rita, Silvia, César, Miguel Armando y Martita, por compartir su tiempo y trabajo. Por los buenos tiempos en el laboratorio.

Al Dr. Rolando Hernández por su apoyo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Ballesteros, por ser mi maestra de profesión. Porque no sólo me ha compartido su experiencia sino también su amistad.

Al Dr. Rolando Hernández por su apoyo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Elba Leyva por el apoyo recibido durante esta etapa de estudiante y por las facilidades para llevar a cabo mi titulación. Gracias por su ayuda.

Muy en especial a Marcus, por motivarme, por tu amor, por colaborar conmigo. Por lo que esta por venir.

Dedico esta tesis:

A Marcus porque es la inspiración  
A mi Padre† , por todas sus enseñanzas

A Tere†, por su amistad

A mi familia, tíos y primos por estar

A mis amigos, por ser

A Theisencito, por existir

# ÍNDICE

1. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	2
2. RESUMEN .....	3
3. ABSTRACT .....	4
4. INTRODUCCIÓN.....	5
4.1. ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	5
4.2. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DEL HÚESPED.....	5
4.3. MICROORGANISMOS ASOCIADOS A ENFERMEDAD PERIODONTAL	8
4.3.1. BIOPELÍCULA Y ECOLOGÍA MICROBIANA.....	8
4.4. <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> .....	12
4.5. LIPOPOLISACÁRIDOS.....	14
4.5.1. ESTRUCTURA.....	14
4.5.2. PATRÓN DE RECONOCIMIENTO POR RECEPTORES.....	16
4.5.3. VÍAS DE TRANSDUCCIÓN.....	19
4.6. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA.....	22
4.6.1. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS).....	23
4.6.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE iNOS. VÍAS DE TRANSDUCCIÓN .....	24
4.6.3. ÓXIDO NÍTRICO.....	26
4.6.4. REGULACIÓN DE iNOS; PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.....	29
5. JUSTIFICACIÓN.....	31
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
7. OBJETIVOS .....	32
8. HIPÓTESIS.....	33
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
10. RESULTADOS.....	40
11. DISCUSIÓN .....	47
12. CONCLUSIONES.....	52
13. REFERENCIAS .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

FIGURA 1. Respuesta innata del huésped en la salud y en la enfermedad periodontal.....	6 y 7
FIGURA 2. Ecología microbiana de la placa supra y subgingival como una biopelícula patógena.....	11
FIGURA 3. Estructura del LPS.....	14
FIGURA 4. La diversidad en la estructura del lipido A en microorganismos gram-negativos.....	15
FIGURA 5. Activación de las vías de transducción en respuesta a LPS.....	20
FIGURA 6. Estructura de iNOS.....	24
FIGURA 7. Reacción de la síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina .....	26
FIGURA 8. Papel del óxido nítrico en la respuesta del huésped.....	28

### TABLAS

TABLA 1. Disacáridos presentes en los diferentes serotipos de <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	12
TABLA 2. Características de las tres isoformas de las óxido nítrico sintasas.....	22

## RESUMEN

Se ha identificado al óxido nítrico (NO) como una molécula de señalización importante involucrada en la regulación de varias actividades biológicas. Sin embargo, la sobreproducción de NO, catalizada por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), es citotóxica. La enzima iNOS es inducida por varios estímulos incluyendo el lipopolisacárido (LPS) bacteriano. El LPS es una molécula de la pared celular de bacterias gram-negativas como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *A. actinomycetemcomitans* está considerada como un patógeno involucrado en la periodontitis juvenil y del adulto. En esta investigación se examinó los efectos de LPS de *A. actinomycetemcomitans* en la producción de NO y la expresión de iNOS en los fibroblastos gingivales humanos (HGF). Intentamos, además, esclarecer la vía de transducción involucrada en la expresión de iNOS inducida por el LPS de *A. actinomycetemcomitans*. Se encontró que el LPS de *A. actinomycetemcomitans* puede estimular la producción de NO y la expresión de iNOS de una manera curso temporal y dosis dependiente. La localización celular de la enzima fue en el citosol de los HGF. El inhibidor de PI3K (wortmanina), el inhibidor de PI-PLC (U73122), el inhibidor de p38 MAPK (203580) y el inhibidor de ERK 1/2 (PD98059) atenuaron la expresión de iNOS inducida por el LPS de *A. actinomycetemcomitans*. Más aún, la expresión de iNOS inducida por LPS de *A. actinomycetemcomitans* fue completamente inhibida por bisindolilmaleimida, c. queleritrin, calfostin C y estaurosporina, (inhibidores de PKC) y PDTC (inhibidor de NF $\kappa$ B). Basado en estos hallazgos, nosotros sugerimos que talvez el LPS de *A. actinomycetemcomitans* active a PKC a través de PI-PLC y PI3K para inducir la activación de p38 MAPK y ERK 1/2, quien en turno inician la activación de NF $\kappa$ B induciendo finalmente la expresión de iNOS y la producción de NO en HGF.

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO) has been identified as an important signaling molecule involved in regulating several of biological activities. However, the overproduction of NO, catalyzed by inducible nitric oxide synthase (iNOS), is cytotoxic. iNOS is induced by many stimuli including bacterial lipopolysaccharide (LPS). LPS is a cell-wall molecule of Gram-negative bacteria such as *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *A. actinomycetemcomitans* is considered a pathogen bacteria involved in juvenile and adult periodontal disease. We examined the effects of LPS from *A. actinomycetemcomitans* on the production of NO and expression of iNOS in human gingival fibroblasts (HGF). We also attempted to throw light on the transduction signaling involved in *A. actinomycetemcomitans* LPS-induced iNOS expression. We found that *A. actinomycetemcomitans* LPS can stimulate the release of NO and iNOS expression in concentration and time-dependent manners. The cellular localization of the iNOS enzyme was at the cytosol of HGF. PI3K inhibitor (wortmanin), PI-PLC inhibitor (U73122), p38 MAPK inhibitor (203580) and ERK 1/2 inhibitor (PD98059) attenuated *A. actinomycetemcomitans* LPS-induced iNOS expression. Further, *A. actinomycetemcomitans* LPS-induced iNOS expression was completely suppressed by bisindolylmaleimide, c. queleritrine, calphostin C and staurosporine, (PKC inhibitors) and PDTC (NF $\kappa$ B inhibitor). Based on those findings, we suggest that *A. actinomycetemcomitans* LPS might activate PKC through PI-PLC and PI3K to induce p38 MAPK and ERK 1/2 activation, which in turn initiates NF $\kappa$ B activation and ultimately induces iNOS expression and NO release in HGF.

# **INTRODUCCIÓN**

## **ENFERMEDAD PERIODONTAL**

Es aquella enfermedad inflamatoria que conduce a la destrucción del tejido que sostiene al diente (periodonto). La periodontitis puede evolucionar por brotes episódicos, seguir un curso en etapas (desde una forma inicial a otra avanzada), tener un carácter crónico o agresivo y ser localizada o generalizada (1).

En el periodonto, las características en la composición microbiana cambia del estado de salud al de enfermedad. Después de la acumulación de la placa microbiana en el surco gingival, la invasión del tejido del huésped por microorganismos induce una respuesta inflamatoria e inmunopatológica, que eventualmente llevan a cabo el desarrollo de la gingivitis y periodontitis. Aunque no se ha entendido por completo el efecto de la población microbiana en el proceso inflamatorio, cualquier disrupción por bacterias comensales, bacterias patógenas o un compromiso en la salud sistémica o local del huésped llevará a cabo una alteración en las condiciones del huésped resultando en la enfermedad (2).

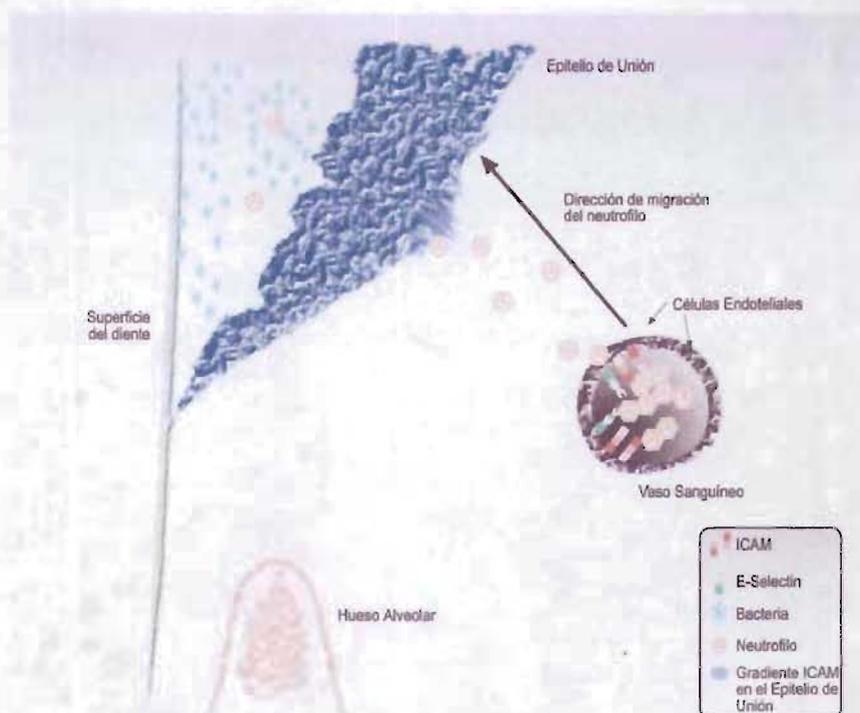
## **MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DEL HUÉSPED**

La salud en la tejido gingival resulta de un evento constante y activo que comprende la formación de una "pared" de neutrófilos estratégicamente localizada entre la bacteria y el epitelio del surco. La infiltración de neutrófilos, ocurre en el tejido periodontal cercano a la superficie radicular del diente. Análisis inmunohistoquímico e in situ sugieren la participación de niveles de E-selectina y de la expresión de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1), las cuales evidentemente facilitan la extravasación de neutrófilos fuera del sistema vascular y la acumulación en el tejido gingival (3) (Fig 1A). La expresión de E-selectinas en las células endoteliales produce la interacción entre los leucocitos y la pared endotelial, iniciando un estado activo necesario para la salida de leucocitos. Una vez en el tejido, es postulado que los neutrófilos pasen a través de las células utilizando el receptor ICAM-1 y siguiendo un gradiente de concentración de interleucina 8 (IL-8), potente citocina quimioatrayente que es producida por el epitelio, los fibroblastos y los macrófagos en respuesta a las bacterias. Esta E-selectina y el gradiente de ICAM-1, en la vasculatura y en el epitelio del surco, se establece antes de que los signos clínicos e histológicos de la inflamación se hagan evidentes (4).

La pérdida de un infiltrado inflamatorio funcional lleva a cabo alteraciones significativas en el tejido periodontal. En el tejido periodontal inflamado se observa entonces máxima expresión de IL-8 y acumulación de neutrófilos en el epitelio de unión adyacente al sitio donde se ubican los microorganismos que han producido la infección (5) (Fig 1B). Se sabe además que existe un aumento en la expresión de MCP-1, una potente citocina quimioatrayente, junto con una correspondiente acumulación de macrófagos a lo largo de la lámina basal del epitelio oral, debido a

la presencia de antígenos microbianos como lipopolisacáridos (6). Alteraciones en la diapedesis, quimiotaxis y migración de neutrófilos/macrófagos provocan ausencia de la barrera de protección inflamatoria, o los defectos en los mismos macrófagos o neutrófilos lleva a cabo la susceptibilidad a una gran variedad de bacterias causantes de enfermedad. Estas anomalías celulares innatas pueden ocurrir debido a defectos congénitos, a deficiencias del huésped (7), agentes inmunosupresores usados en el tratamiento de otras enfermedades sistémicas (8), o a una variedad de estrategias diseñadas por el mismo patógeno para evadir los mecanismos protectores del sistema inmune. Cualquiera que sea la causa, evidencias sugieren que, durante la respuesta innata del huésped, la disminución o alteración de neutrófilos y macrófagos, son críticas para el establecimiento de una severa o crónica enfermedad inflamatoria (9) (Fig. 1C).

A)



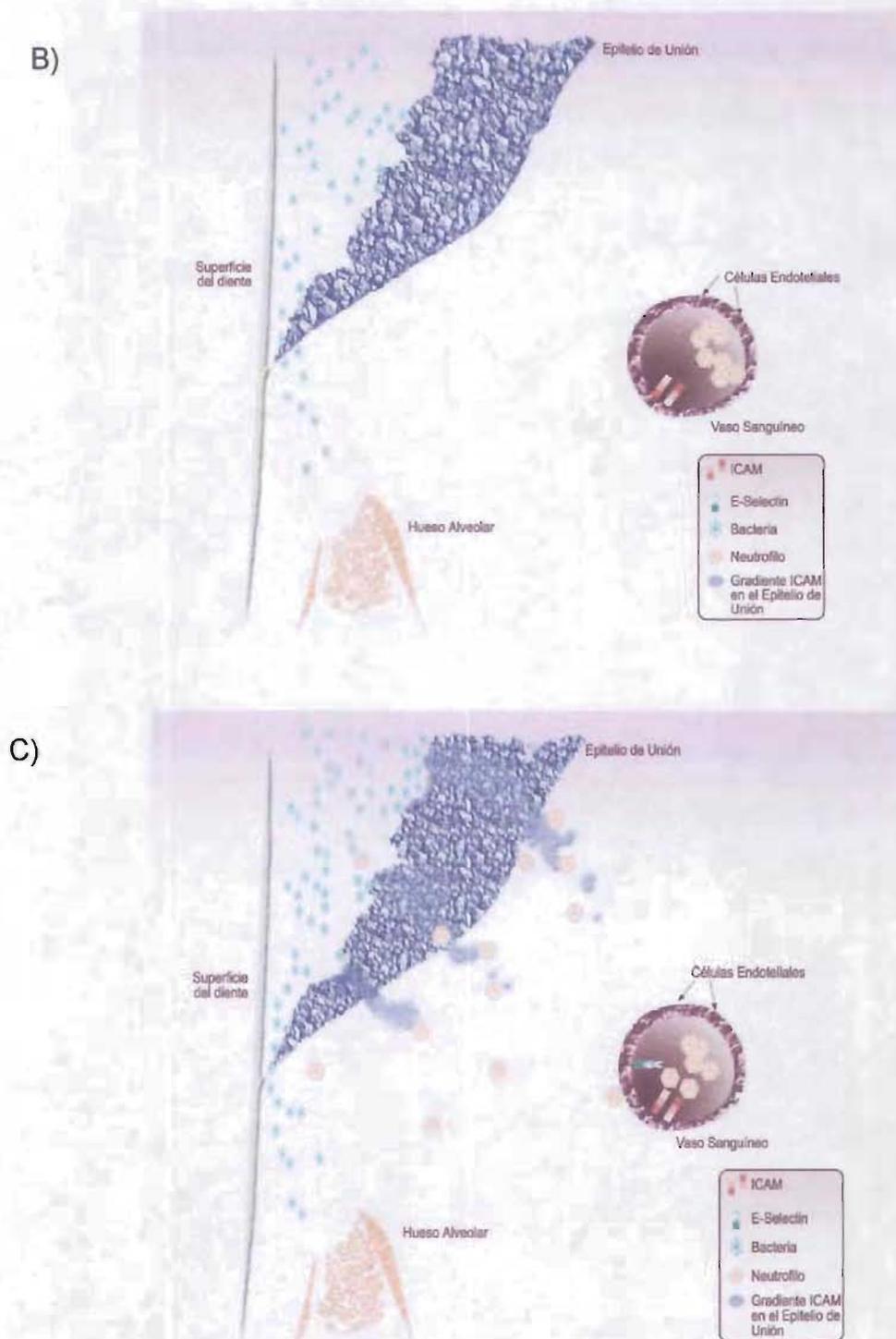


Fig. 1 Respuesta innata del huésped en la salud y en la enfermedad periodontal. A) El tejido periodontal sano es protegido de la infección por un continuo tránsito de neutrófilos del tejido vascular alrededor de la superficie radicular hacia el fluido crevicular. B) Respuesta inmune innata deficiente, la falta de formación funcional de receptores ICAM parece ser característico en esta etapa. C) Deficiente respuesta inmune innata en presencia de microorganismos periodontopatógenos quienes bloquean el tránsito de neutrófilos hacia el periodonto. *Periodontol* 2000. 2004;35:53-74.

## MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Es aceptado que en la etiología microbiana de la periodontitis un conjunto de bacterias, no un solo microorganismo, están involucradas en la infección. Actualmente parece evidente que el inicio y progreso de la enfermedad periodontal están relacionados con los cambios cuantitativos y cualitativos en la flora microbiana subgingival. Socransky et al. (10) han propuesto las siguientes modificaciones del postulado de Koch, que identifica patógenos medicamente serios como periodontopatógenos:

- La mayor porción de bacterias deberán estar asociadas a periodontitis.
- La eliminación de las células blanco resultará en el progreso de la enfermedad.
- Deberá ser elucidada la respuesta del huésped contra la bacteria blanco.
- Si es posible, deberá ser demostrada la patogenicidad en modelos animales.
- Deberán ser indicados los mecanismos únicos de patogenicidad.

## BIOPELÍCULA Y ECOLOGÍA MICROBIANA

La biopelícula bacteriana se define como una comunidad estructurada de células bacterianas incluidas en una matriz polimérica producidas por ellas mismas. El habitat de los microorganismos en las biopelículas muestra características únicas bajo un rango de crecimiento. Además, los microorganismos de las biopelículas muestran súperresistencia a agentes antimicrobianos. El glucocáliz, la sustancia polimérica que constituye la matriz de la biopelícula, retarda la difusión de antibióticos y factores antimicrobianos que produce el huésped.

Una biopelícula es una unidad biológica controlada en una jerarquía ecológica. Las poblaciones de biopelículas tienen dos estrategias que les permiten sobrevivir exitosamente en su comunidad. La primera es el alto rango de reproducción para su continuo desarrollo y su formación depende directamente de la cantidad de fuentes nutricionales. Cuando las fuentes llegan a ser escasas o las condiciones desfavorables, la población fracasa y entonces experimenta una rápida reducción. La segunda ventaja es la capacidad de adaptación en situaciones de fuentes limitadas y esto parece presentarse en las porciones profundas de la biopelícula (11).

Los microorganismos en la biopelícula pueden expresar diferentes conjunto de genes que su contraparte del comensal. La expresión de los genes de los factores de virulencia, por ejemplo, pueden ser diferentes de acuerdo a sus condiciones de supervivencia. De acuerdo con estudios en *A. actinomycetemcomitans* la producción de leucotoxinas se incrementó en condiciones aneróbicas, limitadas en fructosa y de alta dosis de carbonato. El crecimiento óptimo de *A. actinomycetemcomitans* se reporta en el rango de pH 7.0-8.0. Estos resultados

sugieren que *A. actinomycetemcomitans* está localizado en la superficie de la placa subgingival, lugar que está provisto de alta concentración de carbonato y de fluido gingival crevicular (12). Estudios en *P. gingivalis* han indicado que su pH óptimo de crecimiento es entre 7.0 y 8.0. Su crecimiento se acelera en condiciones de exceso de grupos hemo, en donde muestra su actividad proteolítica máxima. Estos hallazgos sugieren que *P. gingivalis* llega a ser más virulenta cuando el fluido crevicular inflamatorio y sangre son provistos al surco (13). En experimentos de coagregación entre *P.gingivalis* y *F. nucleatum*, *F. nucleatum* aumenta la supervivencia de *P. gingivalis* cuando esta bacteria está expuesta al aire. Varios estudios mostraron además que *P. gingivales* co-agrega con *T. denticola* pero no con *A. actinomycetemcomitans*. *T.denticola* co-agrega con *Fusobacterium spp.* pero no con *A. actinomycetemcomitans* y *Actinomyces spp.* (14). Se han implicado a bacterias específicas como *F. nucleatum* en llevar a cabo la transición hacia la enfermedad, no sólo debido a la gran cantidad presente en la gingivitis y periodontitis, sino por la facilidad de coagregación entre bacterias gram-positivas y gram-negativas. Estos resultados muestran que la patogenicidad de los microorganismos es dependiente del ambiente alrededor de las bacterias y del nicho ecológico en el surco y su virulencia puede variar dependiendo de los factores ambientales.

### **Placa supragingival**

El establecimiento de una comunidad microbiana que favorece el desarrollo de la enfermedad periodontal inicia cuando no es mantenida la higiene supragingival. Los microorganismos de la placa supragingival reciben nutrición de la saliva y de los restos de alimento. Casi todos los miembros de la placa supragingival producen fermentación de los carbohidratos produciendo ácidos. Los ácidos productos en la fermentación se dispersan en la placa y entonces se mueven hacia el exterior en poco tiempo. Si las bacterias cariogénicas como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* están presentes en la placa supragingival, ésta madura, la producción de ácidos se traduce en una prolongada disminución del pH alrededor de la superficie del esmalte. La placa supragingival es el paso inicial para la placa subgingival. La secuencia de la formación de biopelículas dentro de la cavidad oral es un proceso dinámico que consiste en que:

1. Los cocos gram positivos se unen la película de la superficie del diente.
2. Los microorganismos aislados crecen en número y se dispersan en la superficie del diente; (colonizadores primarios).
3. Ocurre la autoagregación de una y otra bacteria o coagregación de bacterias vecinas.
4. La población crece en una comunidad; sucesión primaria.
5. El microambiente del interior de la comunidad cambia de aeróbico a anaerobio facultativo.
6. El nicho ecológico cambia y la comunidad se reorganiza; sucesión secundaria.
7. El microambiente del interior de la comunidad cambia de anaerobio facultativo a anaerobio estricto.
8. El nicho ecológico cambia y la comunidad se reorganiza

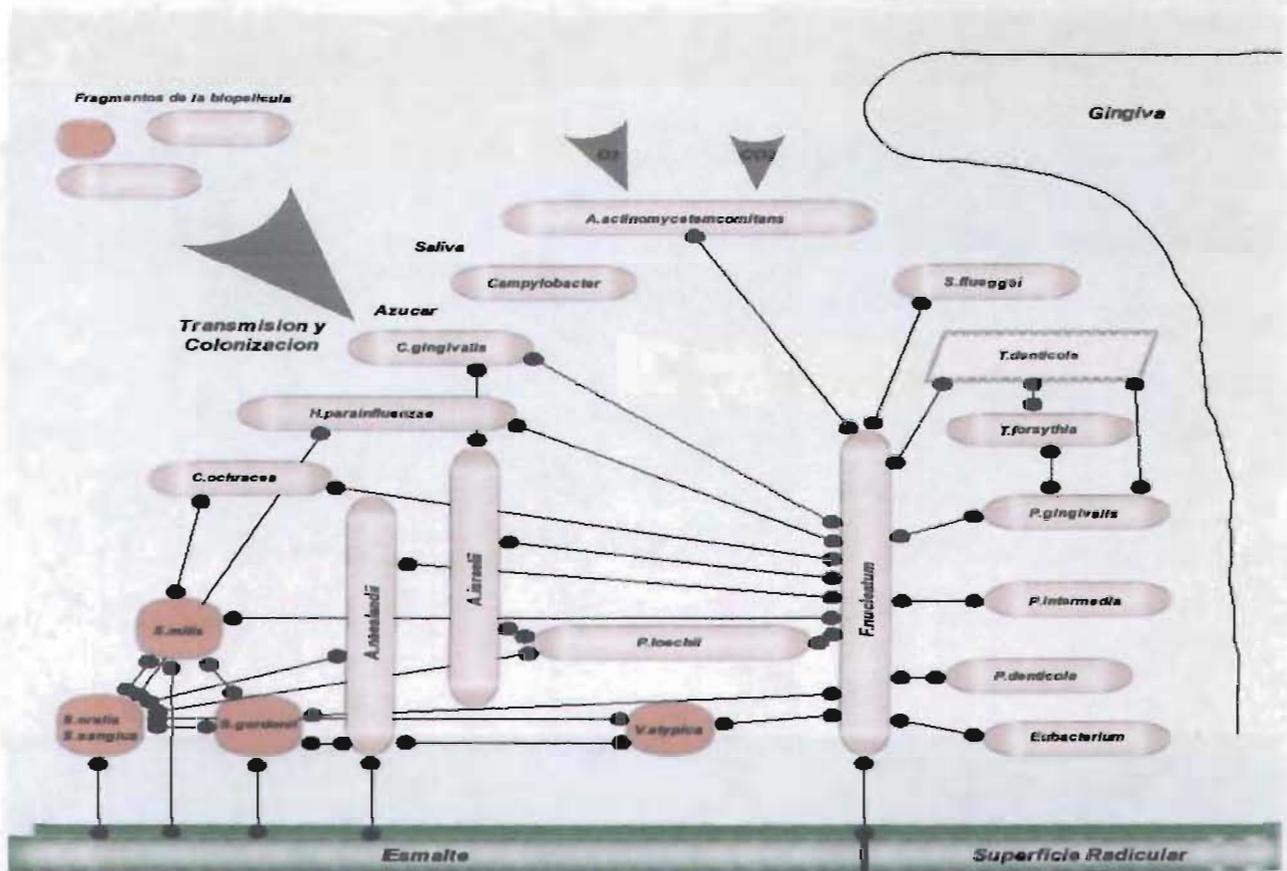
9. Se establece una comunidad estable de diferentes especies, que llega a un climax. Al final de este punto, espiroquetas y microorganismos móviles pueden ser detectados 7 días después de establecida la gingivitis experimental (15).

La frontera de la placa supragingival alrededor del surco periodontal provee información de la iniciación de la bolsa periodontal.

### **Placa subgingival**

La placa subgingival puede ser dividida en tres tipos: unida, no unida, y asociada al epitelio. La placa subgingival unida está asociada al diente y está predominantemente compuesta de cocos y bacilos gram-positivos. Esta población está condicionada a vivir en condiciones de nutrición limitada y un ambiente estrictamente anaeróbico. La placa subgingival no unida está asociada con la deposición de calculos subgingivales y caries radicular y está predominantemente compuesta de bacilos que se extienden hasta la frontera con la placa apical. Esta parece ser el área más bioactiva, debido a la larga cantidad de fluido crevicular que se excreta por el tejido periodontal. *P. gingivalis* y *T. denticola* son los miembros predominantes de la placa no unida, y se considera que inducen una inflamación acelerada. La placa asociada a epitelio está libremente unida al epitelio gingival, y consiste de bacilos móviles gram-negativos. *Prevotella intermedia* y *A. actinomycetemcomitans* son los principales miembros de este tipo de placa. La placa asociada a epitelio se considera que juega un papel importante en la invasión al tejido conectivo (16).

La patogénesis de la enfermedad periodontal entonces es en gran parte el resultado de la infección de la placa subgingival que contiene bacterias específicas (Fig. 2). La colonización bacteriana a las células del huésped es facilitado por los factores bacterianos como las fimbrias de la superficie celular presentes en *P. gingivalis*; y por los factores del huésped como las moléculas presentes en la saliva. Además, ciertas especies de patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* no solo se pueden adherir al epitelio gingival sino también pueden invadir a las células gingivales. Los microorganismos de la placa que persisten en los sitios de colonización evaden los mecanismos de respuesta inmune del huésped a través de la producción de factores como leucotoxinas o factores de supresión leucocítica. Estos microorganismos pueden destruir el tejido periodontal a través de factores de virulencia como colagenasas y otras enzimas proteolíticas produciendo respuestas como la resorción ósea. En la destrucción del tejido mediada por patógenos periodontales, los signos clínicos de la enfermedad periodontal incluyen inflamación gingival, pérdida de la inserción del tejido conectivo, la formación de una bolsa periodontal y la pérdida del hueso alveolar (17).



Sucesión microbiana: Colonizador primario  $\Rightarrow$  Colonizador secundario  $\Rightarrow$  Colonizador terciario  
 Cocos Gram + Bacilos Gram + y - Cocos Gram -

Modificaciones del medio ambiente: Aerobio  $\Rightarrow$  Anaerobio facultativo  $\Rightarrow$  Anaerobio estricto

Fig 2. Ecología microbiana de la placa supra y subgingival como una biopelícula patógena. Periodontol 2000. 2004;36:14-26.

## ***Actinobacillus actinomycetemcomitans***

*A. actinomycetemcomitans* es un bacteria gram-negativa, no formadora de esporas, no mótil, capnofilica, anaerobio facultativo y cocobacilar. Esta bacteria ha sido clasificada en 6 diferentes serotipos (a-f) basada en la localización de la superficie polisacárida localizada en la región O antigénica de la cadena de lipopolisacárido (Tabla 1). La estructura se ha determinado y consiste en unidades repetidas de disacáridos (18,19). La presencia de *A. actinomycetemcomitans* en la placa subgingival se ha asociado con la periodontitis agresiva con el serotipo b dos veces más prevalente que con el serotipo a. En estudios animales se ha demostrado que el serotipo b induce la citocina proinflamatoria interleucina-6 en esplenocitos murinos. Ebersole et al. (20) han reportado que el orden de virulencia de los serotipos de esta bacteria son b > a > c. Los polisacáridos serotipo-específico se han reportado como los mayores blancos antigénicos de la respuesta inmune de la periodontitis agresiva infectada con *A. actinomycetemcomitans* (21,22). Se ha demostrado que suero de pacientes con periodontitis agresiva localizada reconocen otros componentes de los lipopolisacáridos como lípido A y el core de polisacáridos  $\alpha$ -ceto-3-deoxioctonato.

Disacáridos	Serotipo de <i>A. actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
O-acetyl-6-deoxy-D-talosa y 6-deoxy-D-talosa	Serotipo a
Unidades trisacáridas de L-ramnosa, D-fucosa y N-acetyl-D-galactosa	Serotipo b
acetyl-6-deoxy-L-talosa y 6-deoxy-L-talosa	Serotipo c
Unidades tetrasacáridas de D-glucosa, D-manosa y L-ramnosa	Serotipo d
2-acetamida-2-deoxy-D-glucosa y L-ramnosa	Serotipo e
2-acetamido-2-deoxy-D-galactosa y L-ramnosa	Serotipo f

Tabla 1. Disacáridos presentes en los diferentes serotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

*A. actinomycetemcomitans* posee además una proteína antigénica inmunomoduladora llamada leucotoxina anclada a la membrana externa celular o en vesículas membranosas. Un número importante de estudios soportan la idea de que los neutrófilos, las células natural killer y los leucocitos polimorfonucleares mueren en presencia de las leucotoxinas mediante la formación de poros en su membrana celular resultando en la lisis osmótica y necrosis (23). Al parecer las leucotoxinas de *A. actinomycetemcomitans* induce apoptosis o necrosis de una manera dependiente de la dosis; a altas concentraciones la toxina se une de una manera no específica a la membrana de la célula formando largos poros permitiendo el rápido flujo de  $Ca^{2+}$  y la pérdida de ATP (Adenosin trifosfato) dando

como resultado la necrosis, mientras bajas concentraciones de la toxina se une a proteínas específicas en células susceptibles y forma pequeños poros lo que resulta en la pérdida del influjo de  $\text{Na}^+$  y la activación de la apoptosis.

El sobrenadante de cultivos de *A. actinomycetemcomitans* serotipo b se sabe tiene gran actividad proteolítica de tipo tripsina y esto se debe a la presencia de una serina o metaloproteasa de 50kDa cuyos sustratos son el fibrinógeno y la colágena tipo I. Además de la degradación de los principales componentes del tejido conectivo, las enzimas proteolíticas en los sobrenadantes de cultivos de *A. actinomycetemcomitans* se ha reportado que degradan *in vitro* a las cuatro clases de monoglobulinas G (IgG), la IgA sérica no secretoria y la IgM.

Se ha sugerido que las fimbrias de *A. actinomycetemcomitans* juegan un importante rol en la colonización en células debido a que las cepas de *A. actinomycetemcomitans* fimbriadas tienen mayor afinidad a las células epiteliales y a la hidroxiapatita cubierta de saliva que las cepas no fimbriadas. Las fimbrias pueden además tener un rol en la invasión por *A. actinomycetemcomitans* en células epiteliales gracias a la endocitosis mediada por receptor (24).

## LIPOPOLISACÁRIDO

Las estructuras bacterianas y los componentes extracelulares exhiben diversos efectos en las células huésped, finalmente siendo capaces de inducir respuestas inflamatorias clínicamente observables en las lesiones periodontales. El lipopolisacárido (LPS), también denominado endotoxina, es el principal componente de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. El LPS es capaz de producir una estimulación potente y pleiotrópica en células inmunes, por ello se asume que los niveles de moléculas de lipopolisacárido en sitios periodontalmente afectados se correlaciona con el incremento de la severidad de la inflamación.

### ESTRUCTURA LPS

Aunque el LPS difiere de una especie a otra, todos están constituidos por cuatro dominios en su estructura:

- El lípido A, que posee la actividad tóxica y que incluye ácidos grasos y un grupo de azúcares fosforilados;
- El core interno de oligosacáridos;
- El core externo y
- La región polisacárida O-antigénica (25).

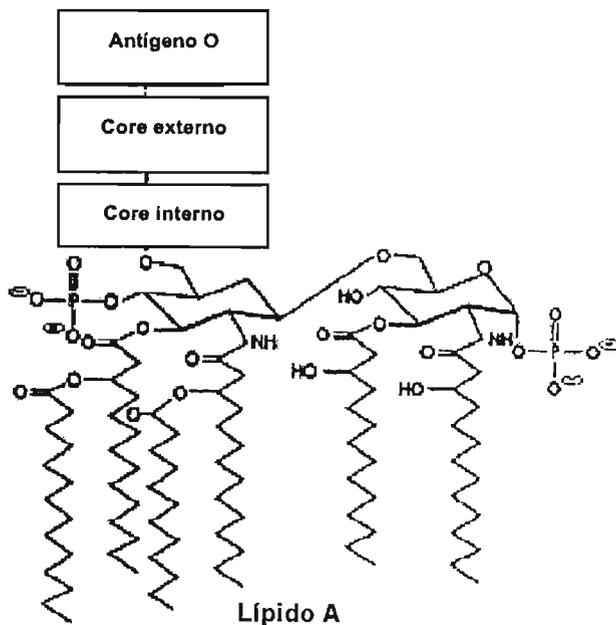


Fig. 3 Estructura del LPS. Cell Signalling 2001;13:85-94.

## Lípido A

El lípido A es una molécula muy diversa debido al número y tamaño de las cadenas de ácidos grasos y a la presencia de residuos terminales de fosfato y modificaciones asociadas (Fig. 4). Una gran variedad de estudios indica que el lípido A hexa-acetilado de *E. coli* con cadenas de 12 y 14 carbonos de largo, produce una estimulación máxima en células humanas, mientras que si se altera el número o largo de los ácidos grasos, o la carga del lípido A, puede reducirse la magnitud de la señal (26). El LPS de las bacterias orales tiene la misma estructura general del lípido A, consistente en de un disacárido  $\beta$ -(1,6)-glucosamino sustituido con ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados en adición al fosfato. La estructura completa del lípido A es solo conocida en algunas especies orales, notablemente en *P. gingivales* y *A. actinomycetemcomitans*. Pero se sabe que algunas son similares al lípido A de *E. coli*. El lípido A de algunas especies son pobremente reconocidas por el receptor TLR4 (receptor toll-like 4) humano cuyo denominador común son las 4 o 5 cadenas acil, algunas de las cuales son de 16 y 18 carbonos de largo. Se piensa que la variación del lípido A puede ser sólo una estrategia bacteriana usada para modular la condición en la inflamación del reconocimiento por el sistema inmune innato (27).

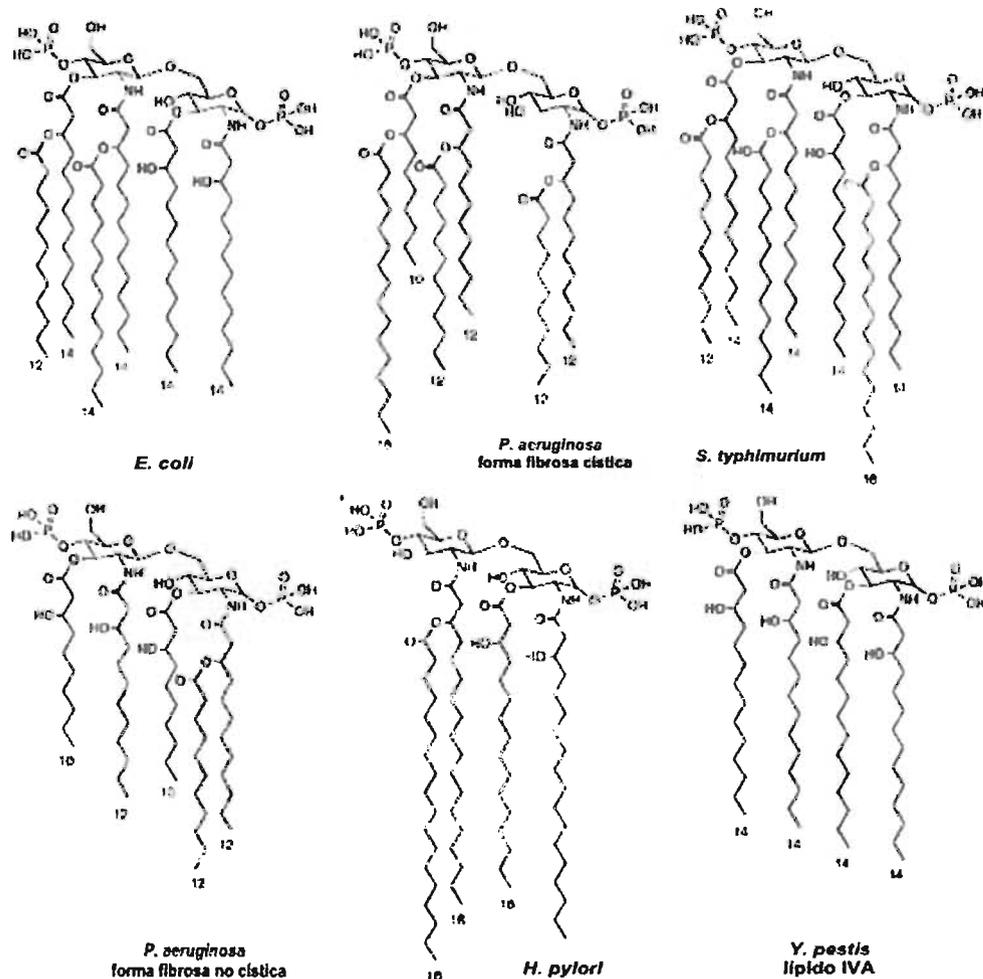


Fig. 4. La diversidad en la estructura del lípido A en microorganismos gram-negativos. El color de cada ácido graso indicará diferente longitud de la cadena hidrocarbonada. Nat Rev Microbiol. 2005;3(1):36-46.

Las bacterias gram negativas tienen mecanismos especiales involucrados en la modificación de la estructura del lípido A en ambientes diferentes, incluyendo los tejidos del huésped. Estas modificaciones pueden promover la resistencia a los péptidos catiónicos antimicrobianos del huésped (CAMPs) y alterar el reconocimiento por TLR4. La regulación de la estructura del lípido A en *Salmonella* sugiere dos principios importantes en la patogénesis microbiana. Primero, los microorganismos pueden sentir el ambiente del huésped, y segundo, los microorganismos pueden remodelar su superficie para resistir el ataque del sistema inmune innato como son los péptidos antimicrobiales (28).

La Pho-P-PhoQ es una enzima que tiene la capacidad de modificar la estructura del lípido A y lo hace a través de la adición del palmitato, aminoarabinosa y fosfoetanolamina, así como la hidroxilación y deacilación de ácidos grasos específicos. Las modificaciones en el lípido A promueven la supervivencia intracelular en macrófagos, probablemente porque se promueve la resistencia a los péptidos antimicrobianos (26,27).

## **PATRÓN DE RECONOCIMIENTO POR RECEPTORES**

Existe especificidad, debido al repertorio de los receptores y su ligando específico que permite una identificación y respuesta rápida por parte del huésped. Un cambio estructural del patrón de reconocimiento del receptor representa una manera de que el huésped use un reconocimiento molecular para distinguir entre estructuras propias y estructuras microbianas. En adición, diferencias específicas estructurales son clave en la activación celular a componentes bacteriales como el LPS.

### **LPS se une a la proteína CD14**

Se ha demostrado que el LPS activa a una gran variedad de células de una manera dependiente del receptor CD14. La unión a CD14 ocurre posterior al complejo formado por el LPS y una proteína plasmática conocida como LBP (LPS-binding protein). LBP es una proteína que se produce en el hígado y que circula en el torrente sanguíneo mientras reconoce y forma un complejo de alta afinidad con el lípido A del LPS. Esta proteína convierte las micelas oligoméricas del LPS a un monómero para entregarla a CD14 (29). Se sabe que CD14 es una glucoproteína de 55 kDa presente en forma soluble (sCD14) o como una proteína glucosilfosfatidilinositol (GPI) anclada a la membrana (mCD14) sin un segmento transmembranal (30). El papel de LBP y CD14 en la activación por LPS de monocitos y macrófagos se ha demostrado tanto bioquímica como genéticamente. Anticuerpos anti-CD14 bloquean la activación de macrófagos por LPS dependiente de LBP (31). La sobreexpresión de CD-14 humano en ratones transgénicos provoca en estos ratones hipersensibilidad a LPS, debido a la susceptibilidad de shock por endotoxina (32). Sin embargo, la ausencia de un segmento transmembranal en la unión de CD14 a la superficie celular sugiere que CD14 no es el receptor de señalización intracelular de los LPS.

## Receptores TLR

El primer miembro de un grupo de proteínas involucradas en el reconocimiento a patógenos que induce una respuesta inmunológica innata se describió en *Drosophila* (33). Este grupo de proteínas dominados Toll presentan en la región extracelular un dominio rico en leucinas (LRR) y un dominio rico en cisteína; y la región intracelular es homóloga a la región citoplasmática del receptor a interleucina-1 (TIR) de mamíferos (34).

A la fecha se han identificado hasta 10 homólogos de receptores Toll en células humanas y son referidos como TLRs (receptores toll-like). Al TLR2 se le ha implicado en la respuesta a LTA (ácido lipoteicoico), lipoproteínas, fimbrias y peptidoglucanos; TLR3 en respuesta a doble hebra de RNA (dsRNA); TLR4 en respuesta a LPS; TLR9 en respuesta a DNA. TLR-1 y TLR-6 se ha reportado que actúan sinérgicamente con el TLR2, aparentemente formando heterodímeros. Otros receptores TLR permanecen sin caracterizarse en relación a su función.

El dominio LRR en los TLRs contienen de 20 a 29 aminoácidos (35,36). El dominio citoplasmático TIR se encuentra asociada a una proteína adaptador MyD88 y tiene una alta similitud con el dominio citosólico del receptor de interleucina 1 (IL-1R). La unión del ligando al dominio extracelular de los TLR inicia una cascada de señalización intracelular que produce finalmente la activación de el factor nuclear de transcripción, NF $\kappa$ B, e incrementan la activación de citocinas pro-inflamatorias (37).

Se sabe que los receptores TLR se expresan en un número importante de tejidos y en una variedad de tipos celulares que incluyen monocitos, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos y células dendríticas (38).

## TLR y LPS

Se sabe que varias moléculas forman complejos con los receptores TLR en la membrana de las células hésped. Estos incluyen CD14, el factor MD-2 y la molécula adaptadora de diferenciación mieloide 88 (MyD88); aunque también se ha descrito una vía independiente de MyD88. CD14 parece unirse a LPS y subsecuentemente presentarlo a MD-2 y TLR4. La región esencial de CD14 se mapeo por Muroi et. al., e incluye los aminoácidos 35-44, 144-153, 235-243 y 270-275, aunque ninguna de estas regiones actúan directamente con la asociación a TLR4.

MD-2 actúa como una proteína adaptadora. Palsson-McDermott et al. (39) demostraron que el LPS se une a MD-2, la cual se asocia con TLR4 via la región LRR. Con estudios de inmunoprecipitación se demostró la unión directa del lípido A al complejo MD-2/TLR4. Y aunque el CD14 no es necesario para la interacción de LPS con el MD-2 soluble, mCD14 si es necesaria para que LPS se asocie con el complejo MD-2/TLR4. Como no se ha demostrado una interacción directa de

CD14 con el complejo de señalización, entonces se refuerza la idea que el papel principal de CD14 es cargar al LPS en el complejo MD2/TLR4, y que la unión directa de CD14 al complejo de receptor es de poca importancia.

MyD88 está compuesta por un dominio TIR en la región C-terminal, el cual es separado mediante un "linker" corto de un dominio de muerte N-terminal (DD). Este DD está relacionado a un motivo de 99 aminoácidos que fueron originalmente definidos como la región de similitud entre la cola citoplasmática de los receptores FAS y TNF (factor de necrosis tumoral) requeridos para la inducción de apoptosis. La región DD media la interacción proteína-proteína a través de otra secuencia DD. Este es un mecanismo utilizado por varios complejos de señalización para inducir respuestas como citotoxicidad, activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y activación de factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B. En un principio se demostró que MyD88 se asociaba con IL-1R (receptor de interleucina-1) tipo I (IL-1RI) a través de su dominio TIR y posteriormente se mostró que ocurre también con TLR4. Cuando se llevaron a cabo estudios con ratones MyD88<sup>-/-</sup> se reveló que existen las vías de señalización de TLR4 dependientes e independiente de MyD88.

Se ha descrito una segunda molécula adaptadora, Mal, en la vía de señalización de TLR4. En estudios donde se utilizaron ratones Mal-knock out se probó que Mal es esencial para, y actúa junto con, MyD88. Mal actúa para formar dímeros con MyD88. Además se mostró que está diferencialmente involucrada en señalización por diferentes TLRs y se piensa que provee especificidad en los eventos "downstream" de los diferentes receptores.

Un modelo reciente de la vía de señalización en respuesta a LPS establece que LPS se une, con ayuda de CD14 a MD-2 y TLR4. Esto induce homodimerización de TLR4, el cual a la vez recluta MyD88 y Mal al complejo del receptor. Al parecer la sustitución de una prolina e histidina en el aminoácido 712 en el dominio TIR del TLR4 produce un efecto dramático en la interacción entre TLR4 y MyD88/Mal inhibiendo la habilidad del receptor para producir una señal (40).

## VÍAS DE TRANSDUCCIÓN

“Downstream” de los eventos de activación de la vía dependiente de MyD88 se lleva a cabo la activación de NF $\kappa$ B. El modelo de activación de NF $\kappa$ B inicia con la asociación de la IRAK-1 (cinasa asociada al receptor de IL-1) e IRAK-4 con el complejo del receptor. La autofosforilación de IRAK-1 ocurre en dos pasos, dando lugar a la hiperfosforilación de IRAK-1, la cual causa disociación del complejo de receptor y asocia a IRAK con y el factor asociado al receptor TNF $\alpha$  (TRAF6). TRAF6 entonces se activa y se asocia con TAB-2, que activa a la MAPK cinasa TAK-1 (cinasa activada por el factor de crecimiento transformante). TAK-1 actúa como un activador común de NF $\kappa$ B, así como de la vía de MAPK (Fig. 5) (41).

La cinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2), las cinasas amino terminal c-Jun (JNKs), y p38 son miembros específicos de la “down” regulación de la familia de las proteínas cinasas MAPK, un grupo de serina-treonina cinasas. MAPKs son activadas por una familia de cinasas específicas (MAPKK), que fosforila a MAPK en residuos específicos de treonina-tirosina (43).

Muchos estudios han demostrado que LPS activa ERK1/2 en monocitos-macrófagos. Los dominios de cinasa de ERK1/2 tienen un motivo TEY que se fosforila y de esta manera se activa. Se ha sugerido que dicha activación se lleva a cabo de una manera dependiente de Ras y Raf-1 (42), apoyando la importancia de la vía Ras  $\rightarrow$  c-Raf (MAPKKK)  $\rightarrow$  MEK1/2 (MAPKK) $\rightarrow$  ERK 1/2 (MAPK) en la expresión de citocinas proinflamatorias por la estimulación de LPS (45).

Hambleton et al. (44) demostraron que LPS activa la vía de JNK, otro de los miembros de la familia de MAPK, en células THP-1 y RAW 264.7. De una manera similar a los motivos TEY de ERK 1/2, las JNK cinasas tienen un motivo TPY en su dominio cinasa y son activadas por fosforilación. “Upstream” de la vía de JNK se sabe que participan, MKK4 (MAPK cinasa, cinasa 4) y MKK7. Ahora bien, los factores que se encuentran “downstream” de la vía de JNK, son los factores de transcripción c-Jun, c-Fos, ATF-2 (factor de transcripción activado-2) y SRF (factor de respuesta sérica), los cuales regulan la activación de varios genes que participan en la respuesta inflamatoria (46).

Por último, p38 localizada dentro de la tercera vía de MAPK, se sabe está involucrada en macrófagos estimulados con LPS. Consistente con las vías de MAPK descritas, la vía de p38 además contiene motivos TGY en sus dominios de cinasa. Inhibición de la vía de p38, previo al tratamiento con LPS, decrece la producción de IL-1 $\alpha$ , IL1ra y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) apoyando la importancia de esta vía en la señalización inflamatoria. Se sabe que muchas MAPKs están involucradas en la activación de la vía de p38 MAPK como MKK3 y MKK6 (45). Una vez fosforilada p38, activa varios factores de transcripción que incluyen a ATF-2, Elk-1, c-Jun, SRF y NF- $\kappa$ B (46).

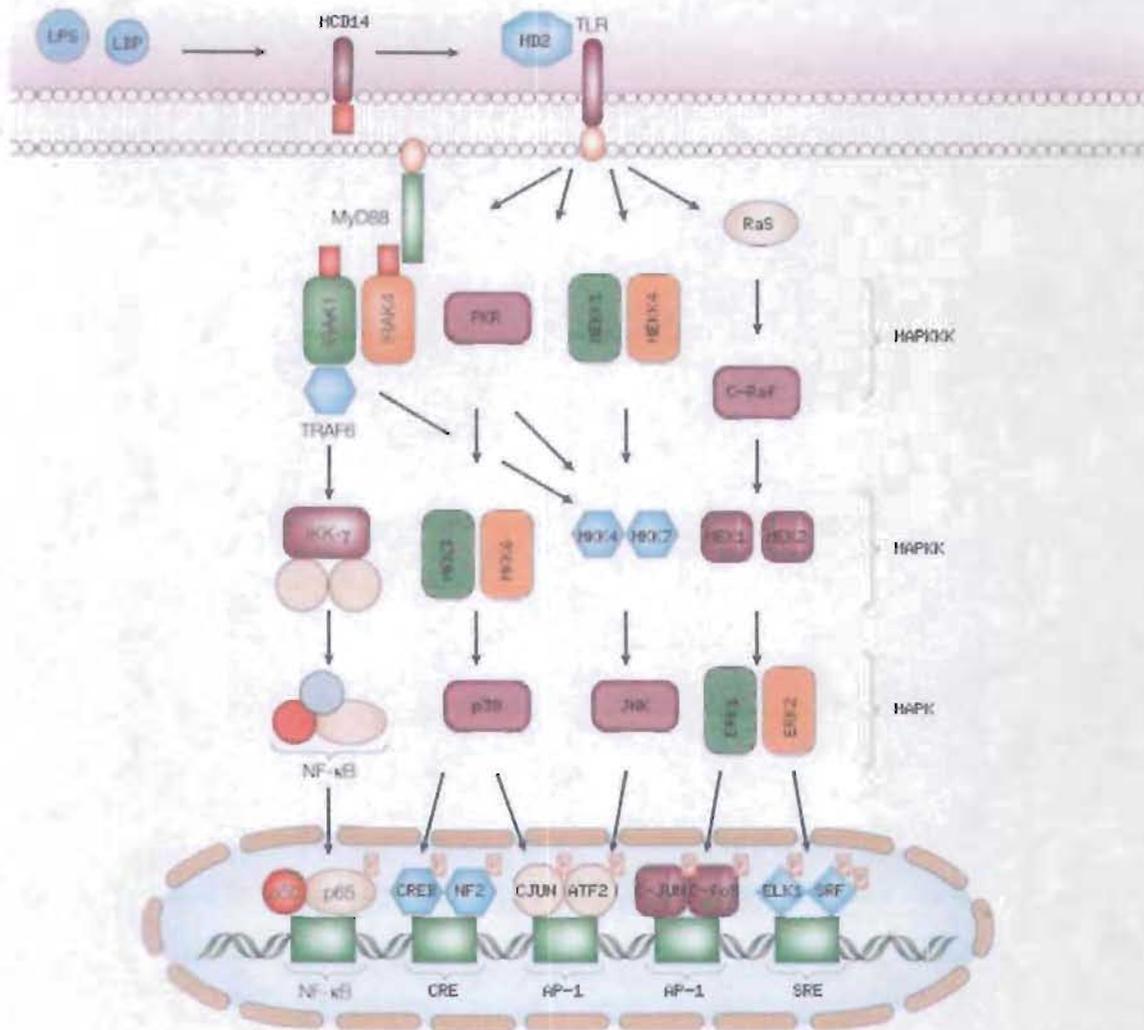


Fig. 5. Activación de las vías de transducción en respuesta a LPS en donde se lleva a cabo la activación de factores de transcripción y la expresión de moléculas efectoras. *Periodontol* 2000. 2004;35:53-74.

Xianwu, et al. (47) demostraron que la vía de PI3K (cinasa 3-fosfoinosítido) se activa en respuesta a LPS en células endoteliales en donde participan las moléculas adaptadoras de TLR4: MyD88 e IRAK-1. PI3K es una clase importante de cinasas de lípidos que cataliza la fosforilación de fosfoinosítidos en el hidroxil 3-D del anillo de inositol, generando PI 3-fosfato, PI 3,4-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) y PI 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Se ha propuesto un modelo en el que estos productos lipídicos activan al siguiente blanco principal AKT (o proteína cinasa B, PKB), quien se ubica "upstream" de la cinasa p70 S6. La activación de AKT ocurre mediante la fosforilación, sensible a wortmanina, de los sitios Thr 308 y Ser 473 que provocan la traslocación de la cinasa a la membrana. La cinasa responsable de la fosforilación en Thr 308 es PDK-1 (proteína cinasa 1 dependiente de PI 3,4,5-trifosfato). AKT parece tener un rol importante en procesos de inflamación (48).

La estimulación por LPS induce una fosforilación rápida de proteínas en residuos de tirosina. LPS activa diferentes isoformas de PKC mediante la vía dependiente de PI3K (49). La superfamilia de PKC comprende 12 distintas proteínas cinasas, las cuales están subdivididas en 3 subfamilias de acuerdo a su perfil de activación: PKCs convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), PKCs nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), las PKCs atípicas ( $\zeta$ ,  $\lambda$ ) y la más distancidas PKC $\mu$ /PKD y PKC $\nu$ . El papel del diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina y Calcio en la activación de PKC ha sido ampliamente estudiado. Varios laboratorios en ensayos *in vitro* han reportado que varias PKC son activadas tanto por PI 3,4-bifosfato como por PI 3,4,5-trifosfato. Se sabe que las PKCs convencionales (cPKCs) como la PKC $\beta$ II son fosforiladas por PDK-1 de una manera independiente de PI 3,4,5-trifosfato. La fosforilación se requiere para hacer una PKC catalíticamente competente pero no significa, por sí misma, la activación de la enzima. El paso crítico para la activación de las cPKCs es la unión de DAG a la membrana plasmática, llevando a cabo la liberación del sitio activo ocupado por el dominio pseudosustrato autoinhibitorio (50). Así es que, diferentes PKCs tienen la habilidad de mediar respuestas dependientes e independientes de PI3K.

La estimulación por LPS de macrófagos y monocitos activa varios genes entre los que se encuentran los que codifican para mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas. Hasta la fecha, los genes mejor estudiados expresados en monocitos-macrófagos en respuesta a LPS son: TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, IL-2R $\alpha$ , p50, c-Rel, Egr-1, e I $\kappa$ B $\alpha$  (51).

## ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

Existen tres isoformas de óxido nítrico sintasas (NOS) en tejidos de mamíferos y todas median la oxidación de L-arginina a L-citrulina con la consecuente producción de óxido nítrico (NO). Dos isoformas aisladas a partir de neuronas (nNOS) y células endoteliales (eNOS) son constitutivamente expresadas y reguladas a un nivel postraducciona (52). Uno de los mecanismos de la activación de estas isoformas de NOS involucra la unión de calmodulina seguida del incremento de los niveles de calcio intracelular (53). La tercera isoforma, la NOS inducible (iNOS), está regulada predominantemente a nivel transcripcional y es independiente de calcio (54). Ésta puede ser expresada por citocinas inmunoestimuladoras y productos bacterianos en una gran variedad de células incluyendo macrófagos, células vasculares del músculo liso, células renales, cardíacas, condrocitos, osteoclastos, hepatocitos y fibroblastos.

Las isoformas nNOS e iNOS se encuentran de manera soluble, mientras eNOS está unida a la membrana y cuyo extremo N-terminal está miristoilado. El óxido nítrico derivado de eNOS parece ser un regulador homeostático de varias funciones esenciales de la mucosa intestinal y de la permeabilidad microvascular y epitelial. (Tabla 2)

Las tres isoformas de NOS (neuronal, endotelial e inducible) son flavoproteínas que contienen tetrahidrobiopterina (H<sub>4</sub>B) y un grupo hemo.

Se ha sugerido la existencia de una isoforma diferente, la NOS mitocondrial (mtNOS) que es Ca<sup>2+</sup> dependiente, y su relevancia bioenergética de la mitocondria se ha reportado en tejido de rata, timo, músculo esquelético y corazón. Durante la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la mitocondria, mtNOS se estimula, y produce peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) y Ca<sup>2+</sup> es subsecuentemente liberado de la mitocondria, lo que sugiere un mecanismo de prevención de una sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> en la mitocondria (55).

	eNOS	nNOS	iNOS
<b>Originalmente se obtuvo de:</b>	Células endoteliales	Neuronas	Macrófagos
<b>Gene que las codifica:</b>	<i>NOS3</i>	<i>NOS1</i>	<i>NOS2</i>
<b>Mecanismo de regulación:</b>	Mecanismo dependiente de Ca <sup>2+</sup> (Ca-calmodulina). Independiente de Ca <sup>2+</sup> (fosforilación, palmitoilación)	Dependiente de Ca <sup>2+</sup>	Independiente de Ca <sup>2+</sup> ; regulación a nivel transcripcional
<b>Localización subcelular:</b>	Aparato de Golgi Caveolas Plasmalemmal	Citosol, retículo endoplásmico, sarcolema, caveola (caveolin 3) Densidades postsinápticas	Fagosomas

Tabla 2. Características de las tres isoformas de las óxido nítrico sintasas. J Physiol and Pharrma 2003;54(4):469-487.

## ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE

La proteína iNOS se purificó por primera vez de macrófago de ratón. Diversos estudios han demostrado que iNOS es una de las enzimas más complicadas tanto en estructura como en regulación y contiene varios cofactores. Los cofactores que participan en la síntesis de NO son: NADPH (nicotidamin adenin dinucleótido fosfato), FAD (flavin adenin dinucleótido), FMN (flavin adenin mononucleotido), tetrahidrobiopterina ( $H_4B$ ), y calmodulina (CaM). Esta enzima consiste en un proteína bidominio, su extremo C-terminal actúa como un dominio reductasa que contiene el sitio de unión a NADPH, FAD y FMN; este dominio se une mediante el sitio de reconocimiento a CaM al extremo N-terminal de la enzima, que actúa como un dominio oxigenasa que contiene el sitio de unión para el grupo hemo,  $H_4B$  y L-arginina (56). El FAD es el primer aceptor de electrones provenientes del NADPH; FMN transporta los electrones del FAD al grupo hemo del dominio oxigenasa. La calmodulina induce un estado conformacional, el cual es necesario para la transportación de electrones del NADPH al grupo hemo (57). Se piensa que  $H_4B$  tiene un papel redox en la catálisis de iNOS en el cual  $H_5B^+$  unido, dona un electrón al grupo hemo, formando  $H_4B^+$  el cual regresa al estado reducido  $H_3B$  para aceptar un electron del grupo flavin del dominio reductasa (58). El grupo hemo pasa de férrico a ferroso al recibir a un electrón. La forma ferrosa entonces une oxígeno formando el complejo oxi estable ( $Fe^{2+}O_2$ ) (61). Durante la síntesis de NO, la arginina y el intermediario N-hidroxi-L-arginina (NOHarginina) se ubican paralelos en el plano hemo, con el grupo guanidion interaccionando con el complejo  $Fe^{2+}O_2$  lo que produce la inserción del oxígeno a la L-arginina. En la estructura de la iNOS murina, en el dominio oxigenasa, el grupo guanidion contribuye con dos puentes de hidrógeno hacia el oxígeno de Glu 371 (Glu 377 en la iNOS humana) y una unión se produce con el grupo carbonilo del Trp 366, posicionando al sustrato sobre el grupo hemo (59).

La enzima iNOS parece estar activa solo en su forma dimérica. La dimerización creada entre dos dominios oxigenasa de la enzima es uno de lo pasos requeridos para la conversión a una forma activa. La dimerización se inicia por la inserción del grupo hemo, resultando en cambios conformacionales rápidos. El grupo hemo se esconde en el interior de la enzima y hace posible interacciones de tipo van de Waals con sitios hidrofóbicos y alifáticos (61).  $H_4B$ , así como la L-arginina promueven y/o estabilizan la forma dimérica. La incorporación de  $Zn^{2+}$  a la interfase del dímero puede proveer estabilización adicional. (Fig. 6).

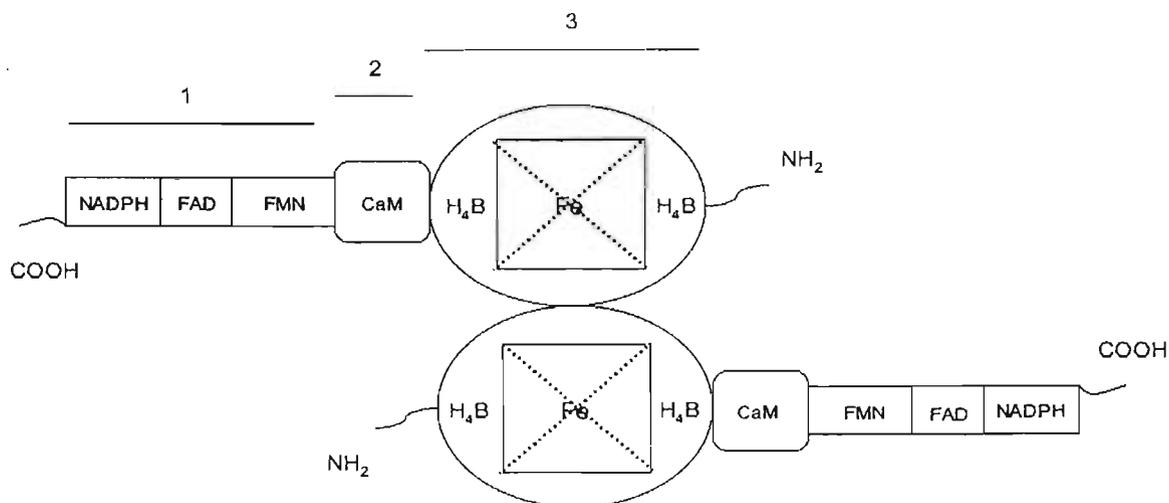


Fig. 6. Estructura de iNOS. 1. El dominio reductasa que tiene los cofactores NADPH, FAD y FMN. 2. El dominio de unión a CaM. 3. El dominio oxigenasa que tiene el locus de unión al grupo hemo, L-arginina y H<sub>4</sub>B. Life Sci. 2004;75(6):639-653.

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE iNOS; VÍA DE TRANSDUCCIÓN

La expresión de iNOS en macrófagos es primeramente regulada y modulada por receptores celulares como los receptores TLR y CD14. El conocimiento de la vía de señalización involucrada en la relación de la expresión de iNOS y la producción de NO es un área de investigación activa. Dil et al. (62) observaron que en macrófagos-K, donde existe gran expresión de TLR4, es mayor la inducción de iNOS y la producción de NO por LPS que en los macrófagos GB2 donde la expresión de TLR4 es pobre. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos con fibroblastos gingivales humanos donde la expresión de iNOS en respuesta a LPS es a través del receptor TLR4 (62). Varias cinasas se han implicado en la regulación de iNOS en diferentes tipos celulares. Cinasas como la proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y las proteínas tirosin cinasas (63). Estas cinasas pueden activar a su vez a otras cinasa que se encuentran debajo de la cascada de señalización, como la familia de las MAPK (64). Bhat et al. (65) examinaron el papel de ERK y p38 en la expresión de NO por LPS en células primarias de la glia. Ellos demostraron que la inhibición de MEK1-ERK y p38 suprime la producción de NO y la expresión de iNOS en células tratadas con LPS, evento que ocurre igualmente en macrófagos (66). Chan et al. (67) demostraron que además la vía MKK4-JNK estaba involucrada en la expresión de iNOS y la producción de NO con la estimulación de LPS más IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), sin embargo ellos encontraron que p38 inhibe la inducción de iNOS con estos mismos estímulos en la subclona de macrófagos RAW 264.7 $\gamma$ NO(-). Por otro lado, se sabe que la activación via PI3K de AKT, una

treonina-serina cinasa, por LPS está involucrada en la inducción de iNOS a través de NF $\kappa$ B en células del músculo liso (68). Sahl et al. han propuesto que la vía de PI3-K/AKT/cinasap70S6 esta involucrada en la producción de NO por LPS en células RAW 264.7. Ellos describen un mecanismo en donde PI3K regula FRAP (proteína dependiente asociada a FKBP12-rapamicin) y que FRAP o algun otro efector es responsable de la fosforilacion y consecuente activación de iNOS (69).

### **Secuencias del promotor de iNOS y factores de transcripción**

A partir de que se ha clonado el gene de ratón de iNOS, la regulación transcripcional de iNOS se ha investigado extensamente. Se ha sugerido que varios factores de transcripción participan en la expresión de iNOS en respuesta a LPS, como el activador de proteina-1 (AP-1) y la proteína de unión al elemento responsable de cAMP (CREB). Lee, et al. (70) demostraron además que AP-1 (Fra-1 y Jun B), fosfo-CREB y NF $\kappa$ B (p50 y p52) sirven como factores de transcripción para la regulación de la expresión del mensajero de iNOS cuando las células del glioma son estimuladas con LPS y TNF- $\alpha$ . Las secuencias de los promotores de iNOS de diferentes especies exhibe homologias con los sitios de union de varios factores de transcripción como C/EBP $\beta$  (proteína de unión al caja enhancer CCAAT), IRF-1 (factor-1 regulatorio de interferon), NF-IL6 (factor nuclear IL6) y Oct-1 (factor-1 octamérico), los cuales se han involucrado en la inducción de la transcripción de iNOS mediada por LPS y citocinas (71,72). Aunque parece que NF $\kappa$ B es el blanco central de los activadores e inhibidores de la expresión de iNOS (73). Los promotores de todas las especies investigadas contiene una caja TATA de cerca de 30bp del sitio del inicio de transcripción. Los promotores de ratón de iNOS contiene dos regiones transcripcionales regulatorias, un enhancer y un promotor basal. Una región proximal en -48 a -209pb funciona como el promotor basal. Esta región contiene un sitio NF $\kappa$ B. La región distal (-913 a -1029pb) funciona como un elemento enhancer y responde a LPS y a INF $\gamma$  a través de NF $\kappa$ B e IRF-1 (74). En ensayos de Supershift se ha demostrado que IRF-1 es un componente del complejo de proteínas que se une al promotor de iNOS en la posición -913 a -923 después del tratamiento con IFN- $\gamma$ .

En particular, los sitios de NF $\kappa$ B son esenciales para la regulación del gen humano de iNOS. Se ha observado que la continua activación de NF $\kappa$ B produce la expresión sostenida de iNOS. Taylor et al. (75) reportaron 5 sitios de unión de NF $\kappa$ B en la región promotora de iNOS humano entre las posiciones -5.2 y -6.5 kb. y el motivo NF $\kappa$ B en la región -5.8kb resultó ser el más importante en la inducción de la expresión de iNOS por citocinas.

El estado estacionario de los niveles del RNA mensajero (RNAm) de iNOS depende de su síntesis, estabilidad y degradación. La región 3'UTR que no es traducida del mensajero de iNOS contiene una secuencia rica en AU que lo estabiliza. La exposición de las células al factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) inhibe la inducción de iNOS porque causa la desestabilización del mensajero de iNOS. Este efecto postranscripcional de TGF $\beta$  puede ser mediado vía modificación de IRF-1 a través de nucleasas actuando en la secuencia rica en

AU. Además, la PKC- $\alpha$  juega un papel esencial en la estabilización del mensajero de iNOS en células pancreáticas  $\beta$ . La estabilidad del RNAm iNOS se aumenta por la elevación de los niveles de AMPc (adenosin monofosfato cíclico) intracelular, pero se reduce por el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico es una molécula de señalización intracelular e intercelulares importante que regula diversos mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos. Puede actuar como un mediador biológico del sistema nervioso, tiene la capacidad de regular la presión sanguínea en el sistema vascular y es un importante efector en la defensa del huésped en el sistema inmunológico pues presenta actividad antimicrobiana, antiviral y antiparasitaria (84). Pero por otro lado, el óxido nítrico es un radical libre de oxígeno (NO) que puede actuar como un agente citotóxico en procesos inflamatorios.

El óxido nítrico es una molécula que difunde libremente en las células desde el sitio de formación hasta el sitio de acción. La biosíntesis del óxido nítrico empleando L-arginina y oxígeno molecular, requiere la presencia de NADPH como un donador de electrones y el grupo hemo, FMN, FAD y  $\text{H}_4\text{B}$  como cofactores. La reacción global consiste en dos pasos oxidativos de L-arginina a L-citrulina vía el intermediario: NOHarginina.

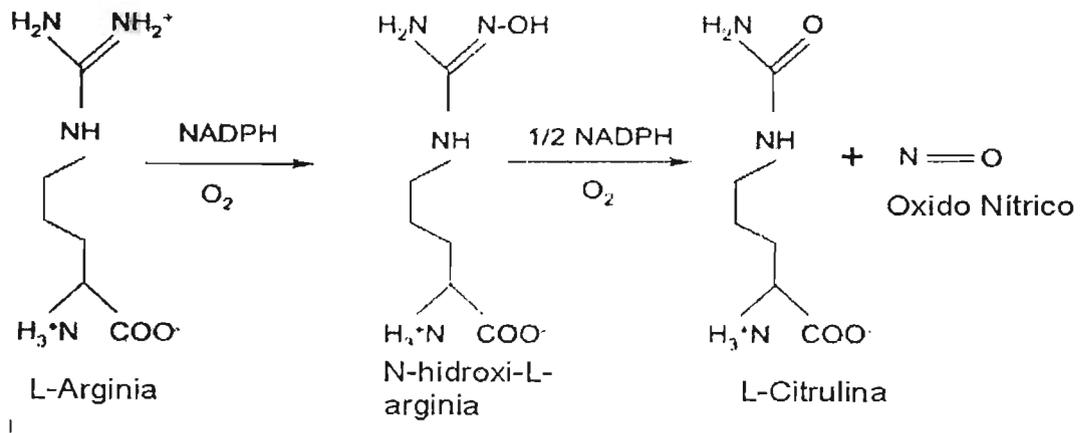


Fig. 7. Reacción de la síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina. Durante la reacción 1.5 moléculas de NAPDH son usadas como donador de electrones y NOH -arginina es generado como un intermediario. Life Sci. 2004;75(6):639-653.

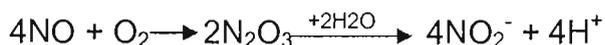
La producción de NO puede inducir un efecto protector o de daño celular. Por ejemplo, mientras que bajas concentraciones fisiológicas de NO pueden inhibir la apoptosis, altas concentraciones pueden causar muerte por apoptosis y, en el sistema nervioso, daño neurodegenerativo (77,78).

Los efectos producidos por NO pueden dividirse en acciones de tipo directas o indirectas. Las reacciones directas son todas aquellas en las cuales el NO interacciona directamente con un molécula biológica o blanco, mientras que reacciones indirectas ocurren cuando la molécula efectora final es generada por la interacción del NO con una especie reactiva de oxígeno (79).

En las reacciones de tipo directo el NO puede interaccionar con proteínas que contienen metales o con radicales libres orgánicos. La interacción directa de NO con metales ocurre *in vivo* primeramente con hemo-proteínas. La más notable de estas reacciones es la reacción con guanilato ciclase, que lleva a cabo la formación de cGMP, esta molécula en turno activa las proteínas cinasas dependientes de cGMP quienes juegan un papel regulatorio y antiinflamatorio. Varios estudios sugieren que el NO modula reacciones de oxidación catalizadas por hierro actuando como un quelante de hierro (80). *In vitro*, en el sistema vascular, puede ser desplazado al reaccionar con oxihemoglobina, de esta manera se previene la generación de metabolitos oxidantes del NO, sugiriéndose que el NO puede tener una remarcada capacidad antioxidante. Así mismo, se puede unir al grupo hemo-hierro de la enzima iNOS e inhibir su activación a nivel postraduccional en ausencia de inductores tales como citocinas y/o LPS. La unión del NO a una NOS constitutiva puede inhibir también su actividad lo que sugiere que puede actuar como un modulador negativo a través de su interacción con la región de unión a hemo (81).

En contraste, los efectos indirectos del NO derivan de las interacciones entre el NO y O<sub>2</sub> o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, las cuales dan origen a estrés oxidativo y nitrosativo. Bajo condiciones normales, es convertido a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

La interacción del NO con O<sub>2</sub> lleva a cabo la auto oxidación del NO y la formación de trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) el cual es un agente de nitrosilación. En adición a N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, se forma otro intermediario: NO<sub>2</sub>.



Se ha demostrado que N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, N-nitrosila a una gran variedad de blancos biológicos, como compuestos de amino, para producir nitrosaminas potencialmente carcinogénicas. Esto podría contribuir al conocimiento de la asociación entre inflamación crónica y transformación maligna. Por otro lado, la S-nitrosilación de ciertos tioles por N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> da lugar al aumento en los aductos nitrosotioles. Estos aductos se sugiere que son los responsables de procesos inflamatorios y fisiológicos, como es la regulación de flujo sanguíneo, inhibición de la adhesión de neutrófilos y la modulación de la producción de citocinas.

La otra vía involucra  $O_2^-$ . Se sabe que  $O_2^-$  y NO interaccionan rápidamente para producir un potente oxidante citotóxico, el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). En la reacción no se muestra el intermediario nitrosoperoxicarbonato que se forma durante el consumo de  $ONOO^-$  quien a su vez da origen a los radicales  $NO_2$  y  $CO_3^-$ :



El peroxinitrito reacciona con proteínas, lípidos y DNA, y es un potente iniciador de la ruptura de la cadena de DNA. Esto último es un estímulo para la activación de la enzima nuclear poly-ADP ribosil sintasa (PARS). La vía de peroxinitrito-PARS puede contribuir al daño celular en un número de condiciones fisiopatológicas. El peroxinitrato se sabe además que puede inhibir la respiración mitocondrial y dañar a un gran número de componentes mitocondriales vía reacciones de oxidación.

Además en la reacción se forma  $NO_2^-$  por la descomposición de  $ONOOH$ , la cual es menor a niveles fisiológicos de  $CO_2$ . El  $O_2$  está disponible intracelularmente. El  $O_2^-$  está encerrado en muchas células en el citosol y en la mitocondria y se produce durante la respiración celular. La concentración de  $O_2^-$  se disminuye gracias a la superóxido dismutasa, lo que representa otra ruta de consumo de  $O_2$  (82).

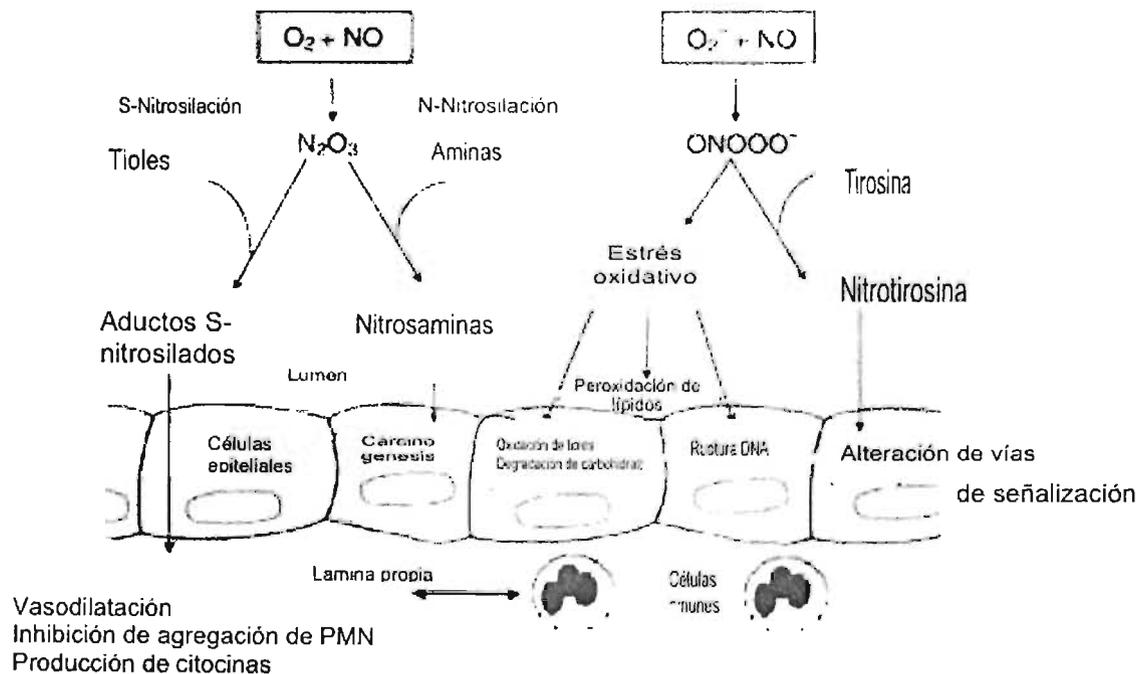


Fig. 8. Papel del óxido nítrico en la respuesta del huésped. Immunology. 2004;113(4):427-437.

La presencia de metabolitos oxidantes de NO puede además inhibir la actividad de enzimas antioxidantes tales como la glutatión peroxidasa y reducir los niveles de antioxidantes celulares como ácido ascórbico, ácido úrico y tioles plasmáticos. Los compuestos de nitrógeno reactivo y ONOO<sup>-</sup> pueden además modular algunas enzimas en el proceso inflamatorio y en funciones vasculares, incluyendo la producción de prostaglandina endoperoxidasa sintasa, citocromo P450 y el metabolismo de 5-lipoxigenasa.

## REGULACIÓN DE iNOS/PRODUCCIÓN DE NO

Existen varios reportes que describen la regulación de la actividad de iNOS por interacción con otras proteínas, por la reducción por arginasas de la disponibilidad de arginina, por regulación de la entrada de arginina o por la concentración de cofactores esenciales como BH<sub>4</sub> (83).

Recientemente se ha descubierto que algunos compuestos como dexometasona y salicilato de sodio son efectivos en modular la traducción del RNAm de iNOS. iNOS puede fosforilar a eIF-2 $\alpha$  el cual está relacionado en la síntesis de proteína a nivel traduccional (84). La reducción en la síntesis de proteínas resulta en la reducción de la actividad de iNOS. Esta regulación es otro paso importante en la “down”regulación de la producción del NO por iNOS.

La regulación postraduccional de la síntesis del NO es importante en el control de la viabilidad de la proteína produciendo efectos en la estabilización, dimerización, fosforilación, unión del cofactor y la viabilidad de los sustratos como O<sub>2</sub> y L-arginina.

El incremento o bloqueo de la proteína de iNOS es otro mecanismo regulatorio postraduccional. TGF- $\beta$  incrementa la degradación de la proteína de iNOS así como disminuye la estabilidad y traducción del RNAm de iNOS. El efecto que tiene TGF- $\beta$  en la proteína puede ser mediado indirectamente por proteasas. La enzima iNOS es degradada bajo el control directo de la vía del proteosoma (85). Lactacistin, un inhibidor del proteosoma, previene la inducción de iNOS mediante el bloqueo de la degradación de I $\kappa$ B a un nivel transcripcional y además bloquea la degradación de iNOS de la degradación enzimática por proteasas a un nivel postraduccional. La proteasa calpaína juega un papel importante en la degradación de iNOS (86).

Kalirin es un compuesto que tiene efectos neuroprotectivos y parece inhibir a iNOS previniendo la formación del dímero. Además, otras proteínas inhiben la dimerización como por ejemplo la proteína asociada a la óxido nítrico sintasa llamada NAP 110. Imidazoles antifúngicos pueden prevenir la dimerización de iNOS (87).

La biosíntesis del NO es controlada a nivel traduccional y postraduccional. La síntesis del NO puede ser regulada por su sustrato; la L-arginina, y por los cofactores; los grupos hemo, H<sub>4</sub>B y el donador de electrones NADPH. La sobreproducción de NO por NOS depende en la concentración intracelular de L-arginina. En macrófagos, CAT1 y CAT2A, las proteínas de transporte de aminoácidos catiónicos "up" reguladas por la estimulación de LPS, incrementa la entrada de L-arginina. Además, en macrófagos, la estimulación de LPS puede generar arginina a partir de citrulina debido a la inducción de arginosuccinato sintasa, la enzima limitante en el ciclo de citrulina-NO. Además, LPS activa arginasas que degradan la arginina a urea y ornitina, potencialmente limitando la producción del NO, aunque el valor de la Km para la arginina por la arginasa es mucho más grande que su valor de Km para iNOS (88,89).

La síntesis del NO se regula vía la subunidad hemo. El CO inhibe la síntesis de NO mediante la coordinación del grupo hemo-hierro. Esta reacción es importante en regular la producción del NO por hemo oxigenasa (HO), la enzima que cataliza la conversión de hemo en biliverdina, CO, y radicales libres. NOS puede unir NO como su sexto ligando en su estado férrico o ferroso en su grupo hemo-fierro proviendo una regulación de "feedback" negativa. La disociación del complejo Fe<sup>3+</sup>-NO compite con su reducción a la estructura Fe<sup>2+</sup>-NO para inhibir la activación de iNOS (90).

La síntesis de NO puede ser regulada vía H<sub>4</sub>B, esencial para la catálisis de NOS. Guanosina fosfato ciclohidrolasa, la enzima clave para la síntesis de H<sub>4</sub>B, es inducida o suprimida por citocinas particulares. Otra enzima que produce H<sub>4</sub>B es la fenilalanina hidrolasa, la cual cataliza la conversión de fenilalanina a tirosina, pero tiene poco impacto en la actividad de iNOS (91).

La síntesis de NO puede ser regulada por modificaciones de fosforilación, aunque la idea de una regulación fisiológica de la enzima no está clara, se han demostrado modificaciones de iNOS por tirosin-cinasas. Estas modificaciones pueden ser importante para la localización y función de la enzima (92).

## JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periodontal se origina por la acumulación de bacterias en el margen dentogingival. Se sabe que entre los agentes causales de la periodontitis está el LPS de las bacterias gram-negativas como *A. actinomycetemcomitans* (Aa) y *P. gingivalis* (Pg) (93,94).

El óxido nítrico se piensa que tiene un importante papel en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria periodontal como lo tiene en otras enfermedades inflamatorias. La sobreproducción de NO ha sido demostrada en la enfermedad periodontal (95). Se sabe que el LPS de Aa produce óxido nítrico a través de iNOS en macrófagos y se cree puede ser la causa del daño del tejido periodontal, pues empleando anticuerpos anti-iNOS la distribución de la enzima es mayor en el tejido inflamado en comparación al tejido no inflamado, en donde la presencia de la enzima es escasa (96). Se sabe que diferentes activadores o inhibidores inducen, aumentan o inhiben la expresión de iNOS y la correspondiente producción de NO por la activación o bloqueo de una gran variedad de vías de señalización, afectando la respuesta inflamatoria de un tejido.

Todavía es desconocido el mecanismo homeostático de las células del tejido periodontal que puede ser importante en el progreso de la periodontitis, por lo cual consideramos que la expresión de iNOS y la producción de moléculas como NO necesitan ser revisadas. Conocer las vías de transducción que activa el LPS en los fibroblastos gingivales humanos es de suma importancia, ya que los eventos intracelulares que activan las estructuras de microorganismos periodontopatógenos como el LPS de *A. actinomycetemcomitans* y las respuestas celulares que éstos generan como la expresión de iNOS y la producción de NO ayudarán a esclarecer el origen de la periodontitis.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe producción de óxido nítrico y expresión de iNOS en fibroblastos gingivales tratados con LPS de *A. actinomycetemcomitans*? ¿Cuáles son las señales intracelulares que se activan al tratamiento de fibroblastos gingivales humanos con LPS de *A. actinomycetemcomitans* para la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico?

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Conocer la vía de transducción para la producción de óxido nítrico y la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa posterior al tratamiento de los fibroblastos gingivales humanos con lipopolisacárido de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si existe producción de nitritos después del tratamiento de los fibroblastos gingivales humanos con lipopolisacárido de *A. actinomycetemcomitans* (Aa).
- Determinar si se expresa la enzima óxido nítrico sintasa en HGF tratados con LPS de Aa.
- Identificar por medio de inhibidores cuál de las vías de transducción de señales está implicada en la expresión de la enzima iNOS en HGF tratados con LPS de Aa.
- Determinar mediante inmunohistoquímica la localización de la enzima iNOS en HGF tratados con LPS de Aa.

## HIPÓTESIS

Hipótesis Alterna:

El tratamiento con LPS de *A. Actinomycetemcomitans* en los HGF produce óxido nítrico.

Hipótesis nula:

El tratamiento con LPS de *A. Actinomycetemcomitans* en los HGF no produce óxido nítrico.

Hipótesis Alterna:

El tratamiento con LPS de *A. actinomycetemcomitans* en los HGF produce la expresión de la enzima iNOS.

Hipótesis nula:

El tratamiento con LPS de *A. actinomycetemcomitans* en los HGF no produce la expresión de la enzima iNOS.

Hipótesis Alterna:

El tratamiento con inhibidores de las vías de transducción de PKC, PI-PLC, PI3K, p38 MAPK, ERK 1/2 y de NF $\kappa$ B en los HGF tratados con LPS de *A. actinomycetemcomitans* suprimen la expresión de la enzima iNOS.

Hipótesis Nula:

El tratamiento con inhibidores de las vías de transducción de PKC, PI-PLC, PI3K, p38 MAPK, ERK 1/2 y de NF $\kappa$ B en los HGF tratados con LPS de *A. actinomycetemcomitans* no suprimen la expresión de la enzima iNOS.

Hipótesis Alterna:

La localización de la enzima es el citoplasma celular de los HGF tratados con LPS de *A. actinomycetemcomitans*

Hipótesis nula:

La localización de la enzima no es el citoplasma celular de los HGF tratados con LPS de *A. actinomycetemcomitans*

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Tipo de Estudio

Experimental

## Definición de variables

En experimentos de tipo curso temporal

### Variables Dependientes

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Concentración de óxido nítrico	Cuantitativa continua	Radical constituido por un átomo oxígeno y un átomo de nitrógeno producido por las enzimas NOS al convertir una molécula de L-arginina a L-citrulina	Valor de absorbancia medida en el espectrofotómetro a longitud de onda de 550nm mediante el reactivo de Griess.	0.001nm-1.00nm
Concentración de proteína iNOS	Cuantitativa continua	Enzima de 115 kDa de peso molecular. Es la isoforma inducible de las óxido nítrico sintasas.	% de densidad óptica, medida por el sistema digidoc, de la banda visualizada en autoradiografía obtenida mediante el ensayo de Western blot	0.001 - 0.999 OD

### Variable independiente

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Tiempo	Cuantitativa continua	Duración de una acción	La duración en la que los HGF estarán en contacto con los LPS de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	6, 12, 24, 48 y 72 h.

## En experimentos de tipo dosis respuesta

### Variables Dependientes

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Concentración de óxido nítrico	Cuantitativa continua	Radical constituido por un átomo de oxígeno y un átomo de nitrógeno producido por las enzimas NOS al convertir una molécula de L-arginina a L-citrulina	Valor de absorbancia medida en el espectrofotómetro a longitud de onda de 550nm mediante el reactivo de Griess.	0.001nm-1 $\mu$ m
Concentración de proteína iNOS	Cuantitativa continua	Enzima de 115 kDa de peso molecular. Es la isoforma inducible de las oxido nítrico sintasas.	% de densidad óptica, medida por el sistema digidoc, de la banda visualizada en autoradiografía obtenida mediante el ensayo de Western blot	0.001 - 0.999

### Variable independiente

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Concentración de LPS	Cuantitativa continua	Molécula que forma parte de la pared de las bacterias gram-negativas	Molécula con la que se tratan los HGF purificada de <i>A. Actinomycetemcom itans</i> diluida en buffer de fosfato salino	0.1 $\mu$ g/ml 1 $\mu$ g/ml y 5 $\mu$ g/ml.

## Experimentos de tratamiento con inhibidores

### Variables Dependientes

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Concentración de proteína iNOS	Cuantitativa continua	Enzima de 115 kDa de peso molecular. Es la isoforma inducible de las oxido nítrico sintasas.	% de densidad óptica, medida por el sistema digidoc, de la banda visualizada en autoradiografía obtenida mediante el ensayo de Western blot	0.001 - 0.999 OD

### Variables Independientes

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Inhibidores	Cuantitativa continua	Reactivos químicos que bloquean la actividad de una proteína que participa en una vía de transducción intracelular	Reactivos que se incuban 1 h. antes del tratamiento de los HGF con los LPS y que permanecen después del tratamiento	*

\*

Inhibidor	Concentración
PD-98059	20 $\mu$ M
Wortmanina	50nM
U73122	10 $\mu$ M
Cloruro de Queleritrine	6 $\mu$ M
Calfostina	0.5 $\mu$ M
Estaurosporina	0.2 $\mu$ M
Bisindolilmaleimida	1 $\mu$ M
SB 203580	2 $\mu$ M
PDTC	100 $\mu$ M

## Experimento Inmunohistoquímica

### Variable Dependiente

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional
Proteína iNOS	Cualitativa	Enzima de 115 kDa de peso molecular. Es la isoforma inducible de las óxido nítrico sintasas.	Luz observada en microscopio confocal con longitud de onda de 520nm cuando es excitada a 494nm

### Variable Independiente

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Tratamiento con LPS	Cuantitativa continua	Molécula que forma parte de la pared de las bacterias gram-negativas	Molécula con la que se tratará a los HGF purificada de <i>A. Actinomycetemcom itans</i> diluida en buffer de fosfato salino	1µg/ml

## MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

### **Población de estudio**

Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF) los cuales se obtuvieron de explantes a partir de encías sanas de pacientes de la clínica de periodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología. El cultivo de los HGF se mantuvo en el Laboratorio de Bioquímica del DEPeI de la Facultad de Odontología, en este mismo lugar se realizó el resto de la metodología.

### Cultivo celular primario de fibroblastos gingivales humanos.

Los fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron de explante a partir de encías sanas de pacientes. El explante se lavó durante 6 ocasiones en solución de Hanks suplementado con penicilina/fungizona. El tejido gingival se cortó en piezas de 1-2 mm. Después de la incubación con tripsina, se sembró en cajas Falco en medio Dulbecco's Modificado por Eagles (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 2mM de glutamina, en presencia de 1% antibiótico-antimicótico. El cultivo de fibroblastos gingivales se incubó a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se alimentaron periódicamente. Las células se utilizaron entre los pases 5 a 15.

### Determinación de la concentración de óxido nítrico.

La producción de óxido nítrico en el sobrenadante en los medios de cultivo se evaluó determinando la presencia de nitritos. Producto estable de la degradación de óxido nítrico usando el reactivo de Griess. Las células se sembraron en caja de 48 pozos hasta sub-confluencia. Se ayunaron 24 h. en DMEM libre de SBF y posteriormente se trataron a diferentes tiempos con 1µg/ml de LPS disuelto en buffer de fosfatos salino estéril (PBS) en presencia de DMEM libre de rojo fenol al 2% de SBF. En otra serie de experimentos se trataron las células con diferentes concentraciones de LPS durante 24 h. en medio DMEM libre de rojo de fenol al 2% de SBF. Se obtuvo el sobrenadante que se mezcló con un volumen igual del reactivo de Griess, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. y se leyeron en espectrofotómetro a 550nm. Para la curva patrón se utilizó nitrito de sodio.

### Detección por Western Blot de la expresión de iNOS

Para estudiar la expresión de iNOS en los fibroblastos gingivales tratados con LPS se sembraron los fibroblastos en caja de 6 pozos hasta sub-confluencia. Se ayunaron las células durante 42h. en DMEM libre de SBF. Después del estímulo, el medio se aspiró y las células se lavaron con PBS que posteriormente fue reemplazado por 30µl de buffer de lisis (20mM Tris-HCl, 1% Triton 100x, 137mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10% Glicerol, 1mM PMSF, 10µg/ml Leupeptina, 1µg/ml Aprotinina). Las células se rasparon y el lisado se transfirió a una microcentrífuga; posteriormente, se sonicó con un pulso en hielo. El Western blot se llevó a cabo con 50µg de proteína que se mezcló con 10µl con el buffer que contiene 20% de glicerol, 4% SDS, 10% 2-β mercaptoetanol, 0.05% de azul de

bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8. Las muestras se cargaron en un gel 7.5% SDS-PAGE y se corrieron a 80mA por 1h. Las células fueron transferidas a nitrocelulosa por 1h. a 25V y 0.30A. Posteriormente la membrana se bloqueó con 150mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 7.8 y 5% de suero albúmina bovina por 1h. se lavo 3 veces con TBS (150 mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 7.8. Tween 20 0.2%) y se incubó con el anticuerpo iNOS rabbit policlonal (1:1000) durante toda la noche a 4°C. La membrana se lavó 3 veces y se incubó con el anticuerpo HRP-conjugado anti-rabbit IgG Ab (1:5000). Las bandas inmunoreactivas se revelaron por quimioluminiscencia. Las membranas fueron desnudadas e incubadas con el anticuerpo primario  $\gamma$ -tubulina como control. La densidad de cada una de las bandas se cuantificó mediante el sistema digi-doc. Los experimentos se llevaron a cabo al menos por 3 ocasiones. En los experimentos con inhibidores, las células se preincubaron con el inhibidor por 1h., previo al tratamiento con el LPS.

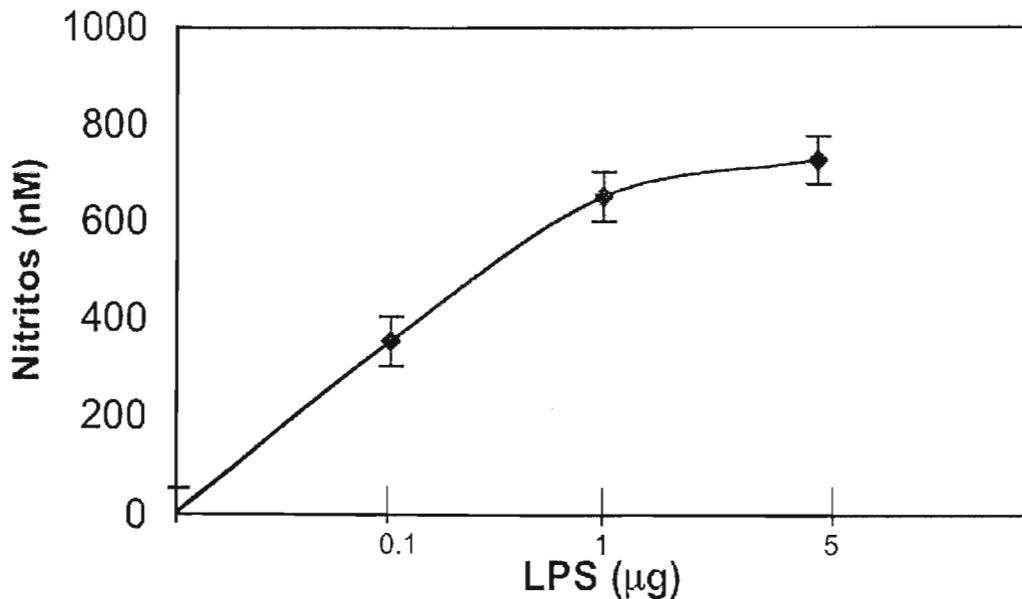
### Inmunohistoquímica

Las células se crecieron en cubreobjetos de vidrio y se fijaron por 30 min. con 2% de formaldehído en PBS a 4°C. Las células se permeabilizaron con tritón 1% durante 5 min. y se lavaron por 5 veces con PBS. Para la visualización de iNOS las células fueron tratadas 1h. con el anticuerpo anti-iNOS específico, diluido 1:100 en PBS y posteriormente se lavaron con PBS por 5 ocasiones. Las células se incubaron por 45 min. con fluoresceína conjugada con anti-rabbit IgG diluido 1:100 en PBS. Las muestras fueron montadas en resina y se examinaron en un microscopio confocal. Los experimentos se realizaron por tres ocasiones.

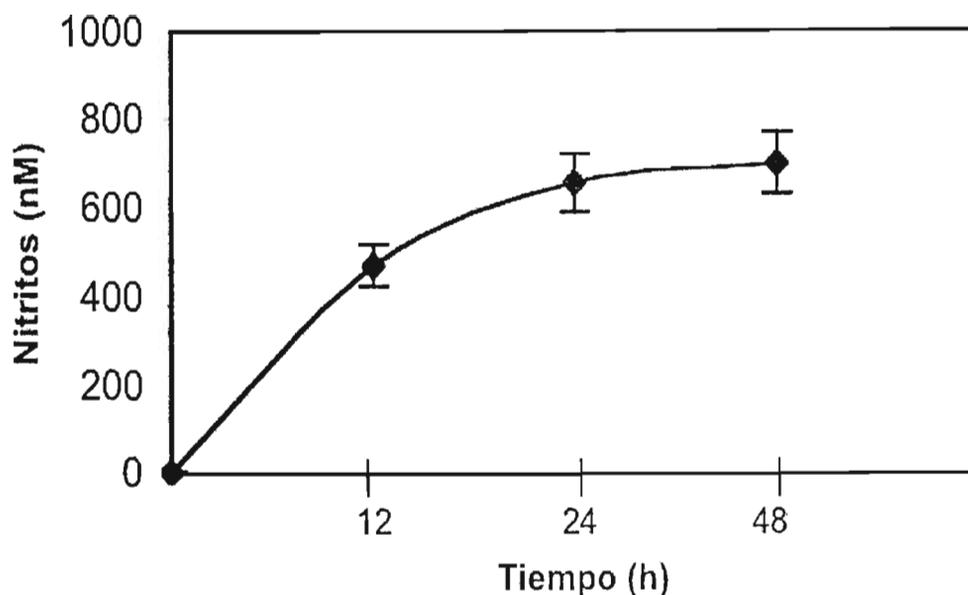
## RESULTADOS

### Producción de NO en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS de Aa

Los HGF se estimularon con diferentes dosis de LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 24 horas y la concentración de  $\text{NO}_2^-$  (un metabolito de NO) se detectó en el sobrenadante del cultivo usando el ensayo del reactivo de Griess. En la figura 1 se observa que las células estimuladas con LPS producen  $\text{NO}_2^-$  de manera dosis dependiente y que la máxima producción de  $\text{NO}_2^-$  se observa a la concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , después de lo cual la producción parece no aumentar significativamente. Para determinar el tiempo de inicio y máxima producción de  $\text{NO}_2^-$  las células se trataron con la dosis submáxima de LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de la producción de  $\text{NO}_2^-$  previamente observado. Los resultados (Fig. 2) muestran que la producción de  $\text{NO}_2^-$  inicia a las 12 h. de tratamiento y alcanza una máxima de 725 veces ( $\pm 25$ ) sobre el basal a las 48h. de haber sido estimulados los HGF con LPS de Aa.



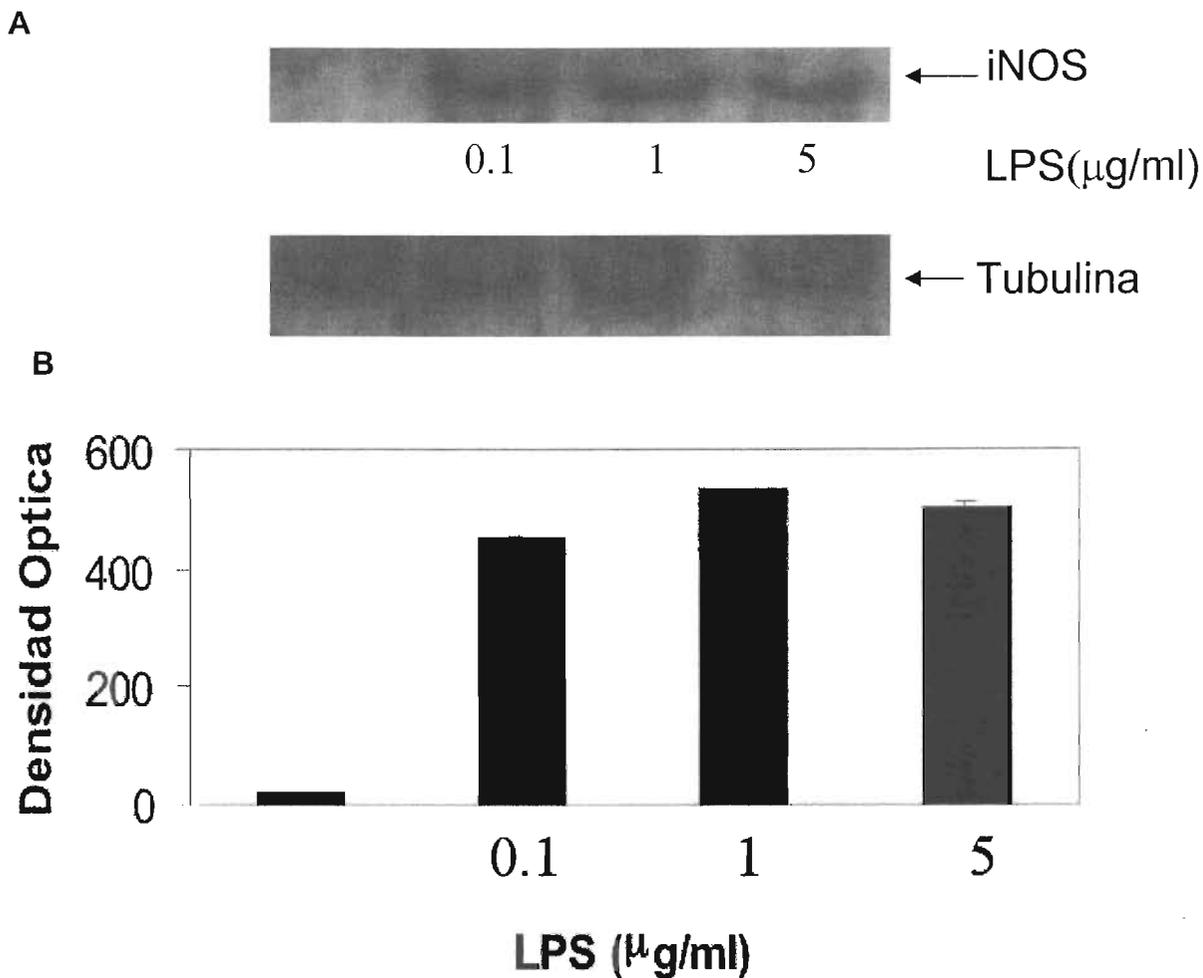
**Fig 1. Dosis respuesta de la producción de Nitritos en HGF tratados con LPS.** Los HGF se estimularon con diferentes dosis de LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 24 h. y después los sobrenadantes del cultivo se trataron con el reactivo de Griess para determinar la acumulación de  $\text{NO}_2^-$ . Los resultados son la media de 3 diferentes experimentos  $\pm$  SD.



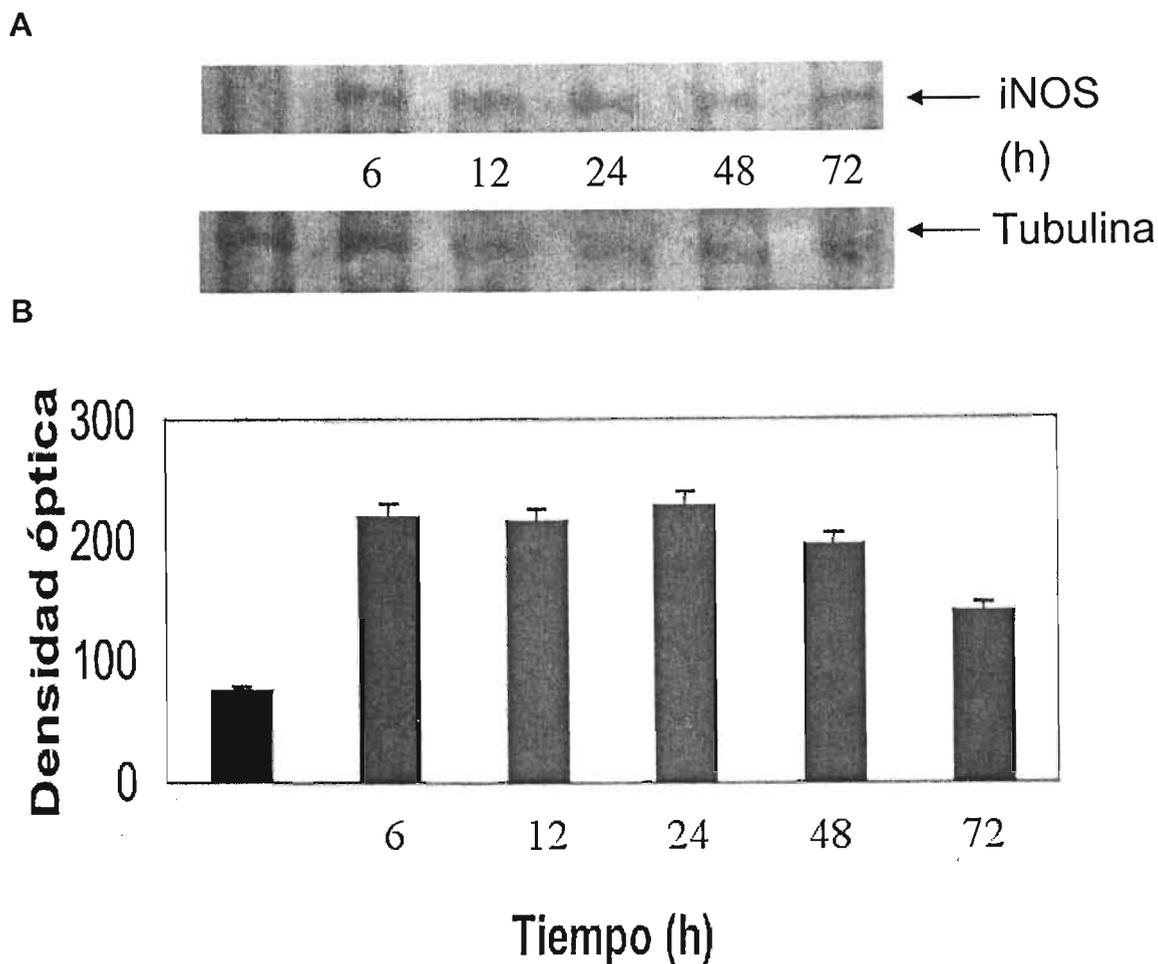
**Fig 2. Curso temporal de la producción de Nitritos en HGF tratados con LPS.** Los HGF se estimularon a diferentes tiempos con LPS (1µg/ml) y después los sobrenadantes del cultivo fueron tratados con el reactivo de Griess para determinar la acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Los resultados son la media de 3 diferentes experimentos ± SD.

### **Expresión de iNOS en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS de Aa**

Debido a que iNOS es la enzima que cataliza la producción de NO, se examinó el efecto del LPS de Aa. en la expresión de la proteína de iNOS mediante ensayos de Western blot. Después de haber estimulado las células con diferentes dosis de LPS (0.1µg/ml, 1µg/ml y 5µg/ml) por 24 h. se detectó la expresión de la proteína de iNOS a la concentración inicial de 0.1µg/ml. La expresión de iNOS aumentó a la concentración de 1µg/ml y permaneció elevada con 5µg/ml (Fig. 3). En la fig 4 se observa el curso temporal de la expresión de iNOS inducida por 1µg/ml de LPS. La expresión de iNOS se detectó a las 6h. de tratamiento después de lo cual la expresión parece no variar. A partir de las 48h. el nivel de la expresión de iNOS empieza a declinar y se hace evidente a las 72h. En el control, las células sin tratamiento no expresan de una manera detectable la proteína iNOS.



**Fig 3. Dosis respuesta de la expresión de iNOS en HGF tratados con LPS.** (A) Los HGF se estimularon con diferentes dosis de LPS (0.1 $\mu\text{g/ml}$ , 1 $\mu\text{g/ml}$  y 5 $\mu\text{g/ml}$ ) por 24 h. Los lisados celulares totales se analizaron por inmunoblot usando anticuerpos anti-iNOS. La membrana fue desnudada y reproada con anticuerpos anti- $\gamma$ tubulina para asegurar la misma concentración de proteína en todas las condiciones. (B) Cuantificación de la densidad óptica del inmunoblots para iNOS. Se muestra un resultado representativo de dos diferentes experimentos.

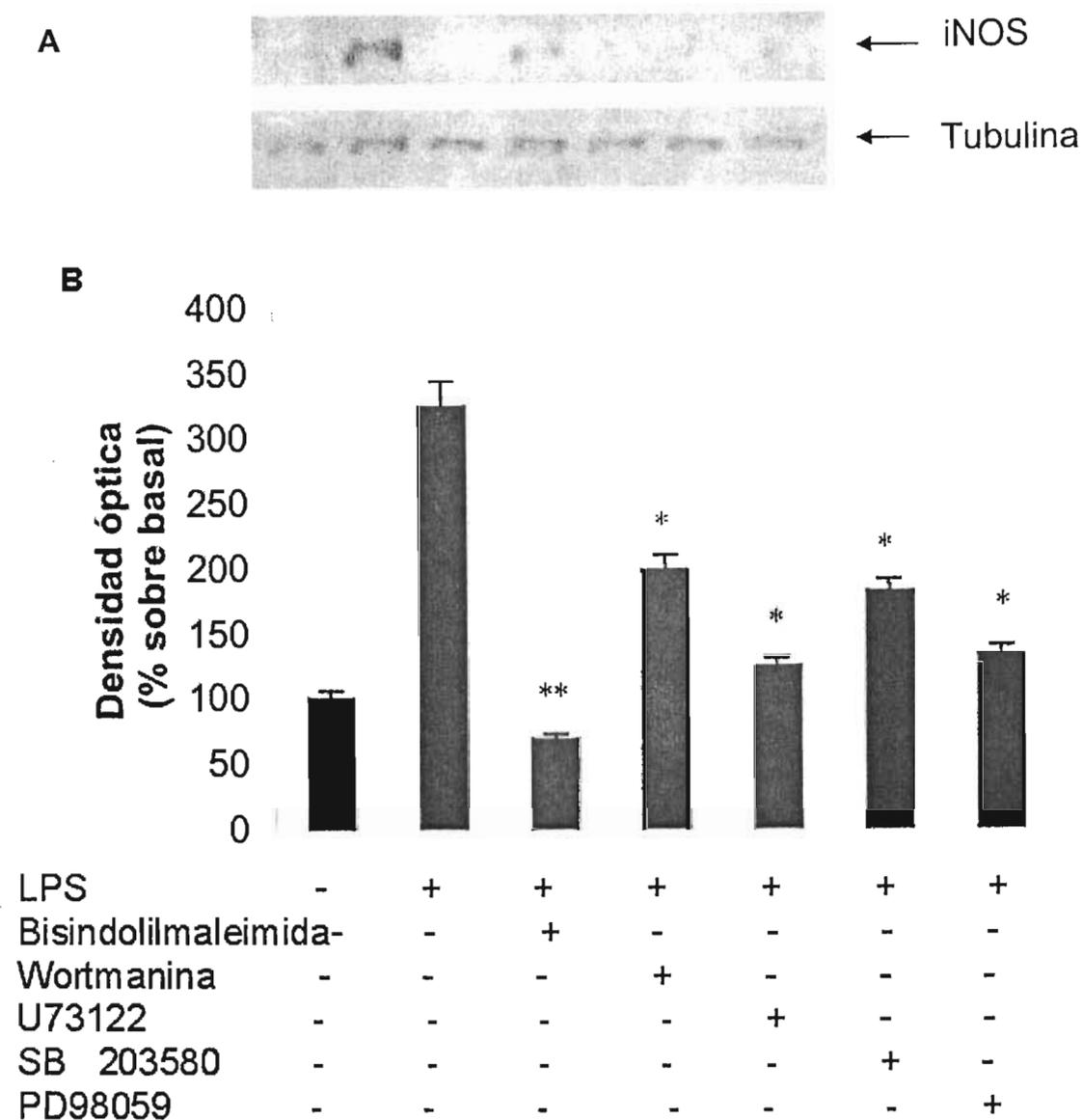


**Fig 4. Curso temporal de la expresión de iNOS en HGF tratados con LPS.** (A) Los HGF se estimularon a diferentes tiempos con LPS (1 $\mu$ g/ml). Los lisados celulares totales se analizaron por inmunoblot usando anticuerpos anti-iNOS. La membrana fue desnudada y reproblada con anticuerpos anti- $\gamma$ tubulina para asegurar la misma concentración de proteína en todas las condiciones. (B) Cuantificación de la densidad óptica del inmunoblots para iNOS. Se muestra un resultado representativo de dos diferentes experimentos.

#### **La vías de transducción involucradas en la expresión de iNOS en fibroblastos gingivales tratados con LPS de Aa.**

Para conocer de señalización involucradas en la expresión de iNOS por LPS de Aa. las células se preincubaron con concentraciones indicadas de inhibidores de PKC, PLC, PI3K y de la vía de las MAPK; ERK y p38 por 1 h. previa al tratamiento con LPS. Ensayos de Western blot se llevaron a cabo. Se observó que la expresión de la proteína de iNOS se ve atenuada por la preincubación con wortmanina, U73122, SB 203580 y PD98059 en un 38%, 62%, 44% y 59% respectivamente. Esto sugiere que las vías de PI3K, PLC y MAPK están involucradas en la expresión de iNOS al tratamiento con LPS. En adición, la

proteína cinasa C (PKC) parece estar fuertemente ligada a la expresión de iNOS, pues el inhibidor bisindolilmaleimida bloquea completamente su inducción (Fig 5).

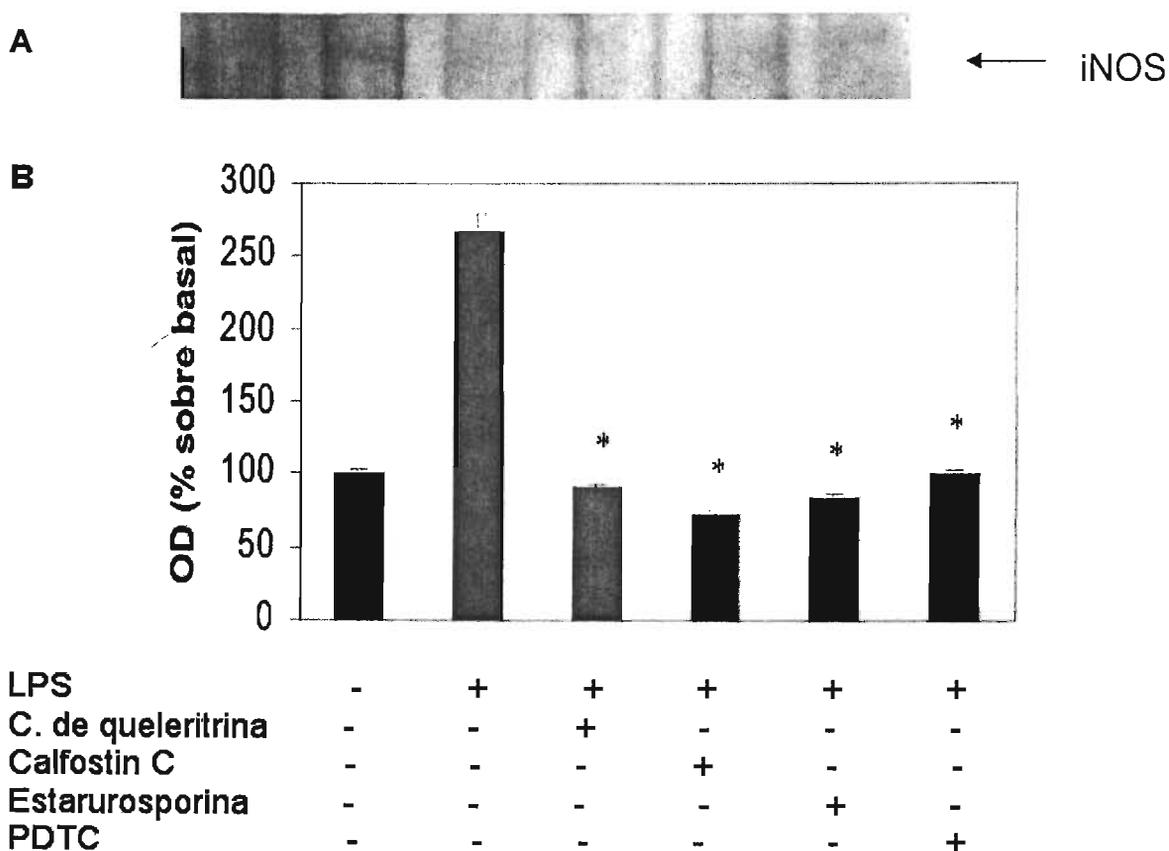


**Fig. 5 Vía de expresión de iNOS en HGF tratados con LPS de Aa.**

A) Las células se preincubaron con Bisindolilmaleimida (1 $\mu$ M), Wortmanina (50nM), U73122 (10 $\mu$ M), SB 203580 (2 $\mu$ M) o PD98059 (20 $\mu$ M) por 1h. previo al tratamiento con 1 $\mu$ g/ml de LPS por 24h. Los lisados celulares totales se analizaron por inmunoblot usando anticuerpos anti-iNOS. La membrana fue desnudada y reprobada con anticuerpos anti- $\gamma$ tubulina para asegurar la misma concentración de proteína en todas las condiciones. (B) Cuantificación de la densidad óptica del inmunoblots para iNOS. Se muestra un resultado representativo de dos diferentes experimentos. \*, \*\* indican diferencia significativa en relación al control ( $P < 0.001$ ).

**LPS de Aa produce la expresión de la proteína iNOS a través de un mecanismo dependiente de PKC y NFκB.**

A partir de que se demostró que PKC era una importante molécula en la expresión de iNOS al tratamiento con LPS de Aa en HGF, otros inhibidores de PKC fueron analizados. En el ensayo de Western blot (Fig. 6) se observa que el clorhidrato de queletrina, calfostin C y estaurosporina suprimieron la expresión de la proteína de iNOS. Con ello se confirma que la expresión de iNOS por LPS de Aa ocurre mediante un mecanismo dependiente de PKC. Además se probó si pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), un antioxidante que actúa como un inhibidor específico de la activación de NFκB, podría afectar la expresión de iNOS por LPS. Al preincubar PDTC por 1h antes del tratamiento con LPS se observa que la adición del inhibidor de NFκB marcadamente suprime la expresión de iNOS, lo que indicando que NFκB media la expresión de la proteína iNOS al tratamiento de LPS de Aa en HGF.

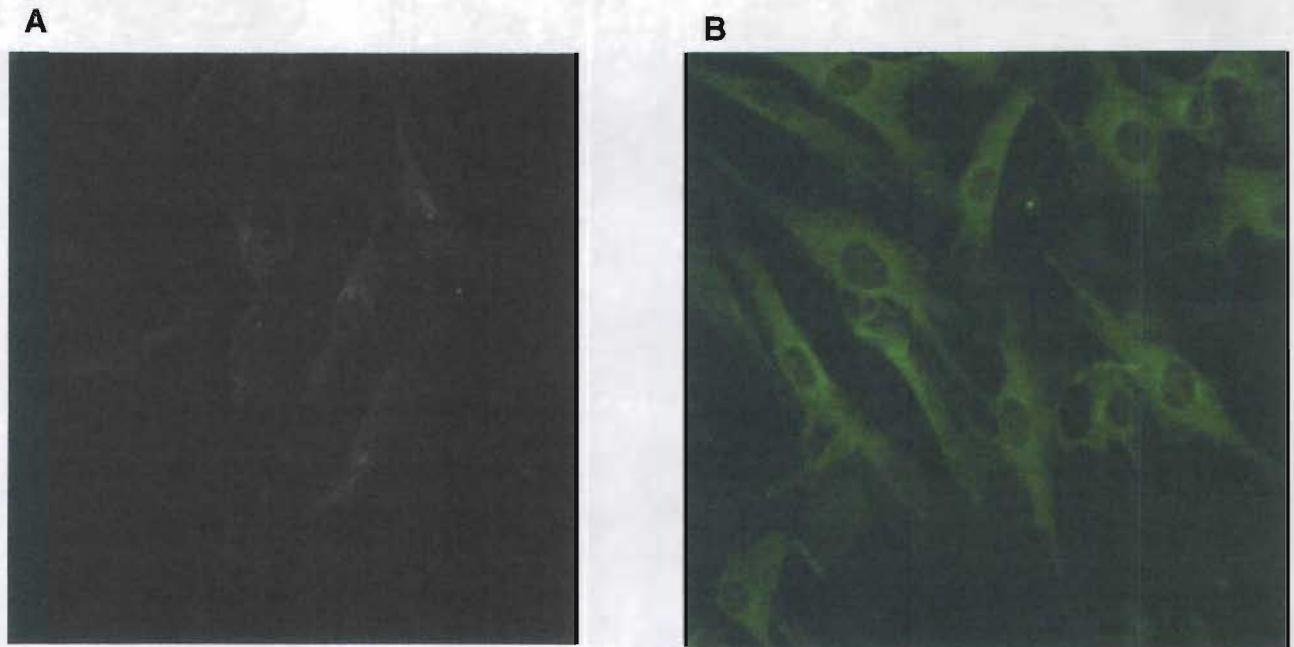


**Fig. 6. Expresión de iNOS mediante mecanismo dependiente de PKC y NFκB al tratamiento con LPS de Aa en HGF.**

A) Las células se preincubaron con C.queletrina (6μM), Calfostin C (0.5μM), Estaurosporina (0.2μM) y PDTC (100μM) por 1h previo al tratamiento con 1μg/ml de LPS por 24h. Los lisados celulares totales fueron analizados por inmunoblot usando anticuerpos anti-iNOS. La membrana fue desnudada y reprobadada con anticuerpos anti-γtubulina para asegurar la misma concentración de proteína en todas las condiciones. (B) Cuantificación de la densidad óptica del inmunoblots para iNOS. Se muestra un resultado representativo de dos diferentes experimentos. \* indican diferencia significativa en relación al control ( $P < 0,001$ ).

### Localización de la proteína iNOS en HGF tratados con LPS de Aa.

En ensayos de inmunohistoquímica (Fig. 7) se observa la proteína iNOS marcada en un 2% de las células control (panel A) mientras que en las células tratadas con 1 $\mu$ g/ml de LPS (panel B) se observa la proteína iNOS en el 100% de las células. La proteína se localiza en el citoplasma celular.



**Fig. 7 Expresión de iNOS detectada por inmunofluorescencia.**

Las células se fijaron e incubaron con anticuerpo anti-iNOS y anticuerpo anti-rabbit acoplado a fluoresceína posteriormente se visualizaron en microscopio confocal. Panel A. las células sin estimulación. Panel B. Las células estimuladas con 1 $\mu$ g/ml de LPS por 24h. Se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes.

## DISCUSIÓN

Muchos microorganismos colonizan las superficies de animales y plantas. En algunos casos la interacción entre el huésped y los microorganismos es benéfica pero en otros los microorganismos patógenos, han desarrollado mecanismos para cruzar las barreras de los tejidos. El reconocimiento por parte del huésped a la invasión microbiana promueve una respuesta inflamatoria a través de la secreción de componentes antimicrobianos y del reclutamiento de células fagocíticas como macrófagos y neutrófilos. Esta respuesta inicial a la presencia de patógenos es llamada inmunidad innata (97). Los avances en la caracterización molecular de la respuesta del huésped ha revelado que la regulación de dicha respuesta puede ocurrir en diferentes sitios en el periodonto, o por diferentes mecanismos, ninguno de los cuales es mutuamente excluyente. Tanto bacterias gram-positivas como gram-negativas presentan moléculas que son identificadas por el huésped, son capaces de generar mediadores inflamatorios específicos en el tejido periodontal y el huésped tiene mecanismos específicos para identificar estas moléculas y los mediadores liberados. Esta constante interacción crea un "diálogo molecular" entre la bacteria y el huésped, que difiere en enfermedad y salud. La condición del huésped, si está sano o enfermo, está establecido a través de la interacción de bacteria y tejido del huésped, involucrándose tanto moléculas de reconocimiento como regulación del sistema inmune innato.

En la base del criterio de Socransky, varias bacterias han sido estudiadas a detalle como periodontopatógenos; *A. actinomycetemcomitans* fue la bacteria mayormente asociada con la periodontitis juvenil localizada y *P.gingivalis*, *B. forsythus*, *A. actinomycetemcomitans* y *Eikenella corodens* fueron las bacterias mayoritariamente presentes en la periodontitis del adulto. Posteriormente a Socransky et al. y Zambon concluyeron que tres especies bacterianas (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans*) fueron los agentes etiológicos de la periodontitis. Además de estas tres bacterias hubo evidencia de la asociación de otras bacterias en la enfermedad periodontal (*T. denticola*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Peptostreptococcus miero*s y *Streptococcus intermedius*). Aunque más de 20 especies bacterianas se han asociado con periodontitis, a la fecha solamente cuatro especies *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* y *A. actinomycetemcomitans* son asociadas consistentemente y fuertemente con el progreso de la enfermedad periodontal (98).

La presencia de bacterias periodontopatógenas y el incremento en el número de estas bacterias, indudablemente, afecta la cantidad y tipo de antígenos bacterianos que promueven una respuesta en los tejidos periodontales. Los antígenos microbianos inician y orquestan la transducción de señales celular por interacción con receptores específicos de varios tipos celulares en el tejido gingival, como es el CD14, las integrinas, TLRs, MD-2 y LBP que son capaces de inducir la expresión de mediadores inflamatorios como citocinas, prostaglandinas y óxido nítrico.

Se obtuvo más conocimiento de papel de la especificidad con el sistema de respuesta del huésped tras el descubrimiento de que los receptores TLR

reconocen diferentes componentes moleculares bacterianos como LPS, LTA, lipoproteínas, fimbrias peptidoglucanos; por lo tanto éstos activan diferentes vías de respuesta celular.

Los primeros reportes que demostraron la relación entre los receptores TLR y LPS fueron publicados en 1998 (99). Aunque inicialmente se creyó que TLR2 era el responsable de la señalización intracelular promovida por el LPS, experimentos posteriores comprobaron que una mutación en el gen de ratón *Tlr4* provocaba una hiporreactividad a LPS en dos especies de ratón, C3H/HeJ y C75BL/10ScCr. Dicha mutación resultó en la sustitución de prolina por histidina en la porción citoplasmática de la proteína TLR4 (100). La explicación del papel aparente de TLR2 vino cuando Hirschfel et al. (102) demostraron que los productos contaminantes solubles en fenol fueron los responsables de la señalización a través del receptor TLR2. Mientras que la parte libre de proteínas del LPS de enterobacterias emplearon el receptor TLR4, y se eliminó por completo la idea de la señalización de LPS a través de TLR2. Finalmente, la comparación entre las respuestas en ratones deficientes para TLR2 y TLR4, mostraron que TLR2 y TLR4 reconoce componentes de la pared celular para bacterias gram-positivas y gram-negativas, respectivamente (101).

Estudios recientes sugieren que los receptores TLR tienen un papel en la periodontitis. Hou et al. (103) examinaron la habilidad de varias bacterias orales de inducir la destrucción ósea. Ellos encontraron que aquellos ratones que fueron tratados con periodontopatógenos, la pérdida de hueso fue significativamente menor en dos cepas de ratones deficientes en TLR4 que en los controles silvestres. Más aún, este decremento fue correlacionado con la expresión reducida de citocinas de resorción ósea como IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estudios previos han reportado que las citocinas proinflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  inducen resorción ósea debido a que promueven la diferenciación de las células precursoras de osteoclastos y por ser activadores de éstas mismas células. Se ha propuesto que el lipopolisacárido de *A. actinomycetemcomitans*, estimula la liberación de IL-1 $\beta$  en leucocitos polimorfonucleares (104) y de IL-1 $\alpha$  en células de médula ósea de murinos. Además se ha reportado que el lipopolisacárido de *A. actinomycetemcomitans* favorece la supervivencia de osteoclastos por la "up" regulación y promoción de IL-1 $\alpha$ . En este modelo, parece ser que el receptor TLR4 está involucrado en la inflamación y destrucción del hueso periodontal en respuesta a una infección bacteriana.

Los fibroblastos gingivales son el tipo principal de células en el tejido conectivo gingival. Y estas células son capaces de producir producen las citocinas proinflamatorias: IL-1, IL-6 e IL-8 en respuesta a la estimulación con LPS. Por lo tanto, pensamos que los fibroblastos gingivales humanos pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la inflamación crónica en la enfermedad periodontal.

En otro orden de ideas, se sabe que existen tres isoformas de NOS. Aunque todas median la oxidación de L-arginina a L-citrulina produciendo NO, el NO formado por eNOS es responsable de mantener un tono muscular bajo y la prevención de la adhesión de leucocitos y plaquetas a la pared vascular. El NO formado por nNOS actúa como neuromodulador o neuromediador. La producción

de NO por nNOS y eNOS es baja; en cantidad de nanomoles y de corta duración, siendo controladas por agentes que movilizan  $\text{Ca}^{2+}$  de una manera transitoria y altamente controlada (105,106). En contraste, iNOS no requiere de  $\text{Ca}^{2+}$  para iniciar su actividad, la inducción de iNOS en presencia de L-arginina son suficientes para iniciar la generación de NO en macrófagos, monocitos y otras células estimuladas con citocinas proinflamatorias,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  o IL-1. Aunque el inductor mejor conocido es el LPS. La síntesis de NO ocurre en grandes cantidades (macromolar) y es regulada a diferentes niveles. La producción de NO por iNOS ocurre de manera retardada después de la estimulación, pero una vez inducida es activo por períodos tan largos como 5 días. El retraso entre la estimulación y la generación enzimática de NO podría ser debida al requerimiento *de novo* síntesis de cofactores para una actividad máxima (107).

La complejidad de los efectos biológicos de NO es una consecuencia de su naturaleza, de la concentración, de la célula blanco que lo produce y de las interacciones con otras moléculas.

Se sabe que la inducción de la expresión de iNOS y la producción de NO ocurre en varios tipos celulares como eosinófilos (108), macrófagos (109) y, en diferentes órganos como corazón e hígado (110) en respuesta a una gran variedad de citocinas y LPS.

La sobreexpresión de iNOS y sobreproducción de NO por iNOS, se asocia a desordenes como shock séptico, artritis reumatoide y enfermedades de tipo crónico como tuberculosis. En esta investigación, se demostró que el LPS de *Aa* promueve en fibroblastos gingivales humanos la expresión de iNOS y la producción de NO.

Está bien establecido que en la vía de transducción propuesta para la expresión iNOS en macrófagos, el receptor CD14 y TLR4 están involucrados en respuesta a LPS (111).

La activación por LPS de fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC) y fosfatidilcolina-fosfolipasa C (PC-PLC) juegan un importante papel en la regulación de funciones celulares. La estimulación de PI-PLC por LPS puede producir dos segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). DAG y  $\text{IP}_3$ , activan PKC y liberan  $\text{Ca}^{2+}$  de los compartimentos intracelulares, respectivamente, en una gran variedad de células. Se ha propuesto que la estimulación con LPS e  $\text{INF-}\gamma$  de la producción de NO en astrocitos resulta en la activación de PC-PLC pero no de PI-PLC, la cual provee una fuente de DAG para la activación de PKC, requerida para la inducción de iNOS (112). En este estudio, sin embargo, se observó que el inhibidor de PI-PLC, U73122, afectó la expresión de iNOS. Con esto, se sugiere que en HGF tratados con LPS la expresión de iNOS, es mediada por un mecanismo diferente al observado en astrocitos, donde PI-PLC sí está involucrado.

La activación de la vía de PI3K juega un papel crucial en la expresión de iNOS en células del musculo liso (113). Se demostró en este estudio, que la expresión de iNOS es sensible al inhibidor wortmanina sugiriéndose que la activación de PI3K está involucrada en la transducción de la señal para la expresión de iNOS inducida por LPS de *Aa* en HGF. En monocitos humanos y en otros tipos celulares, LPS activa PI3K, quien a su vez estimula la proteína cinasa

PKC. En experimentos de cotransfección de células RAW 264.7 con un plásmido que codifica una PKC $\zeta$  constitutivamente activa y un plásmido que contiene el promotor de iNOS, se observa un importante actividad del promotor de iNOS (114). En este estudio, los inhibidores de PKC (Bisindolilmaleimida, c. queleritrina, calfostin C y estaurosporina) completamente suprimieron la inducción de la enzima. Lo que se sugiere que PKC es estrictamente necesaria para la inducción de iNOS en HGF estimulados con LPS de *Aa*. Nosotros creemos, que la inducción de iNOS a través de PKC puede ser mediante PI-PLC y la vía de PI3K.

Estudios previos han demostrado que la activación de p38 MAPK está involucrada en la expresión de mediadores inflamatorios como prostaglandina E<sub>2</sub> por LPS (116). Se sabe que el piridinil imidazol (SB 203580) es un inhibidor específico de p38 MAPK, y que hasta una concentración de hasta 100 $\mu$ M no afecta la actividad de otras cinasas, incluidos los otros miembros de las familia de las MAPK (117). En el presente estudio SB 203580 se usó para inhibir la expresión de iNOS mediada por LPS de *Aa*. y los resultados sugieren que p38 MAPK forma parte de la vía de señalización para la expresión de esta enzima. Como Kim et al. (118) encontraron que, en adición a SB 203580, el inhibidor de ERK 1/2 PD98059 tiene efecto en la disminución en la producción de NO por LPS, se quizá probar el efecto de PD98059 en la expresión de iNOS en nuestro tipo celular y se confirmó que ERK1/2 forma parte de la vía para la expresión de iNOS al tratamiento con LPS concluyendo que ambas MAPKs: p38 y ERK 1/2, juegan un papel en la señalización para la expresión de la enzima de iNOS en los HGF.

NF $\kappa$ B actúa como un regulador positivo en la expresión de genes involucrados en la enfermedad inflamatoria crónica. NF $\kappa$ B es un heterodímero compuesto por dos subunidades Rel A p50 y p65, las cuales existen en el citoplasma como un complejo inactivo unido a proteínas I $\kappa$ B. Generalmente la activación de NF $\kappa$ B involucra la fosforilación de I $\kappa$ B lo que produce su ubiquitinación y su degradación. Este evento permite a NF $\kappa$ B traslocarse al núcleo donde activa la transcripción de genes (119-121). El NF $\kappa$ B es un factor de transcripción que ha sido considerablemente involucrado en la respuesta celular a LPS. Se sabe que el NF $\kappa$ B es crucial para la inducción de iNOS por LPS en macrófagos (83) Casado et. al. (122) concluyeron que en hepatocitos, la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  resulta en la activación de NF $\kappa$ B y la expresión de iNOS. En este estudio, se observó que PDTC, inhibidor de NF $\kappa$ B, suprime la expresión de iNOS por LPS de *Aa*. En adición, se sabe que inhibidores de PKC (Ro 31-8220 y calfostin C) inhiben la formación del complejo de DNA-proteína de NF $\kappa$ B y que además PKC $\zeta$  es un activador de NF $\kappa$ B *in vitro*. Un mecanismo por el cual PKC $\zeta$  puede mediar la actividad transcripcional es mediante la vía de las MAPKs (115). En este estudio sugerimos que las MAPK; p38 y ERK 1/2 se encuentran upstream de la traslocación de NF $\kappa$ B al núcleo y downstream de PKC en la cascada de señalización para la expresión de iNOS activada por LPS de *Aa* en HGF (123).

La inducción de iNOS y el incremento en la liberación de NO en HGF son respuestas celulares elucidadas por estimulación del LPS de *A. actinomycetemcomitans* en HGF. El conocer las vías de transducción que se activan para estas respuestas celulares es un importante paso para entender los

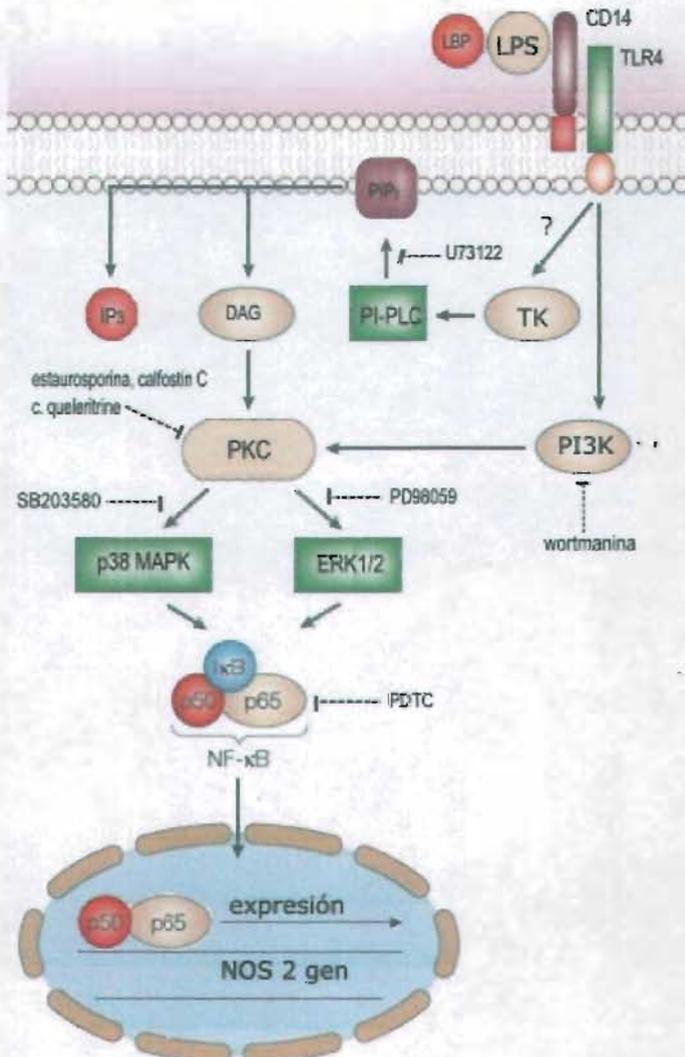
mecanismos del daño del tejido periodontal en presencia de moléculas como el LPS de bacterias periodontopatógena y en el futuro diseñar estrategias terapéuticas para reducir el riesgo a la enfermedad.

## CONCLUSIONES

Se puede concluir con esta investigación que:

- El LPS de *A. actinomycetemcomitans* ejerce un efecto en el incremento de la producción de óxido nítrico y la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa en fibroblastos gingivales humanos de manera curso temporal y dosis respuesta.
- PKC y la activación de NF $\kappa$ B median la expresión de iNOS en estas células por efecto del LPS de *A. actinomycetemcomitans*.
- La expresión de iNOS es regulada por la vía de PI-PLC, PI3K y las MAPKs.

El esquema 1 representa un modelo para la vía de transducción implicada en la expresión de iNOS y producción de NO en fibroblastos gingivales humanos por el LPS de *Aa*. Nosotros sugerimos que talvez el LPS de *A. actinomycetemcomitans* activa a PKC a través de PI-PLC y PI3K para activar a p38 MAPK y ERK 1/2, quien en turno promueven la traslocación de NF $\kappa$ B al núcleo, induciendo la expresión de iNOS y la producción de NO.



Esquema 1. Vía de transducción para iNOS en fibroblastos gingivales humanos tratados con LPS de *Aa*

## REFERENCIAS

1. Armitage, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-6.
2. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. and Kent, R.L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-144.
3. Page, R.C. and Schroeder, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976;34(3):235-249.
4. Tonetti, M.S., Imboden, M.A. and Lang, N.P. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol.* 1998;69(10):1139-1147.
5. Tonetti, M.S., Imboden, M.A., Gerber, L., Lang, N.P., Laissue, J. and Mueller, C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun.* 1994;62(9):4005-4014.
6. Uchiumi, D., Kobayashi, M., Tachikawa, T. and Hasegawa, K. Subcutaneous and continuous administration of lipopolysaccharide increases serum levels of triglyceride and monocyte chemoattractant protein-1 in rats. *J Periodontal Res.* 2004;39(2):120-128.
7. Gronert, K., Kantarci, A., Levy, B.D., Clish, C.B., Odparlik, S., Hasturk, H., Badwey, J.A., Colgan, S.P., Van Dyke, T.E. and Serhan, C.N. A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. *J Immunol.* 2004;172(3):1856-1861.
8. Tlaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Kozakova, H., Rossmann, P., Bartova, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovska, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P. and Kokesova, A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett.* 2004;93(2-3):97-108.
9. Kinane, D.F. Etiology and pathogenesis of periodontal disease. *Ann R Australas Coll Dent Surg.* 2000;15:42-50.
10. Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. The nature of periodontal diseases. *Ann Periodontol.* 1997;2(1):3-10.
11. Caldwell, D.E. The calculative nature of microbial biopelículas and bioaggregates. *Int Microbiol.* 2002;5(3):107-116.
12. Ohta, H., Kato, K., Kokeguchi, S., Hara, H., Fukui, K. and Murayama, Y. Nuclease-sensitive binding of an *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin to the bacterial cell surface. *Infect Immun.* 1991;59(12):4599-4605.
13. Smalley, J.W., Birss, A.J., Percival, R. and Marsh, P.D. Temperature elevation regulates iron protoporphyrin IX and hemoglobin binding by *Porphyromonas gingivalis*. *Curr Microbiol.* 2000;41(5):328-335.
14. Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., Watson, G.K. and Allison, C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biopelícula oral microbial communities during aeration. *Infect Immun.* 1998;66(10):4729-4732.
15. Shibly, O., Rifai, S. and Zambon, J.J. Supragingival dental plaque in the etiology of oral diseases. *Periodontol 2000.* 1995;8:42-59.

16. Listgarten, M.A. The structure of dental plaque. *Periodontol* 2000. 1994;5:52-58
17. Genco, R., Hamada, S., Lehner, T., McGhee, J. and Mergenhagen, S., *Molecular Pathogenesis of Periodontal Disease*. Ed. ASM Press. USA. 1994. p.p. 455.
18. Perry, M.B., MacLean, L.M., Brisson, J.R. and Wilson, M.E. Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycescomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur J Biochem*. 1996;242(3):682-688.
19. Kaplan, J.B., Perry, M.B., MacLean, L.L., Furgang, D., Wilson, M.E. and Fine, D.H. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycescomitans* serotype f. *Infect Immun*. 2001;69(9):5375-5384.
20. Ebersole, J.L., Kesavalu, L., Schneider, S.L., Machen, R.L. and Holt SC Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. *Oral Dis*. 1995;1(3):115-128.
21. Ling, T.Y., Sims, T.J., Chen, H.A., Whitney, C.W., Moncla, B.J., Engel, L.D., and Page, R.C. Titer and subclass distribution of serum IgG antibody reactive with *Actinobacillus actinomycescomitans* in localized juvenile periodontitis. *J Clin Immunol*. 1993;13(2):101-112
22. Wilson, M.E. and Hamilton, R.G. Immunoglobulin G subclass response of localized juvenile periodontitis patients to *Actinobacillus actinomycescomitans* Y4 lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1992;60(5):1806-1812.
23. Mangan, D.F., Taichman, N.S., Lally, E.T. and Wahl, S.M. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycescomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect Immun*. 1991;59(9):3267-3272.
24. O'Brien-Simpson, N.M., Veith, P.D., Dashper, S.G. and Reynolds, E.C. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol* 2000. 2004;35:101-
25. Guha, M. and Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signalling* 2001;13:85-94.
26. Schromm, A.B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Moran, A.P., Koch, M.H., Rietschel, E.T. and Seydel, U. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem*. 2000;267(7):2008-2013.
27. Masoud, H., Weintraub, S.T., Wang, R., Cotter, R and Holt, S.C. Investigation of the structure of lipid A from *Actinobacillus actinomycescomitans* strain Y4 and human clinical isolate PO 1021-7. *Eur J Biochem*. 1991;200(3):775-781.
28. Victor, V.M., Rubio, D. and De la Fuente, M. Comparative study of several lymphocyte functions in two strains of mice with different models of endotoxic shock. *Physiol Res*. 2002;51(3):291-298.
29. Schumann, R.R., Leong, S.R., Flagg, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D. JC Mathison, J.C., Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 1990;249:1429-1431.
30. Juan, T.S.C., Hailman, E., Kelley, M.J., Busse, L.A., Davy, E., Empig, C.J, Narhi, L.O., Wright, S.D., and Lichenstein, H.S. Identification of a lipopolysaccharide binding domain in CD14 between amino acids 57 and 64. *J. Biol. Chem*. 1995; 270:5219-5224.

31. Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. and Mathison, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249:1431-1433.
32. Ferrero, E., Jiao, D., Tsuberi, B.Z., Tesio, L., Rong, G.W., Haziot, A. and Goyert, S.M. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90:2380-2384.
33. Hashimoto, C., Hudson, K.L. and Anderson, K.V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988;29;52(2):269-279.
34. Belvin, M.P. and Anderson, K.V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:393-416.
35. Dobrovolskaia, M.A. and Vogel, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* 2002;4(9):903-914.
36. Miyake, K., Yamashita, Y., Ogata, M., Sudo, T. and Kimoto, M. RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J. Immunol.* 1995;154:3333-3340.
37. Medzhitov, R. and Janeway, Jr. C.A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997;91:295-298.
38. Dixon, D.R., Bainbridge, B.W. and Darveau, R.P. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol 2000.* 2004;35:53-74.
39. Palsson-McDermott, E.M. and O'Neill, L.A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 2004;113(2):153-162.
40. Dunne, A., Ejdeback, M., Ludidi, P.L., O'Neill, L.A. and Gay, N.J. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem.* 2003;278(42):41443-41451.
41. Durando, M.M., Meier, K.E. and Cook, J.A. Endotoxin activation of mitogen-activated protein kinase in THP-1 cells; diminished activation following endotoxin desensitization. *J.Leukoc. Biol.* 1998;64(2):259-264.
42. Reimann, T., Buscher, D., Hipskind, R.A., Krautwald, S., Lohmann-Matthes M,L. and Baccarini M. Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 beta and the TNF-alpha genes. *J. Immunol.* 1994;153(12):5740-5749.
43. Scherle, P.A., Jones, E.A., Favata, M.F., Daulerio, A.J., Covington. M.B., Nurnberg, S.A., Magolda, R.L. and Trzaskos, J.M.,. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J. Immunol.* 1998;161(10):5681-5686.
44. Hambleton, J., Weinstein, S.L., Lem, L. and DeFranco, A.L. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93(7):2774-2778.
45. Roux, P.P. and Blenis, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004(2):320-344.
46. Saklatvala, J., Dean, J. and Clark, A. Control of the expression of inflammatory response genes. *Biochem Soc Symp.* 2003;(70):95-106.

47. Li, X., Tupper, J.C., Bannerman, D.D., Winn, R.K., Rhodes, C.J. and Harlan, J.M. Phosphoinositide 3 kinase mediates Toll-like receptor 4-induced activation of NF-kappa B in endothelial cells. *Infect Immun.* 2003;71(8):4414-4420.
48. Carpenter, C.L. and Cantley, L.C. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(2):153-158.
49. Diaz-Guerra, M.J., Bodelon, O.G., Velasco, M., Whelan, R., Parker, P.J. and Bosca L. Up-Regulation of Protein Kinase C-epsilon Promotes the Expression of Cytokine-inducible Nitric Oxide Synthase in RAW 264.7 Cells. *J Biol Chem.* 1996;271(50):32028-32033.
50. Toker, A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol.* 2000;57(4):652-658.
51. Sweet, M.J. and Hume, D.A. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 1996;60(1):8-26.
52. Kwon, N.S., Nathan, C.F., Gilker, C., Griffith, O.W., Matthews, D.E. and Stuehr DJ. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J Biol Chem.* 1990;265(23):13442-13445.
53. Bredt, D.S., Ferris, C.D. and Snyder, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem.* 1992;267(16):10976-10981.
54. Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D. and Nathan, C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 1992;176(2):599-604.
55. Lores-Arnaiz, S., D'Amico, G., Czerniczyniec, A., Bustamante, J. and Boveris, A. Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430(2):170-177.
56. Sennequier, N. and Stuehr, D.J. Analysis of substrate-induced electronic, catalytic, and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry.* 1996;35(18):5883-5892.
57. Lefevre-Groboillot, D., Frapart, Y., Desbois, A., Zimmermann, J.L., Boucher, J.L., Gorren, A.C., Mayer, B., Stuehr, D.J. and Mansuy, D. Two modes of binding of N-hydroxyguanidines to NO synthases: first evidence for the formation of iron-N-hydroxyguanidine complexes and key role of tetrahydrobiopterin in determining the binding mode. *Biochemistry.* 2003;42(13):3858-3867.
58. Gorren, A.C., Kungl, A.J., Schmidt, K., Werner, E.R. and Mayer, B. Electrochemistry of pterin cofactors and inhibitors of nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2001;5(2):176-186
59. Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593-615.
60. Spink, J., Cohen, J. and Evans, T.J. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* 1995;270(49):29541-29547.
61. Hurshman, A.R. and Marletta, M.A. Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer *Biochemistry.* 2002;41(10):3439-3456.

62. Dil, N. and Qureshi, M.A Involvement of lipopolysaccharide related receptors and nuclear factor kappa B in differential expression of inducible nitric oxide synthase in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002;88(3-4):149-161.
63. Rao, M. Molecular mechanism regulating iNOS expresión in various cell types. *J. Toxicol Environ. Health B Crit Rev.* 3 2000;27-58.
64. Kim, S.H., Kim, J. and Sharma, R.P. Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacol. Res.* 2004;49(5):433-439.
65. Bhat, N.R., Feinstein, D.L., Shen, Q. and Bhat, A.N. p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J. Biol. Chem.* 2002;277(33):29584-29592.
66. Kim, S.H., Kim, J. and Sharma, R.P. Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacol Res.* 2004;49(5):433-439.
67. Chan, E.D. and Riches, D.W. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001;280(3):441-450.
68. Hattori, Y., Hattori, S. and Kasai, K. Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;481(2-3):153-158.
69. Salh, B., Wagey, R., Martota, A., Tao, J.S. and Pelech, S. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production. *J Immunol.* 1998;161(12):6947-6954.
- dis76.
70. Lee, J.K., Choi, S.S., Won, J.S. and Suh, H.W. The regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in C6 cells: involvement of AP-1 and NFkappaB. *Life Sci.* 2003;73(5):595-609.
71. Kim, Y.H., Woo, K.J., Lim, J.H., Kim, S., Lee, T.J., Jung, E.M., Lee, J.M., Park, J.W. and Kwon, T.K. 8-Hydroxyquinoline inhibits iNOS expression and nitric oxide production by down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB and C/EBPbeta in Raw 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329(2):591-597.
72. Won, J.S., Im, Y.B., Singh, A.K. and Singh I. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(11):1834-1844.
73. Madrigal, J.L., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bosca, L., and Leza, J.C. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J. Neurochem.* 2001;76(2):532-538.

74. Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Zinder, S.H., Russell, S.W. and Murphy, W.J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(20):9730-9734.
75. Taylor, B.S., de Vera, M.E., Ganster, R.W., Wang, Q., Shapiro, R.A., Morris, S.M. Jr, Billiar, T.R. and S  ller, D.A. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1998 ;273(24):15148-15156.
76. Aktan, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004;75(6):639-653.
77. Bosca, L. and Hortelano, S. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal*. 1999;11(4):239-244.
78. Kolios, G., Valatas, V., Ward, S.G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*. 2004;113(4):427-437.
79. Wink, D.A., Grisham, M.B., Mitchell, J.B. and Ford, P.C. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol*. 1996;268:12-31.
80. Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-142.
81. Grisham, M.B., Jourd'Heuil, D. and Wink, D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol*. 1999;276:315-321.
82. Nitesh, N. y William, M.D., Nitric Oxide, Oxygen, and Superoxide Formation and Consumption in Macrophage Cultures. *Chem. Res. Toxicol*. 2005, 18, 486-493
83. Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K. and Schwarz, P.M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. 2004;500:255-266.
84. Petrov, T., Underwood, B.D., Braun, B., Alousi, S.S. and Rafols, J.A. Upregulation of iNOS expression and phosphorylation of eIF-2alpha are paralleled by suppression of protein synthesis in rat hypothalamus in a closed head trauma model. *J Neurotrauma*. 2001;18(8):799-812.
85. Musial, A. and Eissa, N.T. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(26):24268-24273.
86. Walker, G., Pfeilschifter, J., Otten, U. and Kunz, D. Proteolytic cleavage of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by calpain I. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1568(3):216-224.
87. Blasko, E., Glaser, C.B., Devlin, J.J., Xia, W., Feldman, R.I., Polokof, M.A, Phillips, G.B., Whitlow, M., Auld, D.S., McMillan, K., Ghosh, S., Stuehr, D.J., and Parkinson, J.F. Mechanistic studies with potent and selective inducible nitric-oxide synthase dimerization inhibitors. *J Biol Chem*. 2002;277(1):295-302.
88. Mori, M., Gotoh, T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr*. 2004;134:2820S-2825S
89. Nicholson, B., Manner, C.K., Kleeman, J, MacLeod, C.L. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J Biol Chem*. 2001;276(19):15881-15885.
90. Watts, R.N., Ponka, P., Richardson, D.R. Effects of nitrogen monoxide and carbon monoxide on molecular and cellular iron metabolism: mirror-image effector molecules that target iron. *Biochem J*. 2003;369(Pt 3):429-440.

91. McDonald, J.K., Taylor, C.M. and Rafferty, S. Design, preparation, and characterization of mixed dimers of inducible nitric oxide synthase oxygenase domains. *Protein Expr Purif.* 2003;27(1):115-127.
92. Pan, J., Burgher, K.L., Szczepanik, A.M. and Ringheim, G.E. Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase: implications for potential post-translational regulation. *Biochem J.* 1996;314:889-894.
93. Slots, J., Reynolds, H.S. and Genco, R.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect. Immun.* 1980 Sep; 1013-1020.
94. Murria, D.A. y Wilton JM. Lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* prevents apoptosis of HL60-derived neutrophils in vitro. *Infect. Immun.* 2003;71(12):7232-7235.
95. Matejka, M., Ulm, C., Partyka, L., Ulm, M. and Sinzinger, H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontitis. *Adv Exp Med Biol.* 1999;469:419-424.
96. Steinsvoll, S., Helgeland, K. y Schenck, K. Mast cells--a role in periodontal diseases?. *J. Clin. Periodontol.* 2004;31(6):413-419.
97. Miller, S.I., Ernst, R.K. and Bader, M.W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):36-46.
98. Nishihara, T. and Koseki, T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2004;36:14-26.
99. Kirschning, C.J., Wesche, H, Merrill, A.T. and Rothe, M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial LPS. *J. Exp. Med.* 1998;188:2091-2097.
100. Poltorak, A., He, X., Smirnova I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E. Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton B. and Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL10/ScCr mice: mutation in *Tlr4* gene. *Science.* 1998;282:2085-2088.
101. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.* 1999;162(7):3749-3752.
102. Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J.H., Vogel, S.N. and Weis, J.J. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 2000;165(2):618-622.
103. Hou, L., Sasaki, H. and Stashenko, P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. *Infect Immun.* 2000;68(8):4681-4687.
104. Yoshimura, A., Hara, Y., Kaneko, T. and Kato, I. Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* 1997;32(3):279-286.
105. Ignarro, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53:503-514.
106. Connelly, L., Madhani, M., and Hobbs, A. J. Resistance to Endotoxic Shock in Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Knock-out Mice. *J Biol Chem* 2005;280:10040-10046.
107. Thomas, M. and Olivier, F. Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and

Why?. *J. Clin. Invest.* 1997;100(9):2146–2152

108. Paoliello-Paschoalato, A.B., Oliveira, S.H. and Cunha, F.Q. Interleukin 4 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in eosinophils. *Cytokine*. 7;30(3):116-124.

109. Fonseca, S.G., Romao, P.R., Figueiredo, F., Morais, R.H., Lima, H.C., Ferreira, S.H. and Cunha, F.Q. TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol.* 2003;33(8):2297-2306.

110. Lee, C.C., Lin, N.T., Hsu, Y.H. and Chen, H.I. Inducible nitric oxide synthase inhibition potentiates multiple organ dysfunction induced by endotoxin in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45(5):396-403.

111. Dil, N. and Qureshi, M.A. Involvement of lipopolysaccharide related receptors and nuclear factor kappa B in differential expression of inducible nitric oxide synthase in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;88(3-4):149-161.

112. Sands, W.A., Clark, J.S. and Liew, F.Y. The role of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C in the production of diacylglycerol for nitric oxide synthesis in macrophages activated by IFN-gamma and LPS. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199(2):461-466.

113. Hattori, Y., Hattori, S. and Kasai, K. Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation. *Eur J Pharmacol.* 2003 ;481(2-3):153-158.

114. Herrera-Velitz, P., Knutson, K.L. and Reiner, N.E. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of protein kinase C-zeta in bacterial lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(26):16445-16452.

115. Schonwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J. and Parker, P.J. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol.* 1998;18(2):790-798.

116. Gutierrez-Venegas, G., Maldonado-Frías, S., Ontiveros-Granados, A. y Kawasaki-Cardenas, P. Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sciences.* 2005;77:60–73.

117. Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R. and Lee, J.C. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 1995;364(2):229-233.

118. Kim, S.H., Kim, J. and Sharma, R.P. Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacol Res.* 2004;49(5):433-439.

119. Karin, M. and Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:621-663.

120. O'Connell, M.A., Bennett, B.L., Mercurio, F., Manning, A.M. and Mackman N. Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30410-30414.

121. Fischer, C., Page, S., Weber, M. Eisele, T., Neumeier, D. and Brand, K. Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic I $\kappa$ B kinase signalsome activation and I $\kappa$ B proteolysis. *J. Biol Chem.* 1999;274(35):24625-24632.
122. Casado, M., Diaz-Guerra, M.J., Bosca, L. and Martin-Sanz, P. Differential regulation of nitric oxide synthase mRNA expression by lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines in fetal hepatocytes treated with cycloheximide. *Biochem. J.* 1997;327:819-823.
123. Chen, C.C., Wang, J.K., Chen, W.C. and Lin, S.B. Protein kinase C  $\epsilon$  mediates lipopolysaccharide-induced nitric-oxide synthase expression in primary astrocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(31):19424-19430.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Carla Pothillo

FECHA: 26. Sept. 05

FIRMA: [Signature]

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

1380300