



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

LOS FLAVONOIDES INHIBEN CASCADAS DE FOSFORILACIÓN EN
FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS ESTIMULADOS CON ÁCIDO
LIPOTEICOICO.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANA DENTISTA.

PRESENTA.

RAMÍREZ MARTÍNEZ MARY CARMEN.

TUTORA:

DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.



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.



La tesis titulada “LOS FLAVONOIDES INHIBEN CASCADAS DE FOSFORILACIÓN EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS ESTIMULADOS CON ÁCIDO LIPOTEICOICO”. SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNAM. BAJO LA TUTORÍA DE LA DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS Y LA ASESORÍA DE LA CD. SILVIA MALDONADO FRÍAS.

EL PRESENTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN FUE FINANCIADO POR PAPIIT IN206806-3.

MARY CARMEN RAMÍREZ MARTÍNEZ. _____
SUSTENTANTE.

GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS. _____
TUTORA.

México 2006.

AGRADECIMIENTO.

A la FACULTAD DE ODONTOLOGIA por darnos la oportunidad de adentrarnos al mundo fascinante de la odontología por su ciencia, su arte y a nuestros pacientes.

Mi reconocimiento cada uno de mis profesores porque sin ellos jamás hubiese aprendido las cosas maravillosas de la Odontología. Gracias a usted Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, por dedicarme parte de su valioso tiempo, por sus conocimientos profesionales.

DEDICATORIA.

Dios todopoderoso, este triunfo
en mi vida es tuyo.

gracias te doy...Señor

A mí amada Familia por enseñarme a apreciar y a valorar la vida, por ser
siempre mí apoyo, mí fuerza, por sus consejos y su amor.

La lista de agradecimientos sería muy larga por lo que:
no quiero dejar de agradecer a todas y todos mis amigos, Que omitiré nombrar
para no dejar a nadie fuera y uno antes de otro, en verdad muchas gracias por
estar aquí conmigo, por haberme permitido conocerlos (as) y aprender a su
lado ha sido un gran placer.

ÍNDICE

Abreviaturas	6
Resumen.....	7
Introducción.....	8
Antecedentes.....	11
Periodonto.....	15
Características Macroscópicas.....	16
Características Estructurales.....	18
Elementos Celulares.....	20
Características Microscópicas.....	21
Enfermedad Periodontal.....	24
Clasificación de la Enfermedad Periodontal.....	25
Gingivitis.....	29
Periodontitis.....	31
Placa dentobacteriana.....	33
Placa supragingival.....	34
Placa subgingival.....	35
Ácido Lipoteicoico.....	36
Receptores de los LTA.....	38
Señales Celulares.....	40
Vías de Transducción.....	41
Vía MAP.....	44
Flavonoides.....	46
Propiedades Antioxidantes.....	48
Acción Prooxidante.....	50
Propiedades Anticancerosas.....	51
Luteína.....	52
Quercetina.....	53
Cempasúchil.....	55
Genisteina.....	57
Planteamiento del Problema.....	60
Hipótesis.....	61
Material y Métodos.....	62
Experimentos.....	64
Análisis de Resultados.....	65
Discusión.....	69
Conclusiones.....	72
Bibliografía.....	74

ABREVIATURAS.

LPS, Lipopolysaccharide.

ERK, Extracellular stress-related kinase.

IL-6, Interleucina -6.

JNK, c-Jun N-terminal kinase.

LTA, Lipoteichoic acid.

MAPK, Mitogen-activated protein kinase.

MEK, Mitogen-activated protein kinase/extracellular stress-related kinase.

NF- κ B, nuclear factor κ B.

TLR, Toll-like receptor.

TNF, Tumor necrosis factor.

Ab, Antibody; mAb, monoclonal antibody.

FCS, Fetal calf serum.

DTT, Dithiothreitol.

PBS, Phosphate-buffered saline.

BSA, Bovine serum albumin.

RESUMEN.

Objetivo: El objetivo del estudio es identificar efecto de los flavonoides sobre las acciones del ácido lipoteicoico en fibroblastos gingivales humanos sanos.

Métodos y Experimentos: Las muestras de fibroblastos gingivales humanos se obtuvieron de encías de pacientes clínicamente sanos, que acudieron a la clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología. Se realizaron experimentos de tipo dosis respuesta y curso temporal para ácido lipoteicoico y flavonoides.

Resultados: El ácido lipoteicoico promueve la activación de los miembros de la familia de las MAPK, que son un grupo prominente de proteínas cinasas con actividad de serina/treonina, que consisten de tres familias: p38, la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) y JNK. En mamíferos ERK1 y ERK2 (ERK1/2) median respuestas para eventos mitogénicos y de diferenciación y p38 y JNK se activan cuando las células son expuestas a señales de estrés. Encontramos así mismo que los flavonoides bloquean el efecto del ácido lipoteicoico y que el flavonoide obtenido del cempasúchil es el que mostró mayor actividad.

Discusión: Los flavonoides conforman una de las familias más enigmáticas de los compuestos naturales. Actualmente en los campos en los que se han realizado mayores estudios con flavonoides están relacionados con enfermedades cardiovasculares y cáncer. Decidimos estudiar el efecto de los flavonoides sobre las acciones del ácido lipoteicoico porque cada vez es más evidente que compuestos derivados de vegetales regulan las acciones de endotoxinas bacterianas. Encontramos de manera semejante a lo reportado con otras líneas celulares en las que se utiliza como ligando al lipopolisacárido que los flavonoides bloquean las acciones del ácido lipoteicoico.

Conclusión: Los flavonoides estudiados (genisteina, luteolina, quercetina y cempasúchil) bloquean las acciones del ácido lipoteicoico y mecanismo de acción podría actuar como un efecto protector frente a las alteraciones de carácter inflamatorio en las encías.

INTRODUCCIÓN.

Las alteraciones relacionadas con la estructura periodontal son las principales patologías que afectan a la población mexicana, su etiología se basa en la presencia de una gran variedad de microorganismos, lo que nos lleva a la búsqueda de nuevas técnicas terapéuticas y medidas de prevención.

En lo referente a las enfermedades periodontales la gingivitis y la periodontitis los principales agentes patógenos son bacterias de tipo gram negativos, facultativas o anaerobias y por algunos microorganismos gram positivos, en la superficie de las bacterias gram positivos se identifican moléculas denominadas lipopolisacáridos y ácido lipoteicoico respectivamente. Estas moléculas desencadenan procesos los cuales son específicos de la inflamación, dentro del proceso natural de la enfermedad periodontal se desarrolla un daño tisular que en algunos casos es reversible o en el peor de los casos es irreversible.¹

El ácido lipoteicoico (LTA) forma parte de la estructura de la pared celular, pertenece a la clase de polímeros de azúcar fosfato que contiene grupos acilo anclados a la membrana celular que es uno de sus principales componentes al igual que los peptidoglucanos, que se encuentran en las bacterias gram positivos que se une a proteínas extracelulares como fibronectina, fibrinógeno y laminina. El LTA estimula respuestas inflamatorias y de igual forma estas moléculas están asociadas a infecciones específicas. Existen tres procesos identificados de las bacterias gram positivos que conllevan a la liberación de citocinas. Una forma no acetilada del LTA es el ácido teicoico, que está unido covalentemente al peptidoglucano de la pared celular de las bacterias gram positivo.

En 1993 se extrajo el LTA por medio de fenol y cromatografía de interacción hidrofóbica, el LTA purificado mostró que activaba a las células inmunes las cuales sintetizan citocinas, en estudios *in vitro* se demostró la expresión de

interleucina (IL-1 β), interleucina (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) en monocitos. En contraste el LTA aislado de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* no inducen liberación de citocinas cuando el LTA es desacilado pierde la capacidad de estimular a monocitos, lo que demuestra que el lípido es importante en la capacidad del LTA para iniciar la síntesis de citocinas.

Los Flavonoides fueron descubiertos por el premio Nóbel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.

Los flavonoides fueron alguna vez agrupados juntos como vitamina P, aunque hay mucho más de 1,500 de ellos, incluyendo los siguientes:

- Flavanos.
- Flavonoles.
- Flavonas.
- Flavanonas

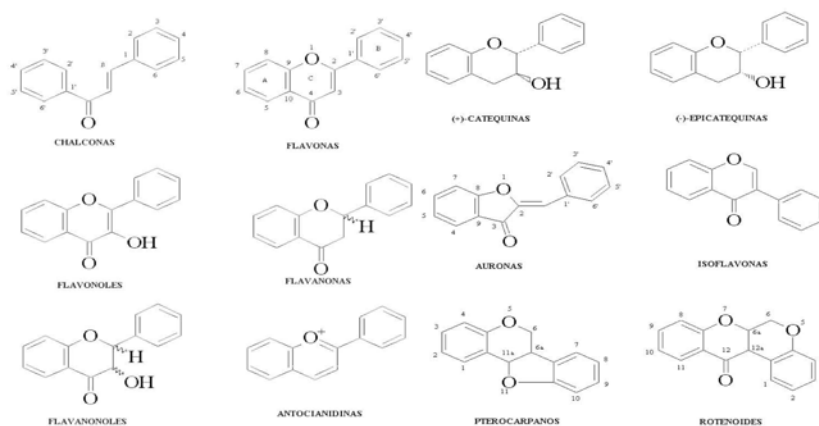


Fig.1 Tipos de flavonoides. (<http://huitoto.udea.co/-farmacogfit/Flavonoides/>)

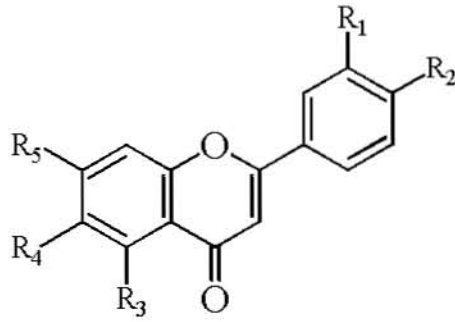


Fig. 2 Estructura básica. (<http://huitoto.udea.edu.co/~farmacogfit/Flavonoides/>)

La actividad biológica de los flavonoides incluye su acción contra alergias, inflamaciones, radicales libres, hepatotoxinas, aglomeración de plaquetas, microorganismos, úlceras, tumores y su acción inhibitoria de ciertas enzimas. Los flavonoides bloquean la enzima de conversión de angiotensina (ECA) que causa aumento de la presión arterial; protegen el sistema vascular y fortalecen a los pequeños capilares que llevan oxígeno y otros nutrientes esenciales a todas las células. Además de todo lo anterior los flavonoides bloquean las enzimas que producen estrógeno.

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales. Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores.

ANTECEDENTES.

La palabra periodontal significa literalmente "alrededor del diente". Las enfermedades periodontales, comprende en algunas procesos inflamatorios de los tejidos periodontales inducidos por bacterias; la relación de especies bacterianas específicas.

Para que un microorganismo produzca una patología es necesario que posea factores que le permitan adherirse a la célula, generar algún tipo de metabolito que dañe al hospedero, ejercer acción tóxica, penetrar en las células, diseminarse a través de los tejidos o evitar la actividad defensiva de los fagocitos o la desarrollada por los anticuerpos naturales o adquiridos, ya sea en forma activa o pasiva. Estos factores pueden estar representados por diversas estructuras generalmente de la superficie bacteriana como las fimbrias, otras adhesinas, la capa mucosa, la cápsula, proteínas de la membrana externa o bien enzimas, proteínas con actividad tóxica, como ocurre con las bacterias gram negativas y el lipopolisacárido (LPS), el ácido lipoteicoico, cuya fracción lipídica constituye la endotoxina, productos metabólicos o enzimas que, al ejercer su acción sobre el sustrato producen metabolitos intermedios o terminales con acción deletérea sobre las células y tejidos.

Una excelente revisión de Shulman permite conocer la historia de los estreptococos. Este agente bacteriano fue inicialmente identificado por Luís Pasteur, en París en 1878-79. Simultáneamente Robert Koch en Alemania observó a este organismo en el pus de lesiones profundas. Cultivos puros fueron obtenidos por Fehleisen en 1883 y por Rosenbach en 1884 de pacientes con erisipela. El cirujano alemán Teodor Billroth acuñó el término de estreptococos y Rosembach dio el nombre de *Streptococcus pyogenes* a la variedad de organismos que se aislaban de lesiones supurativas.

Streptococcus sanguis, es una bacteria anaerobia facultativa del grupo beta hemolítica. Existe una gran variedad de pirógenos entre los que se encuentran

el ácido lipoteicoico, el peptidoglicano, las endotoxinas y ciertos virus, hongos, esteroides y enterotoxinas.

Es necesario conocer los componentes anatómicos de esta bacteria para poder entender el comportamiento antigénico y su clasificación.

Los elementos de la bacteria son:

1. Cápsula.
2. Pared celular.
3. Membrana citoplasmática.
4. Citoplasma.

Pared celular

Está formada por tres elementos:

- a. La parte externa contiene el ácido lipoteicoico, el factor Fc respondedor, el componente proteico denominado proteína M que corresponde a la fracción antigénica de la bacteria y las proteínas T y R; la proteína asociada a proteína M (MAP) y el factor de opacidad sérico (SOF).
- b. La parte intermedia contiene el carbohidrato, que es grupo específico, y de esta manera pueden ser diferenciados los estreptococos hemolíticos en grupos de A hasta V.
- c. La parte interna denominada peptidoglican se ha podido demostrar que no es solamente la estructura responsable de la rigidez de la pared celular.

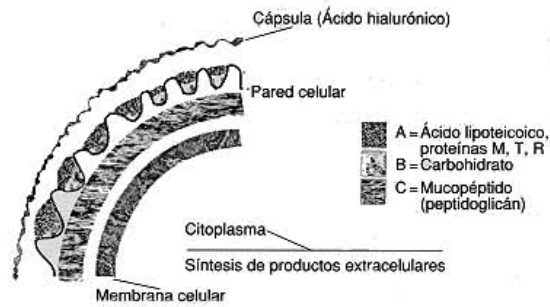


Fig. 3 Cápsula, pared y membrana celular del estreptococo. (Zawaneh SM, Ayoub EM, Baer H, Cruz AC, Spellacy WN (1979) Factors influencing adherence of group B streptococci to human vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 26: 441-447).

Es necesario conocer los componentes anatómicos de esta bacteria para poder entender el comportamiento antigénico y su clasificación.

Cerca de la membrana plasmática, las fimbrias se proyectan a través de la pared celular y de la cápsula, y cuentan con componentes de superficie de gran importancia. El ácido lipoteicoico de las fimbrias es una sustancia con marcada afinidad por las membranas biológicas, que juega un papel decisivo en la colonización, al permitir la fijación de los estreptococos del grupo A de las zonas de fibronectina que existen en la superficie de las células epiteliales humanas (adhesión del microorganismo). También pueden hallarse en las fimbrias los antígenos M y R, similares desde el punto de vista estructural, pero inmunológicamente diferentes.

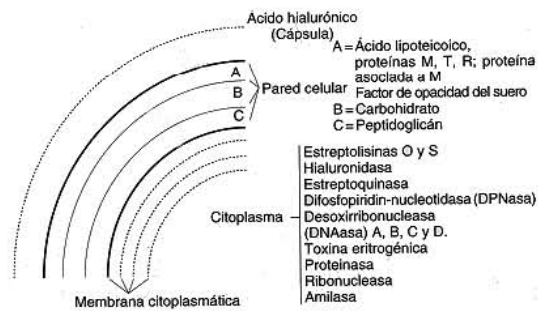


Fig. 4 Los elementos básicos del estreptococo y algunos elementos del citoplasma. En la figura se presenta la distribución de estas partes y sus componentes básicos conocidos hasta el momento actual. (Zawaneh SM, Ayoub EM, Baer H, Cruz AC, Spellacy WN (1979) Factors influencing adherence of group B streptococci to human vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 26: 441-447)

En 1997 el profesor John Pezzutto de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Illinois exponía en Madrid los resultados de un estudio pionero iniciado varios años antes por encargo del National Cancer Institute (EUA). Tras investigar la posible acción quimiopreventiva frente al cáncer, de miles de plantas silvestres del mundo entero su equipo seleccionó una leguminosa de Perú. Cuando identificó su principio activo anticancerígeno, resultó ser el resveratrol, un flavonoide (una modalidad de polifenol) que alcanza niveles de concentración muy superiores en el vino tinto.

La propiedad esencial de los polifenoles es su elevado poder antioxidante. Desde que el profesor Linus Pauling recibiera el premio Nobel por descubrir el papel decisivo de los antioxidantes, éstos no han cesado de adquirir protagonismo. Su papel consiste en neutralizar los llamados radicales libres.

PERIODONTO

La palabra periodonto tiene sus orígenes griegos donde peri- alrededor y odontos diente. El periodonto es el aparato de inserción o tejidos de sostén del órgano dentario. Esta compuesto por la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar; la función principal del periodonto es la de unir al órgano dentario con el tejido óseo y conservar su integridad en la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal.^{2,3}

Estos tejidos se organizan en forma única adecuados a sus funciones:

1. Inserción del diente a su alveolo óseo.
2. Resistir y resolver las fuerzas generadas por la masticación, habla y deglución.
3. Mantener y compensar los cambios estructurales relacionados con el desgaste y envejecimiento.
4. Defensa contra las influencias nocivas del ambiente externo que se presenta en la cavidad bucal.

La mucosa bucal.

Se compone de tres zonas; la encía y el revestimiento del paladar duro, que forman la mucosa masticatoria; el dorso de la lengua, cubierto por mucosa especializada; y la mucosa de revestimiento bucal que cubre el resto de la boca.

Características macroscópicas.⁴

Encía marginal.

Se conoce como no insertada y corresponde al margen terminal o borde de la encía que rodea a los dientes a modo de collar, es una depresión lineal superficial, el surco gingival libre, la separa de la encía insertada, por lo general cerca de 1mm de ancho, la encía marginal forma la pared de tejido blando del surco gingival.

Surco gingival.

Es poco profundo o espacio circundante del diente que forman la superficie dental, por un lado y el revestimiento epitelial del margen libre de la encía por el otro. Presenta forma de V y apenas permite la entrada de la sonda periodontal donde es considerado como parámetro de profundidad de 2 a 3mm en un surco gingival sano.⁵

Encía insertada.

Se continua con la marginal es firme y resiliente, esta fijada al periostio subyacente del hueso alveolar. La superficie vestibular de la encía insertada se extiende hacia la mucosa alveolar relativamente laxa y móvil de la cual esta separada por la unión mucogingival.

Encía Interdental.

Ocupa el nicho gingival que es el espacio ínter proximal por debajo del área de contacto, puede ser piramidal o tener forma de "col". La punta de una papila se halla inmediatamente por debajo del punto de contacto. La segunda forma presenta una depresión a modo de valle que conecta una papila vestibular y otra lingual y se adapta a la morfología del contacto ínter proximal.⁶

Las superficies vestibular y lingual convergen hacia el área de contacto ínter proximal y las mesiales y distales son algo cóncavas. Los márgenes laterales y el extremo de las papilas interdentes están formados por una continuación de la encía marginal de los dientes adyacentes. La porción intermedia se compone de encía insertada.

Características microscópicas

La encía está constituida por un núcleo central de tejido conectivo cubierto por epitelio escamoso estratificado.

Epitelio gingival.

Aspectos generales de la biología del epitelio gingival. Es un revestimiento escamoso estratificado, donde se definen tres áreas morfológicas y funcionales: epitelio bucal o externo, epitelio del surco y epitelio de unión.

El tipo celular principal es el queratinocito, se encuentran otras células conocidas como células claras o no queratinocito; que incluyen células de Langerhans, células de Merkel y melanocitos. La función principal del epitelio gingival es proteger las estructuras profundas y permitir un intercambio selectivo con el medio bucal. Esto se logra mediante la proliferación y diferenciación de los queratinocitos. ³

Las células de Langerhans son de tipo dendrítico y se localizan entre queratinocitos en los niveles suprabasales, pertenecen al sistema mononuclear fagocítico como monolitos modificados derivados de la médula ósea. Contiene gránulos alargados y se los considera macrófagos con posibles propiedades antigénicas. Las células de Langerhans poseen una función relevante en la reacción inmunitaria como células que presentan los antígenos a los linfocitos.

Las células de Merkel se ubican en las capas más profundas del epitelio, poseen terminaciones nerviosas y se conectan con células contiguas mediante desmosomas, se les ha identificado como receptores táctiles. ⁷

El epitelio se une al tejido conectivo subyacente por medio de una lámina basal que consta de las llamadas lámina lúcida y lámina densa. Los hemidesmosomas de las células epiteliales basales hacen contacto con laminina lúcida, formada principalmente por la glucoproteína laminina basal, claramente diferenciada en el plano ultra estructural y se conecta con una condensación reticular de fibras del tejido conectivo subyacente.

Características estructurales y metabólicas de las diferentes zonas del epitelio gingival.

Epitelio bucal o externo cubre la cresta y la superficie exterior de la encía marginal y la superficie de la encía insertada. Está queratinizado, paraqueratinizado o presenta estas variedades combinadas. La superficie prevalente es paraqueratinizado.

Epitelio del surco se trata de un epitelio escamoso estratificado delgado, no queratinizado y sin proyecciones interpapilares, que se extiende desde el límite coronal del epitelio de unión hasta la cresta del margen gingival .

El epitelio del surco es sumamente importante porque en ocasiones actúa como una membrana semipermeable a través de la cual los productos tóxicos de las bacterias pasan hacia la encía y el líquido gingival se filtra hacia el surco. ⁸

Epitelio de unión consta de una banda que rodea al diente a modo de collar constituida por epitelio escamoso estratificado no queratinizado con el aumento de edad de los individuos su grosor aumenta hasta 10 o más, las células pueden agruparse en dos estratos, basal y suprabasal. La longitud del epitelio de unión varía desde 0.25 hasta 1.35 mm.

El epitelio de unión se forma por la confluencia del epitelio bucal y el epitelio reducido del esmalte no es esencial para su formación; de hecho, el epitelio de unión se restaura en su totalidad después de la instrumentación o la reparación quirúrgica y se forma en torno de un implante. ³

Líquido gingival este líquido se filtra desde el tejido conectivo gingival a través del delgado epitelio del surco.

Se estima que el líquido gingival:

- a) elimina material del surco.
- b) contiene proteínas plasmáticas.

- c) posee propiedades antimicrobianas.
- d) ejerce actividad inmunitaria para proteger la encía.

Tejido conectivo gingival.

Este tejido se denomina lamina propia y consta de dos capas; en estrato papilar subyacente al epitelio, que incluye proyecciones papilares entre las proliferaciones epiteliales interpapilares y una capa reticular continua al periostio del hueso alveolar. El tejido conectivo posee un compartimiento celular y otro extracelular compuesto por fibras y sustancia fundamental.

La sustancia fundamental ocupa el espacio entre fibras y células, es amorfa y posee un contenido elevado de agua, se compone de proteoglicanos, ácido hialurónico, sulfato de condrotina y glucoproteínas, sobre todo fibronectina.

Los tres tipos de fibras de tejido conectivo son colágenas, reticulares y elásticas. La colágena tipo I conforma el mayor componente de la lamina propia y confiere al tejido gingival resistencia a la tensión. La colágena de tipo IV se ramifican entre los haces colágenos de tipo I y se continua con fibras de la membrana basal y las paredes de los vasos sanguíneos.⁹

Fibras gingivales

Estas fibras gingivales poseen tres funciones:

- 1.- Aseguran firmemente la encía marginal contra el diente.
- 2.- Proveen la rigidez necesaria para soportar las fuerzas de la masticación sin separarse de la superficie dentaria.
- 3.- Unen la encía marginal libre con el cemento de la raíz y la encía insertada contigua.

Grupo gingivodental. Corresponden a las superficies ínter proximal, lingual y vestibulares. Se insertan en el cemento, justo por debajo del epitelio, en la

base del surco gingival, el cemento hacia la cresta y la superficie externa de la encía marginal, para terminar a poca distancia del epitelio, se extienden por fuera del periostio de los huesos alveolares, vestibular y lingual terminan en la encía insertada o se unen con el periostio.

Grupo circular: atraviesan al tejido conectivo de la encía marginal e interdental y rodean al diente a manera de anillo.

Grupo transeptal: es el espacio ínter proximal, fibras de este grupo forman haces horizontales que se extienden entre el cemento de dientes adyacentes en los cuales se insertan, su ubicación esta entre el epitelio de la base del surco gingival y la cresta del hueso interdental.³

Elementos celulares.

Fibroblasto: Es una célula de preponderancia del tejido conectivo gingival. Estos aparecen en los haces de fibras, sintetizan colágena y fibras elásticas, así como las glucoproteínas y los glucosaminoglucanos de la sustancia intercelular amorfa.

Mastocitos: Abundan en el tejido conectivo de la mucosa bucal y la encía¹⁰, los macrófagos fijos y los histiocitos están presentes en el tejido conectivo gingival como componentes del sistema mononuclear fagocítico y derivan los monocitos sanguíneos. Los adipositos y los eosinófilos, si bien escaso, también aparecen en la lámina propia.

Irrigación sanguínea, vasos linfáticos y nervios.

Es posible observarlos en cortes histológicos mediante reacciones inmunohistoquímicas contra proteínas de células endoteliales.

Características clínicas.

Color de la encía insertada y marginal se describe como rosa coral y se debe al aporte vascular, grosor y grado de queratinización del epitelio así como la presencia de las células que contienen pigmentos.³

Tamaño corresponde a la suma total de la masa de los elementos celulares e intercelulares de la encía y su irrigación.

Contorno o forma de la encía varía de modo considerable y depende de la morfología de los dientes y su alineación en el arco dental, ubicación y tamaño del área de contacto proximal.

Consistencia es firme y resilente se fija con firmeza al hueso subyacente. La naturaleza colágena de la lámina propia y su proximidad al mucoperiostio.

Estructuras de soporte dentario.

Ligamento periodontal:

Consiste en haces anchos de fibras colágenas incluidos en la sustancia fundamental amorfa. Su disposición es tal que forman un ligamento suspensorio entre el cemento que cubre a la raíz del órgano dentario y a la pared ósea del alveolo, y están incluidos en el cemento, en un extremo y el hueso alveolar en el otro. La frecuencia de recambio de la colágena del ligamento periodontal es inusitadamente alta y puede indicar deterioro periodontal o remodelación activa y frecuentemente del ligamento.

El ligamento periodontal está provisto de abundantes fibras nerviosas aferentes que responden a la presión

Las fibras que conforman el ligamento periodontal se clasifican en:

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

Esta disposición de las fibras permite sustentar las fuerzas recibidas por el diente.³

El ligamento periodontal está compuesto principalmente de fibrillas colágenas dispuestas en haces. La colágena representa el 50% del peso seco de todo el ligamento periodontal. Aunque también están presentes fibras elásticas asociadas a los vasos sanguíneos y fibras oxitalánicas. Cerca de la parte media del ligamento, cruzan canales de tejido conectivo laxo, el cual contiene vasos sanguíneo, linfáticos y haces nerviosos. La mayoría de sus vasos sanguíneos surgen de la médula ósea.

Cemento radicular:

El cemento es un tejido mineralizado especializado que recubre las superficies radiculares de los dientes, no posee vasos sanguíneos ni linfáticos, no posee inervación, no presenta reabsorción ni remodelado fisiológico, pero se deposita continuamente toda la vida.

Consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica. Su contenido mineral, principalmente es hidroxapatita es alrededor del 95% del peso. Sus funciones principales son la reparación de la superficie radicular y la de la inserción del ligamento periodontal.

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

Ambos cementos son producidos por el cementoblasto que al quedar contenidos dentro del cemento reciben el nombre de cementositos.

En la parte que corresponde al cemento acelular se pueden observar la inserción de fibras del ligamento periodontal que se insertan tanto en el cemento como en el hueso y se conocen como fibras de Sharpey. ¹

Hueso alveolar

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

Se pueden distinguir dos tipos de hueso:

1.- La porción de hueso alveolar que cubre el alveolo conocida como hueso cortical o a veces llamado lámina dura.

2.- La porción de la apófisis alveolar denominada por su aspecto de red, hueso esponjoso.

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

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

Las unidades estructurales básicas del hueso cortical son los osteones (o sistema Haversiano), son estructuras cilíndricas longitudinalmente orientadas construidas alrededor de los conductos vasculares.

El hueso es formado por las células llamadas osteoblastos, y es reabsorbido por los osteoclastos. Los osteoblastos primero producen el osteoide, constituido por fibras colágenas y una matriz que contiene proteoglicanos y glucoproteínas; este osteoide experimenta una mineralización por depósitos de minerales, como calcio y fosfato, que posteriormente se transforman en hidroxapatita. Durante este proceso de mineralización los osteoblastos pueden ser incluidos en el osteoide y quedar atrapados, y reciben el nombre de osteocitos, los cuales se nutren y comunican por medio de sus prolongaciones citoplásmicas.¹

ENFERMEDAD PERIODONTAL

Los padecimientos más frecuentes de los tejidos periodontales son los procesos inflamatorios gingivales y del aparato de inserción dental; son infecciones microbianas relacionadas con la acumulación local de placa dental, cálculos y flora periodontal patógena subgingival ². Sin embargo también existen otros padecimientos gingivales y del ligamento periodontal que no son infecciones sino procesos generativos, neoplásicos, granulomatosos, quísticos o traumáticos.

La placa bacteriana fue inicialmente descrita por J.Leon William en 1897 y se considero relacionada con la caries dental; medio siglo después los trabajos de Harald Løe y col aclararon la estrecha relación entre la placa bacteriana y la inflamación gingival.

CLASIFICACIÓN:

Se han utilizado diferentes clasificaciones de las enfermedades periodontales, la que se utiliza actualmente se basa en las características clínicas y radiográficas, así como en el estado de salud o enfermedad sistémica del paciente.

1. Enfermedades Gingivales.

A. Enfermedades gingivales inducidas por placa dental.

1. Gingivitis asociada con placa dental solamente.

- a. sin otros factores locales contribuyentes.
- b. con otros factores locales contribuyentes (ver VII A).

2. Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos.

- c. asociadas con el sistema endocrino.
 - 1) gingivitis asociada a la pubertad.
 - 2) gingivitis asociada al ciclo menstrual.
 - 3) asociada al embarazo.
 - a) gingivitis.
 - b) granuloma piógeno.
 - 4) gingivitis asociada a diabetes mellitus.
- d. asociadas con discracias sanguíneas.
 - 1) gingivitis asociada a leucemia.
 - 2) Otras.

3. Enfermedades gingivales modificadas por medicamentos.

- e. enfermedades gingivales influenciadas por fármacos.
 - 1) agrandamientos gingivales influenciados por fármacos.
 - 2) gingivitis influenciada por fármacos.
 - a) gingivitis asociada a anticonceptivos orales.
 - b) Otros.

4. Enfermedad gingival modificada por malnutrición.

- f. gingivitis por deficiencia del ácido ascórbico.
- g. Otros.

B. Lesiones gingivales no inducidas por placa.

1. Enfermedades gingivales de origen bacteriano específico.
 - a. lesiones asociadas a la *Neisseria gonorrea*.

- b. lesiones asociadas al *Treponema pallidum*.
 - c. lesiones asociadas a especies estreptocóccicas.
 - d. Otras.
2. Enfermedades gingivales de origen viral.
- a. infecciones por herpes virus.
 - 1) gingivoestomatitis herpética primaria.
 - 2) herpes oral recurrente.
 - 3) infecciones por varicela- zoster.
 - b. Otros.
3. Enfermedades gingivales de origen micótico.
- a. infecciones por especies de *Cándida*.
 - b. eritema linear gingival.
 - c. histoplasmosis.
 - d. otros.
4. Lesiones gingivales de origen genético.
- a. fibromatosis gingival hereditaria.
 - b. Otras.
5. Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas.
- a. alteraciones muco cutáneas.
 - 1) Liquen plano.
 - 2) Penfigoide.
 - 3) Pénfigo vulgaris.
 - 4) Eritema multiforma.
 - 5) Lupus eritematoso.
 - 6) Inducido por fármacos.
 - 7) Otros.
 - b. reacciones alérgicas.
 - 1) materiales dentales restaurativos.
 - a) Mercurio.
 - b) Níquel.
 - c) Acrílico.
 - d) Otros.
 - 2) reacciones atribuibles a:
 - a) pastas dentales/ dentríficos.

- b) enjuagues bucales/ lavados bucales.
- c) aditivos en la goma de mascar.
- d) alimentos y aditivos.

3) Otros.

6. Lesiones traumáticas (artificiales, iatrogénicas, accidentales).

- a. daño químico.
- b. daño físico.
- c. daño térmico.

7. Reacciones a cuerpo extraño.

8. Otros no especificados (ONE).

II. Periodontitis Crónica.

- A. Localizada.
- B. Generalizada.

III. Periodontitis Agresiva.

- A. Localizada.
- B. Generalizada.

IV. Periodontitis como una Manifestación de Enfermedades Sistémicas.

A. Asociada con alteraciones hematológicas.

- 1. Neutropenia adquirida.
- 2. Leucemia.
- 3. Otros.

B. Asociado a alteraciones genéticas.

- 1, Neutropenia familiar y cíclica.
- 2. Síndrome de Down.
Síndrome de deficiencia en la adhesión del leucocito.
- 4. Síndrome Papillón- Lefèbre.
- 5. Síndrome Chediak- Hagashi.
- 6. Síndromes Histocitosis.
- 7. Enfermedad de almacenamiento de glucógeno.
- 8. Agranulocitosis genética infantil.
- 9. Síndrome de Cohen.
- 10. Síndrome de Ehlers- Danlos (Tipos IV y VIII).
- 11. Hipofosfatasa.
- 12. Otros.

Otros no especificados (ONE).

- V. Enfermedades Periodontales Necrotizantes.
 - A. Gingivitis ulcerosa necrozante (GUN).
 - B. Periodontitis ulcerosa necrozante (PUN).
- VI. Abscesos del Periodonto.
 - A. Absceso gingival.
 - B. Absceso periodontal.
 - C. Absceso pericoronaral.
- VII. Periodontitis Asociada con Lesiones Endodóncicas.
 - A. Lesiones combinadas periodóncicas- endodóncicas.
- VIII. Deformidades y Condiciones del Desarrollo o Adquiridas.
 - A. Factores relacionados el diente que modifican o predisponen las enfermedades gingivales inducidas por placa/ periodontitis.
 - 1. Factores anatómicos dentarios.
 - 2. Restauraciones /Aparatos dentarios.
 - 3. Fracturas radiculares.
 - 4. Resorción radicular cervical y perlas del cemento.
 - B. Deformidades y condiciones mucogingivales alrededor de los dientes.
 - 1. Recesión gingival/ tejido blando.
 - a. superficies faciales o linguales.
 - b. interproximal (papilar).
 - 2. Falta de encía queratinizada.
 - 3. Profundidad del vestíbulo disminuido.
 - 4. Posición aberrante del frenillo/ mascullo.
 - 5. Exceso gingival.
 - a. Pseudobolsa.
 - b. Margen gingival inconsistente.
 - c. Excesiva muestra gingival.
 - d. Agrandamiento gingival (ver I. A. 3. y I. B. 4.).
 - 6. Color anormal.
 - C. Deformidades y condiciones mucogingivales en rebordes edéntulos.
 - 1. Deficiencia vertical y/o horizontal del reborde.

2. Falta de tejido gingival/ queratinizado.
 3. Agrandamiento gingival/ tejido blando.
 4. Posición aberrante del frenillo / músculo.
 5. Profundidad del vestíbulo disminuida.
 6. Color anormal.
- D. Trauma oclusal.
1. Trauma oclusal primario.
 2. Trauma oclusal secundario.

GINGIVITIS.

Definiendo a la gingivitis como un proceso inflamatorio de la encía, en la que el epitelio de unión se une al diente en su nivel original, es decir la porción más apical del epitelio de unión se localiza en el esmalte en o cerca de la unión cemento-esmalte.

Se define más ampliamente por:

1. Tipo de exudado.
2. Manifestaciones clínicas.
3. Etiología.
4. Asociación a enfermedades sistémicas.
5. Asociación a medicamentos.
6. Duración.
7. Asociación con otros factores locales o sistémicos.

La gingivitis presenta tres estadios de acuerdo a los eventos histopatológicos que ocurren cuando se acumula la placa en el margen gingival.¹

Lesión inicial se presenta dentro de los primeros 4 días de acumulación de placa en forma de inflamación aguda, caracterizada por aumento de flujo cervical y migración de leucocitos polimorfo nucleares al surco gingival, el infiltrado inflamatorio ocupa el 5 o 10% del tejido conectivo gingival.

Lesión temprana esta aparece después de 7 días de acumulación de placa puede persistir por 21 días o mas, presenta un desarrollo de un infiltrado dominado por linfocitos y macrófagos, algunas células plasmáticas, los linfocitos comprenden el 75% de las células inflamatorias, el área comprende un 15% del tejido conectivo gingival con destrucción de la colágena.

Lesión establecida se identifica por un incremento amplio en el tamaño de la encía afectada y un predominio de células plasmáticas y linfocitos B, puede presentarse una bolsa gingival, el epitelio de unión y de la bolsa son altamente infiltrados con neutrofilos, las células plasmáticas son encontradas en la periferia de la lesión y los macrófagos y linfocitos de la lamina propia de la pared de la bolsa.²

Gingivitis inducida por placa.

La enfermedad gingival que requiere de la presencia de la placa bacteriana para iniciar el proceso se ha dividido en dos grupos: la enfermedad gingival inducida por placa, asociada a factores locales y la enfermedad gingival inducida por placa que está asociada a factores locales y modificados por factores sistémicos.

La microbiota inicial de la gingivitis cocos gram positivos en proporciones del 56% y el 44% en gram negativos, así como en microorganismos facultativos 59% y anaerobios 41%. Las especies gram positivas predominantes incluyen *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* y los gram negativos son de modo predominante *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *V. parvula*, especies de *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, y especies de *Campylobacter*.³

La gingivitis está caracterizada por la reaparición de la inflamación en el margen gingival como consecuencia de la placa sin evidencia de pérdida de unión progresiva. Desaparece retirando el factor etiológico y comparte las mismas características clínicas de la enfermedad gingival inducida por placa.

Características clínicas de la enfermedad gingival.

- Signos y síntomas clínicos de inflamación (agrandamiento del contorno gingival, color entre rojo a rojo-azuloso, temperatura sulcular elevada, hemorragia al sondear, eritema y aumento del exudado gingival).
- Signos y síntomas limitados a la encía.

Los signos y síntomas de la enfermedad ceden al retirar la etiología.

- Presencia de placa dental para iniciar y/o exacerbar la severidad de la lesión.
- No hay presencia de signos o síntomas que sugieran la pérdida de inserción clínica periodontal o pérdida ósea, además puede presentarse periodonto disminuido pero estable.
- Posible precursor de la pérdida de inserción periodontal alrededor del diente.
- Cambios histológicos. ²

PERIODONTITIS.

La clasificación y descripción de las enfermedades periodontales ha incluido nueva información en relación a la etiología, patogénesis y factores del huésped.

La conversión de la lesión establecida a una lesión avanzada caracterizada por la destrucción de la unión del tejido conectivo a la superficie radicular y pérdida de hueso alveolar, la lesión presenta todas las características de la lesión establecida y adicionalmente migración apical del epitelio de unión y franca aparición de la bolsa.

Periodontitis crónica.

Es la inflamación del periodoncio que se extiende más allá de la encía y destruye la inserción conectiva del diente. La periodontitis es una entidad infecciosa crónica que produce inflamación en los tejidos de soporte dental, en cuya progresión produce pérdida de inserción periodontal debido a la

destrucción del ligamento periodontal y disminución en la altura de la cresta ósea.

Los gérmenes cultivados más a menudo en concentraciones altas incluyen P. gingivales, B. forsythus, P. intermedia, C. rectus, Eikenella corrodens, F. nucleatum, A. actinomycetemcomitans, P. micros y especies de Treponema y Eubacterium.³

Como lo muestra la clasificación, esta enfermedad se presenta en dos formas de acuerdo a la extensión, mostrando idénticas características:

Periodontitis localizada

Periodontitis en la cual solo máximo el 30% de las superficies dentales está afectado.

Periodontitis generalizada

Cuando el número de superficies dentales afectadas supera el 30%.

Además se pueden considerar tres categorías de severidad:

- Leve: se ha perdido 1-2 mm de inserción.
- Moderada: se han perdido 3-4 mm de inserción.
- Severa: cuando se han perdido 5 mm o más de inserción.

Características:

- Pérdida clínica de inserción.
- Pérdida de hueso alveolar.
- Presencia de bolsas periodontales.
- Inflamación gingival (edema, eritema, aumento de la temperatura del surco).
- Hemorragia a la presión.
- Movilidad dental, que puede llevar a exfoliación.
- Es más frecuente en adultos pero puede presentarse también en jóvenes y niños.
- La severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la

presencia de factores locales o factores locales predisponentes.

- Presencia de cálculos subgingivales.
- Asociado con un patrón microbiológico variable (*Porfiromona Gingivalis*, *A. Actinomicetecomitans*, *Bacteroides Forsitus*, *Prevotella Intermedia*, *Campilobacter Rictus*, *Eubacterium Nodatum*, *Treponema Denticola*, *Streptococcus Intermedia*, *Prevotella Nigrecens*, *Peptostreptococcus Micros*, *Fusobacterium Nucleatum*, *Eikenella Corrodens*, Espiroquetas). 2

Patrón de progresión lento a moderado, pero puede presentar períodos de progresión rápida.

Puede estar modificada o asociada con enfermedades sistémicas.

Puede estar asociada con otros factores como el estrés y consumo de cigarrillo.

PLACA DENTOBACTERIANA.

La placa dental es una biopelícula relacionada con el huésped.² La comunidad de la biopelícula se forma por interacciones bacterianas con el diente y luego interacciones físicas y fisiológicas entre especies diferentes en la masa microbiana.

La placa dental se define como los depósitos blandos que forman una biopelícula adherida a la superficie dentaria u otras superficies duras en la boca, entre ellas restauraciones fijas o removibles.

Según su posición sobre la superficie dentaria se clasifica en términos generales, como supragingival o subgingival.³

Placa supragingival la cual se encuentra localizada por arriba del margen gingival recibe la denominación de placa marginal.

Placa subgingival que se ubica por debajo del margen de la gingival entre el órgano dentario y tejido del surco gingival.

La placa subgingival presente 3 porciones:

- a) La placa adherida, que se encuentra firmemente unida a la superficie dentaria.
- b) La placa adherida, que se encuentra libre en la luz de la bolsa.
- c) La placa se asocia al epitelio, que se adhiere al epitelio de la bolsa y puede penetrar. Tejido gingival.

La placa dental es el acumulo de depósitos bacterianos en la cavidad bucal. ^{4,5}

La placa bacteriana es una película transparente e incolora, adherente al diente, compuesta por bacterias diversas y células descamadas, leucocitos y macrófagos, dentro de una matriz de proteínas y polisacáridos, tres cuartas partes de la placa están constituidas por bacterias vivas y en proliferación a mas de 200 especies bacterianas.

La formación de la placa bacteriana se inicia con la deposición de la cutícula o película acelular de un espesor de alrededor de un micrón.

PLACA SUPRAGINGIVAL.

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

Su formación inicia con la aposición al esmalte de la película adquirida, la cual es una cubierta heterogénea que se establece por la adsorción selectiva de proteínas y glucoproteínas salivales a la hidroxiapatita. A los pocos minutos de haberse establecido la película adquirida inicia la colonización bacteriana, el

primer colonizador es *Streptococcus sanguis*, posteriormente se instala *Actinomyces viscosus*, estos se asocian con las glucoproteínas de la película. La mayor parte de las bacterias provienen de la microflora salival que baña el diente y algunas otras son transportadas por células descamadas que las llevan adheridas. Posteriormente se inician los fenómenos de agregación bacteriana y se incorporan nuevas bacterias, en esta etapa la placa es fina, fácilmente desprendible, el metabolismo bacteriano es principalmente aerobio y esta formada principalmente por cocos. ^{4,5}

La colonización continúa hasta llegar a la placa madura en donde se han agregado bacterias anaerobias y anaerobias facultativas por el metabolismo bacteriano y la producción de H₂O₂, las especies predominantes son los cocos Gram-positivos anaerobios facultativos entre ellos *S.sanguis* y *S.mitis*.

PLACA SUBGINGIVAL

Es delgada, contenida dentro del surco gingival o bolsa periodontal por lo que resulta difícil su estudio in situ. En las porciones más próximas al esmalte va a estar influenciada directamente por la placa supragingival, por lo que su composición es muy similar a esta, con cocos Gram positivos anaerobios facultativos. La placa no adherida al diente puede estar adherida al epitelio o estar flotante. Las bacterias de la placa flotante comprenden: bacilos Gram negativos anaerobios facultativos como: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, especies de *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia buccalis* y *Selemonas*. La placa adherida al epitelio esta provista por bacterias que tienen la capacidad de adhesión por medio de fimbrias, como *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivales*, *Prevotella melaninogenica*, *Capnocytophaga*, *Selemonas* y *Fusobacterium*. ^{4,5}

ACIDO LIPOTEICOICO

El ácido lipoteicoico (LTA) es un componente único de la pared celular de las bacterias Gram.-positivas, pertenece a la clase de polímeros de azúcar fosfato que contiene grupos acilo anclados a la membrana celular. Una forma no acetilada del LTA es el ácido lipoteicoico, que está unido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular de las bacterias Gram.-positivas. Una vez que se extrae el LTA se ha observado que activa a las células de la inmunidad las que sintetizan citocinas, en estudios in vitro se demostró que la fijación de la señal de transducción de los eventos de LTA induce la producción de la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF α en monocitos y el antiinflamatorio. El LTA de *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y de cepas de *Enterococci*, inducen la liberación de estas citocinas.

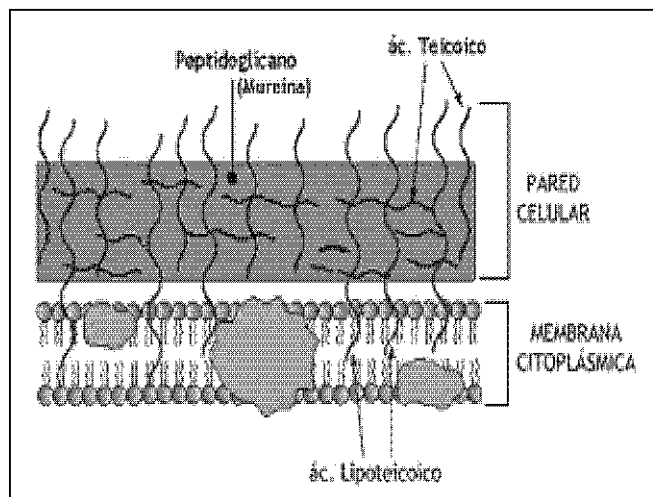


Fig. 5 Tiene una capa gruesa de peptidoglicano (mureína) y dos clases de ácidos teicoicos. Ácido Lipoteicoico que está en la superficie, empotrado en la capa de peptidoglicano y unido a la membrana citoplásmica. Y ácido teicoico de la pared que está en la superficie y se une sólo a la capa de peptidoglicano. El ácido Teicoico es el responsable del determinante antigénico del organismo.)

En contraste el LTA aislado de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* no inducen liberación de citocinas En este estudio se muestra también que la inducción ocurre en presencia y ausencia de suero lo que

sugiere que la estimulación no es dependiente del complemento. Sin embargo los mecanismos de LTA cuando es reconocido por las células de la inflamación en las sendas de señalización se queda en el examen, Por otra parte cuando el LTA es desacilado inhibe su capacidad de activación a monocitos, lo que demuestra que el lípido es importante en la capacidad del LTA para inducir a la síntesis de citocinas. En macrófagos cuando se realizan estudios in vitro el LTA de varias especies activa la secreción del TNF- α y nitritos. Algunos estudios indican que la capacidad del LTA para inducir a las respuestas de inmunidad depende de la especie. Sin embargo *S. aureus* carece de esta habilidad.

Los receptores semejantes Toll- like receptor (TLR) activa la señal esencial de las macrófagos y subsecuentemente iniciación de las respuestas séptica, las células bacteriales de los componentes peptidoglicanos, LTA y la adición de TLR. Los mecanismos de los TLR tuvieron una señalización subjetiva de la extensión en estudios recientemente.

El LTA induce la liberación del TNF α , IL -6 e IL- 10 en cultivos primarios. Las citoquinas inducen la liberación por LTA en comparación con la inducción de LPS en estudios por ELISA.

El LTA es un componente único de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, es un polímero de glicerol-fosfato que contiene azúcar y dos grupos acilo, estos últimos le confieren la propiedad de anclarse en la membrana celular.

La septicemia provocada por bacterias gram positivas puede desencadenarse por dos mecanismos al menos, por producción de exotoxina que actúan como superantígenos , o también a partir de componentes de la membrana celular que actúan como desencadenantes (peptidoglicanos, LTA, lipoproteínas, modulina soluble de fenol). Estos mediadores interactúan en la membrana celular con el TLR2 y son menos activos que el LPS.

La septicemia es una de las patologías que incrementa más las tasas de mortalidad y morbilidad en las unidades de cuidados intensivos, es producida por bacterias Gram-positivas, induciendo al LPS y al LTA activando al sistema inmune. Es una patología infecciosa caracterizada por la presencia de microorganismos y sus toxinas en la sangre circulante. Sus manifestaciones clínicas sistémicas más comunes son fiebre, neutropenia e hipotensión.

La detección de microorganismos invasores es mediada por una familia de receptores de reconocimiento expresados sobre la superficie de las células de inmunidad innata llamados TLR.

Los TLRs receptores de señalización transmembrana alerta en la inmunidad innata al hospedero de la presencia de agentes patógeno, tiene dominio intra y extra celular. La familia de TLR consta de más de 10 componentes descritos en el ser humano hasta la fecha 7 de ellos interactúan con modelos bacterianos. Los más importantes son TLR4, TLR2, TLR5, y TLR9 que reconocen las estructuras llamadas modelos moleculares asociados a patógenos que incluyen endotoxinas (lipopolisacáridos) peptidoglicanos, ácido lipoteicoico (LTA) y lipopéptidos.

RECEPTORES DE LTA.

El LTA activa las respuestas del huésped mediante el reconocimiento y la asociación a los receptores TLR. De los diferentes tipos de TLR solamente el TLR2 está seguidamente involucrado en las respuestas del huésped contra las bacterias Gram.-positivas. Ratones deficientes en TLR2 (TLR2 $-/-$) son susceptibles a la infección con *S.aureus* y *S. pneumoniae* ^{64,65}. Se ha demostrado también que la transfección de células CHO o HEK293 con los receptores TLR.-2 les confiere la habilidad de activar a NF κ B en respuesta al tratamiento con LTA. En ambos estudios la co-transfección con CD-14 incrementa la activación del receptor TLR2. Se obtuvieron ratones deficientes en TLR2 ($-/-$) o TLR4 ($-/-$) a fin de elucidar el papel de estos receptores en la respuesta celular con diferentes componentes microbianos. Macrófagos

peritoneales deficientes en TLR2 (-/-) no sintetizaron TNF α mientras que los deficientes en TLR 4(-/-) sintetizaron grandes cantidades de TNF α . Lo que sugiere que los receptores TLR-2 son las moléculas de reconocimiento del LTA.

Los receptores TLR2 responden a diversos productos bacterianos como lipoproteínas ¹¹ y peptidoglucanos lo que demuestra que el receptor TLR2 no responde forma exclusiva al LTA. En un estudio diferente, se demostró que células CHO transfectadas con los receptores TLR2 responden a *Listeria monocytogenes* pero no a *Streptococci* grupo B lo que sugiere que TLR2 puede discriminar entre dos bacterias gram positivas ¹². En monocitos humanos los anticuerpos monoclonales anti-TLR2 inhiben la liberación de TNF- α cuando se estimulan con LTA. Existen evidencias que muestran el receptor TLR-4 confiere resistencia a las infecciones por pneumococo mediante la interacción con pneumolisina.

La respuesta inmune innata responde y reconoce un gran número de estructuras microbianas. Para lograr esta tarea los receptores TLR pueden formar homo y hetero-dímeros ¹⁵. Los receptores TLR2 y TLR-6 actúan en conjunto para responder a bacterias gram positivas y a la partícula de la pared celular de levadura el zymozan. TLR2 y TLR6 son reclutados al fagosoma de macrófagos donde reconocen al peptidoglicano. En contraste TLR2 reconoce lipopéptidos bacterianos sin TLR6. Se requiere de la dimerización de los dominios citoplasmáticos de TLR2 con TLR 6 o TLR1 para inducir la producción de TNF α . Se ha demostrado también que los dominios citoplasmáticos de diferentes TLR no son funcionalmente equivalentes, lo que sugiere que la capacidad de tipos celulares específicos para responder a bacterias gram positivas no está definida solamente por la expresión de TLR2.

La expresión diferencial y heterodimerización entre los receptores TLR incrementa el repertorio de respuestas celulares que pueden activarse por

estímulos infecciosos, y es posible que esta sea la base para las respuestas celulares específicas.

En células humanas el TLR2 se expresa predominantemente en monocitos, macrófagos, neutrófilos, células T y células B ¹⁷. Sin embargo otros tipos de células sintetizan RNA mensajeros para TLR2 y otros TLR. La expresión y actividad de TLR para la activación de señales de transducción es regulada también por otra proteína accesoria soluble designada MD-1 y MD-2 ¹⁸. El receptor CD14 actúa en concierto con TLR4/MD-2 para iniciar las respuestas a lipopolisacárido. Los peptidoglucanos se asocian a CD14, al bloquear este receptor se inhibe la señalización inducida por peptidoglucanos y LTA lo que sugiere que CD14 está involucrado en el reconocimiento de bacterias gram positivas. También se ha demostrado que el sitio de reconocimiento entre el LTA y los receptores TLR2 es por la región de los carbohidratos.

SEÑALES CELULARES:

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

Así podemos definir un receptor como una estructura química capaz de recibir al mensajero y de transmitir el mensaje para que se produzca la respuesta de la célula. El receptor es una proteína grande de peso molecular elevado, y sus funciones principales son reconocer al mensajero y activar la secuencia de

eventos que conducen a la respuesta celular. La información para su síntesis esta almacenada en el material genético de cada célula; su superficie presenta un sitio de reconocimiento al que se une el mensajero. Las superficies del mensajero y del receptor se unen con un alto grado de selectividad entre si, así como de afinidad. La afinidad puede definirse como una medida de la facilidad de interacción entre dos sustancias. Por su localización los receptores se pueden dividir en dos grandes familias; los que se localizan en la membrana plasmática y los intracelulares.¹²⁻¹⁴

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

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

VIAS DE TRANSDUCCIÓN:

Entre las vías de transducción activadas en respuesta al tratamiento con LTA se encuentran la de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la 3-fosfatidilinositol cinasa (PI3K). En la sepsis en humanos la activación de MAPK está implicada en la granulocitosis y permite de esta forma restaurar la función inmune en sepsis.

La inhibición de MAPK en granulocitos aislados de pacientes con sepsis severa causa la restauración de la apoptosis en granulocitos mediada por lipopolisacáridos. Por otra parte la MAPK p38 media la supresión inmune en bazo y la inhibición de p38 puede restaurar la función de linfocitos. Sin embargo, la activación de MAPK está implicada en la tolerancia a endotoxinas y la activación de macrófagos alveolares después de trauma por hemorragia.

También se ha demostrado el papel que PI3K γ que se activa por receptores acoplados a proteínas G durante la inflamación. Neutrófilos de ratón deficientes en PI3K muestran isquemia, reducción en migración y peritonitis. Por otra parte se muestra también una reducción en la activación de NF κ B y en la síntesis de TNF- α e IL-1 β . Estos estudios muestran que PI3K γ juega un importante papel en la activación de neutrófilos.

La señalización mediada por adenosín monofosfato cíclico (AMPc) inhibe la activación de ERK, p38, MAPK y JNK en macrófagos peritoneales y también inhibe la expresión de TNF α , NF κ B y la síntesis de óxido nítrico inducible en células Kupffer y monocitos.

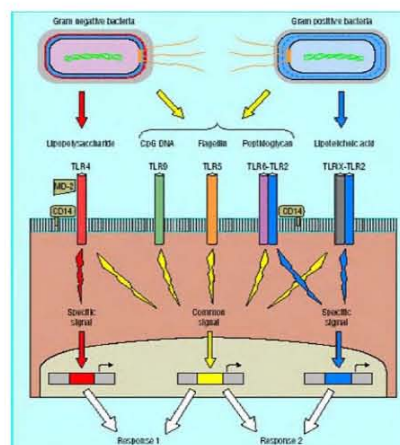


Fig. 6 Interacción entre los productos bacterianos y el modelo de reconocimiento por receptores expresados sobre las células inmunes. (<http://www.medicrit.com/Revista/1-3%20Julio%202004/Sepsis%20Bracho.pdf>).

Después del reconocimiento entre TLR2 y el LTA se produce un amplio espectro de señales intracelulares como la activación de la familia de MAP, PKB e Ikk β . La activación de estas cinasas consecuentemente activan a diversos factores de transcripción como NF- κ B; ATF; el complejo de respuesta a suero; proteína Ets, C/EBP y CREB. El primer evento que inicia la cascada de transducción consiste en la co-localización y agrupamiento de receptores y señales de transducción en la membrana plasmática.

En respuesta al tratamiento con *Streptococcus B*, los receptores TLR2, TLR6 y CD14 se agrupan y la primera molécula intracelular reclutada por el complejo es la proteína MyD88 la cual recluta a IRAK. IRAK forma multímeros que se autofosforilan y reclutan grandes complejos consistentes en el factor activado por el receptor TNF/TRAF6, TAK1, TAB1 y TAB2. IRAK 4 fosforila a IRAK1, esta fosforilación es indispensable para la activación de la transducción de señales, recientemente se ha descrito que la forma IRAK-M es una forma inhibitoria.

La activación de TAK1 promueve su liberación del complejo y de esta forma activa a IKK β y a MAP cinasa (6/MKK6). La cinasa inductora de NF- κ B (NIK) se requiere para la activación de la cinasa Ikk β que inicia la degradación de I κ B y la translocación de NF- κ B al núcleo. MKK β es responsable de la activación de las MAPK p38 y JNK.

En presencia de la proteína adaptadora ECSIT y MEK cinasa 1/MKK1, TRAF puede activar a ERK 1/2. ERK 1/2 también puede activarse por un mecanismo independiente de TRAF6 que involucra a la forma atípica de PKC la PKC ζ que está asociada a la acumulación de ácido fosfatídico, lo que conlleva a la activación de ERK y la endocitosis, inhibidores de la endocitosis bloquean la activación de ERK. Finalmente se ha demostrado también la activación de PI3K de una manera dependiente de PKB lo que conduce a la activación de NF- κ B.

VIA MAP cinasa p38.

En los procesos de señalización celular, una vez que el mensajero entra en contacto con el receptor, la célula decodifica la señal para transformarla en una señal intracelular, denominada segundo mensajero. Es esta sustancia "la que transmite y traduce la orden que lleva el primer mensajero para que las proteínas celulares hagan que la célula prolifere, se divida, se mueva, se muera...". En la cascada de señales lo realizan frecuentemente las proteínas quinasas, que se encargarán de activar o desactivar proteínas, mediante el proceso de fosforilación, para que lleven a cabo una determinada acción. Las quinasas modifican la actividad de las proteínas introduciendo grupos fosfatos en ellas, y las fosfatasas las retornan a la situación inicial, eliminando fosfatos.

"La fosforilación o la desfosforilación es una herramienta muy frecuentemente utilizada por el organismo para controlar las funciones vitales".

La vía de las MAP cinasas refiere una cascada de proteínas que se han conservado a lo largo de la cadena evolutiva y juegan un papel central en la transducción de señales en todas las células eucarióticas. El elemento central de la ruta es una familia de proteínas cinasas treonina-serina llamada MAP cinasa (mitogen-activated protein kinases) que son activadas en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares. En levaduras, esta vía controla una gran variedad de factores de crecimiento y otras respuestas celulares, como su reproducción, forma y esporulación. En los mamíferos regula el crecimiento celular y la diferenciación.

Existen en las células eucariontas de los mamíferos varias rutas de las MAP cinasas, cada cascada consiste de tres proteínas cinasas: una cinasa terminal y dos cinasas intermedias que regulan distintas respuestas celulares. Entre las familias de proteínas de las cuáles se desprenden estas cascada se encuentran ERK, JNK y p38.

La cinasa regulada por señal extracelular (Extracellular signal-regulated kinase) (ERK) es activada en respuesta a varios factores de crecimiento y otras

señales moleculares. En las levaduras ERK lleva la reproducción, forma celular y esporulación.

JNK y p38, a diferencia de ERK, son activadas en respuesta a citocinas inflamatorias y estímulos celulares como la radiación ultravioleta.

Las señales de ERK conllevan principalmente a la proliferación, supervivencia y diferenciación celular; los indicadores de JNK y p38 provocan inflamación y muerte celular. Esto sucede mediante su translocación al núcleo y la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión genética.

ERK es una de las MAP cinasa mejor caracterizada en las células de los mamíferos, su activación de ERK se lleva a cabo mediante la unión del ligando a receptores acoplados a proteínas tirosina-cinasa o a receptores acoplados a proteínas G.

La activación de ERK es mediada por dos proteínas cinasas intermedias, las cuáles se acoplan con factores de crecimiento por un lado y por otro con un GTP, estas proteínas son RAS y RAF, las cuáles fosforilan y activan una segunda proteína cinasa llamada MEK. MEK es una proteína con especificidad dual, esto es activa miembros de la familia ERK por fosforilación de dos residuos de: treonina y tirosina. Una vez activada ERK fosforila una variedad de blancos como pueden ser otras proteínas cinasa y factores de transcripción.

Las tres MAPK son activadas por una cinasa intermedia MAPKK, que tiene especificidad dual, fosforila residuos treonina y tirosina en un sitio tirosina-X-treonina específico para cada MAPK. MAPKK es activada por específicas proteínas quinasas activadora de MAPKK (MAPKKKS) como son Rafs, MEKK1, cinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), MLKs, TAK.

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

FLAVONOIDES

La palabra flavonoide proviene del latín "flavus" Cumarina Simple que significa amarillo. Los flavonoides son pigmentos amarillos ampliamente difundidos en el reino vegetal.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C₂ (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular están ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en todas las variedades de plantas. Están presentes en cantidades apreciables en múltiples alimentos y forman parte de nuestra dieta habitual y, así, la ingesta media estimada es 23 mg/día (flavonoles y flavonas), pero existen amplias variaciones interindividuales y entre poblaciones en cuanto a cantidad y tipo de flavonoides consumidos en función de los hábitos dietéticos. Los flavonoides han recibido sustancial atención en años recientes debido a los efectos positivos de las frutas y vegetales sobre la salud humana y su papel preventivo en el desarrollo de varias enfermedades.

Es el término genérico con que se identifica a compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura química basada en un esqueleto C₆-C₃-C₆, esto es un anillo benzénico unido a una cadena propiónica y esta a su vez a otro anillo benzénico. Los flavonoides son compuestos polifenólicos y son pigmentos vegetales no nitrogenados.

Las estructuras básicas de los principales grupos flavonoides (flavanona, dihidroflavanol, flavonol, flavona, antocianidina y flavanol) se haya establecida por el grado de aromaticidad, el ordenamiento y el número de hidroxilos sustitutos, así como la extensión y tipo de glicosilación de estos grupos. El sitio de glicosilación preferida es en la posición 3 y la glucosa constituye el residuo más usual.

Dependiendo del grado de saturación y patrón de sustitución de grupos funcionales en la estructura base, se da lugar a flavonoides con designaciones comunes como flavanoles, flavonas, chalconas, auronas, isoflavonoides, así como a sus derivados glicosidados que portan moléculas de azúcares e incluso derivados ácidos de azúcares. Suelen encontrarse también parcialmente polimerizados dando lugar a dímeros, trímeros, hasta formar complejos multienlazados como los taninos condensados.

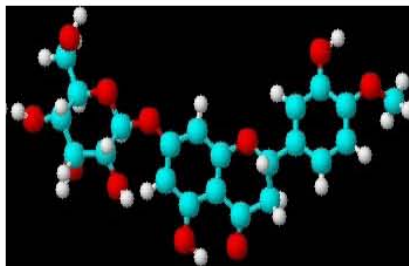


Fig. 7. Estructura básica de los flavonoides.(Flavonoides_archivos\D_main.html)

Se han descubierto más de 600 flavonoides. Todos ellos parecen tener un papel muy importante en la alimentación humana, dado que presentan propiedades medicinales muy interesantes.

El amplio rango de efectos atribuidos a los flavonoides constituye una expresión de su grupo químico funcional, y expone sus propiedades tanto antioxidantes como prooxidantes; anticarcinogénicas; de interacción con traducción de señales celulares, y los efectos beneficiosos en los procesos inflamatorios y en los sistemas inmunomoduladores. La química inherente a las

propiedades tanto antioxidantes como prooxidantes de los flavonoides, pueden explicar una gran parte de los mencionados efectos.

Los flavonoides son esencialmente medicamentos para la insuficiencia venosa. Su acción se sitúa a nivel de las pequeñas venas o de los capilares. Disminuyen la permeabilidad y aumentan la resistencia de los capilares (acción vitamínica P). Los flavonoides son tónicos venosos y protectores capilares. Algunos de ellos son diuréticos, antiespasmódicos, antiulcerosos, antiinflamatorios, antihepatotóxicos, etc. En general son moléculas prácticamente atóxicas de buena tolerancia, pero de acción lenta.

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES:

Se ha publicado recientemente un comprensivo y sólido tratado sobre los aspectos químicos, biológicos y clínicos de los antioxidantes naturales, incluyendo a los flavonoides. En la visión actual, las defensas antioxidantes pueden ser categorizadas en defensas primarias, constituidas por una variedad de enzimas y moléculas antioxidantes, y defensas secundarias, que comprenden una amplia gama de enzimas, pequeñas moléculas y sustancias vegetales.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer.

La mayoría de ellos, y especialmente las catequinas del té verde, que tienen una alta capacidad para neutralizar los radicales libres e impedir los perniciosos efectos que estos ejercen en la salud de nuestro organismo.

Usados como complementos en combinación muchas veces con la vitamina C pueden ser capaces de neutralizar ciertos virus como los del herpes.

DEFENSAS PRIMARIAS

Superóxido dismutasas (SOD):

Catalasa.

Glutación peroxidasa.

DEFENSAS SECUNDARIAS:

Enzimas proteolíticas.

Enzimas lipolíticas.

Enzimas reparadoras del ADN.

Alfa-tocoferol.

Acido ascórbico.

Carotenoides.

Coenzima Q.

Acido úrico.

Melatonina.

Flavonoides.

El criterio químico para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides es el siguiente:

Presencia de estructura o-dihidroxi en el anillo B; esto le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.

Doble ligadura en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.

Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C son necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

ACCIÓN PROOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides no constituyen un grupo homogéneo de compuestos y las mismas propiedades que caracterizan su actividad antioxidante, determinan que tengan efectos pro-oxidantes. Los mecanismos moleculares que determinan la actividad de los flavonoides en ese sentido, se basan en la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide hierro redox lábil. En el primer caso, la autooxidación del radical aroxilo genera anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que, siguiendo la secuencia conocida, genera el radical hidroxilo ($HO\cdot$).

Debe destacarse que las propiedades pro-oxidantes y mutagénicas de los flavonoides se hallan unidas a la acción de captar RL que tienen estos compuestos. Sin embargo, lo que determina el carácter antioxidante o pro-oxidante de esta reacción inicial es, como ya se mencionó previamente, la estabilidad/labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original. Serían responsables de la mutagenicidad de la quercetina bajo condiciones *in vitro*. La autooxidación del radical aroxilo o la formación de compuestos ternarios entre el ADN, el cobre y los flavonoides, son posibles explicaciones de la mutagenicidad mediada por los flavonoides.

PROPIEDADES ANTICANCEROSAS.

Flavonoides se han mostrado tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas. Un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladoras del proceso de carcinogénesis; entre ellas se encuentran los flavonoides que han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos. Asimismo, en lo que respecta a la prevención del cáncer de mama, podría deberse a su potente capacidad de inhibir la actividad de la aromatasa evitando de esta forma la conversión de andrógenos en estrógenos.

PROPIEDADES CARDIOTÓNICAS.

Tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como la genisteína y la luteolina.

FRAGILIDAD CAPILAR:

Mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que estos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado.

PROPIEDADES ANTITROMBÓTICAS:

La capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.

ANTIINFLAMATORIAS Y ANALGÉSICAS:

Los flavonoides, por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se han utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis.

ANTIMICROBIANAS:

La mayoría de estos principios han demostrado tener propiedades antivirales, antifúngicas y antibacterianas.

Tabla. 1 Principales flavonoides y sus propiedades

Betacaroteno	Alfacaroteno	Licopeno	Criptoxantina
Luteína Zeaxantina	Capsantina	Catequinas	Antocianinas
Quercetrina	Hesperidina	Resveratrol	Rutina

Tabla 1

LUTEÍNA.

Propiedades de la luteína: La luteína es un pigmento liposoluble de color amarillento que aparece en algas, bacterias y plantas superiores. Su función sería la de proteger la planta contra la radiación solar. Esta misma propiedad resulta eficaz para proteger la retina humana de las radiaciones ultravioleta del sol. La luteína es un pigmento que ya aparece de una forma natural en la retina, junto con la zeaxantina con la finalidad vista anteriormente.

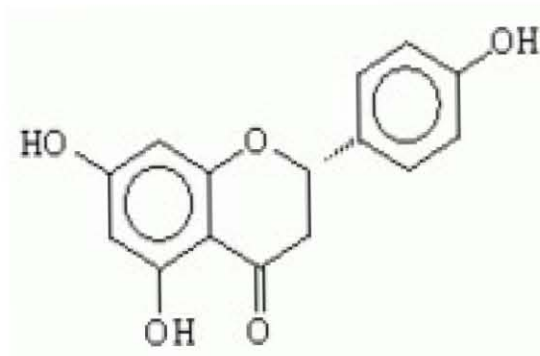


Fig. 8. Estructura química de luteolina .(Flavonoides_archivos\D_main.html)

La Luteolina es flavonoide que se encuentra en los mismos alimentos que la apigenina. Posee muchas de sus propiedades pero también tiene cualidades específicas: inhibe la inflamación producida por el Factor de Activación Plaquetaria (PAF) bajo la influencia de los alergenos. Inhibe la Tirosina kinasa y posee una potente actividad anti-proliferación sobre 27 células cancerosas.

Bloquea la toxicidad de la quimioterapia especialmente de la Adriamicina sobre el corazón y sobre la médula espinal. Inhibe la enzima aromatasa y previene la formación excesiva de estrógenos. Previene el enlace de los estrógenos sobre células cancerosas del pecho.

QUERCETINA.

Es un flavonoide amarillo-verdoso muy interesante dado que es de los principios que presentan más propiedades: alérgicas analgésicas, antiagregantes, vasodilatadoras, antiartríticas, antibacteriales, antiherpéticas, antiinflamatorias, antigripales, antiespasmódicas, antiulcéricas, hepatoprotectivas, antidiabéticas, antiasmáticas.

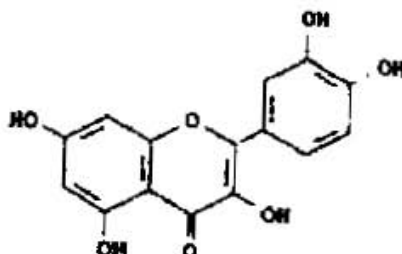


Fig. 9 Estructura química de quercetina.(Flavonoides_archivos\D_main.html)

Quercetina es un flavonoide no cítrico ampliamente distribuido en los alimentos. Esta clasificada como una flavona debido a que contiene la estructura 2-fenilcromona.

Propiedades de la quercetina: es con diferencia el flavonoide más abundante en la dieta, constituyendo aproximadamente el 60-75% del total. A partir del trabajo pionero de Hertog et al, diversos estudios epidemiológicos han descrito una asociación inversa entre la ingesta de flavonoides de la dieta y la mortalidad por cardiopatía isquémica. La presencia de flavonoides en un gran número de alimentos de origen vegetal podría explicar en parte el efecto beneficioso de las dietas ricas en frutas y verduras, del vino y del té.

Es otro flavonoide muy interesante dado que es de los principios que presentan más propiedades: analgésicas, antiagregantes, vasodilatadoras, antiartríticas, antibacteriales, antiherpéticas, antiinflamatorias, antigripales, antiespasmódicas, antiulcéricas, hepatoprotectivas, antidiabéticas, antiasmáticas.

Actividad Antiinflamatoria: La acción antiinflamatoria que poseen muchos flavonoides se relaciona en parte con enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico. En el mecanismo antioxidante sobre la peroxidación lipídica de la quercetina precisamente está involucrada la vía del ácido araquidónico lo cual implica una actividad antiinflamatoria paralela. En general los flavonoides polihidroxilados actúan por la vía de la enzima 5-lipooxigenasa, en tanto los menos hidroxilados lo hacen por la vía de la ciclo-oxigenasa. En cambio, in vivo pueden comportarse como inhibidores duales debido probablemente a la biotransformación que sufren en el organismo.

Por ejemplo, se ha constatado a través de diversos ensayos clínicos que la quercetina disminuye la inflamación de glándulas parótidas humanas, favorece la cicatrización de heridas, en especial aquellas heridas supuradas del área maxilofacial y cuello. En ratas demostró disminuir la inflamación de retina y úvea, así como vesiculitis y perivasculitis aledañas. También disminuye el edema inflamatorio auricular inducido por aceite de crotón, y junto con el ácido ascórbico reducen la inflamación en casos de periodontitis y gingivitis. Se postula que la bromelina (enzima presente en *Ananas sativus*) incrementaría el nivel de absorción intestinal de la quercetina.

Existen muchas técnicas para identificar a los flavonoides, entre ellas se encuentran las reacciones de coloración y precipitación, espectrofotometría ultravioleta, espectrofotometría infrarroja, espectrometría de masas, difracción de rayos X, y resonancia magnética nuclear, entre otros. Las reacciones de coloración también pueden usarse para evidenciar la presencia de flavonoides una de las más específicas es la reacción de Shinoda, de la que resultan coloraciones características según el tipo de núcleo de los flavonoides.

Como características generales se observan: la solubilidad en solventes polares su carácter fenólico y la intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro, debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados.

Los flavonoides poseen espectros con intensas absorciones en el espectro ultravioleta, se pueden distinguir 2 bandas principales: banda II (240 nm - 285 nm), y la banda I (300 nm - 550 nm) ¹⁸.

El espectro infrarrojo aporta datos adicionales de la mayoría de los compuestos orgánicos y puede dividirse en dos partes: las bandas de vibración de sustituyentes específicos entre 1300 y 4000 cm⁻¹ y las bandas de vibración del esqueleto hidrocarbonado (C-C y C-H) entre 650 y 1400 cm⁻¹.

CEMPASUCHIL.

Del náhuatl *cempoalxochitl*, literalmente = 'veinte flores, flores amarillas.

Flor de muertos en este país y también en Cuba; pero desde la antigüedad es utilizada también con fines alimenticios y medicinales.

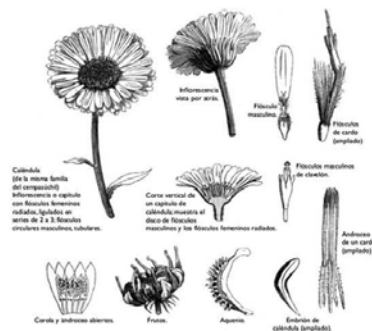


Fig. 10 Diferentes vistas de las estructuras de las flores compuestas de una de las especies de *Tagetes* (L. Watson y M. J. Dallwitz, *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*, 1992).

Los usos actuales y potenciales de las plantas *cempoalxóchitl* son numerosos antioxidante.

En células humanas, pigmento de alimentos, saborizante, perfumería, resina, ornamental (flor de corte, jardín y maceta), alteración genética para control de malezas, insecticida, nematocida, larvicida, atrayente o repelente de insectos abono verde y medicina (tradicional y convencional). La amplia diversidad

plantas cempoalxóchitl que existe en México ha despertado la iniciativa de proponer a nuestro país como centro de origen de estas plantas.

Los carotenoides obtenidos de estas flores también se utilizan en la medicina, pues de ellos se obtiene la luteína, sustancia que actúa como un nutriente antioxidante que protege las células de nuestro cuerpo, en especial aquellas que conforman el tejido de la retina. Es, además, un excelente vermífugo y estimulante del apetito.

Los usos actuales y potenciales de las plantas cempoalxóchitl son numerosos: antioxidante células humanas, pigmento de alimentos, saborizante, perfumería, resina, ornamental (flor de corte, jardín y maceta), alteración genética para control de malezas, insecticida, nematocida, larvicida, atrayente o repelente de insectos, abono verde y medicina (tradicional y convencional).

Desde la época prehispánica se han utilizando las plantas como el Cempoalxóchitl que se utiliza como medicina; las comunidades indígenas y mestizas, siguen empleándolas de forma extendida para atacar los más variados padecimientos; sin embargo, pocas son las evidencias científicas de la efectividad de tales tratamientos tradicionales. Aunque sí se tiene información de que *T. tenuifolia* controla enfermedades respiratorias de origen bacteriano; los aceites de *T.patula* y de *T. erecta* son efectivos contra infecciones dermatomucosas causadas por hongos y las soluciones acuosas de inflorescencias secas de *T. erecta* se han empleado para atender algunos tipos de úlceras en los ojos. Se recomienda para dolor de estómago, parásitos intestinales, empacho, diarrea, cólicos, afecciones hepáticas, bilis, vómito, indigestión, dolor de muelas, lavados intestinales y para expulsar gases.

GENISTEINA.

Dentro del grupo de las isoflavonas encontramos la genisteína, la cual es de forma activa no glicosilada que proviene de su precursor glicosilado genisteína, y que es producida por acción de las glicosidasas de la flora intestinal. Además, la genisteína se produce a partir de los precursores biochanina A y formononetina mediante demetilación efectuada por las bacterias intestinales, y previo a su absorción sufren una serie de eventos enzimáticos, también por acción de la flora intestinal, que las transforman en el caso de la genisteína.

Precusores y formas activas.



Fig. 11 Dentro del grupo de las isoflavonas encontramos la genisteína, la daidzeína y la gliciteína, las cuales son formas activas no glicosiladas que provienen de sus precursores glicosilados genistín, daidzeín y gliciteín, y que son producidas por acción de las glicosidasas de la flora intestinal.(So, et al, 1996; American Institute for Cancer Research, 1996).

La genisteína sería responsable de un efecto antitrombogénico, al inhibir la agregación plaquetaria y el crecimiento de células espumosas (uno de los principales tipos celulares que forman la placa de ateroma). Algunos estudios in vitro demostraron que la genisteína, podría reducir la oxidación del LDL, disminuyendo su capacidad aterogénica, siendo el antioxidante más potente dentro de los isoflavones.

La genisteína actúa de diferentes maneras para reducir el riesgo de cáncer.

Los altos niveles de estrógenos en sangre son un factor de riesgo para el cáncer de mama. La genisteína, cuando una mujer tiene escasa producción de estrógenos (postmenopáusica), puede unirse a los receptores celulares y producir un efecto de estrógeno débil. Cuando hay demasiados estrógenos en sangre, la genisteína compite con ellos por los receptores, y al comportarse comparativamente como estrógeno débil, minimiza el efecto estrogénico.

La genisteína frena el crecimiento de un amplio rango de células cancerígenas. El mecanismo se piensa que es la inhibición de la actividad de enzimas que controlan el crecimiento celular tales como la tiroxinas-kinasa.

La genisteína también inhibe la angiogénesis. Todo tumor aumenta de tamaño y las células quedan sin oxígeno y glucosa. Entonces mandan información para la formación de nuevos vasos sanguíneos. La genisteína es el más potente entre los inhibidores de origen vegetal en prevenir la angiogénesis.

Otro efecto es sobre los radicales libres, que son generados por las células para combatir las infecciones causadas por bacterias y virus. Pero producidos en exceso pueden dañar las membranas celulares, ADN y proteínas, entre ellas la LDL. La genisteína inhibe su formación y tiene efectos sobre la apoptosis (muerte celular programada) de células tumorales.

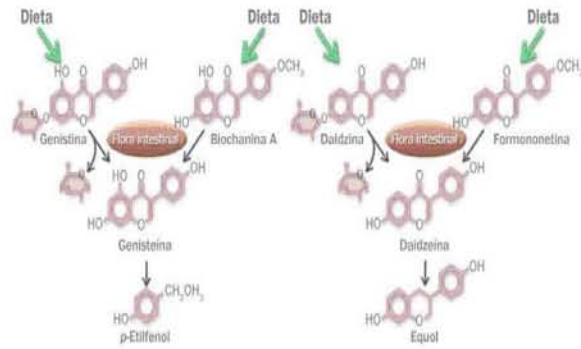


Fig. 12. Metabolismo de la genisteina y la daidzeína (So, et al, 1996; American Institute for Cancer Research, 1996).

Genisteina bloquea el desarrollo de tumores; previene la formación de nuevos vasos por lo que impide la llegada del oxígeno y nutrientes a las células neotumorales. También actúa como un debilitador de estrógenos. Modula la reacción de los estrógenos ligándose a los receptores. A través de esta acción puede disminuir el riesgo de cáncer de mama; además disminuye los síntomas de menopausia, fibroides, enfermedad fibroquística de mama.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La enfermedad periodontal es una de las principales patologías que aquejan a la población en México, y su etiología ha sido ampliamente relacionada con la presencia de distintas bacterias, en la que participan bacterias tipo Gram-positivas que poseen en su pared celular la molécula llamada LTA, estudios realizados con anterioridad muestran que esta endotoxina estimula los mecanismos de defensa del huésped, específicamente en lo que concierne a la respuesta inflamatoria del mismo.

En este trabajo se estudiaron los estímulos que inducen a la respuesta inflamatoria por la inhibición que producen los flavonoides sobre los fibroblastos gingivales de pacientes sanos.

JUSTIFICACIÓN:

Al determinar la fosforilación de p38 por LTA, estaremos observando una de las vías donde se codifica la información para la célula donde se forman citocinas, óxido nítrico y la muerte celular programada, donde llevaran acabo los signos clínicos de la inflamación del tejido periodontal, donde en un futuro se logran el establecimiento de nuevos fármacos que permitan inhibir la acción de los estímulos por medio del bloqueo de la vía de las MAP-quinasas p-38, JNK y ERK respectivamente.

HIPOTESIS VERDADERA:

Si el LTA logra asociarse a su receptor activo iniciara las vías de transducción así los flavonoides, inhibirán los efectos del LTA y de esta forma estimularán una respuesta antiinflamatoria.

HIPOTESIS FALSA:

Si los flavonoides al adicionarse a su receptor inhibe el proceso inflamatorio, por lo que no provocara en este la inflamación ni las consecuencias fisiológicas al periodonto.

OBJETIVO GENERAL:

La base de este trabajo es identificar a los flavonoides por LTA en fibroblastos gingivales humanos sanos, en diferentes dosis de concentración y a distintos tiempos.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Determinar el efecto del LTA sobre la activación de las MAP cinasas (ERK, p38 y JNK).
- Establecer el efecto de los flavonoides sobre la inhibición de la activación de las MAP cinasas.

MATERIALES Y METODOS:

Tipo de estudio: experimental, comparativo y prospectivo.

MATERIAL Y EQUIPO:

EQUIPO Y MARCA

Agitador magnético. (Nuova).

Balanza GA200. (Ohaus).

Baño de agitación. (Precision Scientific).

Cajas de cultivo celular de 6 pozos. (Costar).

Cámara de electroforesis vertical. (Hoeffer).

Cámara de transferencia. (Hoeffer).

Campana de flujo laminar (Nuair).

Centrifuga (Sorvall).

Espectrofotómetro (Perkin Elmer).

Gendarme (Costar).

Gradillas (Nalgene).

Incubadora (Nuair).

Megascopio.

Microscopio de objetos invertidos C22 (Olympus).

Orbit Shaker (Labline).

Pipetas de 10ml y 5 ml (Finnpipette).

Potenciometro (Equipar).

Probetas graduadas.

Propipeta (Pipet-aid).

Sonicador (Lab-Line instruments).

Timer.

Tubos clínicos.

Tubos de ensayo.

Tubos Eppendorf.

Vasos de precipitado.

Vortex (Scientific industries).

REACTIVOS:

Acrilamida (Sigma).

Antibiótico-Antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomicina, anfotericina B (GIBCO BRL).

Anticuerpos mouse monoclonal, pp-38, ERK, JNK.

Glicina (Valer).

Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology).

Marcador de peso molecular (Bio-rad).

Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (GIBCO BRL).

Medio de cultivo de Hanks (GIBCO BRL).

Membrana de nitrocelulosa (Bio-rad).

PBS (SIGMA).

Persulfato de amonio.

Suero bovino fetal (GIBCO BRL).

Trisma (Sigma).

NaCl (GIBCO BRL).

Tripsina.

Tween (Sigma).

Vanadato de sodio.

MÉTODOS.

Cultivo de fibroblastos gingivales humanos sanos (FGH):

Las muestras de FGH se obtuvieron de tejido de encía de pacientes clínicamente sanos, que acudieron a las clínicas de la Facultad de Odontología.

El tejido se coloca en medio de Hanks, posteriormente se obtienen las células y se colocan en medio de Eagle modificado por Dulbecco adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal y 1% de antibiótico antimicótico y se colocan en la incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂ y una temperatura.

EXPERIMENTOS:

Se realizaron experimentos de tipo dosis respuesta y curso temporal para LTA y flavonoides como son cempasúchil, luteolina, quercetina, genisteína.

Análisis de la fosforilación de cinasas por LTA.

Al finalizar los tratamientos las células se obtendrán mediante un raspado con gendarme y se colocarán en buffer de fosfatos salino adicionado con 1mM de ortovanadato de sodio, las células se centrifugarán durante 5 min a 3500 rpm a 4°C y se resuspenderán en buffer de lisis (Tris-HCl 20mM, Triton 1%, NaCl 137mM, EDTA 2mM, Vanadato de sodio 1mM, Glicina 10%) y se sonicarán 30w por 30 segundos. Se cuantificará la proteína por el método de Lowry y las muestras se procesarán para su análisis por western-blot.

ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Los experimentos se realizaron en cinco ocasiones por separado y se analizaron con el software labs work. Los resultados se representaron como la media \pm Error Standard.

Resultados.

Efecto del ácido lipoteicoico sobre la activación de las MAPK.

Efecto del LTA sobre la activación de las MAPK.

Las MAPK son un grupo prominente de proteínas cinasas con actividad de serina/treonina, que consisten de tres familias: p38, la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) y JNK. En mamíferos ERK1 y ERK2 (ERK 1/2) median respuestas para eventos mitogénicos y de diferenciación y p38 y JNK se activan cuando las células son expuestas a señales de estrés. En general las MAPK participan en un amplio rango de procesos fisiológicos en los que se incluyen la respuesta a señales inmunes.

Un gran número de reportes señalan que las vías de transducción que activan las MAPK se encuentran las que se activan por estímulo de endotoxinas bacterianas como LPS.

En esta investigación nos propusimos evaluar el efecto del LTA sobre la activación de las MAPK mediante ensayos de western blot. Valoramos los efectos del LTA utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada de cada una de estas cinasas porque la fosforilación es también un reflejo de la activación de estas cinasas. p38 (se activa cuando se fosforila en la tirosina ubicada en posición 182); ERK 1/2 (se fosforila en Treonina 202 y Tirosina 204) y JNK (se fosforila en Treonina 183 y Tirosina 185).

En la figura 12 se muestran los cursos temporales en la activación de p38, JNK y ERK 1/2. Como se muestra en la figura 1 el tratamiento con LTA (10 µg/ml) promueve la fosforilación de cada una de estas cinasas. ERK 1/2 se activa después de 15 minutos de tratamiento y disminuye al nivel del basal después de treinta minutos de tratamiento. JNK presenta un comportamiento similar. En lo que se refiere a la cinética de p38 la máxima fosforilación se obtuvo a los 10 minutos de tratamiento y disminuye después de los 30 minutos.

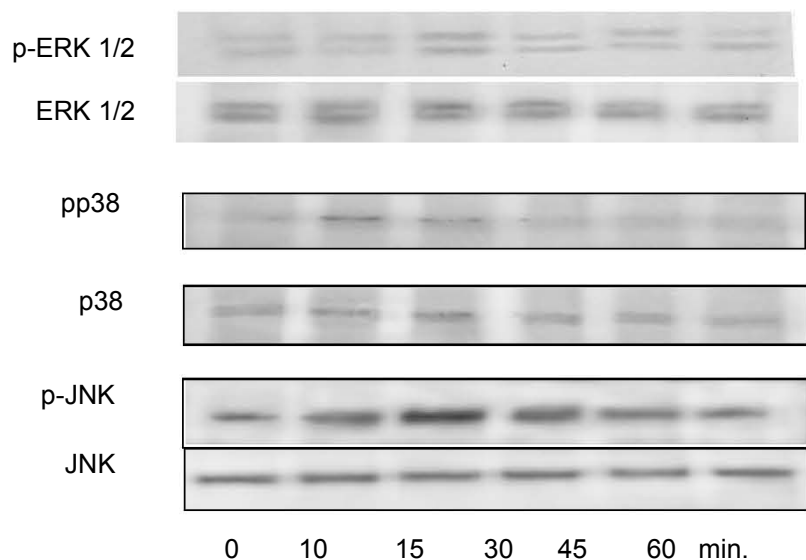


Figura 12. Curso temporal del efecto del LTA en fibroblastos gingivales humanos.

Las células fueron tratadas a diferentes tiempos con LTA (10 $\mu\text{g/ml}$). Después del tratamiento las muestras se procesaron como se describe en la sección de Material y Métodos para los ensayos de Western blot. p-ERK 1/2, pp38, p-JNK se refiere a la forma fosforilada de las MAPK, estas membranas se desnudaron y se trataron con las formas fosforiladas de ERK 1/2; p38 y JNK. El experimento es un representativo de tres experimentos realizados por separado.

Efecto los flavonoides sobre la fosforilación de la MAPK.

Para determinar el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida por LTA. Las células se incubaron con el flavonoide por 30 minutos y posteriormente se trataron con LTA durante 15 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13. Encontramos que el tratamiento con los flavonoides bloquean la fosforilación inducida por el LTA con diferentes actividades mostramos que el flavonoide más activo es el que se obtiene del cempasúchil, siguiendo en actividad la genisteína, quercetina y por último la luteolina.

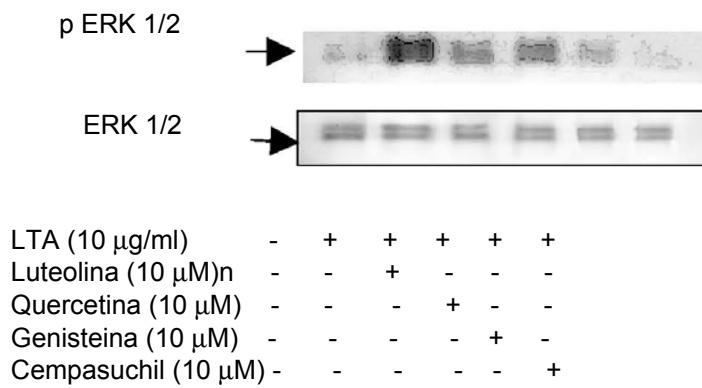


Fig. 13 Efecto de los flavonoides sobre la activación de ERK 1/2 inducida por LTA en Fibroblastos gingivales humanos.

Las células se incubaron a las dosis indicadas en la figura durante 30 minutos y posteriormente se trataron con LTA (10µg/ml) durante 15 minutos. Al término de la reacción las muestras se procesaron como se indica en la sección de Materiales y Métodos.

Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de p38 inducida por LTA en fibroblastos gingivales humanos.

Con el propósito de establecer el efecto que tienen los flavonoides sobre la activación de p38. Se incubaron las células con el flavonoide durante 30 minutos y posteriormente se trataron con LTA (10 µg/ml). Encontramos que los flavonoides promueven una disminución en el patrón de fosforilación siendo menos eficiente la quercetina (Fig. 14).

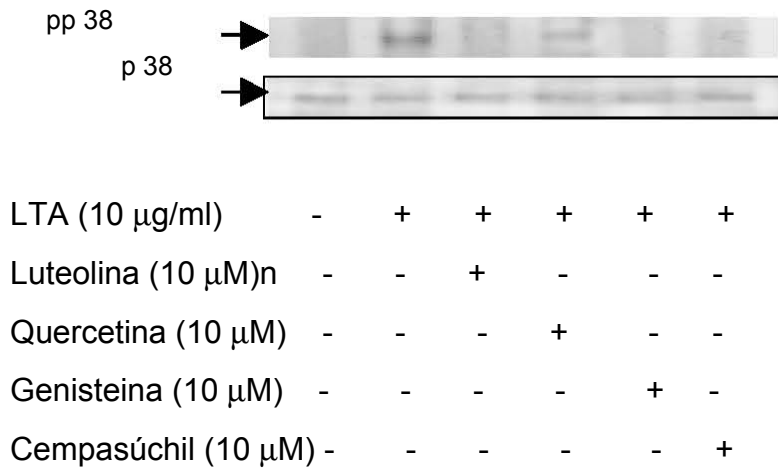


Fig. 14 Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de p38 inducida por el LTA en fibroblastos gingivales humanos

Las células se incubaron a las dosis indicadas en la figura durante 30 minutos y posteriormente se trataron con LTA (10µg/ml) durante 10 minutos. Al término de la reacción las muestras se procesaron como se indica en la sección de Materiales y Métodos.

Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de JNK en fibroblastos gingivales humanos tratados con LTA.

Los fibroblastos gingivales humanos se incubaron con los flavonoides a las dosis indicadas en la figura 15 (durante 30 minutos) y posteriormente se trataron con el LTA por 15 minutos.

Nuestros resultados muestran que todos los utilizados bloquean la fosforilación de JNK.

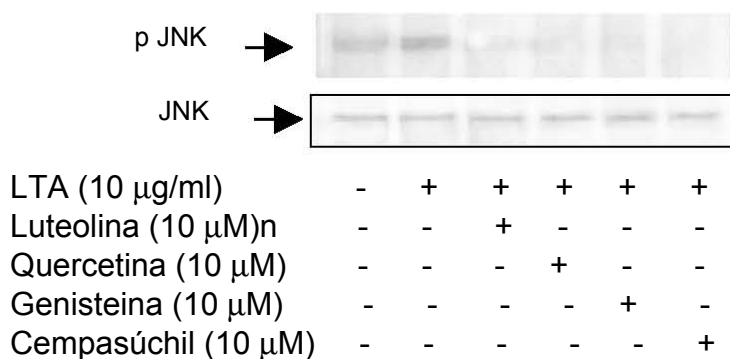


Fig. 15 Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de JNK en fibroblastos gingivales humanos tratados con LTA.

Las células se incubaron a las dosis indicadas en la figura durante 30 minutos y posteriormente se trataron con LTA (10µg/ml) durante 15 minutos. Al término de la reacción las muestras se procesaron como se indica en la sección de Materiales y Métodos.

DISCUSIÓN.

Los flavonoides conforman una de las familias más enigmáticas de los compuestos naturales. Actualmente en los campos en los que se han realizado mayores estudios con flavonoides están relacionados con enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Considerando que el efecto de estos compuestos abarca un mayor rango de enfermedades crónicas nos propusimos estudiar el efecto de los flavonoides sobre la activación de las MAPK que están involucradas en diferentes vías de transducción cuando son estimuladas por el LTA en fibroblastos gingivales humanos.

Decidimos estudiar el efecto de los flavonoides sobre las acciones del LTA porque cada vez es más evidente que compuestos derivados de las bacterias gram positivas en particular el ácido lipoteicoico ocasionan la activación de la respuesta inmune ^{41,42}.

El LTA es un compuesto asociado a la membrana de bacterias gram positivas y de naturaleza amfifílica, es además un potente factor de virulencia que comparte con el lipopolisacárido muchas de sus propiedades fisiopatológicas. El LTA, aunque en dosis más elevadas estimula a los leucocitos y está involucrado en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Es liberado de forma espontánea durante el crecimiento de bacterias y después de que estas son tratadas con fenol ^{43,44}

Tanto la bacteria completa como los peptidoglucanos o el LTA se asocian con los receptores TLR-2 en macrófagos en donde inducen la activación y reubicación del factor nuclear κ B (NF- κ B) ⁴⁵.

Nuestro grupo en investigaciones previas demostró que los fibroblastos gingivales humanos expresan los receptores TLR-4 y TLR-2. Lo que nos llevo a la hipótesis de que el LTA activará las vías de transducción en estas células cuando se tratan con LTA.⁴⁵

LTA induce la activación de p38, ERK 1/2 y JNK. La activación de estas cinasas se produjo de forma rápida y transitoria posiblemente, este evento se participa el equilibrio entre la actividad de cinasas y fosfatasas. Debido a que una vez que son activadas por fosforilación estas cinasas fosforilan y activan a otro intermediario de la vía y las fosfatasas actúan removiendo los grupos fosfato de los grupos hidroxilo de la serina, treonina o tirosina involucrados en la señalización.

Los fibroblastos gingivales humanos participan en la remodelación de la encía y juegan un papel importante en la síntesis de colágena y en la salud periodontal. Es bien sabido que las endotoxinas bacterianas ocasionan la síntesis de citocinas pro-inflamatorias que ocasionan entre otros eventos la respuesta inflamatoria que cuando el estímulo es crónico promueve la expresión continuada de estas citocinas lo que ocasiona lesiones en el periodonto.

Nuestros resultados muestran que las células responden al estímulo con LTA activando a las MAPK, por este motivo nos propusimos caracterizar el efecto de los flavonoides en la respuesta al LTA. Encontramos que los flavonoides bloquearon la fosforilación de las tres cinasas evaluadas y de forma importante la fosforilación de JNK. Sería interesante determinar y realizar investigaciones encaminadas a dilucidar el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de JNK porque encontramos que los flavonoides promueven una disminución en la actividad basal. Lo que sugiere que entre otros efectos, los flavonoides podrían participar en regular el funcionamiento de las fosfatasas.

Los flavonoides se encuentran en estado libre o en forma de heteroglúcidos, solubles en disolventes orgánicos. La estructura básica consiste en un esqueleto carbonado C6-C3-C6, donde los componentes de C6 son anillos

aromáticos unidos por tres átomos de carbono que forman o no un tercer anillo pirano o pirona. Las clases de flavonoides se diferencian en la concentración de saturación y en los sustituyentes del anillo C. Se han identificado 4,000 compuestos diferentes. La capacidad que tienen estos compuestos en modular la actividad de muchas enzimas y consecuentemente interferir en los otros procesos celulares puede deberse a las características fisicoquímicas ya que contiene grupos hidroxilos aromáticos, que son relativamente reactivos, lo que permite el establecimiento de puentes de hidrógeno. La existencia de múltiples blancos intracelulares para los flavonoides puede ser explicado por el hecho de que los flavonoides compiten por el sitio de unión al ATP y de esta forma tiene capacidad de inhibir diversas cinasas⁴⁶.

En conclusión, diversos estudios señalan que el ácido lipoteicoico adquiere cada día un rol importante como factor de virulencia, es por este motivo consideramos importante por un lado caracterizar los efectos que tienen estas toxinas en los fibroblastos gingivales y demostrar que los flavonoides bloquean las acciones de estas moléculas en un punto inicial de la transducción de señales por lo que en un futuro cercano se podrían utilizar como un potencial agente terapéutico.

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos hasta el momento ponen claramente de manifiesto que los flavonoides estudiados, la genisteína, luteolina, quercetina y cempasúchil presentes tienen un efecto protector frente a las alteraciones de carácter inflamatorio en modelos de fibroblastos gingivales humanos sanos.

A las dosis estudiadas los flavonoides reducen el daño identificado por la fosforilación de las proteínas.

Así mismo produce una inhibición en el LTA del *Streptococcus sanguis* puesto de manifiesto por la menor fosforilación en el western blot.

Estos datos confirman los efectos beneficiosos de flavonoides como son luteolina, quercetina, genisteína y cempasúchil y su papel efectivo en los procesos inflamatorios.

La quercetina ha demostrado que mejora la capacidad de fijación de la histamina a varias proteínas (particularmente a las globulinas). Así mismo se ha descrito una acción estabilizante de membrana en los mastocitos, lo que inhibe su degranulación.

Los flavonoides tuvieron procesos biológicos en las células tratadas con inhibidores enzimáticos.

Los flavonoides tienen la capacidad para actuar como antioxidantes y neutralizar radicales libres, en virtud de sus propiedades reductoras de los grupos hidroxilos presentes en los sustituyentes de sus anillos aromáticos (Erick 1999, Pietta 2000, Aherme, 2000), pueden actuar como antiinflamatorios a través de sus efectos sobre factores de transcripción y actividades enzimáticas.

Algunos flavonoides ejercen un efecto antiinflamatorio a nivel de las mucosas lo que ha sido comprobado para la quercetina.

Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que los flavonoides como la quercetina, luteolina, genisteina y cempasúchil, inducen la inhibición del LTA, mediante diferentes mecanismos. . La respuesta producida por la quercetina, genisteina, luteolina y cempasúchil indicó que estos flavonoides ejercen su efecto directamente induciendo la fosforilación de las MAPs cinasas se determinó que su mecanismo de acción involucraba de manera importante la activación de la vía MAPs, lo cual sugiere que estos flavonoides interactúan con receptores y canales de fosforilación de las MAPs en los fibroblastos gingivales humanos dando resultando en la liberación de factores antiinflamatorios. Estos resultados demuestran que el tratamiento de fibroblastos gingivales humanos sanos es eficaz y una buena opción para la prevención de los procesos inflamatorios utilizando flavonoides como el cempasúchil, genisteina, quercetina y luteolina inhibiendo la producción de LTA.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Lindhe Jan. Periodontología clínica e implantología odontológica. Editorial Medica Panamericana.España.2000
- 2- Genco J. Robert. Periodoncia. Editorial Interamericana Mc-Graw-Hill. México.1993.
- 3- Carranza Fermín A. Newman Michael G. Periodontología Clínica. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.2000.
- 4-Liébana Ureña J. Microbiología Oral. Edit. Mc. Graw- Hill Interamericana. México 1997.
- 5-Slots Jorgen and Taubman A. Martin. Contemporary oral and Immunology.Mosby Year Book, USA .1992.
6. Attstrom RM, Graf de Beer M, Schroeder HE (1975) Clinical and Histologic Characteristics of Normal Gingiva in dogs. J Periodont Res 10:115.
7. Armitt KI; Identification OF. (1986) T Cell Subsets In Gingivitis In Children. Periodontology 1986; 7:3.
- 8- Cohen B (1959) Morphological Factors In The Pathogenesis Of Periodontal Disease. Br Dent. J. 107:31.
9. Ainamo J, Loe H. (1996) Anatomical Characteristics of Gingiva. A Clinical And Microscopic Study Of The Free And Attached Gingiva. J Periodontol 11:182
10. Avery JK, Rapp R. (1959) Pain Conductin In Human Dental Tissues.Dent Clin North Am July: 489.
11. Carranza Fa Jr, Cabrini RI; Mast Cells In Human Gingiva. Oral Surg 1(955) 8:1093.
- 12.-Gutiérrez Venegas G, Kawasaki Cárdenas P. (2002) Los Lipopolisacáridos: Estructura, receptores y transducción de señales. Simposium de Transducción de Señales. Universidad Nacional Autónoma de México. Julio Pp31-38
13. Gutiérrez Venegas G. Kawasaki Cárdenas P., Maldonado Frías S. (2002) Efecto de los lipopolisacáridos sobre la vía de transducción de tirosin-cinasa en fibroblastos gingivales humanos. México D:F.: Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 21-24
- 14- Bronislaw L.Slomiany and Amalia Slomiany (2002) Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide interferes with salivary mucin synthesis through

inducible nitric oxide synthase activation by ERK and p38 Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 297:1149-1153

15 García-Sainz J.A. (1997) *Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular*. La ciencia para todos. México. CONACYT.

16- Alberts Bruce. Dennis Bray. (1996) *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.

17- Berridge J. Michael.(1990) *The Molecular Basis of Communication within the cell*. *Sci.Am*. 253:124-134.

18. Misako Hayama, Inoue R. (2001). ERK and p38 Map Kinase are involved in arachidonic acid released induced by H₂O₂ and PDGF in mesangial cells. *Am.J.Physiol. Renal Physiol*. 282:F4845-F491.

19. Taro Matsumoto, Koutaro Yokes (1999) Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J. Bio.Chem*. 274:13954-13960

20. Hidenori Ichijo, Eisuke Nishida (1997). Induction of Apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*.1997; 275:90-94

21. Lehninger. (1993) *Principles of biochememetry*. Worht publishers,

22. Yukihiro Aramaki, Ryozeu Matsuno. (2001) Involvement of p38 MAP kinase in inhibitory effects of phosphatidylserine liposomes on nitric oxide production from Macrophages stimulates with LPS. *Biochemical and Biophysical Research Commuications*.; 280: 982-987.

23. Jiang Y, Ulevitch RJ. (2002) The signal transduction of cell activation by LPS: the studies from CD14 to p38 MAPK. *Cell Res*; 12 (5-6):331-7

24. Stelmach JE, Liu L, Patel SB, Pivnichny JV, Scapin G, Singh S, Hop CE, Wang Z, (2002) Design and synthesis of potent, orally bioavailable dihydroquinazolinone inhibitors of p38 MAP kinase. *Shock*.; 18 (5):401-6

25..Harter L, Keel M, Steckholzer U, Ungethuem U, Trentz O, Ertel W. (2002) Activation of mitogen-activated protein kinases during granulocyte apoptosis in patients with severe sepsis. : *J Immunol* 169(9):5260-9

26. Kan WH, Yan WS, Jiang Y, Wang JZ, Qin QH, Zhao KS. (2002) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced expression

of inducible nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Glia* 40(2):175-183.

27. Koistinaho M, Koistinaho J. (2002) Role of p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinases in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 97(5):1149-1153.

28. Lowry O, Rosebrough N (1951). Protein measurement with folin-phenol reagents. *J. Biol Chem.* 193:265-275.

29. Keith Wilson, John Walker. (1994) *Practical Biochemistry*. Cambridge University Press. U.S.A.

30. Aherne SA y O'Brien NM (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18:75-81.

31. Zawaneh SM, Ayoub EM, Baer H, Cruz AC, Spellacy WN (1979) Factors influencing adherence of group B streptococci to human vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 26: 441-447.

32. Tamura GS, Rubens CE (1995) Group B streptococci adhere to a variant of fibronectin attached to a solid phase. *Mol. Microbiol.* 15: 581-589.33. Kei Sakamoto, Laurie J. Goodyear.: Intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2002; 93: 369-83.

34. Jorgen F. P. Wojtaszewski, Jakob N. Nielsen, Erik A. Richter (2002) Effect of acute exercise on insulin signaling and action in humans. *J. Appl. Physiol.* 93: 384-92.

35. Fadia Haddad, Gregory R. Adams (2002) Acute cellular and molecular responses to resistance exercise. *J. Appl. Physiol.* 93: 394-402.

36. Yoshimoto, T., Furukawa, M., Yamamoto, S., Horie, T. & Watanabe-Kohno, S. (1983) Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116:612-618

37. Rietschel, E. T., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Müller-Loennies, S., Mamat, U., Zähringer, U., Beckmann, F., Seydel, U., Brandenburg, K., Ulmer, A. J., Mattern, T., Heine, H., Schletter, J., Hauschildt, S., Loppnow, H., Flad, H.-D., Schade, U. F., DiPadova, F., and Schumann, R. R. (1996) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 216, 39-81

38. Hernández, Francisco, *Historia Natural de Nueva España*, t.II, vol.I México, UNAM, 1959.

39. Martínez, Maximino (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas, México, Fondo de Cultura Económica,
40. Boune L, Paganga G, Baxter D, Hughes P, Rice–Evans C (2000) Absorption of ferulic acid from low alcohol beer. *Free Radical Research* 32, 273-280.
41. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P y Fisher W. (1991) Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids, *Infect Immun* 59:4614-4620, 1991.
42. John C. Marshall. (2001). Inflammation, Coagulopathy, and the Pathogenesis of Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Crit. Care Med.* 29: 99-106)
43. Armstrong JJ, Baddiley J, Buchanan JG, Davison AL, Keleman MV, Neuhaus FC. (1959). Composition of teichoic acids from a number of bacterial walls. *Nature.* 25:247-248.
44. Armstrong JJ, Baddiley J, Buchanan JG, Carss B. (1958). Nucleotides and the bacterial cell wall. *Nature.* 21:1692-1693
1. .)
45. Gutiérrez-Venegas, G., Kawasaki-Cárdenas P., Cruz-Arroyo SR, Pérez-Garzón M., Maldonado-Frías S. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates the phosphorylation of p44 and p42 MAP kinases through CD14 and TLR-4 receptor activation in human gingival fibroblasts..*Life Sci.* Apr 25; 78(22):2577-83. Epub 2005 Nov 28
46. Middleton , E.J., Kandaswami, C. Theoharides T.C. (2001) The effects of plant flavonoids on Mammalian Cells, implications for inflammation. *Heart Disease and Cancer. Pharmacol. Rev.* 52, 673-751.